

**MEMOIRE  
DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE  
BIOLOGIE MEDICALE**

Soutenu devant le Jury interrégional  
le 16 septembre 2008

par **Mlle PIEL Elodie**

Conformément aux dispositions de l'arrêté  
du 23 janvier 2003 tient lieu de :

**THESE  
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN  
PHARMACIE**

Développement et évaluation d'une technique de RT-PCR  
en temps réel pour la recherche du métapneumovirus humain  
dans des aspirations nasopharyngées

Présidente : Mme Berthe-Marie IMBERT, Professeur de Virologie - Pharmacie

Membres du Jury : Mme Marianne COSTE-BUREL, Praticien Hospitalier - Virologie  
M. Patrick LUSTENBERGER, Professeur de Biochimie - Médecine  
M. Georges PICHEROT, Praticien Hospitalier - Pédiatrie  
Mme Anne MOREAU-KLEIN, Praticien Attaché - Virologie

---

## TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations.....	8
Liste des figures .....	9
Liste des tableaux & annexes .....	10
<b>Introduction .....</b>	<b>12</b>
<b><u>GENERALITES</u> .....</b>	<b><u>13</u></b>
<b>I. Historique .....</b>	<b>14</b>
<b>II. Classification .....</b>	<b>14</b>
<b>III. Structure de la particule virale .....</b>	<b>15</b>
A. Morphologie .....	15
B. Organisation génomique .....	16
C. Génotypes .....	18
D. Sérotypes.....	20
E. Les protéines codées par le génome viral .....	21
1. Les protéines de surface.....	21
a) La protéine de fusion F .....	22
b) La glycoprotéine d'attachement G.....	24
c) La petite protéine hydrophobe SH .....	25
2. La protéine de matrice M.....	26
3. Les protéines impliquées dans la réplication virale.....	26
a) La nucléoprotéine N.....	26
b) La phosphoprotéine P .....	26
c) La polymérase L .....	27
d) Le facteur d'élongation de la transcription M2-1 et le facteur de régulation de la synthèse d'ARN M2-2 .....	27
F. Cycle de réplication .....	28
<b>IV. Epidémiologie .....</b>	<b>30</b>
A. Répartition géographique .....	30
B. Place du hMPV parmi les autres virus respiratoires .....	31
C. Répartition saisonnière.....	32
D. Epidémiologie moléculaire .....	33
E. Séroprévalence.....	34
<b>V. Pathologie.....</b>	<b>35</b>
A. Manifestations cliniques .....	35
1. L'infection chez les jeunes enfants .....	35

2. L'infection chez l'adulte .....	37
3. L'infection chez l'hôte immunodéprimé .....	37
4. Les co-infections .....	38
a) Infections virales mixtes .....	38
b) Surinfections bactériennes .....	39
5. Les autres manifestations .....	39
B. Physiopathologie de l'infection .....	40
<b>VI. Attitude thérapeutique et prévention .....</b>	<b>42</b>
A. Prise en charge .....	42
1. Traitement symptomatique et surveillance .....	42
2. Traitements médicamenteux .....	43
B. Prophylaxie .....	44
1. Candidats vaccinaux .....	44
2. Immunisation passive .....	45
3. Mesures générales de prévention .....	46
<b>VII. Outils du diagnostic virologique .....</b>	<b>47</b>
A. Opportunité du diagnostic étiologique .....	47
B. Modalités de prélèvements .....	48
C. Méthodes de diagnostic.....	49
1. La culture cellulaire .....	49
2. La détection directe des antigènes viraux .....	51
a) L'immunofluorescence directe .....	51
b) Les techniques immunoenzymatiques .....	52
3. La détection du génome viral par biologie moléculaire .....	53
<b>VIII. La RT-PCR en temps réel .....</b>	<b>54</b>
A. L'amplification génique par PCR .....	54
1. Principe .....	54
2. L'amplification à partir d'ARN : RT-PCR .....	54
3. Construction des amorces .....	56
4. La température de fusion T <sub>m</sub> .....	57
B. Analyse des produits d'amplification .....	58
1. Les techniques conventionnelles .....	58
2. La PCR en temps réel .....	58
a) Règles d'interprétation .....	59
b) Les systèmes de détection .....	60
(1) SYBR™ Green I .....	60
(2) Détection à l'aide de sondes .....	62

3. Le séquençage des amplicons .....	66
<b>MATERIELS &amp; METHODES</b> .....	<b>68</b>
<b>I. Matériels</b> .....	<b>69</b>
A. Patients .....	69
1. Caractéristiques générales de la population étudiée .....	69
2. Nature des prélèvements .....	70
B. Témoin positif hMPV .....	71
C. Panels QCMD .....	71
<b>II. Méthodes</b> .....	<b>72</b>
A. Choix de la cible .....	72
B. Extraction de l'ARN total .....	73
C. Transcription inverse et amplification : RT-PCR .....	74
1. Appareillage .....	74
2. Oligonucléotides .....	74
3. Mélange réactionnel .....	75
a) Master Mix .....	75
b) Mg <sup>2+</sup> .....	76
c) Contrôle interne d'amplification - IPC .....	76
d) Protéine T4Gene 32 .....	76
4. Profil des cycles de température .....	76
D. Révélation des produits d'amplification .....	77
E. Séquençage des produits d'amplification .....	77
<b>RESULTATS</b> .....	<b>78</b>
<b>I. Mise au point de la RT-PCR en temps réel</b> .....	<b>79</b>
A. RT-PCR en temps réel initiale .....	79
1. Rappel des conditions opératoires .....	79
a) Séquences des oligonucléotides .....	79
b) Composition du mélange réactionnel .....	79
c) Profil des cycles de température .....	80
2. Analyse des résultats .....	80
a) Validation des étapes précédant la détection en temps réel .....	81
b) Analyse de l'étape de détection .....	83
B. Optimisation de la RT-PCR en temps réel .....	83
1. Les amorces .....	84
2. Les conditions réactionnelles .....	85
a) Technologie SYBR™ Green I .....	85
(1) Adaptation des conditions opératoires .....	85

(2) Essai à partir du témoin positif .....	86
(3) Essai à partir des échantillons A et B du QCMD .....	87
b) L'étape de transcription inverse .....	88
c) La température d'hybridation .....	89
d) La concentration en Mg <sup>2+</sup> .....	90
e) La durée des cycles d'amplification .....	91
3. Optimisation de la détection .....	92
a) Construction de nouvelles sondes .....	92
(1) Choix de sondes génotype-spécifiques .....	92
(2) Orientation des sondes .....	92
(3) Modification de la longueur des séquences et du système de marquage fluorescent .....	93
b) Fixation d'un seuil d'interprétation .....	94
4. Influence de la co-amplification de l'IPC .....	95
C. Conditions définitives de la RT-PCR en temps réel .....	96
<b>II. Evaluation des performances analytiques .....</b>	<b>97</b>
A. Evaluation de la spécificité de l'amplification .....	97
B. Evaluation de la sensibilité de la détection .....	97
<b>III. Analyse des échantillons cliniques .....</b>	<b>98</b>
A. Finalisation de la validation technique .....	98
1. Validation de la spécificité de l'amplification .....	98
2. Analyse des séquences nucléotidiques .....	99
3. Validation de la spécificité des sondes .....	99
4. Estimation des faux négatifs .....	100
B. Etude épidémiologique .....	103
1. Place du hMPV parmi les autres virus respiratoires .....	103
2. Répartition de l'infection à hMPV sur la période d'étude .....	103
C. Approche clinique .....	105
<b><u>DISCUSSION</u></b> .....	<b>110</b>
<b>Conclusion</b> .....	<b>117</b>
Annexes .....	118
<b><u>BIBLIOGRAPHIE</u></b> .....	<b>122</b>

---

## LISTE DES ABREVIATIONS

Ac (m) : anticorps (monoclonal)  
ADN (c) : acide désoxyribonucléique (complémentaire)  
ADV : adénovirus  
Ag : antigène  
AN : aspiration nasopharyngée  
APV : métapneumovirus aviaire  
ARN (m) : acide ribonucléique (messenger)  
ATCD : antécédents  
b : base(s)  
BET : bromure d'éthidium  
BPCO : bronchopneumopathie chronique obstructive  
CRP : protéine C réactive  
Ct : *cycle threshold*  
dl : décilitre  
dNTPs : désoxyribonucléotides  
ddNTPs : didésoxyribonucléotides  
ECP : effet cytopathogène  
GAGs : glycosaminoglycanes  
GITC : isothiocyanate de guanidium  
Hb : hémoglobine  
HIV : *human immunodeficiency virus*  
hMPV : métapneumovirus humain  
IF (D) : immunofluorescence (directe)  
IPC : *internal positive control* / témoin interne d'amplification  
kDa : kiloDaltons  
min : minute  
mM : millimolaire  
nm : nanomètre  
nt (s) : nucléotide (s)  
OMA : otite moyenne aiguë  
pb : paires de bases  
PBS : *phosphate buffer saline* / tampon phosphate  
PCR : *polymerase chain reaction*  
PIV : virus parainfluenza  
PM : poids moléculaire  
QCMD : *Quality Control for Molecular Diagnostics*  
qsp : quantité suffisante pour  
RNases : ribonucléases  
RT-PCR : *reverse transcription – polymerase chain reaction*  
SaO<sub>2</sub> : saturation en oxygène  
SARS-CoV : coronavirus du SARS (Severe Acute Respiratory Syndrome)  
sec : secondes  
T<sub>m</sub> : Température de fusion (*melting temperature*)  
µl : microlitre  
µM : micromolaire

## LISTE DES FIGURES

1. Photographies en microscopie électronique de particules virales de hMPV	15
2. Organisation génomique des membres de la sous-famille des <i>Pneumovirinae</i>	16
3. Structure du hMPV	21
4. Schéma illustrant la protéine de fusion F du hMPV	23
5. Etapes du cycle viral du hMPV	28
6. Prévalence de l'infection à hMPV chez les enfants hospitalisés en Basse-Normandie entre novembre 2002 et mars 2003	31
7. Epidémies à hMPV et VRS chez les enfants hospitalisés en Basse-Normandie au cours de l'hiver 2002-2003	32
8. Analyse phylogénétique d'isolats de hMPV	33
9. Séroépidémiologie du hMPV	34
10. Marquage immunohistochimique de sections de muqueuses nasales, trachéales et d'alvéoles pulmonaires de macaques infectés par le hMPV	40
11. Effet cytopathogène d'une souche de hMPV (sous-groupe B) sur cellules LLC-MK2	50
12. Cellules épithéliales nasopharyngées marquées en immunofluorescence directe par un anticorps monoclonal anti-hMPV	52
13. Amplification d'une séquence d'ADN par PCR	55
14. Amorçages illégitimes	56
15. Marqueur de poids moléculaire V (Roche®)	58
16. Suivi en temps réel d'une réaction de PCR	59
17. Agents se liant à l'ADN double brin (SYBR™ Green I)	60
18. Aspect d'une courbe de fusion réalisée par PCR en temps réel avec le SYBR™ Green I	61
19. Hydrolyse de sondes TaqMan™	63
20. PCR en temps réel utilisant une sonde TaqMan™-MGB®	65
21. Electrophorégramme obtenu avec un automate de séquence	66
22. Répartition par âges des patients sélectionnés	70
23. Protocole d'extraction de l'ARN par centrifugations	74
24. Courbes de fluorescence obtenues pour le témoin interne d'amplification	81
25. Electrophorèse des produits d'amplification générés au cours du premier essai	82
26. Choix d'amorces consensus	84
27. Profil de la RT-PCR en temps réel avec détection par SYBR™ Green I	86
28. Courbe de fusion obtenue après amplification de l'extrait du témoin positif	86
29. Electrophorèse des produits générés par RT-PCR de deux échantillons (hMPV A et hMPV B) du panel QCMD	87
30. Courbe de fluorescence et courbe de fusion obtenues pour deux échantillons (hMPV A et hMPV B) du panel QCMD	87
31. Comparaison des signaux obtenus après RT-PCR réalisée à différentes températures de transcription inverse	88
32. Influence de la présence de T4Gene dans le milieu réactionnel	89
33. Révélation de l'amplification du témoin positif après RT-PCR effectuée à différentes températures d'hybridation	89
34. Impact de la concentration en Mg <sup>2+</sup> sur la qualité du signal	90
35. Variation de la durée des cycles d'amplification	91

36. Choix d'une sonde B consensus	92
37. Diminution de la longueur des sondes A et B	93
38. Signaux de fluorescence acquis sur les canaux Green (génotypes A) et Red (génotypes B) pour les échantillons hMPV positifs du panel QCMD	94
39. Résultat de la co-amplification de l'IPC et des échantillons hMPV A du panel QCMD	95
40. Profil des cycles de la RT-PCR	96
41. Analyse phylogénétique des séquences nucléotidiques des isolats obtenus	102
42. Représentation de l'ensemble des viroses respiratoires identifiées au cours de l'hiver 2006-2007 chez les enfants de moins de 3 ans hospitalisés à Nantes	103
43. Répartition du nombre de prélèvements positifs en fonction de la date de demande	104
44. Distribution des génotypes en fonction de leur date d'isolement	104
45. Répartition par âges des patients hMPV positifs	105

## LISTE DES TABLEAUX

1. Pathogènes humains de la famille des <i>Paramyxoviridae</i>	14
2. Pourcentages d'identité en acides aminés des protéines N, P, M et F entre les deux sous-groupes de hMPV et les autres Pneumovirus	18
3. Pourcentages d'identité en acides aminés et en nucléotides des protéines et gènes N, P, M, F, M2-1, M2-2, SH, G et L entre les deux sous-groupes de hMPV et entre les deux sous-groupes de VRS	19
4. Incidence de l'infection à hMPV dans quelques études	30
5. Composition du panel QCMD 2007 hMPV & VRS	71
6. Comparaison des séquences de la sonde et de sa séquence cible au sein du génome du témoin positif, de génotype B1	83
7. Résultats obtenus pour les échantillons hMPV positifs du panel QCMD	94
8. Mix réactionnel : calcul des volumes pour un tube	96
9. Variations nucléotidiques au sein des séquences obtenues à partir des isolats cliniques	101
10. Critères généraux et motifs d'hospitalisation des enfants infectés	106
11. Etude clinique, biologique et radiologique des enfants infectés	107
12. Données démographiques de deux cohortes, caractérisées en fonction du génotype de la souche de hMPV	108

## LISTE DES ANNEXES

1. Mode opératoire – prise en charge des aspirations nasales au laboratoire de Virologie
2. Protocole d'extraction de l'ARN par centrifugations à l'aide du kit Nucleospin® RNA Virus Macherey-Nagel et de l'appareil QIAVAC
3. Electrophorèse des produits de PCR sur gel de polyacrylamide
4. Tableau récapitulatif des données cliniques des 27 patients hMPV positifs

---

**Développement & évaluation  
d'une technique de RT-PCR en temps réel pour  
la recherche du métapneumovirus humain  
(hMPV)  
dans des aspirations nasopharyngées.**

Les infections aiguës des voies respiratoires sont une cause majeure de morbidité et de mortalité à travers le monde. Dans la population pédiatrique, elles représentent la deuxième cause de mortalité, toutes zones géographiques confondues, après la malnutrition [1]. Du banal rhume à la pneumonie sévère, les aspects cliniques sont d'une grande diversité. Chaque hiver en France, on estime que 460 000 nourrissons (soit 30% de la population de moins de 2 ans) présentent une bronchiolite, ce qui constitue un véritable problème de santé publique. Bien que la majorité de ces enfants soit prise en charge en ville, le recours hospitalier concerne actuellement près de 20% des patients, entraînant l'encombrement du système de soins, et notamment des services d'accueil d'urgences.

Si le virus respiratoire syncytial humain (VRS) est reconnu comme l'agent viral majeur de bronchiolites et de pneumonies, 15 à 35 % des cas d'infections du tractus respiratoire inférieur demeurent sans étiologie déterminée [2, 3]. Cette proportion atteint 50% dans les infections respiratoires hautes [4]. Ces observations suggèrent qu'il existe encore des étiologies infectieuses inconnues responsables d'une proportion non négligeable de pathologies du tractus respiratoire. En effet, depuis quelques années, de nouveaux virus respiratoires ne cessent d'être découverts [5-9], dont le métapneumovirus humain (hMPV), récemment caractérisé.

L'objectif de notre travail a donc consisté en la mise au point au laboratoire de Virologie du CHU de Nantes d'une technique de RT-PCR en temps réel permettant le dépistage du hMPV à partir des aspirations nasopharyngées, et dans un second temps de déterminer l'épidémiologie locale de ce virus, à partir des échantillons prélevés chez les enfants de moins de 3 ans admis au CHU au cours de l'hiver 2006-2007, pour un épisode d'affection respiratoire dont l'étiologie est restée indéterminée.

---

# **Généralités**

## I. Historique

Le métapneumovirus humain (hMPV) a été isolé pour la première fois en 2001 en Hollande par l'équipe de Van den Hoogen *et al.*, à partir d'aspirations nasopharyngées prélevées chez de jeunes enfants atteints d'infection respiratoire aiguë [10]. Bien que de caractérisation récente, le virus lui ne l'est pas puisque cette même équipe rapporte sa circulation en Hollande depuis 1958. Des études sérologiques ont en effet permis de démontrer l'existence du hMPV depuis au moins 50 ans [10].

Son rôle dans la pathogenèse d'affections respiratoires a été rapidement établi par l'équipe de Kuiken *et al.*, qui démontre qu'une affection respiratoire peut être induite après infection expérimentale du singe macaque [11].

L'équipe du Dr Boivin a été la première en Amérique du Nord à identifier la présence de ce virus et à en décrire les manifestations cliniques et les caractéristiques virologiques [12]. Depuis sa découverte, de nombreux groupes de recherche à travers le monde ont rapporté sa présence.

## II. Classification

Le hMPV appartient à l'ordre des *Mononegavirales* (virus à ARN négatif non segmenté), à la famille des *Paramyxoviridae* et à la sous-famille des *Pneumovirinae*.

Il a été classé dans le genre *Metapneumovirus* (tableau 1) sur la base de similitudes structurales, biologiques et génétiques avec les métapneumovirus aviaires, responsables de la rhinotrachéite de la dinde et d'infections respiratoires aiguës chez d'autres oiseaux [13, 14].

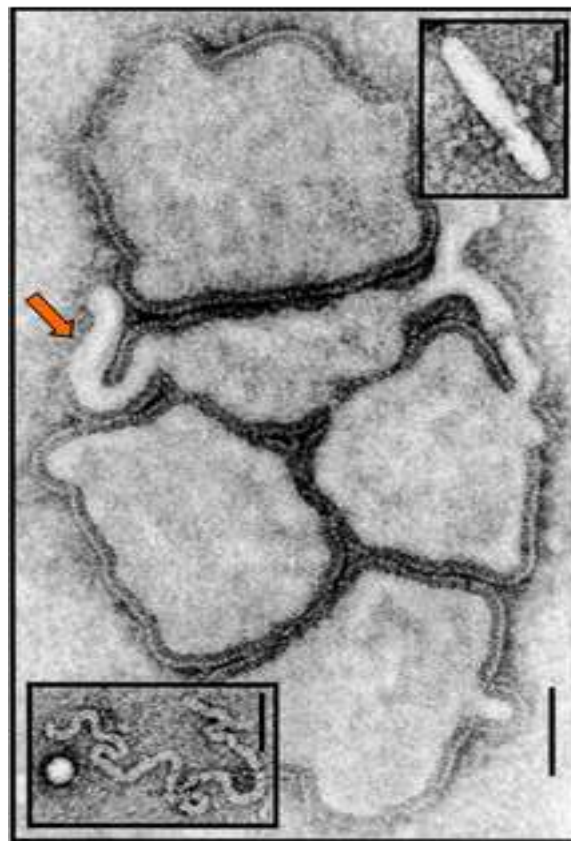
Sous-famille	Genre	Virus
<i>Paramyxovirinae</i>	<i>Paramyxovirus</i>	PIV-1 et PIV-3
	<i>Rubulavirus</i>	PIV-2 et PIV-4 Virus des oreillons
	<i>Morbillivirus</i>	Virus de la rougeole
	<i>Henipavirus</i>	Virus Hendra et Nipah
	<i>Genre aviaire</i>	Virus de la maladie de Newcastle
<i>Pneumovirinae</i>	<i>Pneumovirus</i>	VRS A et B
	<i>Metapneumovirus</i>	hMPV

**Tableau 1. Pathogènes humains de la famille des *Paramyxoviridae*.** VRS (virus respiratoire syncytial humain), hMPV (métapneumovirus humain), PIV-1, 2, 3 et 4 (virus parainfluenza humains 1, 2, 3 et 4), les virus Hendra et Nipah sont des virus animaux pathogènes pour l'homme.

### III. Structure de la particule virale

#### A. Morphologie

L'analyse d'isolats de hMPV en microscopie électronique montre des particules d'aspect pléiomorphe, grossièrement sphériques, d'environ 100 nm de diamètre (figure 1), qui peuvent aussi se présenter sous des formes plus volumineuses ou encore filamenteuses [10, 15]. L'enveloppe lipidique est hérissée de courtes projections (« spicules », de 13-17 nm) et contient une nucléocapside (rarement observée) dont la longueur est comprise entre 200 et 1000 nm avec un diamètre de 17 nm.



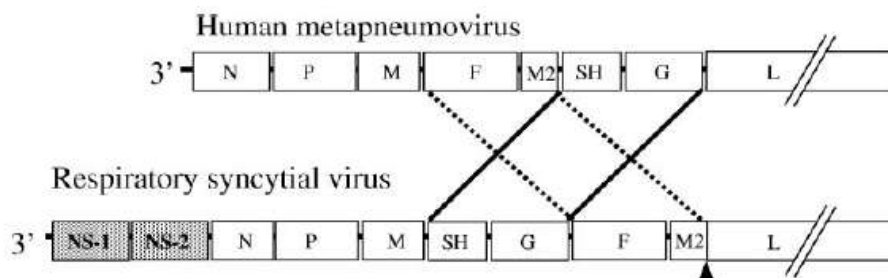
**Figure 1. Photographies en microscopie électronique de particules virales de hMPV** (d'après [15]). L'image centrale montre cinq particules virales pléiomorphes avec quelques projections (flèche) en périphérie des virus. L'image inférieure gauche présente une nucléocapside hélicoïdale, alors que l'image supérieure droite est une particule filamenteuse ressemblant à un bâtonnet. La barre marqueur représente 100 nm.

## B. Organisation génomique

Le génome du hMPV est un monobrin d'ARN négatif non segmenté d'une longueur d'environ 13 300 bases (b).

Il est composé de huit cadres de lecture ouverts codant potentiellement pour neuf protéines différentes :

- la nucléoprotéine N,
- la phosphoprotéine P,
- la protéine de matrice M,
- la protéine de fusion F,
- le facteur d'élongation de la transcription M2-1,
- le facteur de régulation de la synthèse d'ARN M2-2,
- la petite protéine hydrophobe de surface SH,
- la glycoprotéine d'attachement G,
- la sous-unité majeure de la polymérase L.



**Figure 2** (d'après [16]). **Organisation génomique des membres de la sous-famille des *Pneumovirinae*.** Les génomes du hMPV (numéro d'accèsion GenBank AF371337) et du VRS (numéro d'accèsion GenBank NC\_001781) sont représentés dans l'orientation 3' - 5'. Les gènes M2 des deux virus comportent deux cadres de lecture ouverts, M2-1 et M2-2 (non représentés). Les gènes M2 et L sont chevauchants chez le VRS (triangle). Le gène L de chaque virus, codant l'ARN polymérase ARN-dépendante, représente les deux tiers du génome viral et est raccourci pour plus de clarté. La représentation des génomes n'est pas à l'échelle.

Les principales différences entre les deux genres de la sous-famille des *Pneumovirinae* (*Pneumovirus* et *Metapneumovirus*) résident dans la longueur totale du génome ainsi que dans son organisation et la présence de gènes particuliers :

- Les génomes des *Pneumovirus* (VRS) ont une longueur d'environ 15 200 b, alors que ceux des *Metapneumovirus* (hMPV et métapneumovirus aviaires) sont plus courts, d'environ 13 300 b. De plus, la longueur du génome du hMPV varie selon les souches. Le génome de la souche CAN 97-83 (virus prototype du sous-groupe A, numéro d'accèsion sur GenBank : AY297749) est composé de 13 335 b, celui de la souche CAN 98-75 (virus prototype du sous-groupe B, numéro d'accèsion sur GenBank : AY297748) de 13280 b, et celui de la première souche décrite (NETH001, numéro d'accèsion sur GenBank : AF371337) comprend 13 378 b. Cette variation est principalement observée au niveau des protéines G et SH et dans les régions intergéniques.
- L'ordre des gènes est différent [17, 18] (figure 2) : chez les *Metapneumovirus*, les gènes F et M2 sont situés en position 3' des gènes SH et G ; c'est l'inverse chez le VRS.
- Le génome du VRS code pour deux protéines non structurales NS1 et NS2 (grisées sur la figure 2), qui sont absentes du génome du hMPV. Ces protéines ont une activité antagoniste de la synthèse ou de l'action des interférons [19]. L'incidence de leur absence sur la pathogenèse du hMPV reste pour le moment inconnue.

Les études phylogénétiques ont montré que le hMPV est étroitement apparenté au sérotype C du métapneumovirus aviaire (APV) [20-22]. L'identité des séquences en acides aminés des protéines N et F entre les souches des deux génotypes de hMPV et le APV-C varie respectivement de 88 à 89% et de 81 à 82% [23] (tableau 2). Malgré cette parenté, le hMPV ne peut pas infecter les dindes, de même que le métapneumovirus aviaire ne peut infecter les humains [10].

	N	P	M	F
	A ; B	A ; B	A ; B	A ; B
APV-A	70 ; 69	55 ; 55	76 ; 78	67 ; 68
APV-B	71 ; 71	51 ; 50	77 ; 76	67 ; 68
APV-C	<b>89 ; 88</b>	68 ; 66	<b>88 ; 88</b>	<b>81 ; 82</b>
hRSV-A	43 ; 43	26 ; 28	38 ; 38	32 ; 32
hRSV-B	43 ; 42	26 ; 27	37 ; 37	33 ; 30
bRSV	44 ; 43	28 ; 28	37 ; 38	34 ; 34
PVM	45 ; 45	23 ; 25	40 ; 38	38 ; 43

**Tableau 2** (d'après [23]). **Pourcentages d'identité en acides aminés des protéines N, P, M et F entre les deux sous-groupes de hMPV et les autres Pneumovirus.** APV (métapneumovirus aviaires), hRSV (virus respiratoire syncytial humain), bRSV (virus respiratoire syncytial bovin), PVM (pneumovirus de la souris)

### C. Génotypes

L'analyse phylogénétique des souches de hMPV a permis d'identifier deux sous-groupes majeurs A et B [10, 23] (assimilés aux génotypes A et B), et deux sous-groupes mineurs à l'intérieur de chacun d'eux [12, 15, 24, 25] : A1 et A2 ainsi que B1 et B2 [24-27]. La détermination des sous-groupes est concordante quelque soit le gène étudié, ces analyses peuvent donc être basées indifféremment sur le séquençage des gènes N, M, F, P ou L.

Récemment, deux équipes de recherche ont même suggéré des subdivisions additionnelles : Bastien *et al.* proposent de séparer le groupe A1 en A1a et A1b [28], tandis que Huck *et al.* scindent le sous-groupe A2 en A2a et A2b [29].

La classification des différentes souches du hMPV est ainsi susceptible d'évoluer encore au cours des prochaines années, au fur et à mesure que seront isolées de nouvelles souches et effectuées des analyses génétiques et phylogéniques.

La souche de référence du hMPV est la souche hollandaise : NET0001 ; elle appartient au sous-groupe A. Les virus prototypes des deux sous-groupes de hMPV sont les souches canadiennes CAN97-83 (sous-groupe A) et CAN98-75 (sous-groupe B).

L'alignement complet des séquences génomiques indique que les deux sous-groupes sont identiques à 80% en nucléotides et à 90% en acides aminés (tableau 3) [18].

Virus (groupes)	Souches	Identité de séquences en acides aminés (et en nucléotides) pour les différentes protéines mentionnées								
		N	P	M	F	M2-1	M2-2	SH	G	L
hMPV A / hMPV B	CAN 97-83 / CAN 98-75	96(84)	85(81)	97(85)	95(84)	96(85)	89(87)	<b>59(69)</b>	<b>37(59)</b>	94(84)
hMPV A / hMPV A	CAN 97-83 / NETH001	99(94)	95(92)	99(94)	98(94)	98(94)	96(95)	85(88)	70(77)	99(95)
VRS A / VRS B	Souche A2 / B1	95(85)	90(85)	91(85)	89(81)	61(69)	61(69)	72(77)	55(67)	92(85)

**Tableau 3 (d'après [18]). Pourcentages d'identité en acides aminés et en nucléotides des protéines et gènes N, P, M, F, M2-1, M2-2, SH, G et L entre les deux sous-groupes de hMPV et entre les deux sous-groupes de VRS.**

La variabilité entre les séquences en acides aminés se retrouve principalement dans les protéines SH et G puisqu'elles ne partagent que 59 et 37% d'homologies, respectivement [14, 17, 18, 22, 24, 26, 27] ; alors que les protéines N, P, M et F sont beaucoup plus conservées, avec 85 à 97% d'homologies [18, 23].

Cette variabilité peut également être déterminée par l'analyse des pourcentages d'identité en séquences nucléotidiques, puisqu'entre les deux sous-groupes de hMPV, tous les gènes ont de 81 à 87% d'identité, sauf SH et G qui sont notablement plus divergents, avec respectivement 69% et 59% d'identité (tableau 3) [18].

## D. Sérotypes

Diverses études utilisant des modèles animaux ont été effectuées sur le hMPV afin de déterminer si les deux génotypes du hMPV correspondaient à deux sérotypes distincts.

A ce jour, le sujet reste controversé.

Les études abondent dans le sens d'un sérotype unique :

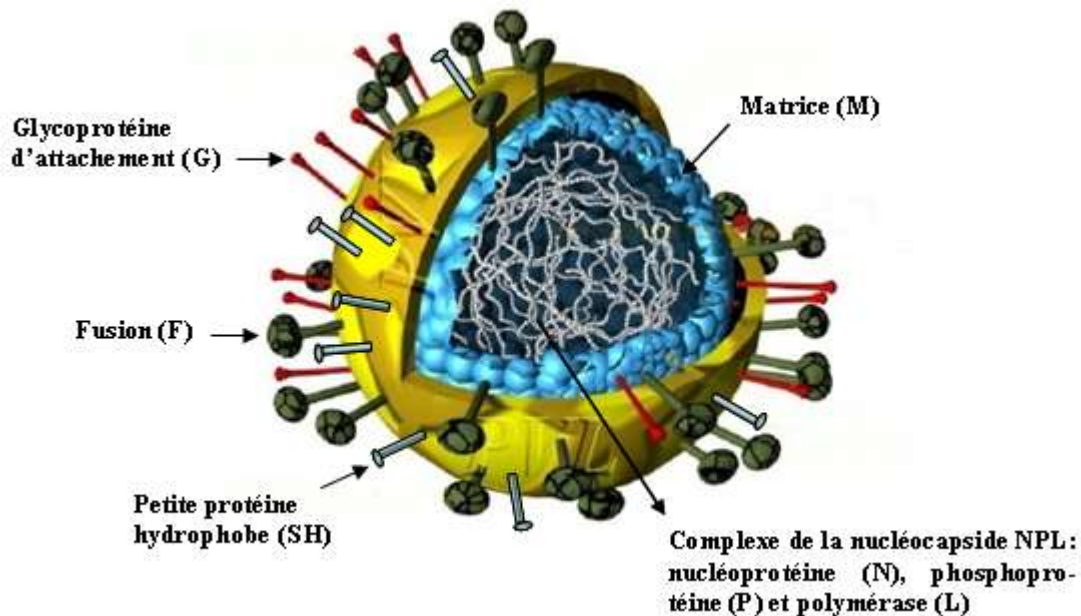
- L'équipe de Skiadopoulos *et al.*, par inoculation au hamster et au singe rhésus des souches CAN 97-83 (virus prototype du sous-groupe A) et CAN98-75 (virus prototype du sous-groupe B), a démontré que les neutralisations générées étaient très élevées et suffisantes pour protéger de l'infection par un virus de génotype hétérologue. Les deux sous-groupes génétiques du hMPV ne constitueraient donc pas formellement des sous-groupes antigéniques [30].
- Le travail effectué par l'équipe de Tang *et al.* chez des hamsters vaccinés par un virus PIV-3 recombinant exprimant la protéine F du hMPV, a permis d'établir que ces derniers développaient une très forte réponse en anticorps neutralisants et étaient protégés contre l'infection virale quelque soit la souche inoculée [31].

Ces données suggèrent donc que l'immunité induite par l'infection est croisée, et que la protéine F constitue l'antigène immunogène majeur impliqué dans la protection contre l'infection par le hMPV [32, 33]. Par conséquent, les deux génotypes ne semblent pas représenter des sérotypes distincts.

D'autres études semblent cependant être en faveur de deux sérotypes : l'équipe de Van den Hoogen *et al.*, utilisant le modèle du furet, a démontré que le sérum obtenu à partir d'un animal infecté par un virus représentant d'un génotype ne pouvait pas neutraliser *in vitro* un virus d'un génotype hétérologue, suggérant ainsi que les deux génotypes du hMPV correspondent bien à deux sérotypes distincts [24].

Des études supplémentaires seront donc nécessaires, afin de déterminer l'antigénicité du hMPV chez son hôte naturel, l'homme ; leurs conclusions auront certainement un impact significatif sur le développement de candidats vaccinaux.

## E. Les protéines codées par le génome viral



### Figure 3. Structure du hMPV.

La particule virale du hMPV est composée de trois protéines de surface (F, G et SH), de la matrice (M) et du complexe de la nucléocapside (NPL). Les facteurs d'élongation de la transcription M2-1 et de régulation de la synthèse d'ARN M2-2 ne sont pas illustrés.

Les caractéristiques structurales et fonctionnelles des différentes protéines du hMPV n'ont certes pas été étudiées de façon exhaustive, mais il est possible, en se basant sur les travaux effectués chez les autres Pneumovirus, de déduire certaines propriétés utiles à la compréhension du schéma de répllication du virus et des conséquences sur la pathogenèse.

### 1. Les protéines de surface

Les particules virales du hMPV comportent une enveloppe, qui comprend trois protéines transmembranaires : la protéine de fusion F, la glycoprotéine d'attachement G et la petite protéine hydrophobe SH.

### a) La protéine de fusion F

Le gène F du hMPV, d'une longueur de 1620 bases, code pour une protéine transmembranaire de 539 acides aminés, pour un poids moléculaire de 58,4 kDa.

Chez les *Paramyxoviridae*, la protéine F est responsable de la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de la cellule hôte, étape indispensable à la pénétration du virus à l'intérieur de cette dernière pour s'y répliquer [34].

Bien qu'elle soit située à la surface des particules virales, et qu'elle soit donc soumise à la pression immunologique, la protéine F est l'une des protéines les mieux conservées du virus, avec 84% et 95% d'identité en séquences nucléotidiques et en acides aminés respectivement entre les deux sous-groupes (tableau 3). Afin de conserver sa pleine fonctionnalité, elle ne peut subir d'importantes mutations [18, 23, 25, 35]. Néanmoins, bien que la structure génétique de la protéine F soit considérée comme très stable, on observe au fil du temps un glissement des génotypes dominants au cours des épidémies, suggérant tout de même une certaine évolution structurale [36].

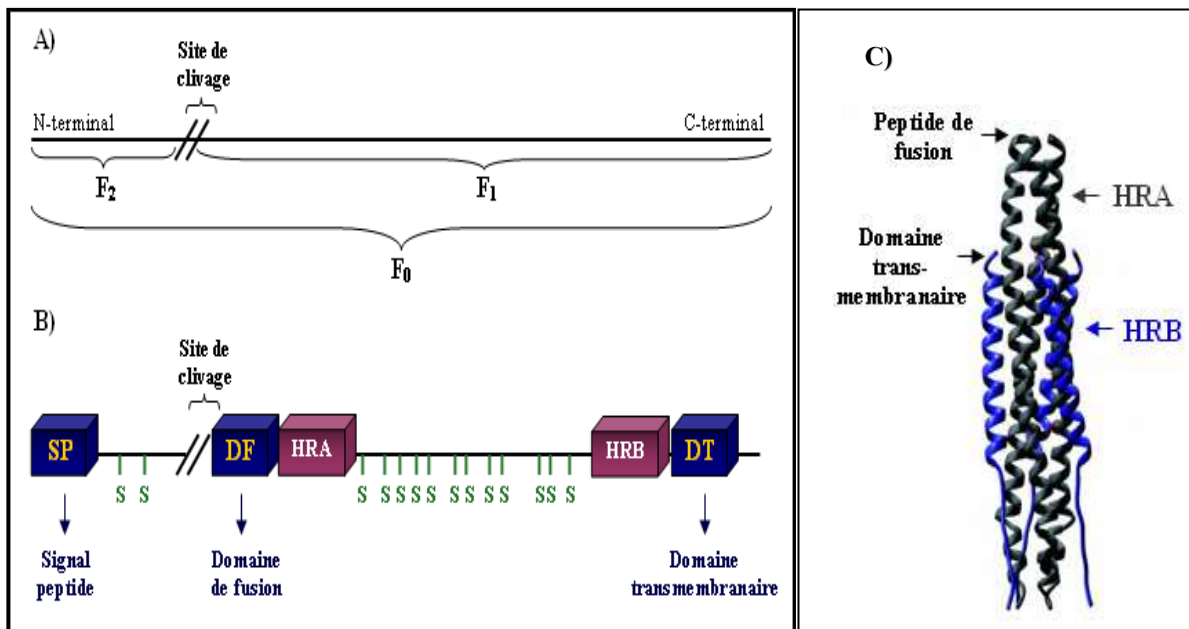
La protéine F est synthétisée sous la forme d'un précurseur F0 qui est clivé par des protéases cellulaires en deux sous-unités F1 (fragment C-terminal) et F2 (fragment N-terminal), liées par des ponts disulfures (figure 4 [34]).

Chez le VRS, le site de clivage est généralement composé des acides aminés R-X-R/K-R (R correspondant à l'arginine, K à la lysine), motif reconnu par une protéase cellulaire [34], la furine. Ce motif est différent chez le hMPV : il est composé des résidus R-Q-S-R [17, 25] (arginine (R) - glutamine (Q) - sérine (S) - arginine (R)), et nécessite l'intervention d'une protéase extracellulaire de type trypsine ; ceci explique que la majorité des isolats de hMPV dépendent de l'ajout de trypsine pour leur croissance en culture cellulaire [10, 30, 37]. Certaines souches de hMPV présentent une substitution de la sérine (S) par une proline (P) (site de clivage : R-Q-P-R), qui les rend indépendantes de la trypsine [38, 39].

Deux motifs particuliers sur le fragment F1 sont également nécessaires à la fusion virale des *Paramyxoviridae* [40-43] : les « *heptad repeats A* » (HRA) et « *heptad repeats B* » (HRB) (figure 4). Ces motifs sont composés d'une répétition de sept acides aminés chargés (a-b-c-d-e-f-g), à l'exception de deux acides aminés hydrophobes (en positions a et d) [17]. Ces régions ont la capacité d'interagir entre elles afin de former une hélice (appelée « *coiled coil* ») à l'intérieur d'une même protéine, ou entre plusieurs protéines (figure 4 C)) [44].

Il a été démontré que la protéine de fusion des Paramyxovirus est une protéine de classe I formant des trimères, tout comme celle des Rétrovirus, des Coronavirus, ou de l'hémagglutinine (HA) des virus influenza [45-48].

Il est ainsi suggéré que la protéine F0 est d'abord assemblée en trimères (par interaction entre trois HRA et trois HRB) avant d'être clivée, les hétérodimères F2-F1 restant ancrés dans la membrane virale par le domaine transmembranaire situé au niveau de l'extrémité C-terminale du fragment F1. Le peptide hydrophobe adjacent au site de clivage, qui constitue l'extrémité N-terminale du fragment F1, devient alors accessible : il agit comme un domaine d'ancrage transmembranaire, et serait ainsi directement impliqué dans l'insertion de la protéine F dans la membrane de la cellule cible.



**Figure 4** (adaptée de [49]). **Schéma illustrant la protéine de fusion F du hMPV.**

- A) Représentation des fragments F2 et F1 créés suite au clivage du fragment F0.
- B) Illustration des motifs particuliers de la protéine F du hMPV et des autres Paramyxovirus. Les 'S' représentent les cystéines susceptibles de former des ponts disulfures. Le domaine transmembranaire 'DT' ancre la protéine dans l'enveloppe virale.
- C) Représentation des trimères HRA et HRB formant des « *coiled coil* ».

Enfin, rappelons que la protéine F a été identifiée comme étant l'antigène immunogène majeur impliqué dans la protection contre l'infection par le hMPV [32, 33]. Citons l'équipe de West *et al.*, qui a démontré que des hamsters ayant été infectés par un virus PIV-1 recombinant exprimant la protéine F du hMPV étaient protégés contre l'infection virale, alors que ceux ayant été infectés par un virus recombinant n'exprimant que la protéine G ou SH ne l'étaient pas [49].

## b) La glycoprotéine d'attachement G

Le gène G du hMPV comporte 660 bases pour le sous-groupe A et 711 bases pour le sous-groupe B. Il code pour une glycoprotéine de 217 à 236 acides aminés pour le sous-groupe A (poids moléculaire de 25,5 à 25,8 kDa) et de 231 à 236 acides aminés pour le sous-groupe B (23,6 à 25,8 kDa) [26].

La protéine G a été identifiée comme étant la protéine d'attachement chez le VRS, puisque les anticorps spécifiques dirigés contre la protéine G bloquaient l'attachement des particules virales aux cellules [50, 51]. Sa structure est très différente de celle des *Paramyxovirinae* puisqu'elle ne possède pas d'activité de neuraminidase ni d'hémagglutinine.

L'analyse du profil d'hydrophobicité de la protéine G du hMPV montre qu'il s'agit d'une glycoprotéine transmembranaire de type II, similaire à celle des *Pneumovirinae* [17] : elle contient une région cytoplasmique hydrophile (N-terminale), suivie d'une courte région hydrophobe transmembranaire, et d'un grand fragment extracellulaire hydrophile (région C-terminale).

Contrairement à ce qui a été observé avec la protéine F, le haut degré de divergence de la protéine G entre et à l'intérieur des sous-groupes de hMPV réduit le rôle qu'elle peut jouer dans les neutralisations et les protections croisées entre les sous-groupes [32]. En effet, la glycoprotéine G est la protéine la plus variable du hMPV [24, 26-28]. La plus forte variation de la structure en acides aminés est principalement retrouvée au niveau de l'extrémité C-terminale [17, 24, 28], où sont également relevés de nombreux sites de glycosylation [17, 27, 52] : cinq sites accepteurs de N-glycosylation, et plus de quarante sites accepteurs de O-glycosylation (résidus sérine et thréonine). En outre, tout comme chez le VRS et le APV, la partie extracellulaire de la protéine G contient un nombre inhabituellement élevé de résidus proline (8%) [17, 26, 28], qui sont des déterminants majeurs de la structure tridimensionnelle des protéines [52]. Cette composition particulière en acides aminés ainsi que la présence de nombreux sites potentiels de glycosylation liés à O sont des caractéristiques propres aux glycoprotéines d'origine muqueuse et suggèrent que la protéine G du hMPV aurait une structure de type mucine hautement glycosylée [49, 53].

La structure générale de la protéine G du hMPV ressemble donc à celle du VRS ; elle est cependant plus petite, puisqu'elle comporte au maximum 236 acides aminés contre 299 pour celle du VRS [34]. L'analyse des séquences du hMPV démontre en effet une utilisation variable du codon stop, résultant en la traduction en des protéines de longueurs variables [24, 26-28]. Mais elle s'en distingue également par plusieurs autres caractéristiques, avec notamment trois éléments manquants dans sa portion extracellulaire [18] :

- elle ne contient pas les 13 acides aminés conservés et les 4 résidus cystéines qui contribuent à former un nez cystéine, cette structure ayant un rôle important dans la conformation de la protéine et la signalisation biologique [54] ;
- elle ne comporte pas le motif CX3C mimant un récepteur de chimiokines [55] ;
- le second codon d'arrêt qui donne naissance à la forme soluble de la protéine G du VRS n'existe pas chez le hMPV [56].

Ainsi, la grande variabilité de la composition en acides aminés de la protéine G du hMPV et sa structure plus simple lui confèrent certainement des fonctions dans l'infectivité et la protection différentes de celles de la protéine G du VRS. Et comme cela a été décrit avec le VRS [57], c'est la pression immunologique qui a pu être à l'origine de la variation de la structure de la protéine G dans le temps.

### c) La petite protéine hydrophobe SH

Le gène SH, de 551 nucléotides, code pour une petite protéine hydrophobe (« *short hydrophobic* ») de 183 acides aminés. Son rôle exact au sein de la particule virale n'est pas connu.

L'analyse du profil d'hydrophobicité de la protéine SH du hMPV montre qu'il s'agit d'une protéine transmembranaire de type II [17]. Tout comme les autres protéines SH des *Pneumovirinae*, elle contient deux sites potentiels de glycosylation liés à N et un nombre très élevé de résidus sérine et thréonine (22%) [17]. En outre, la glycoprotéine SH du hMPV est hautement variable [17, 18].

Comme pour le VRS, la protéine SH n'est pas essentielle pour la croissance du hMPV *in vitro* et *in vivo* [58-60]. En effet, il a été montré que des virus mutants dépourvus du gène SH se répliquaient efficacement en culture cellulaire [60].

Enfin, bien qu'elle soit exprimée à la surface des particules virales, la glycoprotéine SH n'est que faiblement immunogène et n'induit pas la production d'anticorps neutralisants [33].

## **2. La protéine de matrice M**

Le gène M comporte 765 nucléotides et code pour une protéine de 254 acides aminés.

La protéine M n'est pas une protéine membranaire intrinsèque : elle est seulement associée aux membranes, ce qui a été confirmé par des études de fractionnement [61-63].

Cette protéine serait, comme chez les autres Paramyxovirus, au centre de l'organisation de la morphologie des particules virales [59], en servant de matrice qui interagirait à la fois avec la nucléoprotéine (par le biais de ses nombreux résidus basiques [64]), les extrémités cytoplasmiques des protéines de surface et la bicouche lipidique [65-68].

## **3. Les protéines impliquées dans la réplication virale**

### **a) La nucléoprotéine (N)**

Le gène N possède 1185 bases, et code pour une protéine de 394 acides aminés. Rappelons que la protéine N est l'une des protéines les plus conservées au sein des différentes souches de hMPV (tableaux 2 et 3) [23].

La protéine N occupe plus d'un rôle au sein de la particule du hMPV : elle protège l'ARN viral à l'intérieur d'une nucléocapside résistante aux RNases, elle s'associe avec la protéine P et la protéine L lors de la transcription et de la réplication, et elle interagit avec la protéine M lors de l'assemblage des particules [34]. L'assemblage de plusieurs sous-unités de protéines N, via une petite région hydrophobe située près du centre de la protéine, est un pré-requis nécessaire à son action [69]. De plus, la quantité de nucléoprotéine non assemblée à l'intérieur d'une cellule infectée pourrait intervenir comme un contrôle du niveau de la transcription et de la réplication du génome [34, 70, 71].

### **b) La phosphoprotéine (P)**

Le gène P code pour une protéine phosphorylée de 294 acides aminés, dont le rôle n'a pas encore été étudié chez le hMPV. Cependant, son homologie avec la phosphoprotéine des autres Pneumovirus, et notamment la présence d'une zone riche en glutamates très conservée en région C-terminale [17], permet de suggérer une implication de la protéine P dans le maintien de l'intégrité structurale de la nucléocapside (rôle de chaperonne pour la protéine N) [72, 73], ainsi que dans la synthèse de l'ARN viral.

### c) L'unité de polymérase (L)

Le gène L du hMPV code pour une longue protéine de 2005 acides aminés. Par analogie avec les autres virus à ARN négatif, le dernier cadre de lecture ouvert du génome du hMPV correspondrait à l'ARN polymérase ARN-dépendante. En effet, ce gène est d'une longueur similaire à celle des autres Paramyxovirus [17, 20] et contient les six domaines conservés au sein de l'ordre des *Mononegavirales* [17, 74-76]. Ces motifs semblent être impliqués dans la conformation de la protéine L et être essentiels aux fonctions de la polymérase [75, 77, 78].

### d) Le facteur d'élongation de la transcription M2-1 et le facteur de régulation de la synthèse d'ARN M2-2

Le gène M2 du hMPV est spécifique des Pneumovirus. Il est composé de deux cadres de lecture ouverts chevauchants [17] : le premier, M2-1, code pour une protéine de 187 acides aminés ; alors que le deuxième, M2-2, est plus court et code pour une protéine de 71 acides aminés.

La protéine M2-1 correspond au facteur d'élongation de la transcription et joue un rôle essentiel en liaison avec la polymérase [79, 80]. Elle facilite le passage de cette dernière à travers les régions intergéniques en l'empêchant de se détacher du génome et de terminer la transcription de façon précoce [80-82]. La protéine M2-1 du hMPV est très proche de celle de l'APV-C [17] et, parmi l'ensemble des Pneumovirus, la partie N-terminale est la région la plus conservée [83-85].

La protéine M2-2 correspond au facteur de régulation de la transcription et serait impliquée dans le contrôle de l'équilibre entre la réplication et la transcription de l'ARN viral [84, 86-88]. En début d'infection, la quantité de M2-2 est faible et on observe un taux élevé de transcription, alors que plus la concentration de M2-2 augmente, plus la transcription est inhibée et la réplication favorisée [89]. Comme chez le VRS, la protéine M2-2 du hMPV semble donc favoriser la réplication virale, mais n'est pas essentielle [60, 90]. Cette étude trouve son intérêt notamment dans le cadre du développement de candidats vaccinaux. Plusieurs groupes de recherche ont en effet établi que des virus hMPV recombinants dont le gène M2-2 était supprimé se caractérisent par une réplication diminuée associée à une augmentation de la transcription ; l'accumulation de protéines virales résultant de cette expression génique majorée est capable d'induire une immunité protectrice [86, 91, 92].

## F. Cycle de réplication

Le cycle viral du hMPV n'a pas encore été entièrement caractérisé, mais peut néanmoins être suggéré à partir des mécanismes retrouvés chez le VRS et les autres Pneumovirus.

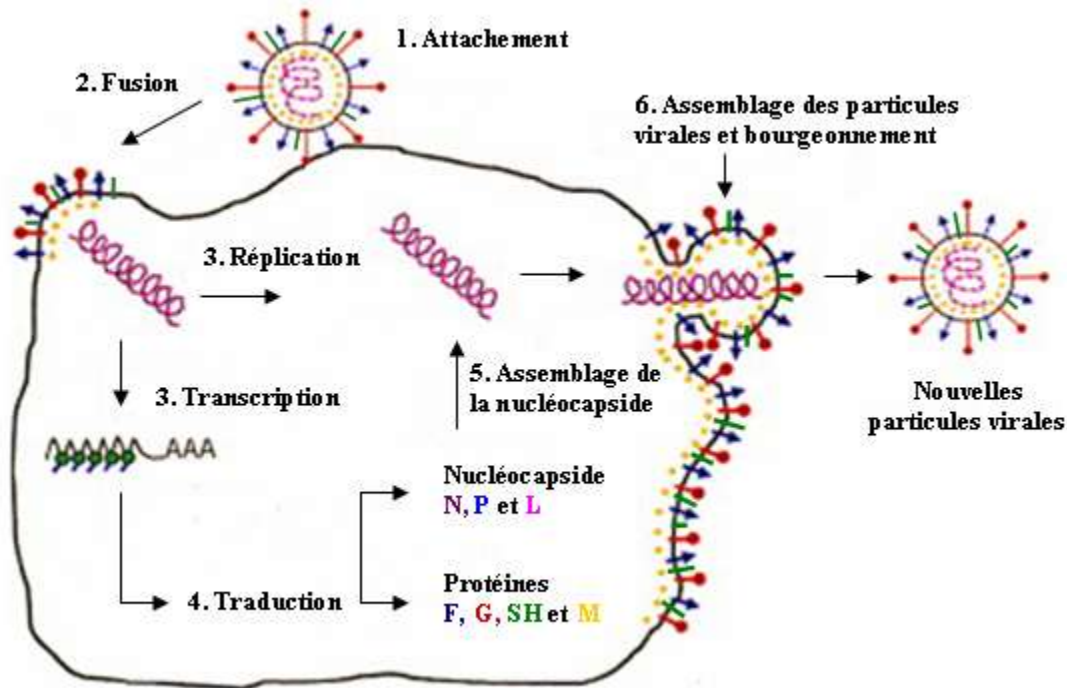


Figure 5. Etapes du cycle viral du hMPV (adapté de [93]).

Le cycle de réplication virale se déroule dans le cytoplasme, et comprend différentes étapes :

- ✓ **L'attachement des particules à la surface de la cellule hôte** constitue la première étape du cycle viral.  
Aucun récepteur cellulaire n'a encore été étudié chez le hMPV. Chez le VRS toutefois, il a été décrit une interaction de la protéine G avec des glycosaminoglycanes (GAGs) [94], la protéine G semblant s'attacher préférentiellement aux GAGs contenant des disaccharides héparane sulfate et chondroïtine sulfate B.
- ✓ **La fusion** a déjà détaillée dans le paragraphe consacré à la protéine F.

✓ **La transcription et la traduction.**

L'ARN, de polarité négative, sert de matrice pour la synthèse des ARNm de polarité positive. La transcription est séquentielle et polaire : les gènes proximaux sont favorisés et plus fréquemment transcrits que les gènes se rapprochant de l'extrémité 5' [95]. En outre, bien que la polymérase ne puisse s'attacher à l'intérieur du génome, il a été démontré que celle-ci pourrait avancer et reculer sur le génome [80], ce qui expliquerait la transcription de gènes contenant des cadres de lecture ouverts chevauchants, comme le M2-2 chez le hMPV [34].

Enfin, une fois les ARNm synthétisés, ils sont traduits en protéines en utilisant la machinerie cellulaire.

✓ **La réplication du génome viral.**

Elle débute suite à la traduction des transcrits et à l'accumulation de protéines virales. Le génome ARN négatif du hMPV se réplique par l'intermédiaire d'un antigénome ARN positif. Ce dernier consiste en une copie d'ARN parfaitement complémentaire, dont l'unique fonction serait de servir d'intermédiaire afin de recréer des copies du génome ARN négatif, qui seront au centre des particules virales nouvellement formées.

✓ **L'assemblage et le bourgeonnement des nouvelles particules virales.**

Les protéines de surface F, G et SH, après maturation dans le golgi, sont transportées à la membrane plasmique. Le mécanisme par lequel elles s'assemblent à la surface de la cellule n'est toujours pas élucidé. Dans le même temps, les sous-unités de la protéine N s'associent au génome ARN négatif, puis au complexe protéique P-L [96], formant ainsi la nucléocapside [89].

Par la suite, la nucléocapside nouvellement formée est transportée à l'endroit approprié où se trouvent les protéines virales dans la membrane plasmique.

Enfin, le virus acquiert son enveloppe en bourgeonnant à la surface de la cellule et les nouvelles particules virales sont libérées. Dans les cellules polarisées, les virus bourgeonnent seulement au niveau apical [97], réduisant ainsi la dissémination du virus à partir de l'épithélium des voies respiratoires.

## IV. Epidémiologie

### A. Répartition géographique

Le hMPV est un virus ubiquitaire : depuis sa description initiale par l'équipe hollandaise en 2001 [10], il a été trouvé dans de très nombreux pays, sur tous les continents. Le tableau 4 synthétise les résultats des premières études épidémiologiques publiées.

Référence	Pays	Année (période)	Type d'étude	Population	hMPV n/N (%)	Commentaires
[10]	Hollande	2000 (hiver)	Rétrospective/échantillons négatifs*	Enfants IATR	7/68 (10)	
[98]	Australie	2001 (année entière)	Rétrospective/échantillons négatifs*	Enfants IATR	3/200 (1.5)	
[12]	Canada	2001 (hiver)	Laboratoire	Tous âges	20/862 (2.3)	Détection par culture
[99]	Royaume-Uni	2001 (hiver)	Prospective/échantillons négatifs*	Tous âges syndromes pseudo-grippaux	9/405 (2.2)	
[100]	Finlande	2000–2001 (Sept–Juin)	Prospective	Enfants hospitalisés "wheezing"	10/132 (9)	3 patients co-infectés
[101]	France	2001–2002 (Nov–Mars)	Rétrospective/échantillons négatifs*	Enfants hospitalisés IATR	19/337 (6.6)	
[102]	Etats-Unis	2001–2002 (Nov–Mars)	Laboratoire/échantillons négatifs*	Enfants < 5 ans	19/296 (6.4)	2 patients co-infectés
[103]	Espagne	2000–2002 (Nov–Fév)	Prospective/échantillons négatifs*	Enfants < 3 ans IATR	6/147 (4.1)	
[104]	Canada	2001–2002 (Déc–Mai)	Prospective/cas-témoins	Enfants hospitalisés < 3 ans IATR	12/208 (5.8)	2 patients co-infectés ; 0 sujet témoin testé positif
[105]	Australie	2001–2002 (année entière)	Prospective	Enfants asthme <sup>a</sup> / infection resp haute <sup>b</sup>	3/179 (2) <sup>a</sup> ; 9/150 (6) <sup>b</sup>	
[106]	Hong-Kong	2001–2002 (année entière)	Prospective	Enfants hospitalisés IATR	32/587 (5.5)	2 patients co-infectés
[107]	Etats-Unis	1999–2001 (hiver)	Prospective/cas-témoins	Cohortes de sujets jeunes et âgés IATR	44/984 (4.5)	Détection par séroconversion ou PCR ; 9 séroconversions (4.1%) parmi 217 sujets témoins
[108]	Italie	2000–2002 (hiver)	Rétrospective	Enfants hospitalisés < 2 ans IATR	23/90 (25)	9 patients co-infectés
[109]	Allemagne	2002 (Janv–Mai)	Rétrospective	Enfants hospitalisés < 2 ans IATR	11/63 (17.5)	3 patients co-infectés
[36]	Canada	2001–2002 (hiver)	Laboratoire /échantillons négatifs*	Tous âges IATR	66/445 (14.8)	
[110]	Hollande	2000–2002 (année entière)	Laboratoire	Tous âges IATR	48/685 (7.0)	6 patients co-infectés

**Tableau 4 (d'après [16]). Incidence de l'infection à hMPV dans quelques études.**

La détection a été réalisée par RT-PCR (sauf spécifications). IATR : infection aiguë du tractus respiratoire. \* échantillons négatifs pour les autres agents viraux recherchés.

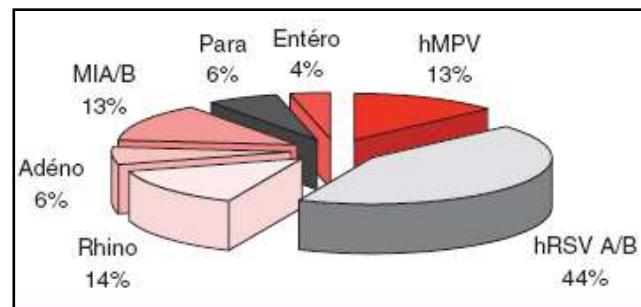
La majorité des études a été conduite chez des enfants hospitalisés pour une infection respiratoire aiguë [16]. Les résultats sont difficiles à comparer en raison de différences méthodologiques portant sur la population (pays d'origine, niveau socio-économique), le type d'analyse (rétrospective ou prospective), le type de prélèvements analysés, et la période d'étude.

## B. Place du hMPV parmi les autres virus respiratoires

Les infections respiratoires de l'enfant sont à 80% d'origine virale. Les virus responsables diffèrent selon le type d'infection (haute ou basse), l'âge et la période de l'année. Plusieurs centaines de virus respiratoires différents peuvent être détectés : les virus respiratoires 'classiques' sont les virus influenza A, B, et C, les VRS A et B, les virus parainfluenza 1, 2, 3 et 4, les adénovirus (51 sérotypes), les rhinovirus (une centaine de sérotypes), et les entérovirus (quelques dizaines de sérotypes). Des virus respiratoires émergents s'ajoutent désormais à ce panel : le hMPV, les nouveaux coronavirus (NL63 et HKU1), le bocavirus, mais également d'autres virus dont la pathogénicité n'a pas encore été démontrée (polyomavirus KI et WU).

L'incidence de l'infection à hMPV représente en général 5% à 10% des étiologies infectieuses virales chez l'enfant hospitalisé, avec des extrêmes allant de 1,5% à 43 % [16].

Les premières études réalisées en France sont des études rétrospectives, faites au CHU de Caen par l'équipe du Dr Freymuth. Cette dernière observe que la prévalence des infections à hMPV est plus faible que celle des infections à VRS (44%), du même ordre (13%) que celles des infections à virus influenza et à rhinovirus, et deux fois plus fréquente que celle des infections à virus parainfluenza ou adénovirus (figure 6) [111].



**Figure 6** (d'après [111]). **Prévalence de l'infection à hMPV chez les enfants hospitalisés en Basse-Normandie entre novembre 2002 et mars 2003.** Le pourcentage indiqué est celui calculé sur le total des virus respiratoires détectés.

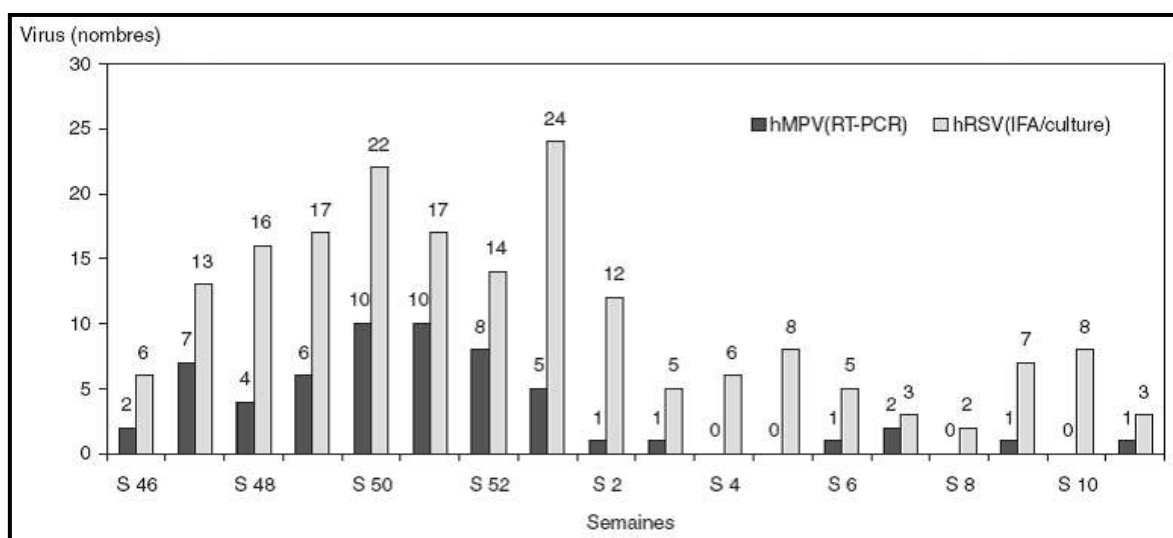
La première étude prospective publiée en France est celle de l'équipe de Guyon *et al.*, qui a porté sur les enfants de moins de 5 ans hospitalisés au CHU de Montpellier entre novembre 2003 et novembre 2004 pour une infection respiratoire [112]. Les résultats corroborent l'épidémiologie retrouvée à Caen, avec 44,5% d'infections à VRS, 9,6% à hMPV et 3,7% à virus influenza.

### C. Répartition saisonnière

La connaissance de l'activité saisonnière des virus respiratoires est un élément important, à prendre en compte notamment dans la démarche diagnostique.

Une étude canadienne poursuivie sur l'ensemble de l'année a rapporté que la majorité des cultures cellulaires positives pour le hMPV (86,7 %) étaient retrouvées entre décembre et mai [12], ce qui permet de restreindre la période de surveillance à la saison hivernale.

Dans les pays à climat tempéré, l'infection à hMPV a une distribution saisonnière qui recouvre parfaitement celle du VRS (figure 7) : l'épidémie débute assez brutalement en novembre, culmine en décembre et s'éteint très progressivement en mars. On note néanmoins que l'activité du hMPV se prolonge au début du printemps [113].



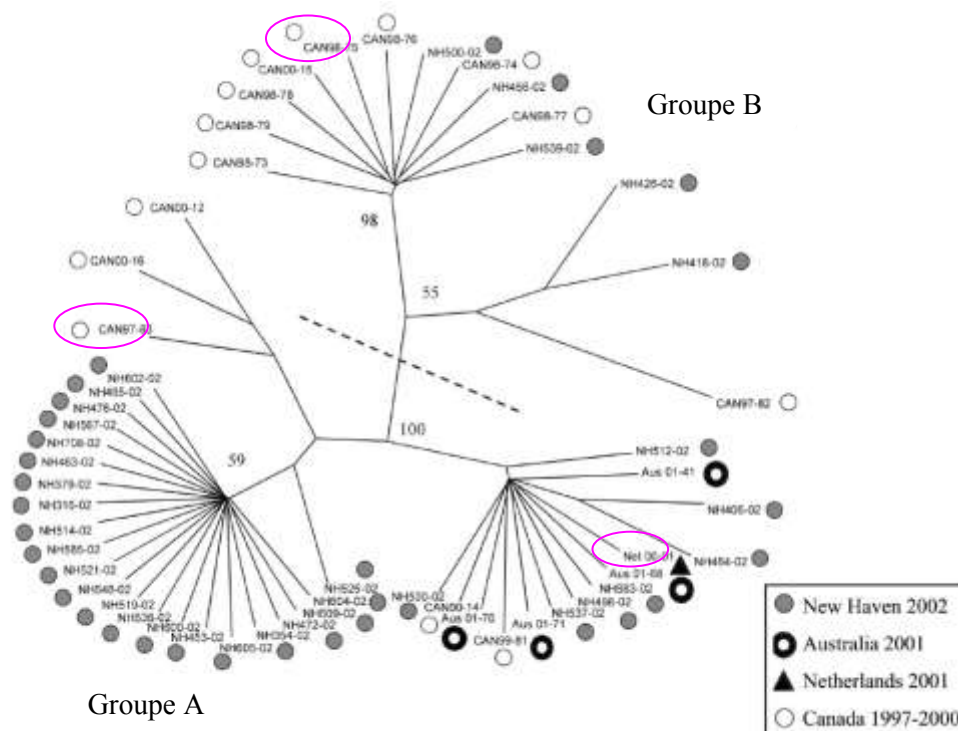
**Figure 7** (d'après [111]). **Epidémies à hMPV et VRS chez les enfants hospitalisés en Basse-Normandie au cours de l'hiver 2002-2003.** Les hMPV sont détectés par RT-PCR et les VRS par immunofluorescence (IFA) et culture. On observe une superposition des courbes des épidémies à VRS et à hMPV.

Il est également possible que la répartition saisonnière puisse ne pas être la même selon les pays. Ainsi, l'épidémie de l'hiver 2001-2002 a culminé en décembre et janvier en France [101], alors qu'elle n'a atteint son pic qu'en mars et avril au Canada [104]. Cette survenue tardive, en fin d'hiver, a aussi été signalée à Hong-Kong [106] et en Argentine [114]. L'activité virale du hMPV diffère donc légèrement dans les pays à climat subtropical, où elle semble plus importante au printemps et dans les premiers mois d'été [106].

## D. Epidémiologie moléculaire

Une étude réalisée en 2004 par l'équipe du Dr Boivin a porté sur l'analyse du polymorphisme du gène F : en comparant les séquences des gènes F de virus isolés en Australie (2001), France (2000 et 2002), Canada (1999, 2000, 2001 et 2002), Israël (2002) et Hollande (2001), cette équipe a pu démontrer que les isolats étaient fortement apparentés [25].

Pour illustrer cette observation, nous pouvons considérer l'arbre phylogénétique élaboré d'après une étude réalisée par Esper *et al.* en 2004 (figure 8) : la souche prototype identifiée en Hollande (NETH0001) est génétiquement similaire à des souches isolées en Australie, à New Haven (Connecticut – Etats-Unis) ou au Canada, au cours de différentes années [115].



**Figure 8** (d'après [115]). **Analyse phylogénétique d'isolats de hMPV.**

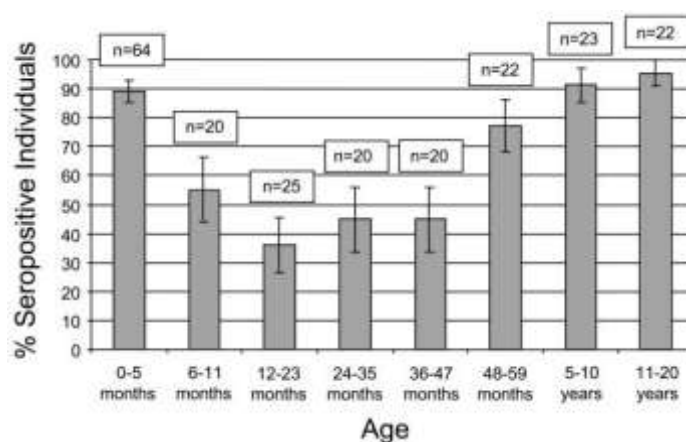
Les séquences des gènes F d'isolats de hMPV provenant du Connecticut, de Hollande, d'Australie et du Canada ont été utilisées pour construire cet arbre phylogénétique. Le groupage des génotypes (A et B) est basé sur la proposition de la référence [24].

Toutes les études s'accordent pour montrer que les deux sous-groupes de hMPV et les variants génétiques co-circulent au cours de l'épidémie hivernale, au sein d'un pays comme à l'échelle mondiale. Une étude réalisée par Agapov *et al.* a montré que la prédominance d'un génotype de hMPV variait selon les années [116]. Au sein de ce travail, il est intéressant de noter qu'aucune différence n'a été établie entre les deux génotypes au regard de la sévérité de la pathologie induite. Ce n'est pas le cas de Vincente *et al.* [117], dont l'étude suggère une plus grande sévérité de la pathologie liée à l'infection par une souche de génotype A.

## E. Séroprévalence

Les études sérologiques ont pour but d'objectiver à la fois l'âge moyen d'acquisition de l'infection et la persistance de l'immunité. Elles ne trouvent que très peu d'utilité dans un cadre diagnostique, étant donnée l'infection universelle par le hMPV.

Les infections par le hMPV surviennent principalement chez les jeunes enfants entre 3 et 6 mois, soit légèrement plus tard que celles provoquées par le VRS qui surviennent majoritairement entre 0 et 2 mois [104, 110, 118, 119]. La majorité des enfants a été infectée par le virus avant l'âge de 5 à 10 ans (figure 9) [10, 119, 120].



**Figure 9. Séroépidémiologie du hMPV** (d'après [118]).

Les pourcentages de séropositivité pour le hMPV ainsi que le nombre de sérums testés (n) pour chaque groupe d'âge sont indiqués. Les barres d'erreur représentent des intervalles de confiance de 95%.

La séroprévalence des anticorps spécifiques du hMPV chez les nourrissons de moins de 3 mois est de plus de 90%, mais correspond à la persistance des anticorps maternels.

La présence d'anticorps détectables diminuerait approximativement à 85 % chez les adultes de plus de 40 ans [121]. Malgré la contraction universelle de ce pathogène viral, de nouvelles infections peuvent être acquises au cours de la vie, comme le suggèrent des observations d'infections sévères chez l'adulte [12] et des descriptions de cas de réinfections précoces [122-124]. Il est impossible à ce jour de savoir si ces nouvelles infections sont dues à une immunité résiduelle imparfaite après une primo-infection acquise dans l'enfance ou à une infection par des génotypes quelque peu différents. De même, il n'a toujours pas été déterminé si ces anticorps spécifiques du hMPV protègent efficacement d'une infection, ou bien s'ils en diminuent la pathogénèse.

## V. Pathologie

### A. Manifestations cliniques

Le métapneumovirus humain est un authentique agent pathogène des voies respiratoires.

Comme les autres viroses respiratoires, les infections par le hMPV concernent tous les groupes d'âge, affectant cependant préférentiellement les jeunes enfants, les personnes âgées et les sujets immunodéprimés.

#### 1. L'infection chez les jeunes enfants

Le hMPV est désormais reconnu comme étant le deuxième pathogène respiratoire majeur chez le jeune enfant, après le VRS. Il est responsable d'environ 10% des infections respiratoires inférieures chez les jeunes enfants hospitalisés. Il est également associé à des cas d'infections respiratoires hautes.

Williams *et al.* ont mené deux études rétrospectives chez les enfants de moins de 5 ans, sur une période de plus de 20 ans. Ils ont identifié le hMPV dans 20% des cas d'infections du tractus respiratoire bas n'ayant pas fait leur preuve étiologique (soit 12% des épisodes totaux d'infection respiratoire basse) [124]. Le hMPV n'est détecté que dans 5% des infections respiratoires hautes d'étiologie non déterminée (soit 3% des prélèvements totaux) [125].

Ils constatent une différence dans la moyenne d'âge des enfants en fonction de la symptomatologie observée, et suggèrent l'hypothèse suivante : la présentation initiale durant l'enfance de l'infection à hMPV serait une affection des voies respiratoires inférieures (âge moyen des enfants : 11,6 mois) ; l'immunité induite limiterait ensuite la réplication du hMPV au tractus respiratoire supérieur en cas de réinfection (moyenne d'âge des enfants : 20 mois). Ces données nécessitent évidemment d'être confirmées par des études supplémentaires, en particulier grâce à des investigations histopathologiques, immunologiques, et des études du profil cytokinique.

Les manifestations cliniques observées lors des infections par le hMPV chez les jeunes enfants sont comparables à celles associées à l'infection par le VRS [126]. Même si le diagnostic final le plus souvent rapporté est la bronchiolite [100, 101, 104, 109, 113, 127], la diversité des manifestations cliniques est importante, allant du simple rhume à la pneumonie sévère. Les principaux symptômes relevés sont ainsi la rhinorrhée, la toux et la fièvre. Les manifestations à type de dyspnée ou de tachypnée, ainsi que les respirations sifflantes (*wheezing*) sont également fréquentes. D'autres manifestations cliniques ont été rapportées telles que otite, conjonctivite, difficultés alimentaires, diarrhée, vomissements, éruptions et convulsions fébriles [12, 102, 104, 106, 110].

L'implication des virus respiratoires dans l'initiation et la progression de l'asthme demeure un sujet à controverse. Il est cependant assez communément établi qu'ils peuvent être responsables de *wheezing* et d'épisodes d'exacerbation d'une hyperréactivité respiratoire ou d'un asthme [128]. L'association entre l'infection par le hMPV et le déclenchement de crises d'asthme est rapporté dans plusieurs études [100, 106, 127], et n'est pas confirmé dans une seule [105]. Dans l'étude de Jartti *et al.*, 8% des enfants hospitalisés en Finlande pour exacerbation de *wheezing* ont été testés positifs pour le hMPV [100].

Des hypothèses contradictoires ont été émises quant à la sévérité des infections par le hMPV. Dans une étude comparative de 26 cas d'infections à hMPV avec une cohorte appariée de nourrissons infectés par le VRS, Bach *et al.* ne trouvent aucune différence significative en ce qui concerne les motifs d'hospitalisation, les signes cliniques et la prise en charge thérapeutique [127]. D'autres auteurs ont évalué la proportion de patients avec hypoxie, pneumonie, ou ayant nécessité une admission en soins intensifs, et affirment que l'infection par le VRS serait plus sévère que celle associée au hMPV [104-106, 110].

Les enfants souffrant de pathologie sous-jacente sont davantage sujets à des manifestations sévères. Une étude réalisée en Amérique du Nord a montré que 25 à 33% des hospitalisations suite à une infection par le hMPV survenaient chez des enfants présentant un terrain prédisposant [12, 102].

Les infections asymptomatiques chez les jeunes enfants semblent rares. Dans l'étude de Williams *et al.*, le hMPV n'est détecté que dans un seul des 86 échantillons analysés issus d'enfants asymptomatiques [124].

## 2. L'infection chez l'adulte

Le rôle du hMPV dans les infections respiratoires aiguës de l'adulte a été moins étudié.

Chez l'adulte sain, l'infection à hMPV est souvent associée à des rhinites ou à des syndromes grippaux, dont il serait l'agent étiologique dans 2 à 5% des cas [12, 107, 129]. Stockton *et al.*, au cours d'une étude communautaire portant sur des patients se présentant chez leur généraliste pour un syndrome grippal, et pour lesquels la recherche des virus influenza et de VRS était négative, identifient une infection à hMPV chez 2,2% des patients, soit une prévalence totale de 1,3% [99].

Quelques études rapportent que le hMPV est l'agent étiologique de près de 5% des pneumonies d'acquisition communautaire. Dans d'autres travaux, le hMPV est également responsable de cas d'exacerbations aiguës de BPCO (bronchopneumopathie chronique obstructive) et d'asthme [129-132].

Falsey *et al.* observent une fréquence d'infections à hMPV chez les jeunes adultes de 3,4%, et notent que les sujets âgés présentent des formes plus sévères [107]. Une étude rétrospective de 10 cas de patients de plus de 65 ans infectés par le hMPV a décrit 4 pneumonies et 2 décès [12]. Tous ces patients présentaient cependant une pathologie sous-jacente (maladie cardiovasculaire, pulmonaire ou neurologique). Récemment, une épidémie d'infections respiratoires aiguës causée par le hMPV a été rapportée dans un centre de soins prolongés pour personnes âgées dans la région de Québec [133]. Parmi les sujets infectés, plusieurs présentaient des symptômes d'allure grippale, et d'autres des infections sévères des voies respiratoires inférieures. Au total, 10% des patients infectés sont décédés.

## 3. L'infection chez l'hôte immunodéprimé

Chez les sujets immunodéprimés, enfants ou adultes, le hMPV peut causer des infections prolongées et sévères.

Chez les greffés de moelle en particulier [134], l'infection à hMPV peut entraîner une pneumonie interstitielle et être mortelle [12, 123, 134, 135]. Ces manifestations ont également été décrites chez un enfant leucémique [123] et chez un sujet souffrant de problèmes rhumatoïdes traité par prednisolone et méthotrexate [129]. Au cours d'une étude prospective

chez 245 adultes souffrant d'hémopathie, 9% des épisodes infectieux respiratoires ont pu être imputés au hMPV. 73% des individus testés positifs étaient greffés de moelle. 3 des patients sont décédés, 2 d'entre eux présentaient une infection bactérienne concomitante [136].

Plusieurs cas de pathologie pulmonaire sévère ont également été rapportés chez des patients transplantés pulmonaires. Dans l'étude de Larcher *et al.* portant sur un an, 9 des 25 individus d'une cohorte de transplantés pulmonaires ont été testés au moins une fois positifs pour le hMPV. Plusieurs décès ont été rapportés. Des épisodes de rejet ont aussi été décrits ; il est néanmoins difficile de déterminer l'implication du hMPV dans la pathogenèse chez ces individus, étant donné que nombreux sont ceux qui présentent une infection bactérienne concomitante [137].

Une seule étude a été menée en Afrique du Sud chez des enfants séropositifs HIV, cependant le peu d'enfants inclus dans l'étude ne permet pas d'affirmer que la pathologie associée au hMPV est plus sévère que chez des enfants non HIV [138].

#### **4. Les co-infections**

##### **a) Infections virales mixtes**

La plupart des virus respiratoires humains partagent la même saisonnalité et ont les mêmes cibles, il n'est donc pas étonnant de les retrouver associés. Les co-infections impliquant le hMPV existent, mais leur prévalence globale est difficile à estimer : de 0 à 27% selon les études et les méthodes diagnostiques employées, allant jusqu'à 35% dans les travaux de l'équipe de Van de Pol [139].

Le rôle d'une co-infection comme facteur aggravant de la pathologie respiratoire reste discuté. Greenshill *et al.* rapportent une grande fréquence de co-infections à VRS et hMPV chez les enfants atteints de bronchiolite grave : dans leur étude, 70% des enfants infectés par le VRS et hospitalisés en soins intensifs étaient co-infectés par le hMPV [140]. Dans une autre étude se basant également sur le critère de l'admission en soins intensifs, Semple *et al.* suggèrent également une aggravation de la pathologie liée au VRS lorsqu'elle est associée à une infection par le hMPV [141].

Ces résultats ne font cependant pas l'unanimité puisque d'autres études cas – témoins effectuées chez des patients hospitalisés en unité de soins intensifs de pédiatrie pour une pathologie sévère due au VRS n'ont pas retrouvé d'enfant positif pour le hMPV [113, 142]. Laham *et al.* ne relèvent aucune co-infection à VRS et hMPV dans une cohorte de 373 nourrissons présentant des signes respiratoires [114].

L'association du hMPV au SARS -CoV a été rapportée au Canada [143], ainsi qu'à Hong-Kong en 2003 [144], où la présence du hMPV a été identifiée dans 20% des échantillons nasopharyngés des 155 patients possiblement infectés par le SARS. Mais l'hypothèse d'un pouvoir aggravant de la co-infection virale n'a pas été confirmée dans l'infection expérimentale du singe [145]. La significativité de la co-infection reste donc pour le moment indéterminée, l'hypothèse d'une potentialisation de la dissémination virale lors d'une co-infection a également été avancée.

### **b) Surinfections bactériennes**

Les virus respiratoires sont impliqués dans la pathogenèse des otites moyennes aiguës (OMA) [146, 147]. Dans l'étude de Williams [148], 50% des enfants atteints d'infection respiratoire haute associée au hMPV étaient diagnostiqués avec une OMA concomitante [124].

Les données actuelles suggèrent que les surinfections bactériennes à type de pneumonie compliquant une infection à hMPV sont rares, cependant les études appropriées à la vérification de cette hypothèse n'ont pas été menées [126].

## **5. Les autres manifestations**

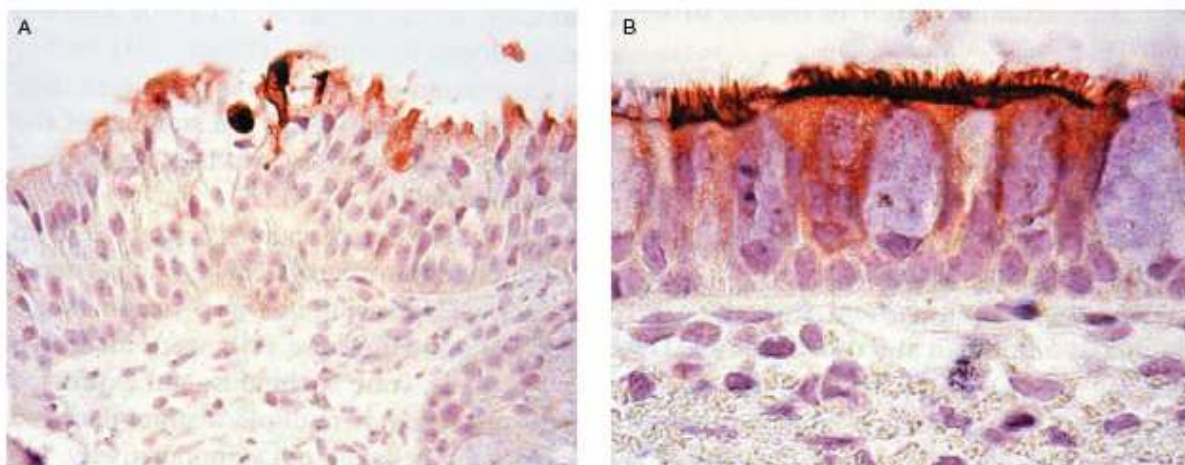
Un cas de dissémination extrapulmonaire du hMPV a été rapporté chez un enfant de 14 mois décédé d'une encéphalite [149] : l'ARN du hMPV a été retrouvé à la fois dans les tissus pulmonaire et cérébral, alors qu'aucun autre pathogène n'a pu être détecté.

## B. Physiopathologie de l'infection

Bien que ne disposant pas réellement de données sur l'infection humaine à hMPV, il est possible d'extrapoler à partir des observations faites dans l'infection expérimentale du macaque [11]. Les périodes d'incubation et d'excrétion virale sont courtes, respectivement de 2 et 8 jours. Le mode de contamination respiratoire s'apparente très probablement à celui du VRS : la transmission est soit directe, par les sécrétions contaminées ou les gouttelettes de Pflügge émises lors de la toux ou des éternuements, soit indirecte par le matériel souillé ou les mains.

La pathogenèse a donc principalement été étudiée dans des modèles expérimentaux, chez le petit animal de laboratoire et chez les primates. Il a très rapidement été établi que le hMPV n'infectait pas les oiseaux : l'inoculation intranasale au poulet ne provoque pas de signe clinique [10].

Kuiken *et al.* ont étudié l'infection expérimentale du singe macaque cynomolgus par le hMPV [11]. Elle produit une atteinte clinique modérée des voies aériennes supérieures : les lésions de l'épithélium respiratoire sont modérées, avec une perte de la ciliature, une désorganisation de l'architecture épithéliale, un œdème intra et intercellulaire et un afflux de polynucléaires neutrophiles. Après marquage immunologique, l'expression virale s'observe surtout au pôle apical des cellules cylindriques ciliées (figure 10), et de façon plus sporadique dans les pneumocytes de type I.



**Figure 10** (d'après [11]). **Marquage immunohistochimique (anticorps anti-hMPV marqués par la peroxydase) de sections de muqueuses nasales, trachéales et d'alvéoles pulmonaires de macaques infectés par le hMPV.**

L'importante réplication virale au niveau de l'épithélium respiratoire aboutit à une nécrose cellulaire. L'accumulation de cellules nécrotiques desquamées, des sécrétions muqueuses (hypersécrétion) et de l'exsudat sérofibrineux, associée à la dysfonction ciliaire, constitue un véritable bouchon muqueux, obstruant plus ou moins complètement la lumière bronchiolaire déjà réduite par l'inflammation pariétale. L'obstruction des voies aériennes est donc, comme dans l'infection à VRS, d'origine à la fois endoluminale et murale.

Laham *et al.* [114] observent cependant que l'infection à hMPV entraîne la production de 2 à 6 fois moins de cytokines inflammatoires que l'infection à VRS, et que le taux de ces cytokines n'est pas plus élevé chez les enfants atteints de formes sévères et hospitalisés que chez ceux atteints de formes légères et non hospitalisés [114].

Cette différence dans le profil cytokinique, également relevée dans l'étude de Jartti *et al.* [100], permettrait d'expliquer la relative inefficacité des anti-inflammatoires dans cette indication, mais soulève avant tout de nouvelles interrogations : si l'infection à hMPV produit la même clinique respiratoire que celle due au VRS, d'autres mécanismes sont certainement impliqués, dont l'étude sera cruciale pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques [150].

## VI. Attitude thérapeutique et prévention

Les progrès concernant une stratégie antivirale efficace vis-à-vis du hMPV sont actuellement limités par les données insuffisantes sur la pathogenèse du virus chez son hôte naturel [126], et il n'existe aujourd'hui aucun traitement antiviral ni vaccin qui puisse être utilisé dans la prise en charge des infections à hMPV.

### A. Prise en charge

#### 1. Traitement symptomatique et surveillance

La conférence de consensus de 2000 [151] a fixé la prise en charge des bronchiolites, qui est principalement symptomatique : elle est centrée sur les mesures hygiéno-diététiques (désobstruction rhinopharyngée, hydratation, alimentation fractionnée éventuellement épaissie, couchage en proclive dorsal à 30°) et la kinésithérapie.

La surveillance et la réévaluation du nourrisson sont essentielles, à la recherche de critères de gravité pouvant justifier le recours hospitalier :

- Aspect « toxique », altération importante de l'état général
- Survenue d'apnée, présence d'une cyanose
- Fréquence respiratoire > 60 / min
- Age < 6 semaines
- Prématurité < 34 semaines d'aménorrhée, âge corrigé < 3 mois
- Cardiopathie sous-jacente, pathologie pulmonaire chronique grave
- SaO<sub>2</sub> < 94% (saturation transcutanée en oxygène sous air et au repos ou lors de la prise des biberons)
- Troubles digestifs compromettant l'hydratation, déshydratation et perte de poids > 5%
- Difficultés psychosociales
- Présence d'un trouble de ventilation confirmé par radiographie thoracique.

En milieu hospitalier, le traitement pourra avoir recours, en plus des mesures citées, à l'hydratation parentérale et/ou l'alimentation entérale, l'oxygénothérapie, voire la mise en place d'un traitement antiviral (ribavirine par aérosol).

## 2. Traitements médicamenteux

### ➤ Antiviraux

La ribavirine, analogue nucléosidique de la guanosine, est utilisée en milieu hospitalier sous forme d'aérosol dans les bronchiolites sévères à VRS. Son intérêt reste cependant controversé : l'efficacité clinique est modeste [152], les difficultés liées à son utilisation, son coût et sa toxicité non négligeables en réduisent les indications. Wyde *et al.* ont montré que la ribavirine avait la même activité antivirale *in vitro* sur le hMPV que sur le VRS [153].

Le NMSO<sub>3</sub>, un composé lipidique sialylé sulfaté, a montré une activité antivirale contre le hMPV en culture cellulaire ; la diminution de la réplication semble liée à un mécanisme d'inhibition de l'attachement ou de la pénétration du virus dans les cellules [153, 154].

### ➤ Bronchodilatateurs et corticoïdes

Ils n'ont pas leur place dans le traitement de la première bronchiolite, la preuve de leur efficacité n'ayant pas été faite dans cette indication.

### ➤ Antibiothérapie

Elle n'est pas indiquée en première intention. L'instauration d'un traitement antibiotique se discute devant des signes faisant craindre une surinfection bactérienne ou devant une fragilité particulière (pathologie pulmonaire ou cardiaque sous-jacente) :

- Fièvre supérieure ou égale à 38,5°C depuis plus de 48 heures
- Otite moyenne aiguë (OMA)
- Foyer pulmonaire radiologiquement documenté
- Elévation de la CRP et/ou des polynucléaires neutrophiles

## B. Prophylaxie

### 1. Candidats vaccinaux

Quelques candidats vaccinaux prometteurs ont été testés sur des modèles animaux. Les résultats de ces études doivent néanmoins être interprétés avec prudence, car les limites à l'extrapolation du modèle du petit animal sont nombreuses, et l'étroite spécificité d'hôte du virus n'en est pas la moindre.

Il est également important de noter que l'étude de Van den Hoogen *et al.* chez les macaques a permis de démontrer que l'immunité protectrice induite n'était que transitoire : dans le modèle testé, la protection disparaît 8 mois après la dernière inoculation [155]. Un vaccin réellement efficace devra par conséquent être plus immunogène et plus protecteur que l'infection naturelle.

Plusieurs méthodes sont utilisées pour la création de vaccins [156] :

➤ les virus inactivés :

Une inactivation du hMPV par le formol a permis l'immunisation de rats de cotonniers. La protection obtenue est complète, cependant il a été constaté une augmentation importante des lésions pulmonaires induites après réinfection [157].

➤ les sous-unités virales purifiées :

L'immunisation par une protéine F soluble a été testée par les équipes de Herfst et Cseke : elle permet une réduction significative de la réplication virale dans les modèles d'infection respiratoire basse du rat de cotonniers ou du hamster [158, 159].

➤ les vaccins vivants atténués

C'est le modèle le plus intéressant à développer en vue d'une utilisation chez le jeune enfant ; il présente en effet l'avantage majeur de mimer une infection naturelle.

▪ **les virus vecteurs**

Un virus parainfluenza 3 bovin exprimant la glycoprotéine F du hMPV induit l'apparition d'anticorps protecteurs chez le hamster [30, 31, 60].

- **les virus recombinants**

Les équipes de Biacchesi *et al.* et de Buchholz *et al.*, ont utilisé la technique de génétique inverse pour générer des mutants délétés : des virus hMPV dépourvus des gènes G et/ou SH, ou bien du gène M2-2 ont permis d'obtenir des taux d'anticorps neutralisants très élevés chez l'animal (hamster et singe vert d'Afrique), conférant une protection totale contre une réinfection ultérieure [32, 60, 92].

- **les virus chimères**

Dans ce modèle, les gènes des antigènes immunogènes majeurs du hMPV sont conservés, alors que d'autres gènes sont remplacés par les gènes correspondants d'un virus proche mais infectant un hôte naturel différent. Cette modification induit une restriction de la réplication *in vivo* du virus, due à l'incompatibilité de l'hôte, tout en conservant le caractère antigénique.

Des virus chimères hMPV/APV, correspondant à des virus hMPV recombinants dans lesquels les gènes N ou P ont été remplacés par ceux du virus aviaire ont été expérimentés chez le singe vert africain. Ils démontrent une atténuation de leur réplication (les recombinants P étant 10 à 1000 fois plus atténués que les recombinants N), mais conservent une immunogénicité identique à celle de la souche sauvage d'origine [160].

## 2. Immunisation passive

Les anticorps monoclonaux humanisés anti-protéine F du VRS (pavilizumab, Synagis®) ne présentent aucune activité contre le hMPV.

Des anticorps monoclonaux neutralisant le hMPV ont été isolés et testés. Récemment, l'équipe de Williams *et al.* [161] a ainsi développé un anticorps monoclonal recombinant humanisé anti-protéine F du hMPV qui neutralise *in vivo* le hMPV, et entraîne une forte réduction du titre viral dans les poumons de rats des cotonniers.

### 3. Mesures générales de prévention

Il n'existe pas de prévention réellement efficace, si ce n'est l'information des parents de jeunes nourrissons sur le risque de contamination interhumaine, importante en saison hivernale.

Les précautions à prendre pour prévenir cette affection et en limiter la dissémination sont donc basées non pas sur des études scientifiques, mais sur la pratique quotidienne. Il s'agira notamment :

- d'éviter les lieux surpeuplés (transports, galeries commerçantes, lieux publics, salles d'attente médicales...)
- de retarder au-delà de l'âge de 6 mois l'accueil des nourrissons en collectivité
- de supprimer le tabagisme passif
- de respecter les précautions d'hygiène standard (lavage des mains)
- en cas d'hospitalisation, il s'agira de veiller à l'isolement en chambre individuelle ou au regroupement géographique (afin d'éviter la transmission aux enfants hospitalisés pour une autre pathologie). La décontamination régulière des objets et des surfaces devra également être assurée (la transmission indirecte constitue le principal facteur d'infections nosocomiales).

## VII. Outils du diagnostic virologique

### A. Opportunité du diagnostic étiologique

Dans la forme commune de la bronchiolite aiguë du nourrisson, traitée en ambulatoire, le diagnostic est essentiellement clinique, sans indication à des examens complémentaires (Conférence de Consensus de 2000 [151]). Le diagnostic virologique d'une infection respiratoire reste donc actuellement réservé aux cas d'infections sévères nécessitant une hospitalisation. Dans ce contexte, il permet notamment la mise en place de mesures d'isolement précoces (afin de prévenir les infections nosocomiales), mais aussi de participer à la veille épidémiologique (contribution à la connaissance globale du spectre des virus à tropisme respiratoire, et repérage des virus émergents).

En outre, rappelons qu'il y a toujours un intérêt pédagogique à démontrer l'origine virale de l'infection :

- contribuer à la dissuasion d'instaurer une antibiothérapie ;
- limiter les investigations invasives habituellement entreprises dans le cadre de la recherche microbiologique en pneumopédiatrie ;
- participer à l'information des parents, afin de les rassurer, mais également afin de leur prodiguer les conseils nécessaires à la surveillance de l'évolution clinique de leur enfant, et au respect des mesures d'hygiène pour éviter la dissémination de l'infection à la fratrie ou les récurrences.

## B. Modalités de prélèvements

Le prélèvement de choix pour réaliser le diagnostic d'une infection respiratoire chez l'enfant est le lavage - aspiration nasale à l'aide d'un dispositif stérile. Le prélèvement par écouvillonnage nasal et dépôt dans un milieu de transport pour virus constitue une alternative, mais la sensibilité de détection des virus respiratoires semble alors légèrement diminuée [162].

La supériorité des aspirations nasopharyngées (AN) pour la détection de l'ensemble des virus respiratoires a été clairement démontrée par plusieurs équipes : l'étude de Chan *et al.* a ainsi montré que la charge virale était significativement supérieure dans des sécrétions nasales récupérées par aspiration [163].

Les virus peuvent aussi être recherchés dans les prélèvements pulmonaires, et notamment dans les liquides de lavage bronchoalvéolaire, qui sont le prélèvement de choix chez les enfants sous ventilation mécanique [141].

Il conviendra donc de privilégier un prélèvement par aspiration nasopharyngée, qui reste néanmoins de réalisation délicate, et nécessite un équipement adapté.

Une attention particulière devra être portée au transport et à la conservation du prélèvement. En effet, les virus enveloppés sont fragiles dans le milieu extérieur ; il est par conséquent indispensable d'acheminer le prélèvement au laboratoire le plus rapidement possible (le délai doit être inférieur à 2 heures), l'alternative étant de diluer l'échantillon dans un milieu de transport (qui permet une conservation à + 4°C pendant 48 heures). Si ce délai ne peut être respecté, une congélation à une température inférieure à - 70°C permettra de préserver la viabilité des virus, mais rendra alors la technique d'immunofluorescence directe impraticable, puisqu'elle requiert une préservation de l'intégrité des cellules épithéliales. Les techniques de recherche de l'acide nucléique viral permettent de s'affranchir de la plupart de ces contraintes, une congélation à -20°C étant suffisante.

## C. Méthodes de diagnostic

Nous aborderons exclusivement les techniques de diagnostic direct, les méthodes sérologiques n'étant pas applicables dans le cadre des infections respiratoires virales en dehors des études épidémiologiques.

### 1. La culture cellulaire

La méthode diagnostique de référence reste à l'heure actuelle la culture cellulaire, car elle est la seule technique permettant d'isoler les souches virales, même si elle constitue également la méthode la plus longue et la plus laborieuse.

La culture cellulaire consiste à inoculer les prélèvements respiratoires sur une nappe cellulaire et à surveiller périodiquement l'apparition d'un effet cytopathogène (ECP) lié à la multiplication virale. Cet effet survient plusieurs jours voire plusieurs semaines après l'inoculation et retarde d'autant le diagnostic. En outre, chaque virus ayant un tropisme cellulaire propre, il n'existe pas de système de culture universel, et le laboratoire doit entretenir plusieurs lignées pour obtenir la multiplication d'un grand nombre de virus.

En ce qui concerne le hMPV, sa croissance en culture de cellules est très difficile. Plusieurs lignées cellulaires permissives ont été décrites :

a) **Cellules tMK** (cellules tertiaires de rein de singe) :

La réplication est lente : l'ECP, qui apparaît à partir du 14<sup>ème</sup> jour après l'inoculation, est caractérisé par la formation de syncytia suivie d'une destruction rapide de la nappe cellulaire (avec décollement du support). Van den Hoogen *et al.* remarquent que cet ECP est plus aisément observable avec les souches de génotype A [10].

b) **Lignée Hep-2** (cellules humaines issues d'un carcinome de larynx) :

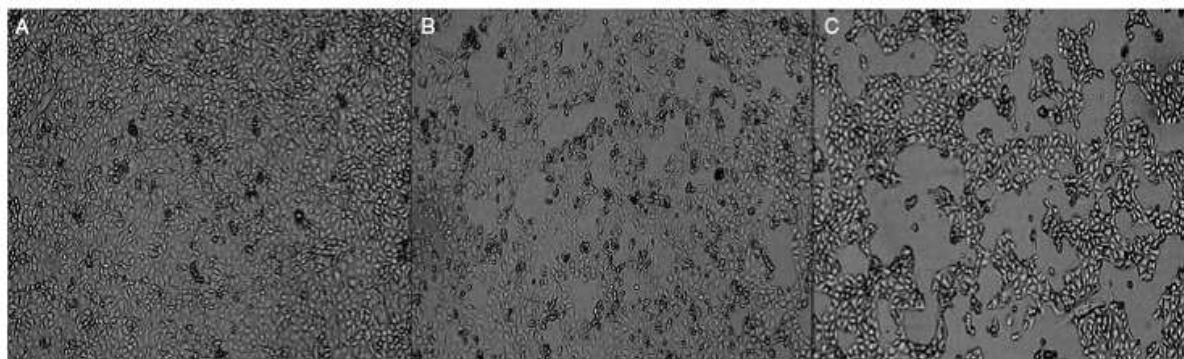
L'équipe de Chan *et al.* a utilisé ces cellules pour l'isolement du hMPV à partir d'aspirations nasales [143]. Néanmoins, comme aucun ECP n'est observable [12], une détection par RT-PCR est nécessaire pour affirmer la réplication du virus. De plus, les cellules Hep-2 ne peuvent être maintenues plus de 2 semaines en culture, ce qui rend d'autant plus difficile la propagation du hMPV. Cette lignée n'est donc pas utilisable en pratique courante.

c) **Cellules Vero** (cellules de rein de singe vert africain) :

Elles ont été qualifiées initialement par l'équipe de Van den Hoogen comme étant très peu sensibles à l'infection par le hMPV [10] ; cependant le clone Vero 118 a par la suite été utilisé par cette même équipe pour isoler les 4 sous-groupes du hMPV, avec observation d'un ECP [164]. Plus récemment, le clone Vero E6, remarquable par sa longévité en culture (sans changement fréquent de milieu), a montré son efficacité dans l'isolement du hMPV [165], avec apparition d'un ECP dans la semaine qui suit l'infection.

d) **Lignée LLC-MK2** (cellules de rein de singe rhésus):

Ces cellules sont les plus utilisées pour l'isolement du hMPV. L'ECP apparaît entre 3 et 23 jours selon la souche isolée (avec une moyenne à 17 jours). Il se caractérise par un arrondissement des cellules, qui deviennent réfringentes, puis se décollent du tapis cellulaire. La présence de petits amas cellulaires irréguliers d'aspect granuleux peut également être observée, ainsi que des images de petits syncytia. Après plusieurs passages sur cellules LLC-MK2, certaines souches produisent des plages de lyse (figure 11).



**Figure 11** (d'après [111]). **Effet cytopathogène d'une souche de hMPV (de sous-groupe B) sur cellules LLC-MK2.** A) cellules non infectées ; B) et C) cellules infectées à j8 et j12 : petites cellules et plages de lyse.

La lignée LLC-MK2 semble définitivement être la plus appropriée à l'isolement du hMPV à partir des prélèvements cliniques. Plusieurs équipes ont en effet comparé les cinétiques de répllication du hMPV sur les différentes lignées cellulaires permissives par technique de RT-PCR quantitative, et concluent à une meilleure efficacité de la culture sur cellules LLC-MK2 [166]. Reina *et al.* ont réussi à isoler la totalité des souches virales pour les échantillons pédiatriques testés positifs dans leur étude [167].

Les récentes évolutions dans le domaine des techniques de culture cellulaire ont notamment porté sur le développement de nouveaux formats de culture. Les cultures sur plaques 24 puits, avec centrifugation initiale de l'inoculum et couplage avec les techniques d'immunofluorescence en sont un exemple ; la détection pré-ECP de l'apparition d'antigènes viraux grâce à des anticorps monoclonaux marqués par une enzyme ou un fluorochrome constitue ainsi une avancée technique très intéressante et a d'ailleurs fait l'objet de publications. Citons l'étude de Landry *et al.* [168], dans laquelle l'infection a pu être détectée par un anticorps dès le deuxième jour d'une culture centrifugée de cellules LLC-MK2 ou Hep-2 pour 8 des 9 prélèvements positifs en RT-PCR.

## **2. La détection directe des antigènes viraux**

En pratique courante, le diagnostic conventionnel des infections respiratoires repose sur la mise en évidence de protéines virales directement dans les prélèvements à l'aide d'anticorps monoclonaux marqués. L'avantage majeur de ces techniques par rapport à la culture cellulaire est qu'elles peuvent être pratiquées sur un prélèvement dans lequel les virus sont inactivés, il y a donc moins de contraintes dans les délais d'acheminement au laboratoire. Cette possibilité doit malgré être tout relativisée, puisque l'intégrité des cellules nécessite d'être préservée.

Plusieurs types de techniques sont utilisés, et il existe aujourd'hui des kits commerciaux disponibles pour la détection du hMPV. Cependant, étant donné le faible recul par rapport à leur mise sur le marché, les études publiées à ce jour ont pour la plupart appuyé leurs travaux sur des techniques de mise au point « maison ».

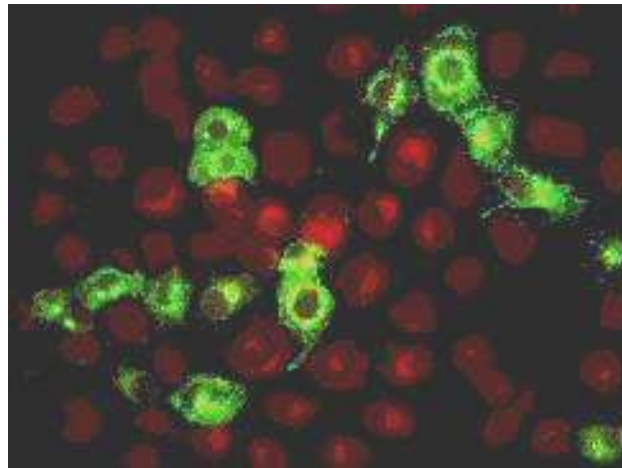
### **a) L'immunofluorescence directe**

L'immunofluorescence directe (IFD) consiste à détecter la présence d'antigènes viraux dans les prélèvements à l'aide d'anticorps monoclonaux (Acm) spécifiques marqués par la fluorescéine. Les cellules respiratoires, récupérées après centrifugation du prélèvement, sont déposées sur les différentes cupules d'une lame, puis les Acm spécifiques des virus respiratoires recherchés sont déposés sur ces cupules. La lecture des lames au microscope à fluorescence permet de mettre en évidence des inclusions vertes dans les cellules infectées (figure 12).

Cette technique, réservée aux laboratoires spécialisés, nécessite donc de disposer d'un microscope à fluorescence ; de plus, la lecture des lames est souvent délicate [168] et doit être

réalisée par un technicien expérimenté. Ses avantages sont considérables : le diagnostic est presque immédiat, le coût modéré, et la qualité du prélèvement est contrôlée par l'observation de la présence de cellules épithéliales.

Très récemment, les sociétés Argène et Oxoid ont mis sur le marché un anticorps monoclonal anti-hMPV.



**Figure 12. Cellules épithéliales nasopharyngées marquées en immunofluorescence directe par un anticorps monoclonal anti-hMPV.**

### **b) Les techniques immunoenzymatiques**

Ces tests consistent également à détecter la présence d'antigènes viraux à l'aide d'anticorps monoclonaux spécifiques, marqués cette fois par une enzyme, et adsorbés au fond des puits d'une microplaque. Un test est actuellement commercialisé (société par Biotrin). Néanmoins il n'y a pas eu d'étude réalisée à partir de spécimens cliniques, et la méthode n'est validée que pour la détection d'antigènes du hMPV à partir de cultures cellulaires [169].

Ces techniques immunoenzymatiques disposent d'une lecture standardisée, par conséquent plus objective que l'IFD. Néanmoins elles ne permettent pas de valider la qualité du prélèvement [169], et leur sensibilité est moindre.

### 3. La détection du génome viral par biologie moléculaire

Les techniques d'amplification des acides nucléiques sont toujours plus sensibles que les techniques traditionnelles de culture [170-172], y compris pour des virus cultivables sur lignées cellulaires « classiques ». C'est pourquoi elles remplacent progressivement la culture pour le diagnostic étiologique des infections respiratoires [172, 173], réduisant de moitié la proportion des épisodes restant d'étiologie indéterminée [174, 175]. Le gain de sensibilité et de spécificité vis-à-vis des autres procédures de détection antigéniques est également incontestable, et les nouveaux outils diagnostiques (notamment les tests rapides) sont désormais validés en les comparant aux techniques d'amplification génique [176].

La **PCR** (*polymerase chain reaction*) est la méthode d'amplification génique la plus répandue, et la majorité des protocoles décrits dans la littérature pour la détection du génome viral du hMPV utilise cette technologie. Les applications sont généralement de mise au point « maison », mais des offres industrielles existent désormais, avec des systèmes de détection conventionnels (par exemple le kit LightMix® de la société Tib-Molbiol) ou en temps réel. Plusieurs tests standardisés multiplex arrivent également sur le marché : Seeplex™ RV detection Kit de la société Seegene, Hexaplex® Plus de la société Prodesse, RespiFinder® de la société PathoFinder...

La technique **NASBA** (*nucleic acid sequence based amplification*) exploite un autre mode d'amplification, générant de multiples copies d'ARN. Ce procédé, développé par la société Biomérieux sous l'appellation NucliSENS, a été adapté au diagnostic du hMPV, et un kit commercial (Nuclisens EasyQ® hMPV), permettant une détection en temps réel, a très récemment vu le jour.

## VIII. RT-PCR en temps réel

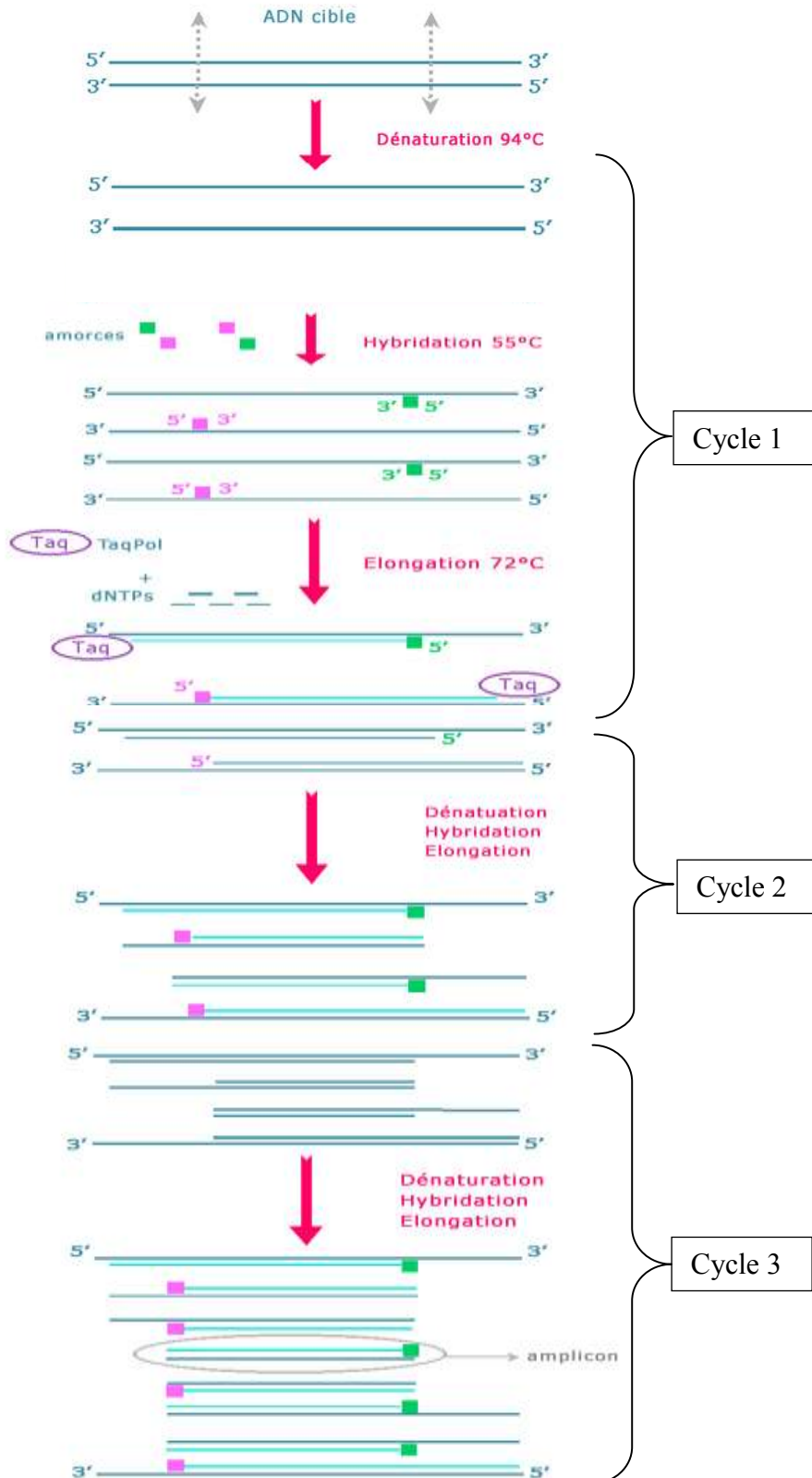
### A. L'amplification génique par PCR

#### 1. Principe

La méthode d'amplification de séquences nucléiques par PCR (*polymerase chain reaction*), décrite par Kary Mullis en 1983 [177], est basée sur la capacité de l'ADN polymérase à synthétiser le brin complémentaire d'un ADN servant de matrice. Pour initier le processus, un segment d'acide nucléique doit s'y associer afin de servir d'amorce. L'hybridation de l'amorce à sa séquence complémentaire sur l'ADN cible est suivie de son élongation par la polymérase, aboutissant à la synthèse d'un ADN double brin. La PCR consiste en une succession cyclique de 3 étapes (dénaturation thermique, hybridation des amorces et élongation) : à chaque cycle correspond le doublement du nombre de copies de la séquence cible (figure 13). L'amplification est donc exponentielle.

#### 2. Amplification à partir d'ARN : RT-PCR

La PCR est une technique qui amplifie des fragments d'ADN. Par conséquent, pour étudier l'ARN par PCR, il faut passer par une étape intermédiaire : la transcription inverse (*reverse transcription*, RT), qui convertit l'ARN en son ADN complémentaire (ADNc). On peut alors réaliser une PCR classique. L'ensemble des deux réactions (RT puis PCR) est plus communément appelé RT-PCR.



**Figure 13. Amplification d'une séquence d'ADN par PCR.**  
**Produits formés au cours des trois premiers cycles.**

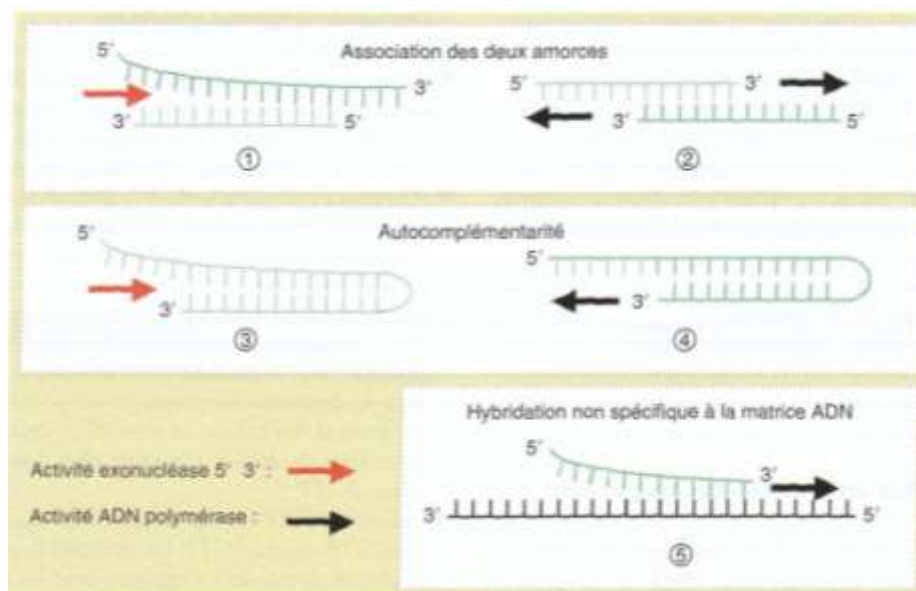
### 3. Construction des amorces

Les bornes de la séquence à amplifier sont déterminées par les deux amorces, chacune étant complémentaire d'un des brins à amplifier.

Certains critères doivent être respectés lors de la conception des amorces, à savoir :

- une longueur comprise entre 17 et 30 bases ;
- une absence d'autocomplémentarité (risque de formation de structures secondaires type « épingle à cheveux », par hybridation des amorces sur elles-mêmes) ;
- une absence de complémentarité entre elles (risque de formation de dimères) ;
- la partie 3' des amorces doit être instable, de façon à limiter les risques d'hybridation non spécifique (il faut donc éviter un T (dans l'idéal, G ou C)) ;
- une différence de  $T_m$  (température de fusion) entre les deux amorces inférieure à  $5^{\circ}\text{C}$ .

La compatibilité des amorces, à la fois avec les conditions de la PCR en temps réel et entre elles peut être vérifiée à l'aide de logiciels de dessin d'amorces disponibles sur Internet, comme PrimerQuest (IDT SciTools - <http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest>) : il s'agira d'éviter les « amorçages illégitimes », responsables d'une diminution de la spécificité et/ou de l'efficacité de la PCR (figure 14).



**Figure 14. Amorçages illégitimes.** Les phénomènes pouvant se produire sont : 1-2. Association de deux amorces : avec mésappariement : l'activité exonucléase  $5' \rightarrow 3'$  de la Taq ADN polymérase dégrade l'extrémité 5' de l'amorce ; sans mésappariement : l'ADN polymérase synthétise la séquence complémentaire, ce qui génère un dimère d'amorces. 3-4. Auto-complémentarité d'amorce : avec mésappariement : l'activité exonucléase  $5' \rightarrow 3'$  de la Taq ADN polymérase dégrade l'extrémité 5' de l'amorce ; sans mésappariement : l'ADN polymérase synthétise la séquence complémentaire. 5. Hybridation non spécifique à l'extrémité 3' de l'amorce avec extension par l'ADN polymérase.

#### 4. La température de fusion $T_m$

La connaissance de la température théorique de fusion «  $T_m$  » (*melting temperature*) d'un oligonucléotide est capitale pour déterminer sa température optimale d'hybridation à un ADN de séquence complémentaire.

Il s'agit de la température à laquelle 50% des oligonucléotides sont hybridés (hybride ADN simple brin : oligonucléotide) et 50% ne le sont pas.

Cette  $T_m$  dépend essentiellement de trois paramètres :

- la composition en bases : les séquences riches en G:C ont une  $T_m$  plus élevée que les séquences riches en A:T (du fait de la différence du nombre de liaisons hydrogène (trois *versus* deux), les liaisons G:C sont plus stables que les liaisons A:T ; donc plus il y a de paires de bases G:C dans un fragment d'ADN double brin, plus il faudra d'énergie pour séparer les deux brins) ;
- la longueur de la séquence ;
- la stringence du milieu : celle-ci varie en fonction du type et de la concentration des cations monovalents ( $\text{Na}^+$ ) présents (une haute force ionique augmente la  $T_m$  par stabilisation des ADN duplex).

La formule de calcul de la  $T_m$  la plus simple est celle de Wallace [178] :

$$T_m = [ 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C) ] \text{ (en } ^\circ\text{C)}.$$

Cette formule, valable pour les oligonucléotides de moins de 14 bases, est cependant approximative. Aussi, nous préférons utiliser la formule suivante (qui suppose que la réaction s'effectue en présence de 50 mM des cations  $\text{Na}^+$ ) :

$$T_m = 64.9 + 41 \times [ (G + C) - 16.4 ] / N \text{ (en } ^\circ\text{C)} ; \text{ où } N \text{ est le nombre de bases.}$$

Ce calcul peut être effectué au moyen de logiciels disponibles gratuitement sur Internet (par exemple sur le site <http://www.promega.com/biomath/calc11.htm>).

Il faut noter une donnée essentielle : la  $T_m$  est diminuée de  $5^\circ\text{C}$  par mésappariement.

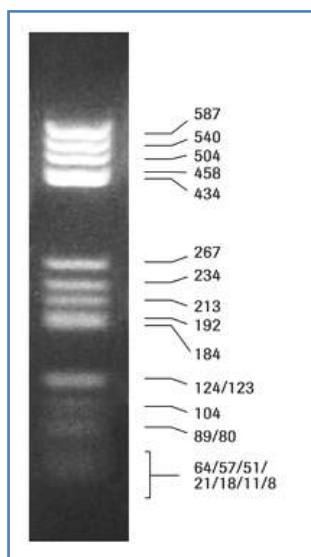
## B. Analyse des produits d'amplification

L'analyse des produits amplifiés répond à deux objectifs : d'une part la révélation de la présence de produits d'amplification, et d'autre part leur identification.

Selon la technologie utilisée, cette analyse sera effectuée en une ou plusieurs étapes.

### 1. Les techniques conventionnelles

Au cours d'une réaction de PCR dite « classique », les étapes d'amplification et d'analyse sont séparées : la détection des amplicons se fait après électrophorèse sur gel (le protocole est détaillé en annexe 3).



Cette technique est basée sur la séparation des acides nucléiques chargés négativement sous l'effet d'un champ électrique. Cette séparation s'effectue à travers la matrice d'un gel d'agarose ou de polyacrylamide : les molécules de plus petite taille se déplacent plus rapidement et migreront plus loin que les molécules de taille supérieure. La visualisation des bandes est rendue possible sous éclairage ultraviolet après révélation du gel par un agent intercalant fluorescent, le bromure d'éthidium (BET).

Un marqueur de poids moléculaire est migré en parallèle pour mesurer la taille du produit de PCR (figure 15).

**Figure 15. Marqueur de poids moléculaire V (Roche®) : de 8 à 587 paires de bases.**

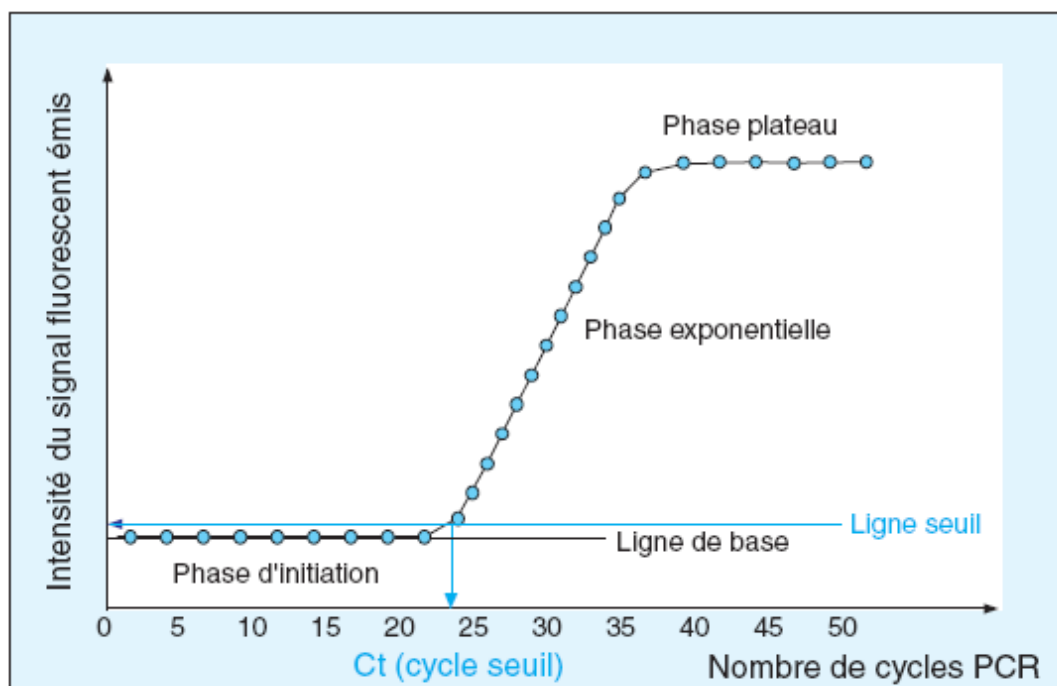
### 2. La PCR en temps réel

Dans la PCR en temps réel, l'amplification et la détection sont simultanées. Le principe de cette technique est fondé sur la détection en continu d'un signal fluorescent dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de produits amplifiés pendant la PCR.

### a) Règles d'interprétation

Les résultats sont présentés sous la forme d'une courbe d'allure sigmoïde. L'axe des abscisses correspond au nombre de cycles de PCR et l'axe des ordonnées à l'intensité de fluorescence, c'est-à-dire à la quantité de produits de PCR synthétisés (figure 16).

La ligne de base reflète l'intensité du bruit de fond de fluorescence. La ligne seuil (*threshold*) correspond au seuil de détection optique au-delà duquel la variation en intensité de fluorescence suit une loi exponentielle. Le point d'intersection de la courbe cinétique d'amplification avec la ligne seuil définit le cycle seuil ou Ct (*cycle threshold*), qui est directement lié à la quantité de cible initialement présente dans l'échantillon.



**Figure 16. Suivi en temps réel d'une réaction de PCR.**

Les critères de validation de la technique de PCR en temps réel sont :

- × l'allure générale des courbes d'amplification, de type sigmoïde (avec un point d'inflexion Ct, une phase exponentielle et une phase de plateau)
- × la négativité du témoin d'extraction ( $Ct > 45$ )
- × l'amplification des témoins positifs ( $Ct < 40$ )
- × l'amplification du contrôle interne ( $Ct < 40$ ), qui permet de vérifier l'absence d'inhibiteur de PCR dans chaque tube.

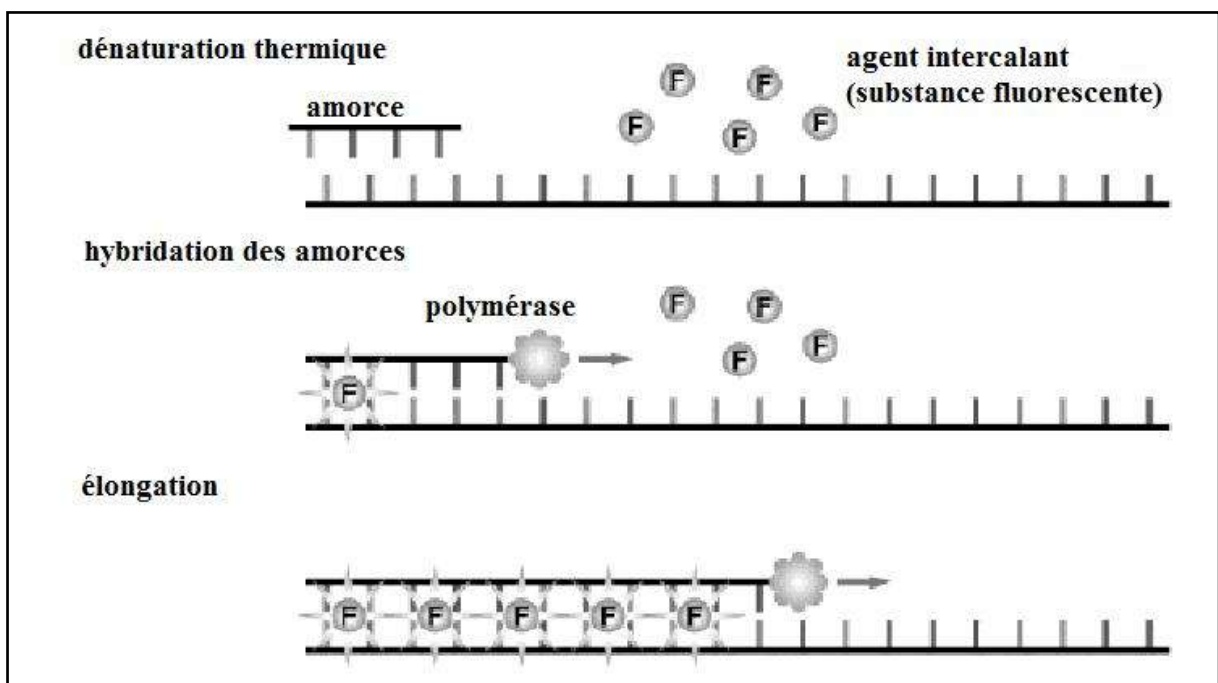
Cette technologie présente plusieurs avantages par rapport à la technique de PCR traditionnelle, notamment la réduction du risque de faux positifs (les tubes restent clos : absence de manipulation post-PCR), la possibilité de quantification et la facilité d'automatisation.

## b) Les systèmes de détection

Il existe deux principes généraux pour la détection des amplicons en temps réel : les agents intercalants se liant à l'ADN double brin (SYBR<sup>TM</sup> Green I) et le système des sondes d'hybridation fluorescentes.

### 1) SYBR<sup>TM</sup> Green I (figure 17)

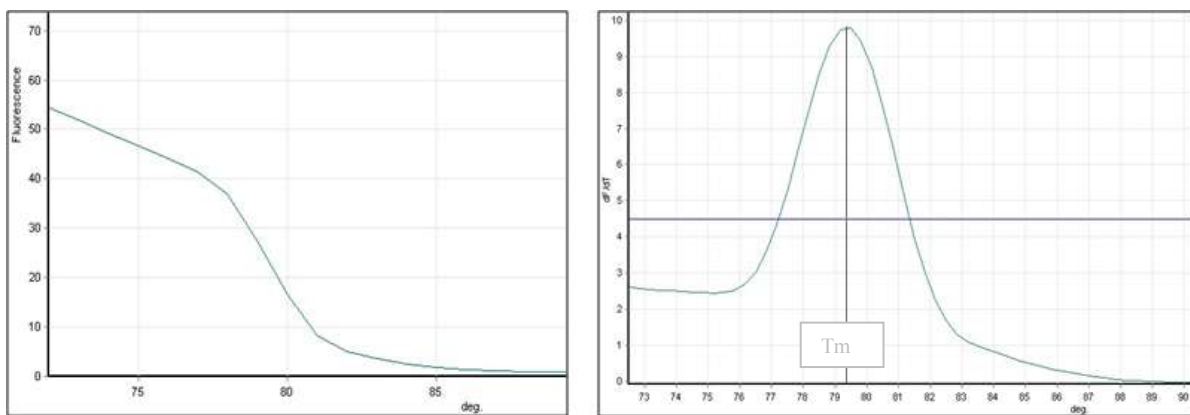
Le système de détection le plus simple repose sur l'inclusion d'un agent intercalant, le SYBR<sup>TM</sup> Green I, qui se lie à l'ADN double brin. A chaque étape d'hybridation et d'élongation d'un cycle de PCR, le SYBR<sup>TM</sup> Green I s'intercale entre les bases nucléotidiques de l'ADN double brin nouvellement synthétisé et peut émettre un signal de fluorescence après excitation par des rayonnements ultraviolets. La mesure de l'intensité du signal émis à la fin de chaque étape d'élongation permet le suivi cycle par cycle de la réaction de PCR.



**Figure 17. Agents se liant à l'ADN double brin.** Durant la dénaturation, le SYBR<sup>TM</sup> Green I libre exhibe peu de fluorescence. A la température d'appariement, quelques molécules se lient au double brin d'ADN naissant, résultant en une émission de fluorescence lors de l'excitation. Durant la phase de polymérisation, de plus en plus de molécules se lient au brin naissant et l'accroissement de la fluorescence peut être suivi en temps réel.

Cette technique ne nécessite aucune expertise particulière pour sa mise au point, est d'une grande facilité d'utilisation, très sensible, et économique.

Elle permet également, par l'établissement d'une courbe de fusion (figure 18), de déterminer la  $T_m$  des produits amplifiés. Après le dernier cycle de PCR, la température est rapidement élevée à 95°C pour dénaturer l'ADN double brin, puis elle est abaissée à la température de couplage, ce qui provoque la reformation d'ADN double brin. La température est ensuite élevée lentement à 95°C, la fluorescence étant lue en continu pendant cette remontée. Le SYBR<sup>TM</sup> Green I est fluorescent tant qu'il est lié à l'ADN double brin, mais quand la température augmente, l'ADN double brin se dissocie, libérant le SYBR<sup>TM</sup> Green I dans le milieu et entraînant par conséquent une diminution progressive de la fluorescence. Lorsque 50 % de l'ADN double brin est dissocié, la fluorescence chute brutalement : cette température correspond à la température de fusion du produit synthétisé (pic de la courbe obtenue en traçant la dérivée négative de la fluorescence en fonction de la température ( $-dF/dT$ )).



**Figure 18. Aspect d'une courbe de fusion réalisée par PCR en temps réel avec le SYBR<sup>TM</sup> Green I.** La valeur de  $T_m$  de l'amplicon est indiquée.

La principale limite de ce système est son défaut de spécificité : les agents intercalants marquent toutes les molécules d'ADN double brin, qu'elles soient spécifiques ou non de la séquence d'intérêt. L'autre limite relève du fait que l'intensité générée soit proportionnelle à la masse d'ADN double brin produite, et par conséquent à la taille des amplicons.

Les systèmes utilisant une sonde fluorogénique permettent de s'affranchir de ces limites : la production d'un signal de fluorescence est indépendante de la longueur du produit amplifié, et spécifique de l'amplicon détecté.

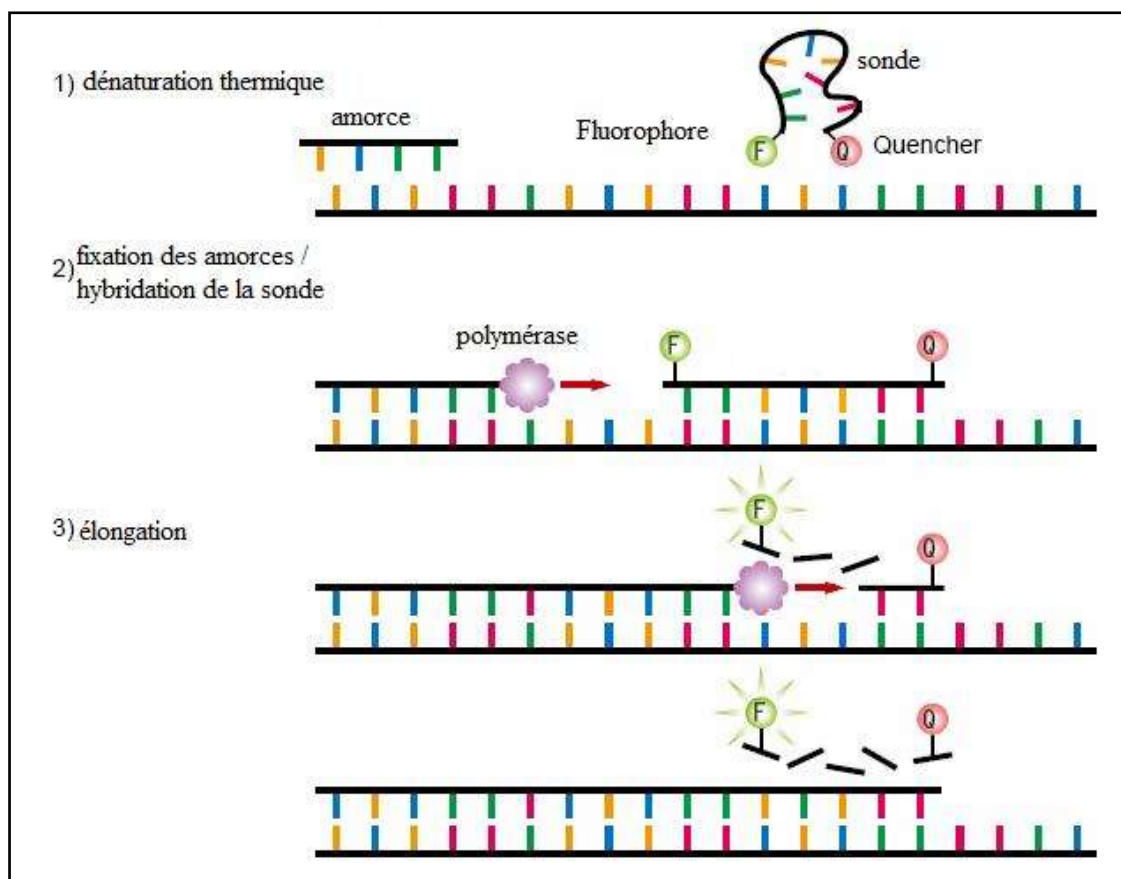
## 2) Détection à l'aide de sondes (figure 19)

Il existe différents systèmes de sondes d'hybridation, mais seule la technologie des sondes d'hydrolyse, utilisée dans notre travail, sera détaillée ci-après.

La technologie des sondes TaqMan<sup>TM</sup> est basée sur l'utilisation d'un fragment oligonucléotidique marqué par deux groupements fluorophores en ses extrémités. Un fluorophore émetteur (*reporter* : par exemple FAM, TET, JOE, HEX, VIC ou Cy5) est fixé à l'extrémité 5' de la sonde. Son émission est inhibée par un fluorophore suppresseur (*quencher*), dérivé de la rhodamine (TAMRA), et situé à l'extrémité 3'. Du fait de la petite taille de la sonde, les deux groupements fluorophores sont suffisamment proches pour autoriser entre eux un transfert d'énergie par résonance de fluorescence ou FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfert*) : le spectre d'émission du *reporter* chevauche le spectre d'excitation du *quencher*, le *quencher* absorbe l'énergie qui lui est transmise par le fluorophore donneur excité, et émet un signal à une longueur d'onde supérieure.

La particularité du système TaqMan<sup>TM</sup> est d'exploiter l'activité 5'-exonucléasique de l'ADN polymérase, qui permet d'hydrolyser la sonde hybridée à sa cible spécifique au cours de l'étape d'élongation. Le clivage de la sonde aura pour conséquence d'éloigner les deux fluorophores, de libérer le *reporter* de l'environnement du *quencher*, rétablissant ainsi l'émission de fluorescence du *reporter*. L'activité 5'-exonucléasique de la Taq polymérase étant spécifique de l'ADN double brin, les sondes libres en solution demeurent intactes et n'émettent aucune fluorescence à la longueur d'onde du *reporter*.

L'intensité de la fluorescence émise par le *reporter* est mesurée à la fin de l'étape d'élongation de chaque cycle d'amplification.



**Figure 19. Hydrolyse de sondes (TaqMan™).** (1) Durant l'étape de dénaturation, la sonde est libre en solution. (2) A la température d'appariement, la sonde et les amorces s'hybrident à leurs séquences cibles respectives et la proximité des fluorochromes permet l'inhibition de la fluorescence. La polymérisation débute. (3) La polymérase se déplace et hydrolyse la sonde. Le fluorochrome émetteur (F) est libéré de l'environnement du suppresseur (Q), permettant ainsi l'émission de fluorescence.

Le clivage de la sonde étant irréversible, le système TaqMan™ ne permet pas d'établir de courbe de fusion. Cependant, ces sondes ont l'avantage d'une spécificité accrue par rapport aux agents intercalants, ainsi qu'une meilleure capacité de multiplexage : en choisissant plusieurs sondes marquées par des fluorochromes *reporter* différents et dont les spectres d'émission sont suffisamment éloignés, il est possible de détecter plusieurs séquences distinctes au cours d'une même réaction de PCR.

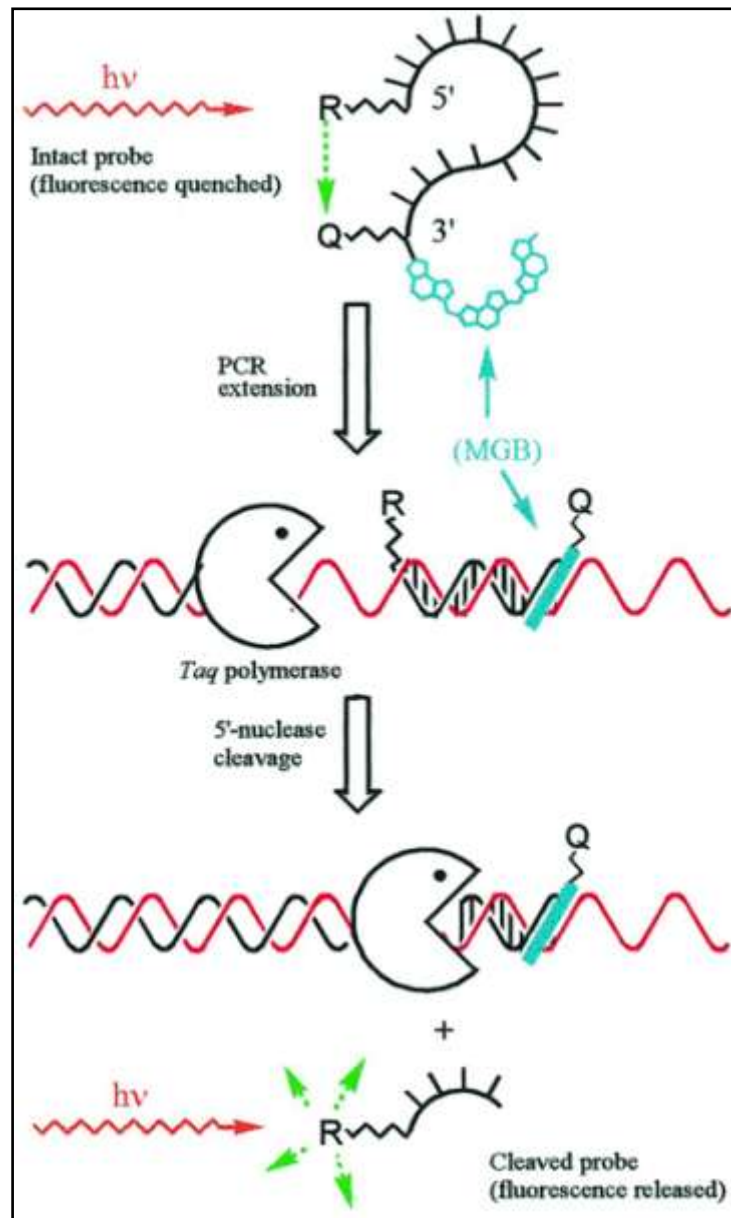
La construction d'une sonde TaqMan™ doit respecter les principes suivants :

- une longueur comprise entre 20 et 40 nucléotides ;
- un contenu en GC variant de 40 à 60% ;
- l'absence de séquence répétée ;
- l'absence de séquence chevauchante avec les amorces ;
- éviter les mésappariements du côté 5' (la sonde doit être accrochée fortement à sa cible pour permettre une meilleure efficacité de l'hydrolyse par l'activité 5'-exonucléasique de la Taq polymérase) ;
- une T<sub>m</sub> de 5 à 10°C plus élevée que celle des amorces (afin de s'assurer qu'elle s'hybridera avant les amorces et qu'elle demeurera hybridée pendant l'étape d'extension).

Un nouveau modèle de sondes d'hydrolyse, les sondes TaqMan™-MGB® (Eclipse® probes), a été récemment développé afin de pallier certaines limites du système TaqMan™. L'innovation porte sur l'introduction d'une molécule MGB (*Minor Groove Binder*) à l'extrémité 3' de la sonde. Le noyau MGB est une petite molécule en forme de croissant qui s'insère parfaitement dans le petit sillon de l'ADN double brin formé par la sonde et sa séquence cible. La molécule MGB® stabilise ainsi très fortement l'hybridation de la sonde (figure 20).

Cette augmentation de stabilité du duplex sonde / ADN cible se traduit par une augmentation importante de la T<sub>m</sub> [179], ce qui permet l'utilisation de sondes plus courtes (13 à 20 nucléotides). Kutuyavin *et al.* ont d'ailleurs montré que plus la sonde est courte, meilleure est la contribution du MGB® à la stabilité globale du duplex. La méthode gagne ainsi en sensibilité, grâce à l'augmentation du *quenching* (lui-même favorisé par l'emploi de sondes courtes), donc un faible bruit de fond. Elle gagne aussi en spécificité, puisqu'un mésappariement au sein du duplex (sonde / ADN cible) dans lequel s'insère le noyau MGB est particulièrement déstabilisant.

Ces sondes sont relativement chères comparées aux sondes TaqMan™ non modifiées.



**Figure 20. PCR en temps réel utilisant une sonde TaqMan™-MGB® [179].**

La sonde porte à l'extrémité 5' un *reporter* (R), et à l'extrémité 3' un *quencher* non fluorescent (Q) couplé à une molécule MGB. L'hybridation de la sonde avec la molécule d'ADN cible est stabilisée par la fixation de la molécule MGB au sein du petit sillon de la double hélice d'ADN. Pendant la phase d'élongation, la sonde est clivée par l'activité 5'-exonucléasique de la Taq polymérase, ce qui entraîne l'émission de fluorescence.

### 3. Le séquençage des amplicons

Le séquençage consiste à déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides d'un fragment d'ADN. Il permet de caractériser des produits d'amplification, donc de valider la spécificité de la réaction d'amplification (et par conséquent le choix de la cible et la conception des amorces).

Les amplicons détectés après réalisation d'un gel ne sont caractérisés que par leur poids moléculaire ; de même, avec la détection par SYBR™ Green I, les produits de PCR ne sont caractérisés que par leur  $T_m$ . L'identification avec certitude des produits d'amplification nécessite par conséquent de procéder à leur séquençage.

Le principe de la réaction de séquençage repose sur la méthode enzymatique de Sanger, dite des didésoxyribonucléotides ou de « terminaison de chaîne ». Une amplification par PCR, réalisée par une ADN polymérase dépourvue d'activité 5' → 3' exonucléasique, est effectuée en présence des dNTPs auxquels sont ajoutés quatre didésoxyribonucléotides marqués spécifiquement par des fluorophores différents (émission de fluorescence à quatre longueurs d'onde différentes : vert pour ddATP, bleu pour ddCTP, jaune pour ddGTP, et rouge pour ddTTP). Ces ddNTPs sont dénommés « terminateurs d'élongation » (« *BigDye Terminators* » ou « *Dye-labeled Terminators* »). Une fois incorporés à la nouvelle chaîne synthétisée, ils empêchent la poursuite de l'élongation, car la liaison phosphodiester avec un autre nucléotide est rendue impossible par l'absence de groupement hydroxyle sur leur carbone 3'. Il en résulte de nouveaux fragments d'ADN de taille variable, qui sont ensuite séparés par électrophorèse capillaire. Chaque base ayant un signal spécifique, ceci permet de l'identifier lors de son passage dans le faisceau d'un photomètre situé à la sortie du capillaire. L'analyse des signaux reçus, réalisée par un logiciel d'interprétation (par exemple SeqScape v 2.5), permet de reconstituer la séquence (figure 21).



**Figure 21. Electrophorégramme obtenu avec un automate de séquence.**

L'exploitation des résultats du séquençage des produits amplifiés nécessite l'utilisation de bases de données et de logiciels (d'accès libre sur Internet) :

- ✓ BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) est le logiciel le plus largement utilisé à des fins d'identification et de génotypage.  
Il s'agit d'un outil de recherche d'homologies entre une séquence et une banque de séquences (GenBank). La correspondance avec une souche donnée est déterminée par un 'score de similitude'.
  
- ✓ L'analyse des variations nucléotidiques, qui trouve son application dans les domaines de la phylogénie moléculaire et surtout dans l'investigation d'épidémies (recherche de polymorphisme et distinction des épisodes de rechute *versus* réinfection), est réalisée à l'aide de multiples outils. Nous utiliserons le logiciel MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) qui permet, après alignement de plusieurs séquences d'ADN, de reconstituer leurs relations phylogénétiques. Ce système utilise l'algorithme de « neighbour-joining » (estimation des distances évolutives entre les diverses séquences d'ADN comparées) pour constituer un arbre dont la longueur totale des branches est minimale. La robustesse de la phylogénie obtenue est déterminée par le « bootstrap » : la robustesse est d'autant plus élevée que le *bootstrap* est important.

---

## **Matériels & Méthodes**

# I. Matériels

## A. Patients

### 1. Caractéristiques générales de la population étudiée

Les échantillons cliniques ont été recueillis sur une période de 5 mois, allant de novembre 2006 à mars 2007.

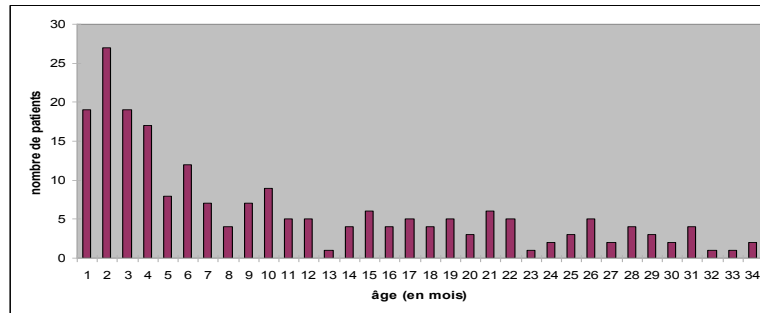
Nous avons restreint notre étude aux infections respiratoire d'étiologie indéterminée chez les enfants âgés de moins de trois ans à la date de réalisation du prélèvement et avons sélectionné exclusivement les prélèvements provenant de patients admis au CHU de Nantes à l'occasion d'un épisode infectieux.

Les motifs d'hospitalisation ont été retrouvés rétrospectivement sur les courriers médicaux de sortie des patients. Les arguments ayant motivé la prescription d'une analyse virologique de prélèvement respiratoire étaient : la présence de signes d'infection respiratoire haute dans 40% des cas, des signes d'infection respiratoire basse dans 27% des cas ; la fièvre était présente (seule ou accompagnant la symptomatologie respiratoire) chez 52% des patients.

Au total, 247 prélèvements ont été testés au cours de notre étude ; ils correspondent à 226 épisodes infectieux respiratoires distincts et concernent 213 patients différents. Certains enfants ont en effet été plusieurs fois prélevés au cours d'un même épisode, l'étiologie de ce dernier demeurant indéterminée.

Les principales caractéristiques démographiques de la population étudiée sont répertoriées ci-dessous:

- âge médian : 6 mois (moyenne à 9,9 +/- 9,5 mois), la répartition est illustrée sur la figure 22.
- sex-ratio : 66% (1,5 fille pour 1 garçon)
- hospitalisation : 77% des cas.



**Figure 22. Répartition par âges des patients sélectionnés.**

Les critères cliniques, biologiques et radiologiques ont été extraits des dossiers des patients.

Nous avons retenu les éléments suivants :

- les facteurs de risque ou liés au terrain (la prématurité < 36 semaines d'aménorrhée, l'atopie personnelle ou familiale) ;
- les motifs d'hospitalisation (dyspnée, toux, fièvre > 38°C, nausées, diarrhée, vomissements, convulsions) ;
- les symptômes dominants au cours de l'hospitalisation (fièvre, toux, signes de lutte, sibilance, saturation transcutanée en oxygène (SaO<sub>2</sub>) < 95%, difficultés alimentaires) ;
- les mesures thérapeutiques (antibiothérapie, oxygénothérapie) ;
- les paramètres biologiques (taux d'hémoglobine < 11 g/dl ; neutropénie < 500/μl ; CRP (protéine C-réactive) > 10 mg/l)
- la radiographie thoracique éventuellement pratiquée ('distension thoracique', 'foyer systématisé', 'syndrome bronchoalvéolaire' ou 'absence d'anomalie').

## 2. Nature des prélèvements

Les prélèvements respiratoires analysés ont été des aspirations nasopharyngées (AN), qui représentent la majorité des prélèvements à visée diagnostique pour la recherche des virus respiratoires. Leur prise en charge au laboratoire de virologie du CHU de Nantes est détaillée en annexe 1.

Les aspirations nasales sont d'abord fluidifiées avec du milieu de transport pour virus. Une partie est centrifugée afin de procéder à la détection par immunofluorescence directe, à partir du culot cellulaire, des virus suivants : VRS, virus parainfluenza-3, adénovirus, virus grippaux A et B, à l'aide d'anticorps monoclonaux spécifiques (marqués par la fluorescéine). Une autre partie de l'échantillon est utilisée pour l'isolement des virus en culture cellulaire. Des flasques Hep-2 et MRC-5 (fibroblastes diploïdes issus de poumons fœtaux humains) sont inoculées et

conservées respectivement une et trois semaines, avec une observation régulière à la recherche de l'apparition d'un ECP : les virus détectés sont les VRS, adénovirus, entérovirus ainsi que certains sérotypes de rhinovirus. En période d'épidémie grippale, une lignée cellulaire MDCK (lignée continue de cellules rénales de chien) est également inoculée.

Un aliquot de l'échantillon est systématiquement conservé 3 mois à  $-80^{\circ}\text{C}$ . C'est à partir de cette « échantillothèque » que nous avons sélectionné les spécimens d'intérêt pour notre étude, à savoir les échantillons négatifs pour l'ensemble des recherches virologiques et bactériologiques effectuées en routine.

## B. Témoin positif hMPV

Le témoin positif nous a été aimablement fourni par le laboratoire de Virologie du CHU de Caen, service du Dr Freymuth, sous la forme d'un surnageant de culture sur lignée cellulaire LLC-MK2 d'une souche de hMPV de sous-groupe B.

## C. Panels QCMD

Le programme d'évaluation externe de la qualité QCMD (*Quality Control for Molecular Diagnostics*) est organisé en collaboration avec les sociétés savantes ESCV (*European Society for Clinical Virology*) et ESCMID (*European Society for Clinical Microbiology & Infectious Diseases*). Il est distribué annuellement, sous la forme de panels d'échantillons. Dans notre étude, nous avons utilisé les panels 2007 suivants : hMPV & VRS (détaillé dans le tableau 5), rhinovirus & coronavirus ; influenza A & B, ainsi que le panel adénovirus.

Echantillon	Contenu*	Dilution de la souche*	Résultats attendus
CQ01	hMPV - A	$1 \times 10^{-6}$	Positif
CQ02	VRS - A	$1 \times 10^{-2}$	Positif (fort)
CQ03	hMPV - A	$1 \times 10^{-4}$	Positif (fort)
CQ04	VRS - A	$1 \times 10^{-5}$	Positif (fort)
CQ05	hMPV - B	$1 \times 10^{-6}$	Positif (faible)
CQ06	hMPV - B	$1 \times 10^{-4}$	Positif
CQ07	hMPV - B	$1 \times 10^{-5}$	Positif
CQ08	VRS - B	$1 \times 10^{-4}$	Positif
CQ09	VRS - A	$1 \times 10^{-4}$	Positif (fort)
CQ10	VRS - B	$5 \times 10^{-4}$	Positif
CQ11	VRS - A	$1 \times 10^{-3}$	Positif (fort)
CQ12	VRS/hMPV négatifs		Négatif

**Tableau 5. Composition du panel QCMD 2007 hMPV & VRS. \*surnageants de culture (dilués dans du milieu de transport pour virus).**

## II. Méthodes

Nous avons choisi de développer une technique de détection du hMPV par RT-PCR en temps réel. Toute technique d'amplification génique procède par étapes :

- Extraction de l'acide nucléique
- (Transcription inverse de l'ARN en ADNc)
- Amplification de l'ADN par PCR
- Détection des produits amplifiés

### A. Choix de la cible

Le choix de la cible est l'étape clé de la mise en place d'une technique de détection par biologie moléculaire. La définition de la cible débute par la sélection du gène, puis par la localisation au sein de ce dernier de séquences spécifiques du hMPV, qui soient les plus conservées entre les différentes souches.

La majorité des protocoles de RT-PCR décrits dans la littérature pour la détection du hMPV amplifie des fragments de séquences des gènes N, M, P ou F. Les techniques les plus récentes permettent la détection des deux sous-groupes majeurs et des quatre sous-groupes mineurs avec des niveaux de sensibilité équivalents [180]. Sur la base d'une revue de la littérature, nous avons décidé de développer une technique de RT-PCR en temps réel ayant pour cible le gène N. En effet, ce gène est l'un des plus conservés parmi les différents sous-groupes de hMPV [23]. De plus, l'étude publiée en 2003 par l'équipe canadienne de Côté (évaluation comparative des performances analytiques de techniques de RT-PCR ciblant les gènes N, M, P, F et L du hMPV [181]) conclut à la supériorité des techniques ayant pour cible le gène N.

Notre choix initial a été d'adapter une technique de RT-PCR en temps réel décrite en 2005 par Bouscambert-Duchamp *et al.* (CHU de Reims) [182]. La cible, d'une longueur de 200 paires de bases, est située au sein du gène N (1185 paires de bases). Nous avons déterminé sa position d'après la référence [23], en nous basant sur la souche référencée CAN98-79 (numéro d'accèsion GenBank AY145285). La séquence cible est ainsi constituée des nucléotides 575 à 774.

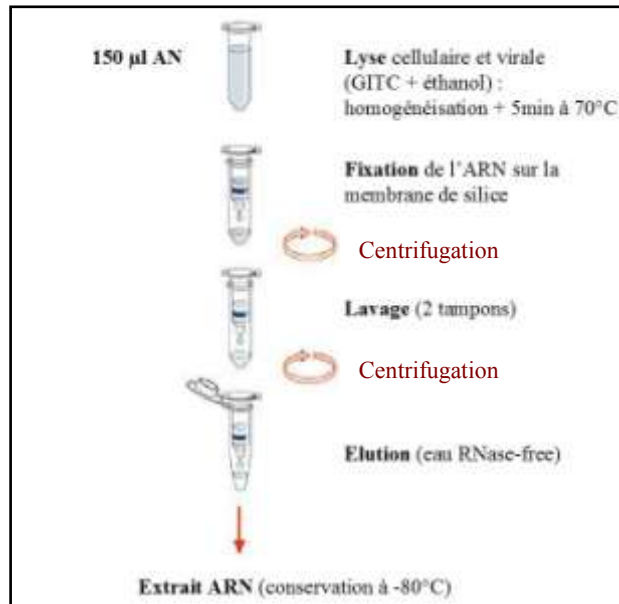
## B. Extraction de l'ARN total

La recherche d'un génome viral au sein d'un prélèvement biologique implique une étape initiale d'extraction des acides nucléiques totaux. Cette étape est cruciale, puisqu'elle conditionne la qualité des acides nucléiques obtenus, dont dépendent toutes les étapes ultérieures. Elle constitue aussi l'étape la plus longue et la plus laborieuse, bien qu'elle fasse appel à des kits d'extraction, car c'est à ce stade que sont susceptibles de survenir des contaminations croisées. Ce risque est limité en réalisant les extractions par petites séries (au maximum 20 échantillons), dans une pièce « blanche », sous hotte à flux laminaire. Afin de dépister une éventuelle contamination, un témoin d'extraction est inclus dans chaque série, avec ajout d'eau « RNase free » en lieu et place d'un échantillon.

Les ARN étant fragiles, nous avons également veillé à limiter au maximum le risque de contamination externe par des RNases, en appliquant les précautions standard (port de gants, revêtement d'une casaque). Les extraits ont été conservés à - 80°C.

Après décongélation des échantillons, nous avons réalisé les extractions avec le kit NucleoSpin® RNA Virus (Macherey-Nagel), utilisé selon les recommandations du fournisseur. Le protocole est détaillé en annexe 2.

- L'étape initiale d'homogénéisation et de lyse cellulaire est effectuée grâce à l'usage combiné du thiocyanate de guanidium (GITC) et du bêta-mercaptoéthanol, qui permettent la dissociation des protéines, la lyse des cellules, l'inactivation des RNases et la dénaturation de l'ARN ;
- L'isolement est réalisé sur support solide. En présence de sels chaotropiques (NaI, GITC), d'alcool et en milieu acide, les acides nucléiques s'adsorbent sur la membrane de silice. La séparation est effectuée par centrifugation (figure 23) ;
- Après lavage, l'ARN est élué de son support à l'aide d'un tampon à faible force ionique. Les éluats doivent être conservés à une température inférieure ou égale à - 20°C.



**Figure 23. Protocole d'extraction de l'ARN par centrifugations.**

## C. Transcription inverse et amplification (RT-PCR)

### 1. Appareillage

L'automate utilisé dans notre étude est le RotorGene 3000® (Corbett Research).

Cet appareil combine 2 unités : le thermocycleur, qui assure les changements de température grâce à un système à air pulsé ; le module de détection, un spectrofluorimètre de type LED (« *light emitting diode* »), assure la mesure des signaux de fluorescence émis. Le mélange réactionnel est déposé dans des microtubes de 200 µL qui s'adaptent sur un carrousel dont la capacité est de 36 ou de 72 échantillons.

### 2. Oligonucléotides

Nous avons procédé à la commande des amorces et sonde décrites dans la publication [182].

Les séquences sont donc les suivantes :

**Amorce SENS (n°1) :** (575) 5' GTGATGCACTCAAGAGATACCC 3' (596)  
(22 nucléotides ; GC% 50 ; Tm 55°C)

**Amorce ANTISENS (n°1) :** (774) 5' CATTGTTTGACCGGCCCCATAA 3' (753)  
(22 nucléotides ; GC% 50 ; Tm 55°C)

**SONDE (n°1) :** (690) 5' FAM-CTTTGCCATACTCAATGAACAAAC-TAMRA 3' (665)  
(24 nucléotides ; GC% 37,5 ; Tm 52°C)

Les oligonucléotides ont été commandés auprès de la société Eurogentech. Ces amorces et sonde sont fournies sous forme lyophilisée. Elles sont reconstituées avec de l'eau stérile (eau pour préparation injectable), selon les recommandations du fournisseur, de façon à obtenir une solution mère de 200  $\mu\text{M}$  (stockée à  $-20^{\circ}\text{C}$ ).

### 3. Mélange réactionnel

#### a) Master Mix

Le kit retenu pour le développement de notre technique est le kit One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit (Perfect Real Time), distribué par la société Takara. Il s'agit d'un kit de RT-PCR prêt à l'emploi : il contient tous les éléments indispensables à la réalisation de la PCR, c'est-à-dire les désoxyribonucléotides (dNTPs : dATP, dCTP, dTTP, dGTP), le cation  $\text{Mg}^{2+}$ , la PrimeScript™ *reverse transcriptase* et la TaKaRa Ex Taq™ HS *DNA polymerase* « Hot Start », ainsi qu'un tampon et des stabilisants. La préparation du mélange réactionnel est par conséquent simplifiée, puisqu'il suffit de rajouter les amorces, la (ou les) sonde (s) et l'extrait ARN. Le kit existe sous deux formes, avec et sans SYBR™ Green I dans le tampon.

- L'ADN polymérase est de type « hot start », c'est-à-dire qu'elle est complexée par un anticorps qui bloque l'activité polymérase à température ambiante. Cette activité est restaurée après l'étape de dénaturation à  $95^{\circ}\text{C}$ . Le démarrage « hot start » améliore la spécificité, la sensibilité et le rendement de la PCR.
- La transcriptase inverse (*reverse transcriptase*, RT) est une ADN polymérase 5' → 3'ARN-dépendante. L'enzyme incluse dans le kit est dépourvue d'activité RNase H : la matrice ARN n'étant pas détruite, l'enzyme agit avec un meilleur rendement. Elle présente également une excellente stabilité thermique.

Nous avons systématiquement préparé le mélange réactionnel sous la forme d'un « Master Mix » (pour un minimum de 10 réactions de PCR). La distribution des réactifs est ainsi plus précise, et les erreurs de pipetage diminuées par minimisation des étapes. Ceci est crucial pour l'optimisation d'une technique de biologie moléculaire : les conditions de réaction doivent être parfaitement reproductibles, afin de pouvoir évaluer l'impact de la variation d'un seul paramètre.

### **b) Mg<sup>2+</sup>**

L'ion Mg<sup>2+</sup> est un cofacteur indispensable de la Taq polymérase. Ce cation bivalent interagit avec les charges négatives de la chaîne d'ADN. En limitant les forces de répulsion entre les brins d'ADN, il favorise la stabilité de l'hybridation. Plus la concentration en Mg<sup>2+</sup> est importante, plus l'hybridation est facilitée, que celle-ci soit spécifique ou non. C'est pourquoi il est important d'en déterminer la concentration optimale dans le milieu réactionnel. Nous l'avons utilisé dans nos travaux sous la forme d'une solution de MgSO<sub>4</sub>.

### **c) Contrôle interne d'amplification - IPC**

L'IPC (*Internal Positive Control*) est un témoin interne de RT-PCR en temps réel. Il permet de vérifier l'absence d'inhibiteur dans chaque tube. Il s'agit d'une matrice ARN (Amplimer pAW109), commercialisée par Applied Biosystems, avec son couple d'amorces et sa sonde (marquée par le fluorochrome VIC). Cet IPC est utilisé à la concentration de 1000 copies/réaction. Il est conservé à -20°C.

### **d) Protéine T4Gene 32**

Cette protéine de liaison à l'ADN simple brin, issue du phage T4, améliore le rendement et l'efficacité des réactions de transcription inverse. Elle est commercialisée par USB Corp et conservée à -20°C.

## **4. Profil des cycles de température**

La programmation initiale des cycles de RT-PCR a été effectuée selon les recommandations du fournisseur du mélange réactionnel :

- \* étape de transcription inverse : 5 min à 42°C
- \* étape de dénaturation : 10 sec à 95°C
- \* cycles d'amplification (45 répétitions) :
  - 5 sec à 95°C (dénaturation)
  - 20 sec à 60°C (hybridation)
  - 15 sec à 72°C (élongation).

## **D. Révélation des produits d'amplification**

L'objectif de notre travail était la mise au point d'une technique de détection « en temps réel », à l'aide de la technologie des sondes d'hydrolyse TaqMan™. L'optimisation de la technique a nécessité le recours à d'autres méthodes de révélation, puisque nous avons aussi utilisé le SYBR™ Green I, ainsi que l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide des produits d'amplification.

Toutes ces méthodes ont été décrites dans le chapitre des Généralités consacré à la RT-PCR en temps réel.

## **E. Séquençage des produits d'amplification**

Les fragments amplifiés sont dans un premier temps soumis à l'action d'une exonucléase (exonucléase I recombinante Eso SAP-IT® de la société USB Corp). Ils sont ensuite purifiés par transfert sur une membrane en fibres de verre, suivi d'un lavage par l'éthanol et une solution aqueuse, avant d'être soumis à une seconde réaction de PCR, avec incorporation des ddNTPs marqués à chaque acide nucléique néosynthétisé. Le kit Big Dye® Terminator Cycle (Applied Biosystems) a été utilisé dans notre étude. Une nouvelle purification des échantillons est effectuée avant leur traitement par électrophorèse capillaire (précipitation de l'ADN par l'éthanol-EDTA à l'aide du kit QIAquick™ PCR purification kit de Qiagen). Le séquenceur automatique utilisé est le ABI Prism™ 3130. Les données recueillies lors de la résolution de la migration sont transférées sur un serveur informatique, à partir duquel les séquences sont lues et analysées (logiciel SeqScape v 2.5).

Les logiciels d'exploitation utilisés aux fins d'identification et d'analyse phylogénétique (respectivement BLAST et MEGA) ont déjà fait l'objet d'un paragraphe descriptif au chapitre des Généralités (p.67).

---

# Résultats

# I. Mise au point de la RT-PCR en temps réel

## A. RT-PCR en temps réel initiale

Nous avons dans un premier temps importé la technique de RT-PCR en temps réel décrite par Bouscambert-Duchamp *et al* [182].

Le transfert de cette technique a nécessité quelques adaptations, le thermocycleur utilisé étant différent, ainsi que le kit choisi pour la préparation des mélanges réactionnels.

### 1) Rappel des conditions opératoires

#### a) Séquences des oligonucléotides :

Amorce SENS (n°1) : 5' GTGATGCACTCAAGAGATACCC 3'

Amorce ANTISENS (n°1) : 5' CATTGTTTGACCGGCCCCATAA 3'

SONDE (n°1) : 5' FAM-CTTTGCCATACTCAATGAACAAAC-TAMRA 3'

#### b) Composition du mélange réactionnel :

La préparation du mélange réactionnel a été réalisée avec le kit One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit (Perfect Real Time)™ de Takara. Le calcul des volumes des différents constituants du mélange est effectué de façon à obtenir les concentrations finales suivantes (pour un volume réactionnel total de 25µL) :

- tampon : 1X (à partir du 2X One Step RT-PCR Buffer III)
- amorces : 300 nM
- sonde : 200 nM
- TaKaRa Ex Taq™ HS : 0,1 U/µL
- PrimeScript™ RT enzyme Mix II : 0,1 U/µL
- T4Gene : 0,04 g/L
- IPC : - matrice ARN : 40 copies/µL
  - amorces : 0,15 µM
  - sonde : 0,08 µM
- eau RNase free qsp 20 µL ;

5 µL d'extrait ARN sont ajoutés à ce mélange.

### c) Profil des cycles de températures :

La programmation initiale des cycles de PCR a été effectuée de la façon suivante :

- \* Transcription inverse : 5 min à 42°C
- \* Dénaturation : 10 sec à 95°C
- \* Cycles d'amplification (45 répétitions) :
  - étape 1 (dénaturation) : 5 sec à 95°C
  - étape 2 (hybridation des amorces et de la sonde) : 20 sec à 60°C
  - étape 3 (extension des amorces) : 15 sec à 72°C

L'acquisition de la fluorescence sur les canaux "Yellow" (émission du fluorochrome VIC, correspondant à l'IPC), et "Green" (émission du fluorochrome FAM, marquant la sonde hMPV n°1) est réalisée à la fin de chaque étape d'élongation.

## 2) Analyse des résultats

Notre premier essai a été réalisé à partir de l'extrait du témoin positif pur, ainsi que sur ses dilutions au 1/5<sup>e</sup> et au 1/10<sup>e</sup>, un témoin d'extraction et un témoin négatif de PCR (eau RNase free au lieu des 5 µL d'extrait).

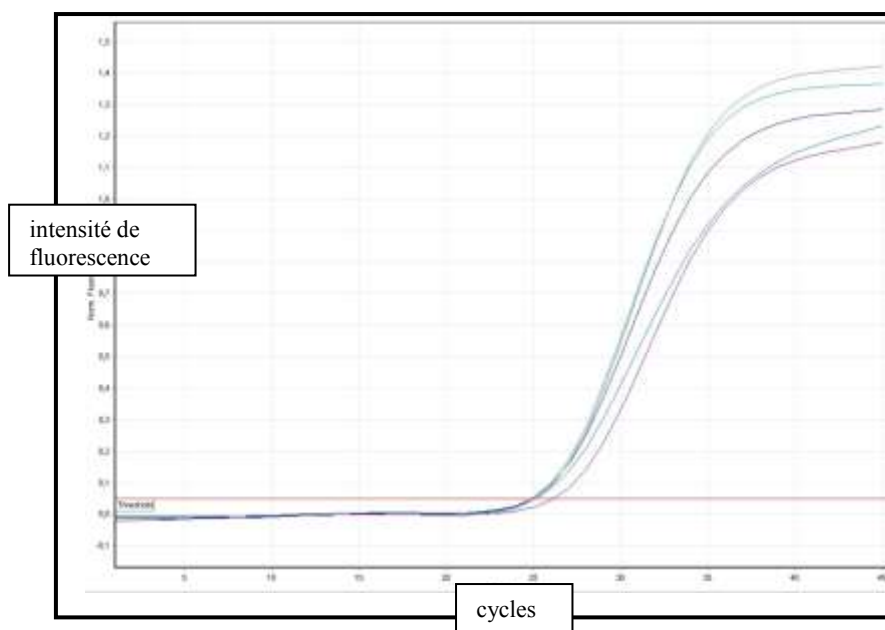
Au cours de cette première amplification, aucun signal n'a été obtenu sur le canal Green, correspondant à la sonde hMPV. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer l'absence de détection de produits d'amplification :

- S'agit-il d'un défaut de **détection** par la sonde ?
- L'**amplification** de la cible a-t-elle été effective ?
- S'agit-il d'un défaut de l'étape de **transcription inverse** ?
- Le problème réside-t-il en amont, à savoir l'étape d'**extraction** de l'ARN ?

Les étapes de notre mise au point ont consisté à trouver réponse à ces différentes interrogations.

**a) Validation des étapes précédant la détection en temps réel :**

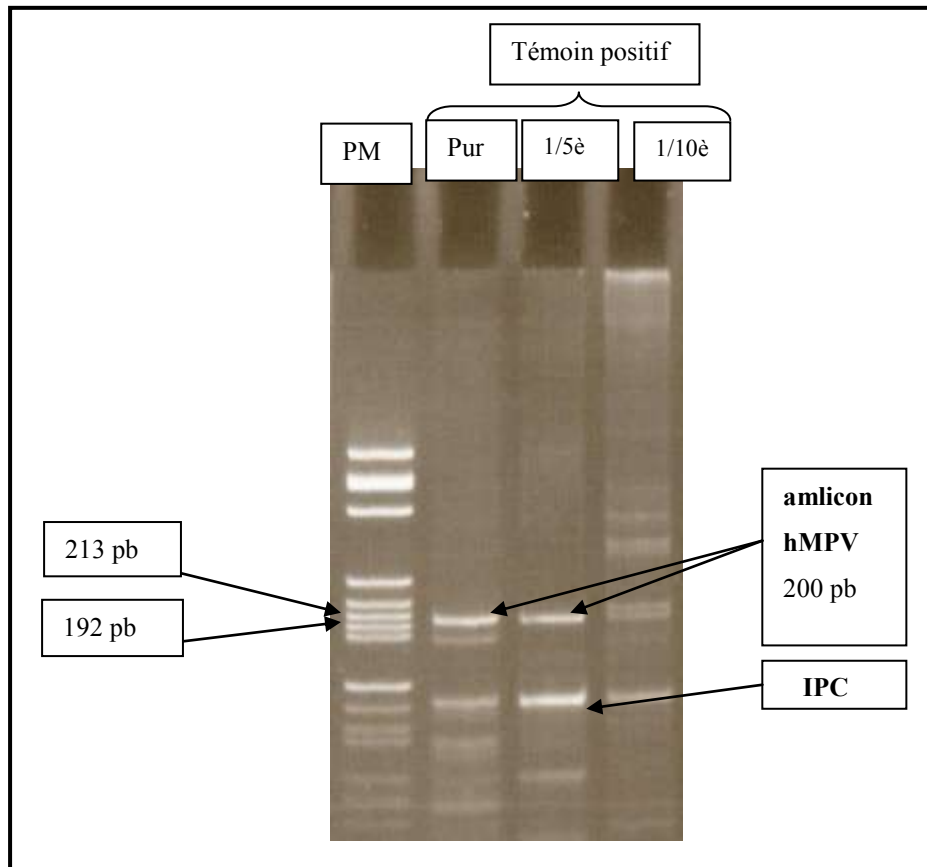
L'amplification du témoin interne (IPC) a été détectée dans l'ensemble des tubes réactionnels, ainsi que le montrent les courbes de fluorescence acquises sur le canal Yellow (figure 24).



**Figure 24. Courbes de fluorescence obtenues sur le canal Yellow, correspondant au témoin interne d'amplification.**

Nous pouvons donc écarter l'éventuelle responsabilité d'inhibiteurs de RT-PCR dans l'échec de notre premier essai.

Afin de déterminer s'il y a eu ou non génération de produits d'amplification, nous avons réalisé une électrophorèse des produits de la RT-PCR sur un gel de polyacrylamide (figure 25).



**Figure 25. Electrophorèse des produits d'amplification générés au cours du premier essai de RT-PCR.** 'PM' correspond au marqueur de poids moléculaires. Les emplacements des bandes correspondant à des fragments d'ADN de 192 et 213 paires de bases (pb) sont indiqués.

Nous observons sur le gel la présence de bandes correspondant à des produits d'amplification dont la taille correspond à celle de l'amplicon escompté, c'est-à-dire 200 paires de bases.

La spécificité de cette amplification a ensuite été confirmée par le séquençage de ces amplicons : la séquence obtenue présente 100% d'homologie avec la souche de « métapneumovirus humain » référencée sur GenBank sous le numéro d'accèsion AY355328, de génotype B1.

L'amplification du fragment ciblé a donc été effective, de même que l'ensemble des étapes en amont (à savoir l'extraction de l'ARN total et la transcription inverse). Le problème réside donc dans l'étape de détection.

### b) Analyse de l'étape de détection

Après alignement de la séquence de notre sonde (n°1) avec sa séquence cible sur la souche AY355328, nous mettons en évidence trois mésappariements, expliquant vraisemblablement l'absence d'hybridation de la sonde (tableau 6) :

1 -	5' CTTTGCCATACTCAATGAACAAAC 3'
2 -	3' GAAA <u>A</u> GG <u>C</u> ATGAGTTACTT <u>A</u> TTTG 5'

**Tableau 6.** Séquences nucléotidiques 1) de la sonde (n°1) et 2) de sa séquence complémentaire sur le génome du témoin positif (souche AY355328), de génotype B1.

La sonde (n°1) n'est donc pas adaptée pour le recrutement de l'ensemble des sous-groupes de hMPV, puisqu'elle ne peut pas s'apparier à une séquence de génotype B.

Il nous faut redessiner la sonde, en tenant compte de toutes les variations nucléotidiques susceptibles d'intervenir au sein de la séquence cible pour l'ensemble des souches de hMPV, quelque soit leur génotype.

## B. Optimisation de la RT-PCR en temps réel

Depuis la publication de l'étude sur laquelle nous nous sommes appuyés, de nombreuses souches de hMPV ont été isolées, séquencées puis répertoriées dans la base de données GenBank. Nous avons donc effectué un alignement de la totalité des séquences de hMPV disponibles sur GenBank correspondant à notre fragment cible au sein du gène N. L'objectif poursuivi au départ était de redessiner la sonde, mais nous avons également décidé d'exploiter cet alignement afin d'optimiser le choix des amorces, puisque la présence de variations nucléotidiques au sein de leur zone d'hybridation a également été montrée.

## 1. Optimisation des amorces

En fonction des génotypes (A1, A2, B1 et B2), nous mettons en évidence des variations nucléotidiques en positions 588, 755, 765 et 768 (figure 26). Nous décidons donc de dessiner des amorces « consensus », à l'aide de nucléotides dégénérés, afin d'autoriser le recrutement de l'ensemble des souches décrites de hMPV. Selon la nomenclature des bases dites « dégénérées », recommandée par l'IUB (International Union for Biochemistry), Y correspond à toute base pyrimidine (T ou C) et R à toute base purine (A ou G). K correspond à G ou T.

Amorce sens – HMPV S (n°1) :	5' GTGATGCACTCAA <b>G</b> AGATACCC 3'
	(22 nucléotides ; positions 575 à 596 ; GC% 50 ; Tm 55°C)
Génotypes A1 ( <i>n</i> = 18)	GTGATGCACTCAA <b>G</b> AGATACCC
Génotypes A2 ( <i>n</i> = 25)	GTGATGCACTCAA <b>A</b> AGATACCC
Génotypes B1 ( <i>n</i> = 20)	GTGATGCACTCAA <b>A</b> AGATACCC
Génotypes B2 ( <i>n</i> = 16)	GTGATGCACTCAA <b>A</b> AGATACCC
→ <u>Amorce sens (n°2) :</u>	<u>GTGATGCACTCAA<b>R</b>AGATACCC</u>
	(22 nucléotides ; positions 575 à 596 ; GC% 47,7 ; Tm 53,9°C)
Amorce antisens – HMPV AS (n°1) :	5' CA <b>T</b> TGTTTGAC <b>C</b> <b>G</b> G <b>C</b> CCATAA 3'
	(22 nucléotides ; positions 753 à 774 ; GC% 50 ; Tm 55°C)
Génotypes A1	CATTGTTTGAC <b>C</b> <b>G</b> G <b>C</b> YCCATAA
Génotypes A2	CATTGTTTGAC <b>R</b> <b>G</b> <b>C</b> CCATAA
Génotypes B1	CA <b>K</b> TGTTTGAC <b>R</b> <b>G</b> <b>C</b> YCCATAA
Génotypes B2	CATTGTTTGAC <b>C</b> <b>G</b> G <b>C</b> TCCATAA
→ <u>Amorce antisens (n°2) :</u>	<u>CATTGTTTGAC<b>R</b><b>G</b><b>C</b>YCCATAA</u>
	(22 nucléotides ; positions 753 à 774 ; GC% 45,5 ; Tm 53°C)

**Figure 26. Choix d'amorces « consensus ».** Les variations nucléotidiques correspondant aux différents génotypes sont indiquées en gras. *n* correspond au nombre de séquences alignées. Les isolats de génotype B1 contenant un G en position 755 sont en faible proportion (4 séquences sur les 20 alignées) : ils n'ont pas été pris en compte.

## 2. Optimisation des conditions réactionnelles

Afin d'établir et d'optimiser les conditions réactionnelles, nous avons choisi d'utiliser la technologie SYBR™ Green I, qui permet de passer outre l'étape d'hybridation des sondes, tout en autorisant une lecture en temps réel de l'amplification. L'objectif poursuivi est d'améliorer le rendement de l'amplification, sans en affecter la spécificité. Nous devons pour cela définir des compromis, et faire varier un à un chacun des paramètres de la réaction.

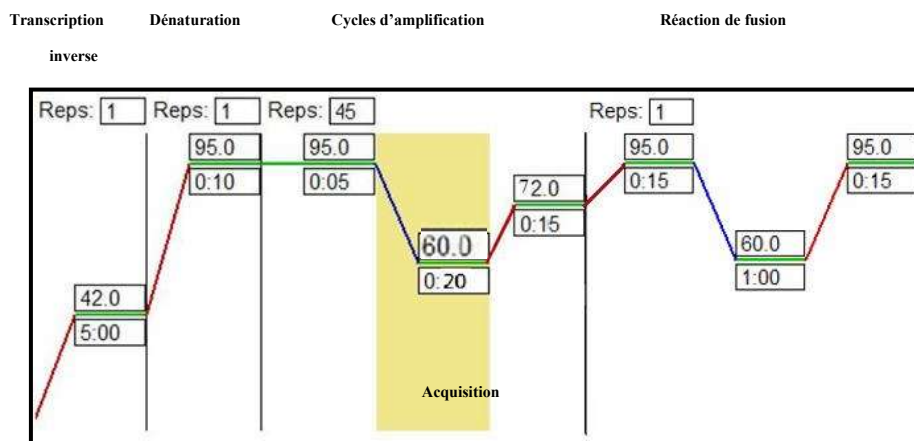
### a) Technologie SYBR™ Green I

#### *(1) Adaptation des conditions opératoires*

Le kit utilisé est le Kit One Step SYBR® PrimeScript™ RT-PCR Kit (Perfect Real Time) commercialisé par Takara. Il ne diffère du kit utilisé initialement que par la présence dans le tampon de SYBR™ Green I. Les conditions réactionnelles (à savoir les concentrations des différents composants du mélange réactionnel, ainsi que le profil des durées et températures) sont directement transposables. L'acquisition s'effectue sur le canal Green.

Deux modifications s'avèrent tout de même nécessaires :

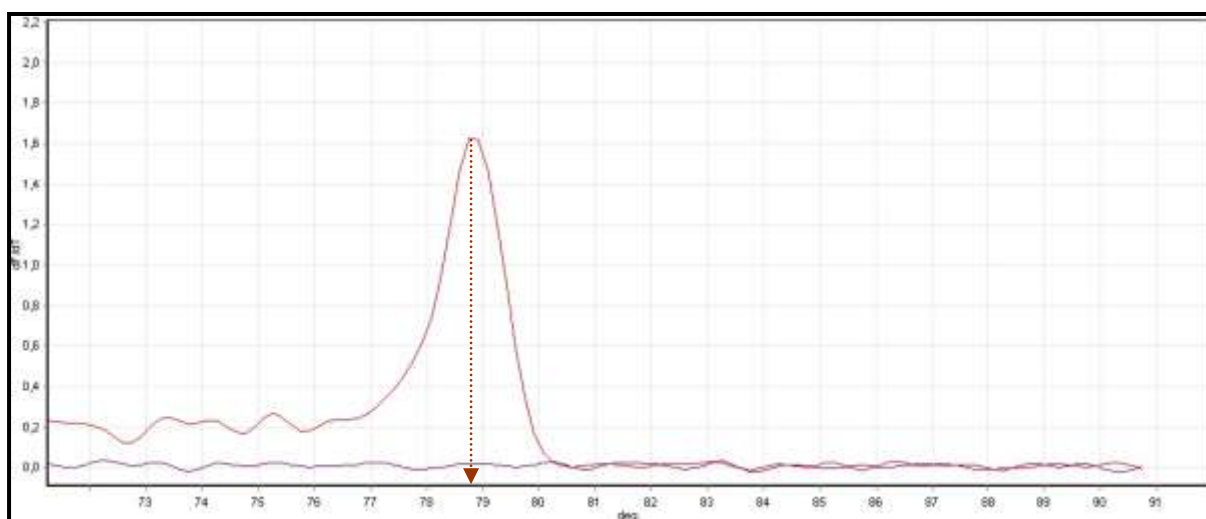
- Nous utilisons un agent intercalant non spécifique, donc nous ne pouvons pas introduire d'IPC dans le mélange réactionnel, car les amplicons correspondants donneraient systématiquement un signal, gênant l'interprétation des courbes de fluorescence.
- La technologie SYBR™ Green I permet de réaliser des courbes de fusion. Nous décidons d'exploiter ce potentiel en ajoutant au programme une étape finale de montée progressive en température (0,1°C / sec), afin de déterminer la  $T_m$  de nos amplicons. Le nouveau profil est résumé sur la figure 27.



**Figure 27. Profil de la RT-PCR en temps réel avec détection par SYBR™ Green I.** Le nombre de répétitions ainsi que les durées et températures des différentes étapes sont indiqués.

*(2) Essai à partir du témoin positif*

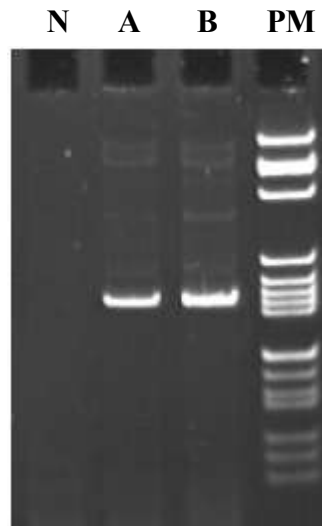
Un nouvel essai portant sur l'extrait du témoin positif est réalisé. Une amplification est détectée en temps réel, puisque nous pouvons visualiser l'apparition d'un signal sur le canal Green. Sur la courbe de fusion obtenue (figure 28), le pic est net : la Tm de notre amplicon est de 78,7°C.



**Figure 28. Courbe de fusion obtenue après amplification de l'extrait du témoin positif.** La courbe rouge correspond au témoin positif (Tm = 78,7°C), la courbe violette correspond au témoin négatif.

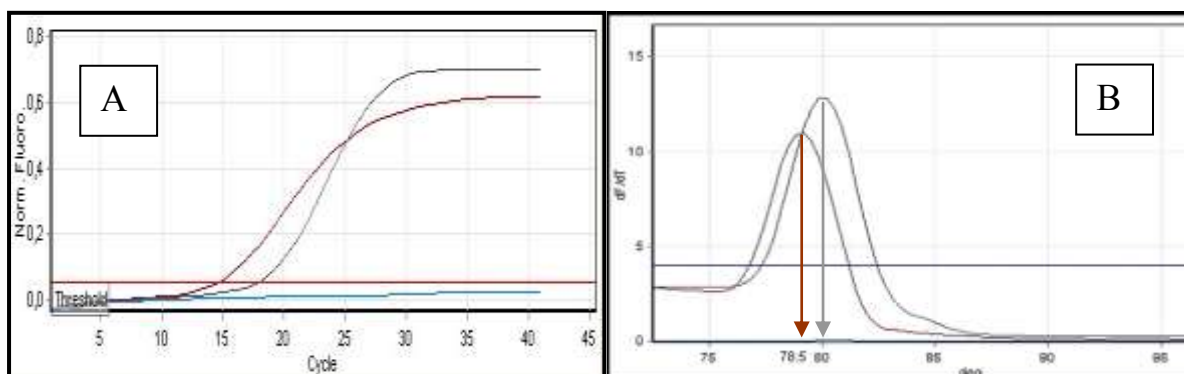
### (3) Essai à partir d'échantillons hMPV A et B du panel QCMD

Afin de vérifier que notre technique amplifie les séquences de hMPV quelque soit leur génotype, nous utilisons des échantillons positifs de génotypes A et B du QCMD : CQ01 (génotype A) et CQ06 (génotype B) (Matériels & Méthodes, p.71).



**Figure 29.** Electrophorèse des produits générés après amplification par RT-PCR des extraits des échantillons CQ01 et CQ06 du panel QCMD. La piste N correspond au témoin négatif.

L'amplification s'est effectuée correctement pour les deux génotypes, puisque nous observons la présence de produits d'amplification, que ce soit sur le gel d'électrophorèse réalisé (figure 29) ou par la lecture en temps réel sur le canal Green (figure 30).



**Figure 30.** Courbes de fluorescence (A) et de fusion (B) obtenues sur le canal Green pour deux échantillons positifs du panel QCMD. CQ01 (génotype A) correspond à la courbe grise ; CQ06 (génotype B) à la courbe rouge ; le témoin négatif est en bleu.

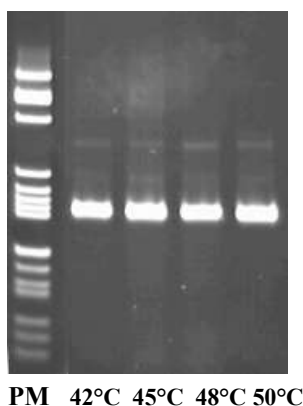
Les pics sur la courbe de fusion sont décalés : les Tm des échantillons sont différents (Tm hMPV A : 80°C et Tm hMPV B : 78,5°C), ce qui confirme leur appartenance à des génotypes distincts.

Les étapes suivantes de notre démarche d'optimisation des conditions réactionnelles ont été réalisées à partir de l'extrait du témoin positif initial.

### b) Optimisation de l'étape de transcription inverse

Dans le but d'optimiser la quantité d'ADNc produite, donc le rendement de notre amplification, nous avons fait varier différents paramètres de la réaction de transcription inverse :

- 4 températures ont été testées : 42, 45, 48 et 50°C (figure 31).

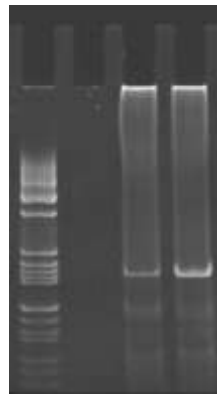


**Figure 31. Comparaison des signaux obtenus après amplification par RT-PCR de l'extrait du témoin positif avec différentes températures de RT.**

Aucune différence n'a été constatée en comparant l'intensité des signaux obtenus après avoir réalisé l'électrophorèse des produits d'amplification.

Nous avons préféré conserver la température de 42°C, puisqu'elle représente l'optimum théorique d'activité de la PrimeScript® *reverse transcriptase*.

- L'incidence d'un allongement de cette étape a également été étudiée : aucun impact n'étant observé lorsqu'elle est allongée à 10 ou 15 minutes, nous avons décidé de conserver la programmation initiale à 5 minutes.
- Nous avons enfin confirmé l'impact de la présence de la T4Gene sur le rendement de la transcription inverse : le signal obtenu est meilleur lorsqu'elle est présente dans le milieu réactionnel (figure 32).

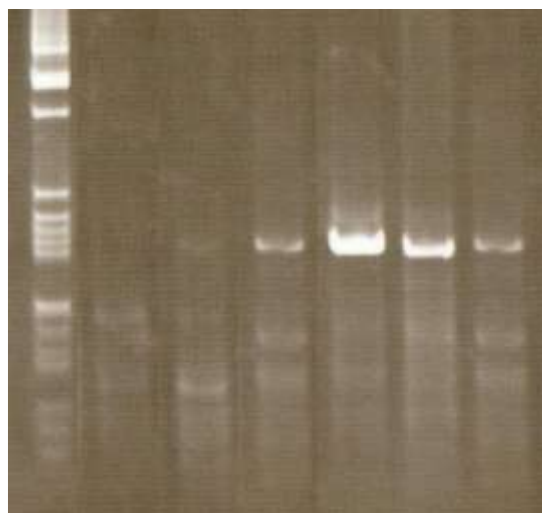


PM N -T4 +T4

**Figure 32. Influence de la présence de T4gene dans le milieu réactionnel.** La piste '+T4' correspond à l'amplification réalisée avec T4gene et la piste '-T4' sans T4gene.

### c) Optimisation de la température d'hybridation

Différentes températures d'hybridation ont été testées : 50, 53, 56, 58, 60 et 62°C. De la même façon, l'évaluation de l'impact de cette modification sur l'efficacité de l'amplification est rendue possible par la visualisation du gel d'électrophorèse des produits d'amplification (figure 33).



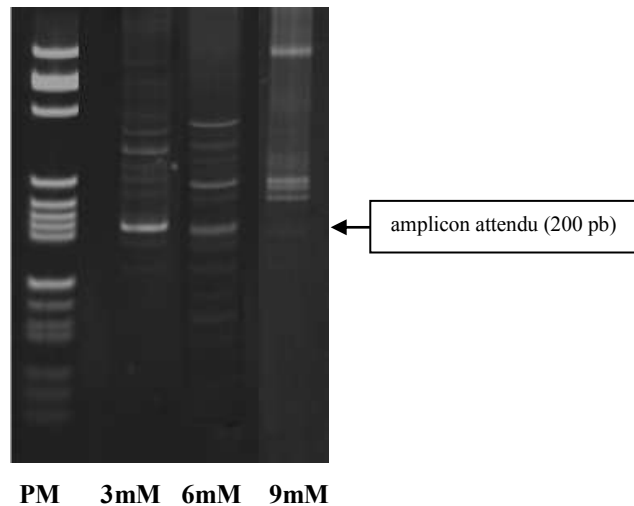
PM 50°C 53°C 56°C 58°C 60°C 62°C

**Figure 33. Révélation de l'amplification du témoin après RT-PCR effectuée à différentes températures d'hybridation.**

L'intensité du signal est maximale à 58°C. Nous avons donc retenu cette température par la suite.

#### d) Optimisation de la concentration en $Mg^{2+}$

L'augmentation de la concentration en  $Mg^{2+}$  dans le milieu réactionnel, donc une diminution de la stringence, aurait pour avantage théorique de stabiliser les hybrides sonde/cible. Nous avons donc testé deux concentrations supérieures de  $MgSO_4$  : 6 et 9 mM (figure 34).



**Figure 34. Impact de la concentration en  $Mg^{2+}$  sur la qualité du signal.**

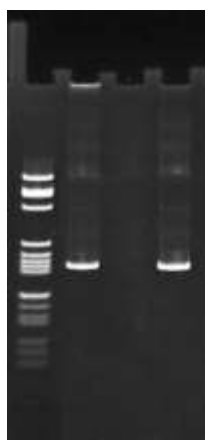
Nous constatons sur le gel l'apparition de bandes parasites, traduisant un manque de spécificité de l'amplification, ainsi qu'une perte d'efficacité (aucune bande correspondant à la taille de l'amplicon à la concentration la plus forte de 9 mM).

La concentration initiale de 3 mM en  $MgSO_4$  a donc été conservée.

### e) Optimisation de la durée des cycles d'amplification

Nous avons testé l'effet de l'allongement des étapes des cycles d'amplification sur le rendement de la PCR (figure 35) :

- l'étape de dénaturation à 95°C est portée à 15 sec (au lieu de 5 sec),
- l'étape d'hybridation à 58°C est portée à 30 sec (au lieu de 20 sec),
- l'étape d'élongation à 72°C est portée à 30 sec (au lieu de 15 sec).



PM C N L

**Figure 35. Variation de la durée des cycles d'amplification : cycles longs (L) versus cycles courts (C).** N est la piste correspondant au témoin négatif.

Aucun bénéfice n'est mis en évidence avec des cycles plus longs : les bandes sur le gel sont de même intensité.

Nous conservons par conséquent le profil des cycles « courts ».

### 3. Optimisation de la détection

#### a) Construction de nouvelles sondes

##### 1) *Choix de sondes génotype-spécifiques*

L'alignement des séquences répertoriées sur GenBank nous a permis de mettre en évidence des mésappariements au sein de la sonde n°1 vis-à-vis des isolats de génotype B. Aucun mésappariement n'est constaté par rapport aux isolats de génotype A.

Nous décidons donc de réaliser une RT-PCR « multiplex », en utilisant deux sondes « génotype-spécifiques » : la sonde n°1 sera destinée au recrutement des hMPV de génotype A (sonde n°1 - A) ; une nouvelle sonde doit être dessinée pour obtenir un recouvrement des hMPV de génotype B (sonde n°2 - B) (figure 36).

Sonde (n°1) :	5' CTTT <b>GCC</b> ACTACTCAATGAAC <b>CAAAC</b> 3'
	(24 nucléotides ; positions 690 – 665 ; GC% 37,5 ; Tm 52°C)
Génotypes B1 :	5' CTTT <b>TCCG</b> TACTCAATGAAT <b>TAAAC</b> 3'
Génotypes B2 :	5' CTTT <b>CCC</b> A TACTCAATGAAT <b>TAAAC</b> 3'
Sonde (n°2-B) :	5' CTTTYCC <b>R</b> TACTCAATGAAT <b>A</b> AAAC 3'
	(24 nucléotides ; positions 690 – 665 ; GC% 33,3 ; Tm 50,5°C)

**Figure 36. Choix d'une sonde B « consensus ».** Les variations nucléotidiques sont en gras.

Ces nouvelles sondes doivent, pour différencier les génotypes A et B, être marquées à l'aide de fluorochromes distincts : marquage FAM pour la sonde « A » (acquisition du signal fluorescent sur le canal Green), et Cy5 pour la sonde « B » (la lecture se fait sur le canal Red).

##### 2) *Orientation des sondes*

La présence de nucléotides dégénérés à l'extrémité 5' de notre sonde B n'est pas appropriée à une hydrolyse optimale par la Taq polymérase (activité 5'-exonucléasique). Nous préférons inverser l'orientation des séquences ; les sondes s'hybrideront alors sur le brin opposé. Les séquences deviennent donc :

Sonde n°3 - A :	5' GTTTGTT <b>C</b> ATTGAGTATGGCAAAG 3'
	(24 nucléotides ; positions 665 – 690 ; GC% 37,5 ; Tm 52°C)
Sonde n°3 - B :	5' GTTTATT <b>C</b> ATTGAGTAYGGRAAAG 3'
	(24 nucléotides ; positions 665 – 690 ; GC% 33,3 ; Tm 50,5°C)

### 3) *Modification du système de marquage fluorescent et de la longueur des séquences*

Les amorces ont une T<sub>m</sub> théorique de l'ordre de 53°C, alors que les T<sub>m</sub> de nos sondes sont respectivement de 52°C (sonde n°3 – A) et de 50,5°C (sonde n°3 – B). Ceci n'est théoriquement pas compatible avec une détection en temps réel, puisque la température d'hybridation d'une sonde doit être supérieure à la température d'appariement des amorces, pour pouvoir détecter son hydrolyse en temps réel. Dans l'idéal, les sondes ont une T<sub>m</sub> de 5 à 10°C plus élevée que celle des amorces, afin de s'assurer que leur hybridation précède celle des amorces.

Nous décidons donc d'utiliser la technologie MGB®, qui permet une augmentation importante des T<sub>m</sub>, de l'ordre d'une dizaine de degrés Celsius (Généralités, p.64).

La sensibilité de détection de ce type de sondes étant favorisée par l'emploi de courtes séquences (moins de 20 bases), nous réduisons la longueur de nos sondes (figure 37) :

Sonde n°4 - A :	5' <del>GTTT</del> G TTCATTGAGTATGGCAAAG 3'
	(24 nucléotides ; positions 665 – 690 ; GC% 37,5 ; T <sub>m</sub> 52°C)
	5' G TTCATTGAGTATGGCAAAG 3'
	(20 nucléotides ; positions 665 – 684 ; GC% 40 ; T <sub>m</sub> 47,7°C)
Sonde n°4 - B :	5' <del>GTTT</del> A TTCATTGAGTAYGGRAAAG 3'
	(24 nucléotides ; positions 665 – 690 ; GC% 33,3 ; T <sub>m</sub> 50,5°C)
	5' A TTCATTGAGTAYGGRAAAG 3'
	(20 nucléotides ; positions 665 – 684 ; GC% 35 ; T <sub>m</sub> 45,6°C)

**Figure 37. Diminution de la longueur des séquences des sondes A et B.**

La technologie MGB® permet de surmonter la diminution théorique de T<sub>m</sub> engendrée.

**Au final, les séquences commandées sont donc les suivantes :**

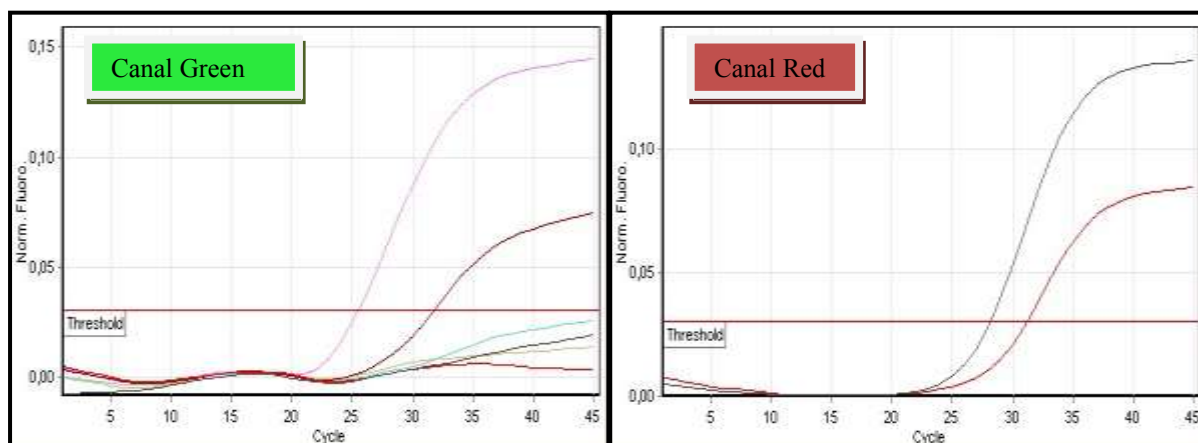
**Sonde hMPV A (n°4) : 5' FAM - G TTCATTGAGTATGGCAAAG – NFQ MGB 3'**

**Sonde hMPV B (n°4) : 5' Cy5 - A TTCATTGAGTAYGGRAAAG – NFQ MGB 3'**

(NFQ : *Non Fluorescent Quencher*)

**b) Fixation d'un seuil d'interprétation**

Les échantillons du panel QCMD nous ont permis d'établir un seuil de fluorescence, de manière à ce que seuls les échantillons de génotype A soient positifs sur le canal Green, et les échantillons de génotype B sur le canal Red (figure 38).



**Figure 38. Signaux de fluorescence acquis sur le canal Green (génotypes A) et sur le canal Red (génotypes B) pour les échantillons hMPV positifs du panel QCMD.**

Légende : CQ01 (courbe bordeaux) = hMPV A ; CQ03 (courbe rose) = hMPV A fort ; CQ06 (courbe grise) = hMPV B ; CQ07 (courbe rouge) = hMPV B ; témoin négatif (courbe ocre).

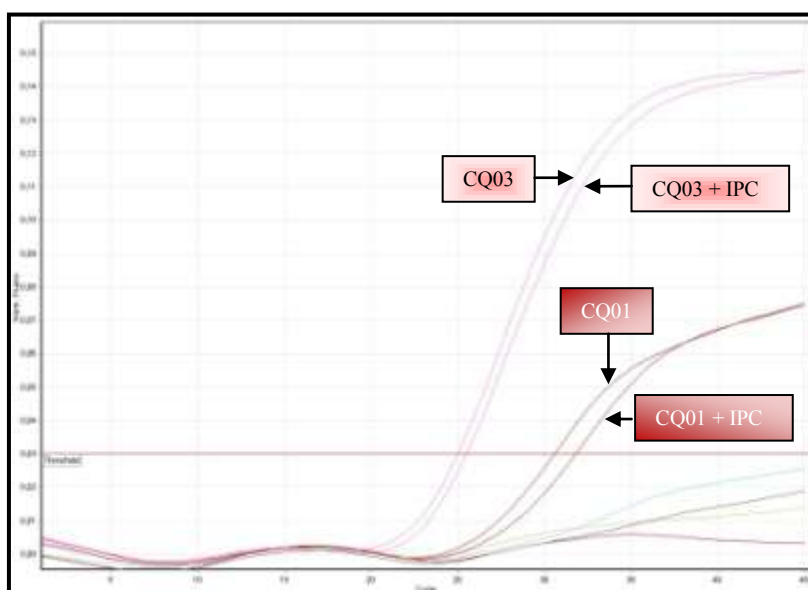
Après fixation du seuil à 0,03 (quelque soit le canal de lecture), nous ne constatons aucune réactivité croisée entre les deux sondes. Les résultats sont résumés sur le tableau 7.

Résultats attendus	Résultats obtenus (Ct)	
	Canal Green	Canal Red
CQ01 - hMPV A Positif	Positif (30,80)	Négatif
CQ03 - hMPV A Positif fort	Positif (25,02)	Négatif
CQ06 - hMPV B Positif	Négatif	Positif (28,16)
CQ07 - hMPV B Positif	Négatif	Positif (31,17)

**Tableau 7 : Résultats obtenus pour les échantillons hMPV positifs du panel du QCMD.**

#### 4. Influence de la co-amplification de l'IPC

Grâce à l'utilisation du système des sondes d'hydrolyse, le signal détecté en temps réel est désormais spécifique du hMPV, et nous pouvons réintroduire le contrôle interne d'amplification dans nos mélanges réactionnels. Rappelons que le signal correspondant à l'émission de la sonde spécifique de l'IPC est suivi sur le canal Yellow (marquage VIC). Afin de déceler une éventuelle perte d'efficacité suite à cette incorporation, nous passons en parallèle les échantillons positifs avec et sans IPC (figure 39).



**Figure 39. Résultat de la co-amplification de l'IPC et des échantillons hMPV A du panel QCMD.**

Les courbes de fluorescence, obtenues avec et sans IPC, sont quasiment superposées. Nous démontrons ainsi l'absence de perte d'efficacité liée à l'amplification simultanée de l'IPC. Les Ct sont en effet très proches (31.56 *versus* 30.80 pour l'échantillon CQ01 ; 25.50 *versus* 25.02 pour le CQ03).

### C. Conditions définitives de la RT-PCR en temps réel

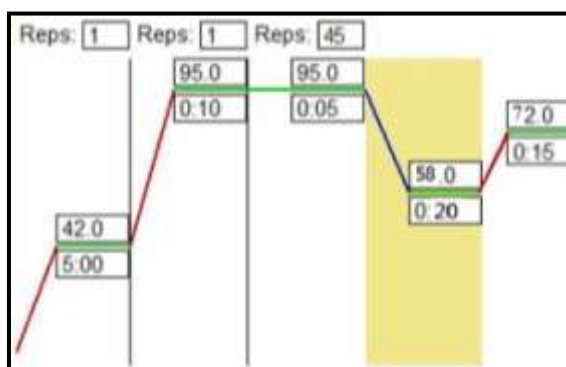
➤ Calcul des volumes pour un tube réactionnel :

	concentration initiale	volume (µl)	concentration finale
TAMPON 2X	2X	12,5	1X
amorce SENS n°2	20µM	0,375	0,3µM
amorce ANTISENS n°2	20µM	0,375	0,3µM
sonde hMPV A (n°4)	20µM	0,125	0,1µM
sonde hMPV B (n°4)	20µM	0,125	0,1µM
T4gene 32	4µg/µl	0,5	0,08µg/µl
TaKaRa Ex Taq™ HS	5U/µl	0,5	0,1U/µl
PRIME SCRIPT	5U/µl	0,5	0,1U/µl
matrice ARN IPC	10 000cop/µl	0,1	40cop/µl
amorce IPC 1	20µM	0,1875	0,15µM
amorce IPC 2	20µM	0,1875	0,15µM
sonde IPC	20µM	0,1	0,08µM
eau RNase Free		4,425	

RNA/tube		5
volume final/tube		25

**Tableau 8. Mix réactionnel : calcul des volumes pour un tube.**

➤ Profil des cycles réactionnels :



**Figure 40. Profil des cycles de la RT-PCR.**

La durée totale de la RT-PCR ou « *turnaround time* » est de 96 minutes.

## **II. Validation des performances analytiques**

### **A. Evaluation de la spécificité**

Des extraits ARN de témoins positifs forts pour les virus VRS A et B, Influenza A et B, Rhinovirus et Coronavirus, ainsi qu'un extrait ADN d'adénovirus ont été amplifiés selon les mêmes conditions opératoires que les témoins positifs hMPV. Aucune amplification n'a été observée, quelque soit le système de révélation employé (sondes MGB® ou technologie SYBR™ Green I suivie d'une électrophorèse), confirmant la spécificité de la technique.

### **B. Evaluation de la sensibilité**

Les résultats obtenus pour les spécimens du panel QCMD hMPV 2007 ont déjà été présentés (figure 38 et tableau 7). Ils nous ont permis de vérifier que l'amplification était effective quelque soit le géotype, et qu'il n'y avait pas de réactivité croisée entre les sondes A et B.

Nous avons pu appréhender la limite de sensibilité de notre technique, puisque l'échantillon du panel QCMD CQ05 (hMPV de sous-groupe B « faiblement positif ») n'a pas été détecté. Néanmoins, si nous considérons les résultats globaux du QCMD, près des deux tiers des participants ont rendu un résultat négatif pour cet échantillon. Nous pouvons ainsi considérer que la sensibilité de notre technique est satisfaisante.

### **III. Analyse des échantillons cliniques**

Nous avons réalisé l'extraction puis l'amplification par RT-PCR des 247 prélèvements sélectionnés en utilisant la technologie SYBR™ Green I. Une électrophorèse des produits d'amplification a été effectuée de façon systématique, quelqu'ait été le signal de fluorescence observé.

Nous avons retrouvé au total 28 échantillons positifs.

Dans un premier temps, ces isolats ont tous été séquencés, ce qui nous a permis de finaliser la validation de notre technique. Dans un second temps, nous avons pu aborder l'aspect clinique et épidémiologique de l'infection à hMPV.

#### **A. Finalisation de la validation technique**

##### **1) Validation de la spécificité de l'amplification**

Cette seconde étape de validation a son importance, puisque la matrice de départ est plus complexe : il s'agit d'aspirations nasopharyngées et non plus de surnageants de culture (témoin positif et échantillons du panel QCMD).

Le séquençage de l'intégralité de nos isolats positifs a donc été réalisé. L'identification 'méta-pneumovirus humain' a été établie avec certitude pour l'ensemble des 28 échantillons. Pour 4 des 28 isolats, la séquence obtenue est incomplète (à cause d'un bruit de fond trop important). Les segments de séquences obtenus suffisent cependant pour affirmer qu'il s'agit bien d'échantillons de hMPV.

Aucun produit d'amplification non spécifique (« faux positif ») n'ayant été généré, nous confirmons ainsi la spécificité de notre technique et par là-même la pertinence du choix de la cible et des amorces.

## 2) Analyse des séquences nucléotidiques

Les séquences complètes (obtenues pour 24 des isolats) ont été alignées (tableau 9).

Leurs relations phylogénétiques ont été établies grâce au logiciel MEGA, et reconstituées sous la forme d'un arbre (figure 41). Nous avons pu ainsi affilier les souches à leur sous-groupe respectif : 12 échantillons sont de génotype A, et 12 de génotype B. La distinction entre les souches de génotype B1 (1 isolat ainsi que le témoin) et les souches de génotype B2 (11 isolats) est nette, de par l'existence d'assez nombreuses substitutions (*bootstraps* élevés). Par contre, les isolats de génotypes A1 et A2 ne peuvent être différenciés.

Au sein de la séquence cible, nous observons que les génomes des isolats de génotype A comprennent en moyenne 5 bases G ou C supplémentaires par rapport aux génomes des isolats de génotype B. Ceci explique la différence de  $T_m$  observée au cours de notre mise au point par la technique SYBR™ Green I : la variation constatée ( $T_m A > T_m B$ ) est corrélée aux variations de composition nucléotidique.

## 3) Validation de la spécificité des sondes

Les isolats positifs pour lesquels il nous restait suffisamment de prélèvement (14 échantillons) ont fait l'objet d'une nouvelle amplification, cette fois avec la technique des sondes MGB®. L'affiliation aux différents génotypes (A et B) a été confirmée. Aucune discordance n'est observée : l'amplification des isolats de génotype A (10 échantillons) génère un signal sur le canal Green, alors que l'amplification des échantillons de génotype B (4 échantillons) n'est visualisée que sur le canal Red (seuil fixé à 0,03). L'absence de réactivité croisée entre les deux sondes est ainsi de nouveau démontrée.

L'alignement effectué (tableau 9) nous a également permis de vérifier que le dessin des sondes était judicieux, puisqu'aucun mésappariement n'est constaté au sein de leur zone d'hybridation (positions 665 à 684).

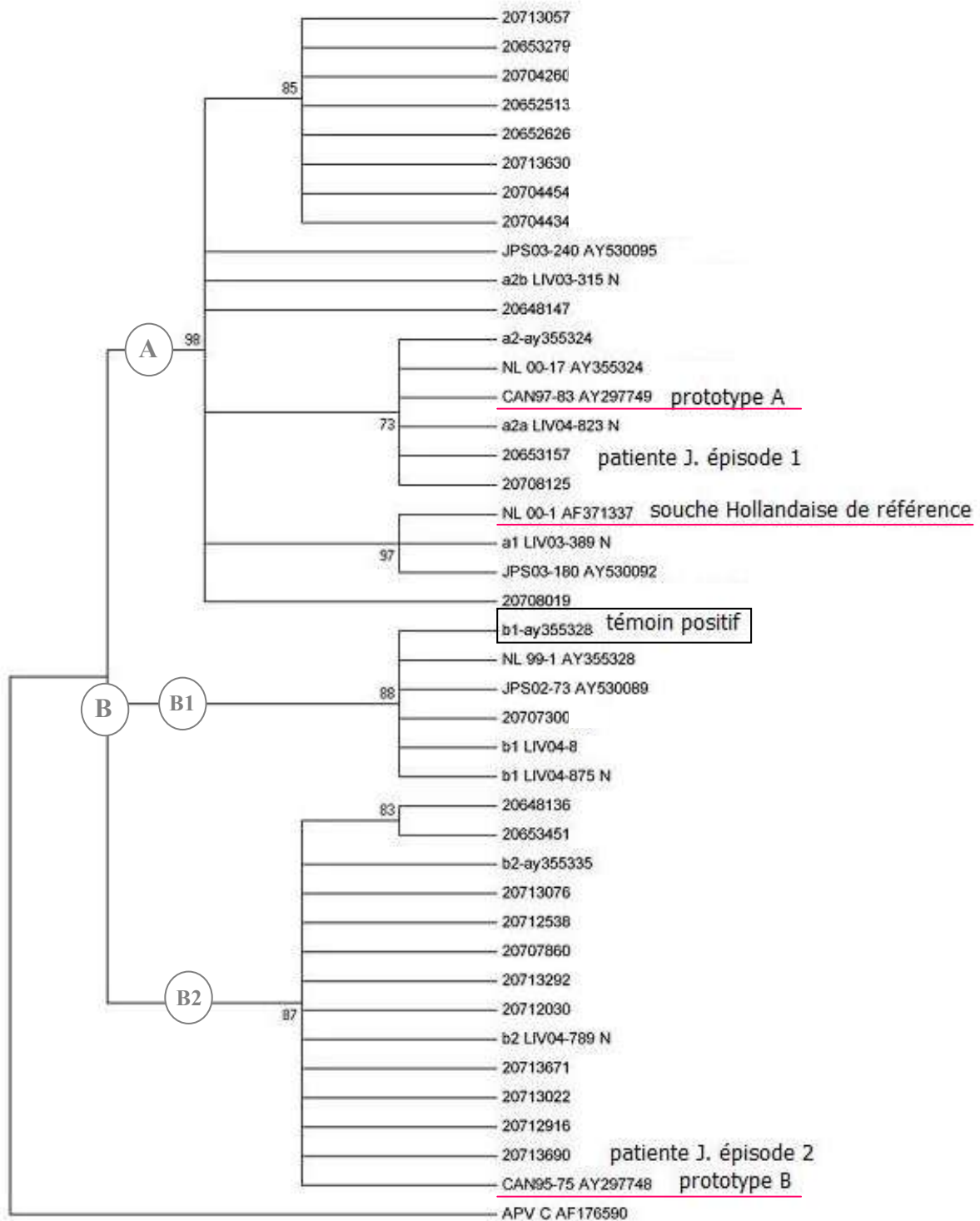
#### **4) Estimation des « faux négatifs »**

Nos séries de prélèvements ont été amplifiées sans témoin interne. Nous ne pouvons donc pas écarter l'éventualité de résultats faussement négatifs. Aussi avons-nous testé de nouveau 25 prélèvements négatifs (soit 10% des échantillons hMPV négatifs), cette fois avec la technologie des sondes MGB® incluant l'IPC. Aucun effet inhibiteur n'a été mis en évidence au sein de ces échantillons. Nous pouvons ainsi présumer que les inhibiteurs de RT-PCR sont rares au sein des prélèvements sélectionnés, ou bien qu'ils sont correctement éliminés au cours de l'étape d'extraction (sous réserve de la représentativité des 10% d'échantillons re-testés).

position nt	614	622	626	632	633	641	644	653	654	656	659	662	663	665	677	680	683	684	686	698	701	707	719	725	728	731	734	740	génotype
témoin	T	T	T	A	C	A	A	C	T	C	A	T	T	A	C	A	A	G	T	T	A	A	A	G	T	A	T	T	B1
20707300												C																	B1
20712538			C			G	G	T			G		C		T	G													B2
20707860			C			G	G	T			G		C		T	G													B2
20713690			C			G	G	T			G		C		T	G													B2
20712030			C			G	G	T			G		C		T	G													B2
20713292			C			G	G	T			G		C		T	G													B2
20712916			C			G	G	T			G		C		T	G													B2
20713022			C			G	G	T			G		C		T	G													B2
20713671			C			G	G	T			G		C		T	G													B2
20713076						G	G	T			G		C		T	G								A					B2
20653451						G	G	T		T	G		C		T	G								A					B2
20648136						G	G	T		T	G		C		T	G								A					B2
sonde B															A	Y	R	A	G										
20648147		C	C	C	T			T						G	T	C			A	C	T	C		A	C	T		C	A
20652513		C	C	C	T			T	C					G	T	C			A	C	T	C	G	A	C	C	C	C	A
20652626		C	C	C	T			T	C					G	T	C			A	C	T	C	G	A	C	C	C	C	A
20653157	C		C	C	T			T				C		G	T	C			A	C	T	C		A	C	T		C	A
20653279		C	C	C	T			T	C					G	T	C			A	C	A	C	G	A	C	C	C	C	A
20713630		C	C	C	T			T	C					G	T	C			A	C	T	C	G	A	C	C	C	C	A
20713057		C	C	C	T			T	C					G	T	C			A	C	T	C	G	A	C	C	C	C	A
20704454		C	C	C	T			T	C					G	T	C			A	C	T	C		A	C	C	C	C	A
20704260		C	C	C	T			T	C					G	T	C			A	C	T	C	G	A	C	C	C	C	A
20708019		C	C	C	T			T						G	T	C			A	C	T	C		A		T		C	A
20704434		C	C	C	T			T	C					G	T	C			A	C	T	C		A	C	C	C	C	A
20708125	C		C	C	T			T				C		G	T	C			A	C	T	C		A	C	T		C	A
sonde A															G	T	C	A	G										

**Tableau 9. Variations nucléotidiques au sein des séquences obtenues à partir des isolats cliniques.**

Les positions indiquées sont établies d'après la référence [23], les nucléotides ne sont précisés que lorsqu'ils diffèrent de la séquence du témoin positif (souche AY355328). Les nucléotides correspondants sur les sondes A et B sont également précisés.



**Figure 41. Analyse phylogénétique des séquences nucléotidiques des isolats obtenus.**

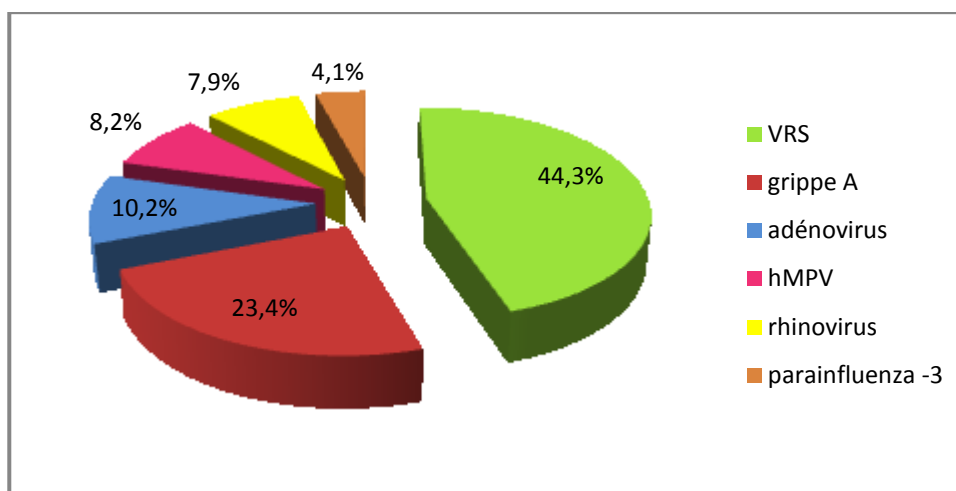
Les emplacements des séquences d'intérêt sont indiqués. L'arbre a été reconstitué avec le logiciel MEGA. Plusieurs autres souches référencées ont été ajoutées afin de catégoriser les sous-groupes de façon précise (isolats anglais LIV (Liverpool), canadiens CAN, japonais JPS et hollandais NL). La longueur de chaque ligne horizontale représente le nombre de substitutions par site. Les valeurs de « bootstrap » supérieures à 70% sont précisées. Le groupe externe (« outgroup ») utilisé pour enraciner l'arbre est le APV-C.

## B. Etude épidémiologique

### 1) Place du hMPV parmi les autres virus respiratoires

Nous avons retrouvé 28 échantillons cliniques hMPV positifs.

Le hMPV nous permet donc d'expliquer 12% (28 sur 230) des épisodes infectieux respiratoires d'étiologie jusqu'alors inconnue chez les enfants de moins de 3 ans admis au CHU de Nantes au cours de la période novembre 2006 – mars 2007. Si nous considérons l'ensemble des infections respiratoires virales ayant affecté les enfants de moins de 3 ans sur cette même période, le hMPV se classe en 4<sup>ème</sup> position (8,2%), derrière le VRS (44,3%), la grippe A (25,4%) et l'adénovirus (10,2%), soit au même rang que l'infection à rhinovirus (7,9%) (figure 42).



**Figure 42. Représentation graphique de l'ensemble des viroses respiratoires identifiées au laboratoire de Virologie du CHU de Nantes au cours de l'hiver 2006- 2007 chez les enfants de moins de 3 ans.** Les pourcentages indiqués sont calculés sur le total des virus respiratoires détectés. (Absence de grippe B sur la période d'étude).

### 2) Répartition de l'infection à hMPV sur la période d'étude

Contrairement à ce qui est observé pour la grippe et le VRS, nous ne retrouvons pas de pic épidémique franc pour le hMPV. Nous remarquons néanmoins que l'infection à hMPV s'est poursuivie au-delà des périodes épidémiques du VRS et de la grippe : une prolongation au début du printemps est suggérée par le recouvrement de 10 isolats positifs au mois de mars (figure 43).

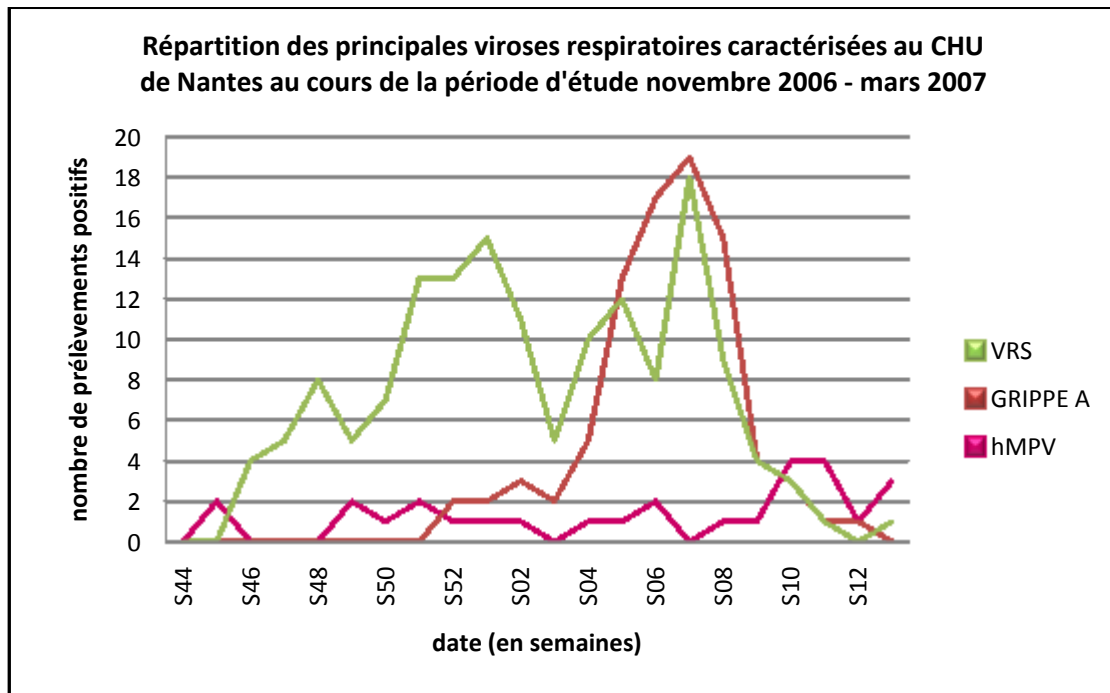


Figure 43. Répartition du nombre de prélèvements positifs en fonction de la date de la demande, sur la période d'étude novembre 2006 à mars 2007. Pour plus de clarté, seuls les VRS, grippe A et hMPV ont été représentés.

Nous avons constaté la co-circulation des deux génotypes, tout au long de la période d'étude (figure 44).

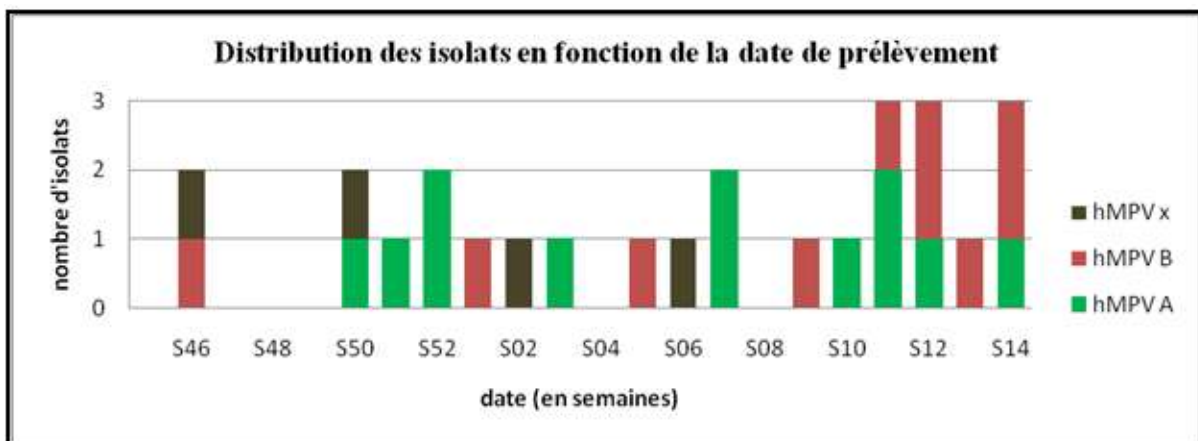


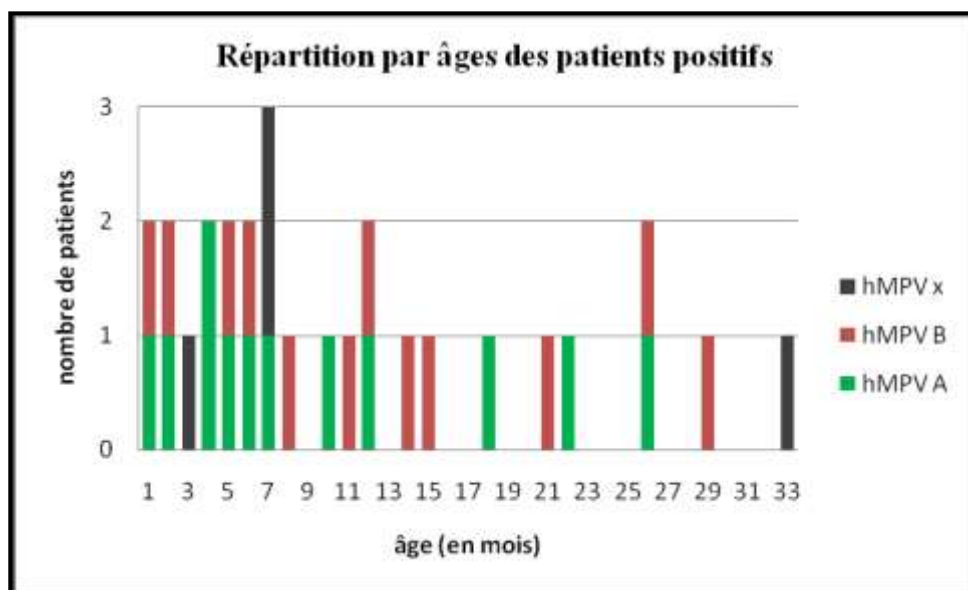
Figure 44. Distribution des génotypes en fonction de la date d'isolement.

### C. Approche clinique

L'ensemble des données cliniques recueillies est colligé dans le tableau joint en annexe 4, ainsi que dans les tableaux 10 & 11.

L'âge médian des nourrissons infectés est de 6,5 mois (moyenne à 10,4 +/- 9,2 mois). La répartition est illustrée sur la figure 45.

Le sex-ratio est de 0,65 garçon pour 1 fille (11 épisodes concernent des garçons (39%) et 17 des filles (61%).



**Figure 45. Répartition par âges des patients hMPV positifs.**

La présence de facteurs prédisposants est relevée dans près d'un tiers des cas (7 cas sur 28) :

1. 5 enfants étaient nés prématurément (soit 18 %) ;
2. une pathologie sous-jacente existe chez 6 enfants (soit dans 21% des cas) : cardiopathie, dysplasie broncho-pulmonaire, syndrome polymalformatif lié à une anomalie chromosomique ;
3. un terrain atopique familial ou un asthme (chez le cas index ou chez les apparentés au premier degré) est retrouvé chez 5 enfants (18% des cas) ;
4. la notion de tabagisme passif est expressément notée dans le dossier de deux patients ;
5. 6 enfants avaient déjà fait au moins un épisode de bronchiolite (21% des cas).

Les motifs d'admission principalement retrouvés sont la fièvre (dans 68% des cas) et les troubles respiratoires (toux et gêne respiratoire dans 61% des cas). Des vomissements sont présents dans un tiers des cas. Deux enfants se sont présentés en état de mal comitial fébrile.

	<i>n</i>	%
Nombre d'enfants	28	
Sexe féminin	17	60,7
Sexe masculin	11	39,3
ATCD d'atopie personnelle ou familiale	5	17,9
ATCD de prématurité	5	17,9
Age médian (en mois)	6,5	
Age moyen (en mois)	10,4	
Durée moyenne d'hospitalisation en jours	4,9	
<b>Motifs d'hospitalisation</b>		
Gêne respiratoire	17	60,7
Fièvre (>38°C)	19	67,9
Toux	17	60,7
Troubles digestifs (nausées, vomissements, diarrhée)	10	35,7
Convulsions	2	7,1

**Tableau 10. Critères généraux et motifs d'hospitalisation des enfants infectés.**

Au total, 79% des patients ont été hospitalisés. Nous avons noté que 2 patients non hospitalisés ont été admis aux urgences à trois reprises pour un même épisode. La durée moyenne d'hospitalisation était de 4,9 jours, après exclusion d'une enfant hospitalisée 2 mois et demi en service d'oncopédiatrie. L'hospitalisation était systématique pour les nourrissons de moins de 3 mois, ainsi que pour tous les enfants souffrant de co-morbidités.

Des signes de gravité se sont manifestés au cours de l'hospitalisation chez 11 patients (signes de lutte et/ou saturation transcutanée en oxygène inférieure à 95%).

<b>Clinique</b>	<i>n</i>	%
Sibilants	10	35,7
Signes de lutte	9	32,1
Rhinite / rhinorrhée	20	71,4
Fièvre (>38°C)	18	64,3
Difficultés alimentaires	18	64,3
<b>Prise en charge thérapeutique</b>		
Oxygénodépendance (SaO <sub>2</sub> < 95%)	7	25
Antibiothérapie	15	53,6
<b>Examens complémentaires</b>		
<b>Biologie</b>	<i>CRP (17 patients) +/- hémogramme (14 patients)</i>	
Anémie (Hb < 11 g/dl)	8	57,1
Neutropénie (< 500/mm <sup>3</sup> )	1	7,1
Syndrome inflammatoire (CRP > 10 mg/l)	10	58,8
<b>Radiographie thoracique</b>	<i>Pratiquée pour 18 patients</i>	
Normale	10	55,6
Distension thoracique	1	5,6
Foyer systématisé	3	16,7
Syndrome bronchoalvéolaire	4	22,2

**Tableau 11 : Etude clinique, biologique et radiologique de la cohorte d'enfants infectés.**

Le diagnostic final le plus communément porté est la « bronchiolite aiguë du nourrisson » (12 cas sur 28, soit dans 43% des cas). Pour deux patients, l'infection à hMPV n'a pas engendré d'autre symptôme que la fièvre (« fièvre sans point d'appel infectieux »). 11 épisodes (39% des cas) sont restés limités aux voies aériennes supérieures (étiquetés « pharyngite »). Deux se sont néanmoins compliqués d'une otite moyenne aiguë, et l'un des enfants a présenté une conjonctivite.

La surinfection bactérienne était également probable chez trois enfants ayant présenté un tableau de véritable pneumopathie, eu égard à l'importance du syndrome inflammatoire et à l'imagerie, même si les investigations microbiologiques sont restées stériles. Un rôle de cofacteur du hMPV dans cette évolution est cependant envisageable.

### ➤ Description de deux cohortes en fonction du génotype

Bien qu'aucune exploitation statistique ne soit possible (les effectifs étant trop petits), nous avons analysé les épisodes associés aux isolats de génotype A comparativement à ceux reliés aux isolats de génotype B (tableau 12).

	<i>Génotypes A</i>	<i>Génotypes B</i>
Sex-ratio	0,6	0,7
Age (en mois)	médiane = 6 (moyenne = 9,5)	médiane = 10,5 (moyenne = 11,6)
Hospitalisations	75% (4,3 jours)	83% (5,5 jours)

**Tableau 12. Données démographiques des deux cohortes, caractérisées en fonction du génotype de la souche de hMPV impliquée.**

Aucune différence n'a été relevée dans les motifs d'admission. L'âge médian est plus élevé pour la cohorte des patients infectés par une souche de génotype B (10,5 mois *versus* 6 mois). La durée d'hospitalisation est allongée d'une journée en moyenne (5,5 jours *versus* 4,3 jours) pour les épisodes reliés aux génotypes B. Cependant l'estimation de la sévérité clinique ne peut se baser sur ce seul critère, puisque par ailleurs les signes cliniques constatés au cours de l'hospitalisation semblent plus importants lorsque l'épisode est relié à une souche de génotype A (44% de sibilants *versus* 25%, et 38% de signes de lutte *versus* 25%). Néanmoins, aucune différence n'est constatée quant à la nécessité d'une oxygénothérapie (25% des patients pour les deux cohortes).

### ➤ Description d'un cas de réinfection

Deux prélèvements retrouvés positifs au cours de notre étude concernent un même patient, mais correspondent à des épisodes infectieux différents, puisqu'ils sont distants de plus de 3 mois. Il s'agit d'une patiente J., née prématurément (à 29 semaines d'aménorrhée), qui a pour principal antécédent une hospitalisation en service de Néonatalogie pendant les deux mois ayant suivi sa naissance, du fait de la présence d'une dyspnée aux deux temps avec stridor. La notion d'un terrain atopique familial est également retrouvée.

Le premier épisode est daté du 07 décembre 2006. J. est alors âgée de 6 mois (âge corrigé de 3 mois). Au cours de la prise d'un biberon, elle a présenté un malaise avec cyanose et perte de connaissance. La saturation en oxygène à l'arrivée des secours est à 85%. Elle est hospitalisée dans le service de Pédiatrie / Néonatalogie du CHD de La Roche-sur-Yon.

L'examen clinique d'entrée retrouve un bon état général. L'enfant est apyrétique ; la prise alimentaire se fait sans difficulté. Elle tousse un petit peu, mais il n'y a pas de notion de rhinite dans les jours précédents. L'examen ORL est normal, mais des signes de lutte respiratoire sont observés, ainsi qu'une majoration du stridor. Devant la dégradation progressive de l'état respiratoire de l'enfant (apparition de sibilants), un transfert dans le service de Pédiatrie de Nantes est décidé, où une oxygénothérapie sera nécessaire durant quatre jours. Les examens complémentaires entrepris sont restés infructueux : les recherches virologiques nasales sont négatives, l'hémogramme est sans particularité, et il n'y a pas de syndrome inflammatoire. La radiographie pulmonaire, l'électrocardiogramme et l'endoscopie ORL sont normaux.

Nous avons rétrospectivement pu caractériser cet épisode comme étant le fait d'une infection par une souche de hMPV de génotype A (échantillon 20653157).

Le second épisode est daté du 30 mars 2007, date à laquelle J. est hospitalisée pour une exploration de son stridor (par fibroscopie trachéo-bronchique et échographie cardiaque). La constatation d'une rhinorrhée a donné lieu à l'envoi d'une aspiration nasale au laboratoire de Virologie. Le dossier comporte pour seule notion une majoration du stridor dans la semaine qui a suivi ces examens, « probablement en rapport avec un épisode viral ». Les recherches virologiques étaient négatives, mais nous avons pu identifier rétrospectivement une souche de hMPV de génotype B (échantillon 20713690).

Il s'agit donc bien d'une réinfection (et non d'une rechute), car les souches de hMPV impliquées sont différentes. Les séquences respectives sont indiquées sur la figure 41.

---

## **Discussion**

Actuellement près de 40% des infections respiratoires basses de l'enfant demeurent sans étiologie caractérisée. Le métapneumovirus humain serait la cause de 2 à 10% d'entre elles, se positionnant comme le deuxième agent viral incriminé dans les bronchiolites du nourrisson, après le VRS [112, 164]. Par conséquent, il doit être envisagé d'inclure le hMPV dans le panel des virus recherchés lors du diagnostic de ces infections respiratoires [183].

L'objectif de notre travail était de mettre au point une technique de détection du hMPV dans les aspirations nasopharyngées, afin d'évaluer la prévalence de ce virus au sein de la population des nourrissons hospitalisés au CHU de Nantes durant l'hiver 2006-2007.

Dans une première partie, nous discuterons des performances analytiques de notre technique. Dans une seconde partie, nous aborderons l'aspect clinico-biologique de l'infection à hMPV, afin de définir la place susceptible d'être attribuée à sa recherche au sein de la stratégie diagnostique des infections respiratoires du nourrisson au laboratoire de Virologie.

Nous avons choisi de mettre au point une technique de détection du hMPV par biologie moléculaire, car la culture cellulaire de ce virus est extrêmement délicate, et les méthodes de diagnostic rapides (anticorps monoclonaux) ne sont que très récemment apparues sur le marché. La recherche du hMPV à partir d'échantillons cliniques est, dans la grande majorité des études épidémiologiques, réalisée par RT-PCR (les plus récentes utilisent la détection en temps réel à l'aide de sondes) [184, 185]. Ces techniques sont indéniablement plus sensibles que les approches conventionnelles [186, 187] : la détection d'un agent viral est augmentée de 100% dans certaines études [174, 188], et pas uniquement pour les virus de culture délicate [176]. De plus, l'interprétation du résultat d'une amplification est objective, et ces techniques sont plus adaptées à la réalisation d'études « à grande échelle », de par la possibilité de regrouper les échantillons par séries [170, 172].

Nous avons décidé d'amplifier par RT-PCR une séquence située au sein du gène N, non seulement car ce gène est le plus conservé parmi l'ensemble des gènes du hMPV [23], mais également car plusieurs études ont démontré une meilleure sensibilité de détection de l'ensemble des génotypes de hMPV lorsque la cible était localisée dans ce gène [180, 181]. L'hypothèse de l'existence d'un nouveau sous-groupe de hMPV a aussi été émise suite à la description d'une amplification d'un isolat exclusivement à partir d'un fragment de séquence du gène N [29].

Nous avons initialement envisagé de simplement transférer une technique de RT-PCR en temps réel publiée [182], mais nous avons constaté que la sonde employée ne permettait pas de détecter l'ensemble des génotypes décrits de hMPV : des mésappariements ont été mis en évidence au sein de la zone ciblée vis-à-vis de souches de génotype B. Dans l'étude citée, aucun isolat de génotype B n'avait en effet été retrouvé. Nous avons donc redessiné les amorces et sondes de façon à recruter les ARN génomiques de hMPV quelque soit leur génotype, et ceci après analyse des alignements de l'ensemble des séquences répertoriées dans la base de données GenBank.

Notre technique utilise deux sondes génotype-spécifiques, dont les performances ont été validées par l'affiliation correcte aux deux sous-groupes principaux (A et B) du hMPV des spécimens du panel QCMD. Ce génotypage confère une valeur ajoutée dans le domaine de l'épidémiologie.

L'analyse phylogénétique réalisée sur 24 isolats cliniques nous a permis de distinguer 12 génotypes A et 12 génotypes B. Une discrimination supplémentaire a pu être déterminée pour les isolats de génotype B, avec 1 génotype B1 et 11 génotypes B2. La région amplifiée et séquencée est courte (200 pb), et hautement conservée, ce qui assure la sensibilité et la spécificité de la détection. Un séquençage réalisé après amplification d'une région plus variable nous aurait sans doute permis de classer les souches de façon plus précise [18, 189], même s'il est établi que la détermination du sous-groupe de hMPV est concordante quelque soit le gène étudié (N, M, P, F ou L) [23, 24].

La première étape de validation de notre technique a consisté en une évaluation de sa spécificité.

Tous les échantillons testés « positifs » ont été confirmés par séquençage. Aucun faux positif n'a été obtenu, l'amplification est donc spécifique. Comme nous n'avons travaillé qu'à partir d'échantillons négatifs pour l'ensemble des virus respiratoires recherchés en routine, nous avons vérifié l'absence de réactivité croisée en amplifiant cette fois des spécimens connus positifs pour les autres virus respiratoires courants : VRS (sous-groupes A et B), rhinovirus, coronavirus, virus grippaux A et B, et adénovirus. Aucune amplification n'a été détectée, ce qui confirme la spécificité de notre technique pour le hMPV. Nous avons dès lors pu valider le choix de notre cible, et par là-même le dessin de nos amorces. L'absence de réactivité croisée entre les deux sondes a également été contrôlée.

La seconde étape de notre démarche de validation a consisté en l'évaluation de la valeur prédictive négative de notre technique.

La présence d'inhibiteurs au sein des échantillons cliniques pourrait être à l'origine d'une sous-estimation du nombre de prélèvements positifs. Or aucun effet inhibiteur n'a été mis en évidence au cours des essais réalisés sur 10% des échantillons testés négatifs. Syrmis *et al.* ont fait la même constatation et suggèrent que l'introduction préalable des échantillons dans un milieu de transport pour virus dilue efficacement les inhibiteurs. Ces auteurs en arrivent même à la conclusion qu'inclure un IPC (contrôle interne de RT-PCR) au sein de la technique n'est pas opportun au regard des coûts induits [190]. Par contre, la co-amplification d'un fragment de séquence d'un gène humain, décrite dans certaines études [191], aurait un réel intérêt. Elle permettrait en effet de vérifier non seulement l'efficacité de la procédure d'extraction, mais également la richesse de l'échantillon en acide nucléique humain, et donc en matériel cellulaire pouvant renfermer des virus. Le gène le plus utilisé est celui codant pour la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH). Bien que n'ayant pas réalisé cette recherche dans notre étude, la qualité des échantillons analysés a toutefois pu être expertisée, puisque tous les prélèvements ont dans un premier temps fait l'objet d'une investigation par immunofluorescence. Nous avons ainsi pu nous assurer que la richesse en cellules des prélèvements sélectionnés était correcte.

L'analyse des résultats de l'ensemble des laboratoires ayant participé au programme d'évaluation externe de la qualité QCMD a montré de grandes différences de sensibilité entre les techniques de RT-PCR utilisées, plus particulièrement concernant la détection des isolats de hMPV de génotype B. En effet, 60% des laboratoires n'ont pas détecté l'échantillon hMPV B le plus faiblement titré (CQ05). Néanmoins, 16% des participants ne détectent pas non plus le hMPV B de charge virale la plus forte (CQ06), ce qui peut être lié non plus à un problème de sensibilité, mais très probablement à l'existence de mésappariements au sein de la zone d'hybridation des amorces utilisées, n'autorisant pas le recrutement des souches de génotype B. Cela pourrait en partie être expliqué par le fait que la première souche de hMPV isolée, NETH001, est de génotype A [10] ; or de nombreuses mises au point de techniques ont été réalisées à partir de cette séquence. Ceci souligne une fois encore l'intérêt de l'alignement que nous avons réalisé à partir de l'ensemble des séquences répertoriées sur GenBank.

L'étude rétrospective des 247 aspirations nasopharyngées collectées au cours de la période d'étude novembre 2006 - mars 2007 nous a permis de caractériser les aspects cliniques et épidémiologiques de l'infection à hMPV chez les enfants de moins de 3 ans. La population cible du hMPV est essentiellement constituée par les jeunes enfants, et plus particulièrement la population des moins de 2 ans [192]. Dès l'âge de 5 ans, la séroconversion est quasi-universelle [10, 118]. L'épidémiologie retrouvée au cours de notre étude est semblable à celle observée au sein des autres CHU français : le hMPV a été détecté dans 12% des épisodes infectieux respiratoires jusqu'alors non étiquetés, soit 8% du total des viroses respiratoires caractérisées. Ce pourcentage est du même ordre que ceux établis à Caen (13% [111]), Dijon (6% [183]), Reims (6% [182]) ou Montpellier (10% [112]).

La répartition 'saisonnière' observée est également corrélée à celle habituellement décrite, c'est-à-dire que le nombre d'épisodes infectieux est stable tout au long de la période hivernale (sans véritable pic épidémique), avec une tendance à la prolongation au-delà de la période épidémique du VRS, au début du printemps [115].

L'analyse phylogénétique nous a permis de démontrer que non seulement différents génotypes du hMPV co-circulaient au cours de la période d'étude [109], mais également qu'un cas de réinfection était intervenu. En effet, un enfant a présenté deux épisodes d'infection à hMPV, distants de plus de 3 mois. Le premier épisode a été relié à un isolat de génotype A, et le second, de moindre sévérité, a été associé à un isolat de génotype B. Cette observation corrobore plusieurs cas décrits dans la littérature [122, 123]. Ebihara *et al.* [119, 122] retrouvent une même succession d'épisodes infectieux (premier épisode relié à un isolat de génotype A, second épisode induit par une souche de génotype B) chez une patiente de 12 ans, avec une morbidité moindre lors de la réinfection. Les réinfections à hMPV semblent assez fréquentes, puisque ces mêmes auteurs ont rapporté que plus de 50% des patients avaient des anticorps de type IgG anti-hMPV à la phase aiguë d'une infection à hMPV [119]. L'association entre la pathogénicité et le génotype de hMPV est très controversée dans la littérature [116, 117, 189]. Par contre, une corrélation entre l'intensité de la charge virale et la sévérité clinique d'une part, et la contagiosité d'autre part (description de cas familiaux) semble établie [189, 193] ; ce qui soulève la question de l'intérêt des techniques de RT-PCR quantitatives.

La grande sensibilité des techniques d'amplification génique implique d'interpréter avec prudence un signal positif, qui peut ne pas refléter une infection active [139]. Or l'étude réalisée par Williams *et al.* a montré qu'il existait très peu d'infections asymptomatiques [124]. De même, dans l'étude menée par Bosis *et al.*, la recherche du hMPV réalisée à

distance de l'épisode infectieux est toujours négative, et semble montrer qu'il n'y a pas de persistance du génome viral du hMPV dans le tractus respiratoire à distance d'une infection [189]. Il est néanmoins important de tempérer ces résultats, en signalant le biais de recrutement inhérent à ces différentes études, car les patients admis aux urgences ne sont pas représentatifs de la population générale, avec une sélection des pathologies les plus sévères. Ceci met en évidence la nécessité à l'avenir de réaliser des études communautaires [192].

Les études épidémiologiques récentes mettant en œuvre des techniques de RT-PCR quantitatives suggèrent que l'implication du virus dans la pathologie est d'autant plus probable que la charge virale est importante [185]. Le Ct est un indicateur de charge virale relative (plus sa valeur est basse, plus le titre viral est élevé) ; cependant l'interprétation des résultats doit tenir compte des incertitudes quant à la qualité du prélèvement (richesse en cellules) et de son transport (milieu de transport, durée et température de conservation). Selon Bosis *et al.*, compte-tenu de la variabilité dans la collection des spécimens respiratoires, une variation de Ct d'un facteur 10 semble nécessaire pour être significative [189].

Les techniques moléculaires offrent ainsi de grandes perspectives dans le cadre du diagnostic étiologique des infections respiratoires [186, 194-196]. Leur intérêt s'est accru avec l'avènement des techniques multiplex (initiées par Gilbert *et al.*, en 1996 [197], puis Freymuth *et al.*, en 1997 [198]), qui permettent la détection simultanée de plusieurs génomes viraux dans un même tube. L'étude de Templeton *et al.* [186], qui inclut également la recherche d'agents bactériens atypiques (*Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumophila* et *Bordetella pertussis*), détermine l'étiologie de 76% des épisodes infectieux respiratoires. Cette proportion atteint 86% dans l'étude de Gruteke *et al.* [196].

L'utilisation de PCR multiplex a également permis de caractériser les infections virales simultanées [171], avec des incidences extrêmement variables : de 3 à 33% [186, 191]. Il n'y a pas de combinaison préférentielle de virus rapportée, et seul un petit nombre d'études montre une association entre co-infection et sévérité clinique [140, 141].

La mise au point de telles techniques est néanmoins particulièrement délicate. Leur conception relève désormais du domaine industriel, et non de mises au point 'maison'. Quelques kits sont déjà commercialisés, ou en développement (exemple : Seeplex™, de la société Seegene). Toutefois, la nécessité de détecter un nombre d'agents infectieux s'accroissant sans cesse excèdera les possibilités des PCR multiplex. Cette tâche sera sans doute entreprise avec la future génération de diagnostics, la technologie des puces à ADN [194].

La mise en place en routine des techniques moléculaires dans le cadre du diagnostic des infections respiratoires reste cependant controversée [195].

L'utilisation en pratique quotidienne au laboratoire se heurte en effet à plusieurs écueils, et notamment le surcoût induit, au regard du faible impact constaté sur la prise en charge clinique. Les techniques moléculaires sont plus chères que les approches conventionnelles. De plus, le délai de réponse actuel des techniques de diagnostic moléculaire est encore trop important pour influencer la démarche clinique.

Plusieurs études ont montré le bénéfice clinique et financier d'une détection rapide du VRS dans les prélèvements respiratoires. Une corrélation directe est établie entre cette rapidité et une diminution de la durée d'hospitalisation, de l'utilisation des antibiotiques, des examens complémentaires de laboratoire, et du coût global de la prise en charge [199].

Le seul format disponible à ce jour pour le dépistage rapide (anticorps monoclonaux) du hMPV est l'immunofluorescence directe (technique pratiquée uniquement au laboratoire et non pas sous forme de « doctor-test »), dont il existe des kits commerciaux. Quelques équipes ont déjà évalué leurs performances analytiques, en les comparant à la RT-PCR : Landry *et al.* ont travaillé sur le kit Light Diagnostics de Millipore [184], l'équipe de Aslanzadeh *et al.* a testé les kits commercialisés par Diagnostic Hybrids Inc et Oxoid (Imagen™) [200]. La spécificité des anticorps approche 100% quelque soit le kit testé. La sensibilité demande néanmoins à être améliorée : elle a été mesurée à 85.4%, 62.5% et 63.2%, respectivement, pour les 3 kits cités [184, 200]. Les études médico-économiques concluent cependant à une meilleure « efficacité clinique » des techniques d'immunofluorescence directe (résultat rapide, à moindre coût). Les techniques moléculaires semblent par contre plus adaptées à la réalisation d'études épidémiologiques 'à grande échelle' [194]. L'étude de Gerna suggère d'utiliser une combinaison de ces techniques, leur complémentarité assurant l'obtention d'une meilleure sensibilité de détection du hMPV [193].

Rappelons aussi que la faible charge virale présente dans les sécrétions respiratoires des populations adultes limitera toujours l'intérêt de la détection antigénique directe [187]. D'autres études coût-efficacité doivent donc être menées, afin d'optimiser la place à attribuer aux diverses techniques au sein de la stratégie diagnostique, en fonction des populations concernées. Cette évaluation devra également être conduite hors du contexte de la pneumopédiatrie, en particulier chez les greffés de moelle ou les transplantés pulmonaires.

---

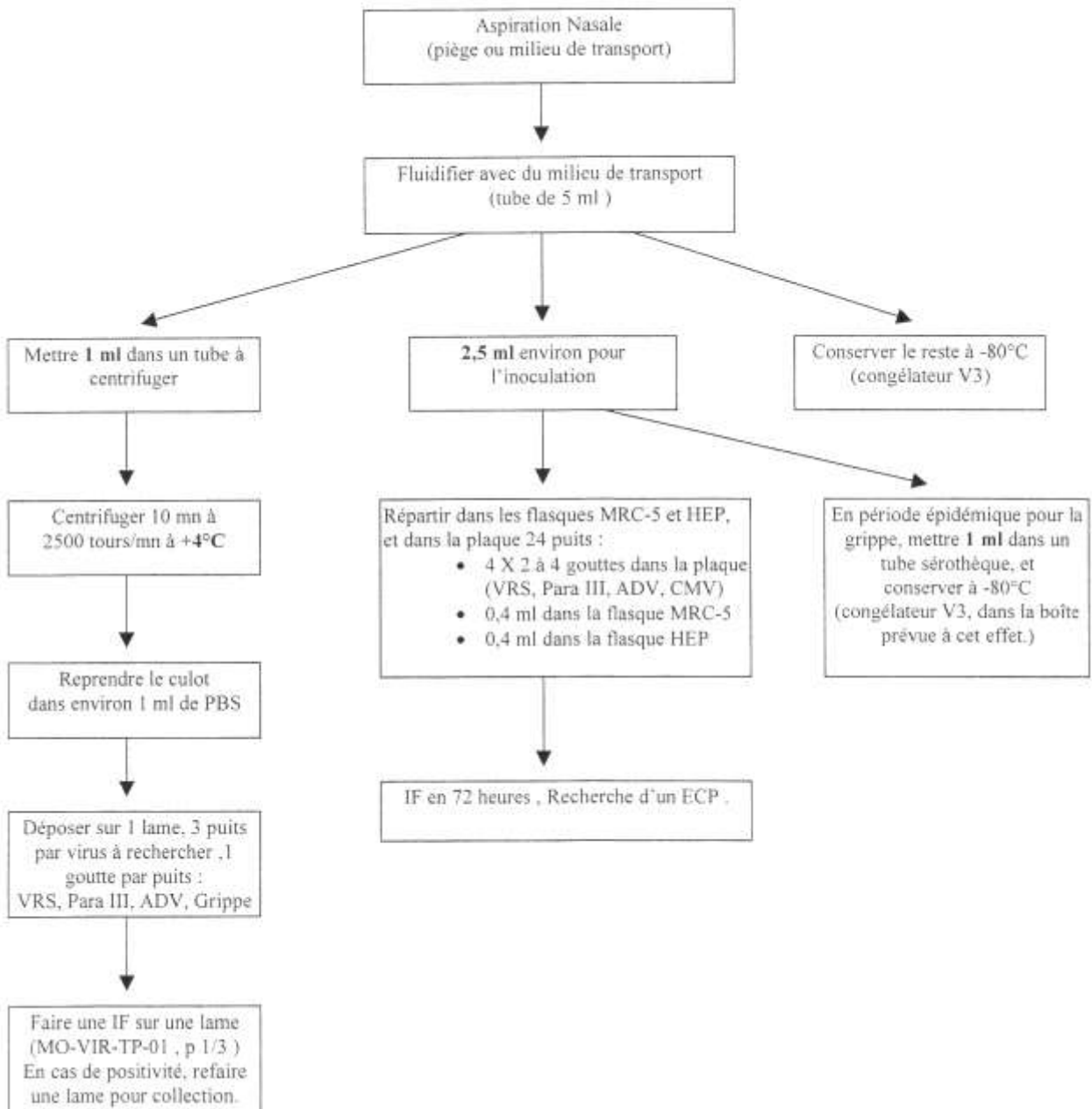
Le métagneumovirus humain joue un rôle significatif dans les infections respiratoires du jeune enfant et du nourrisson. Le diagnostic des infections à hMPV est actuellement réalisé par RT-PCR. Son isolement en culture cellulaire est difficile, et par conséquent beaucoup moins utilisé. Récemment, des anticorps monoclonaux ont été développés.

Notre travail a consisté en la mise au point d'une technique de RT-PCR en temps réel, adaptée à l'objectif d'une détection sensible et spécifique du hMPV dans des aspirations nasopharyngées. Cette technique nous a permis d'estimer la prévalence du hMPV chez les enfants âgés de moins de 3 ans admis au CHU de Nantes au cours de l'hiver 2006-2007. Son implication a été établie dans 12% des épisodes infectieux respiratoires jusqu'alors d'étiologie inconnue, soit 8% des infections respiratoires virales caractérisées ; ce qui le place en 4<sup>ème</sup> position (derrière le VRS (44%), la grippe (23%) et l'adénovirus (10%)), en position équivalente à celle des rhinovirus (8%).

Les techniques moléculaires tendent à devenir la référence dans le diagnostic des infections respiratoires virales, car elles s'avèrent beaucoup plus sensibles que la technique de culture cellulaire. La possibilité de combiner la recherche de multiples agents pathogènes leur confère un intérêt supplémentaire. La place de la PCR en routine ne fait cependant pas l'unanimité. Les techniques de diagnostic rapides (anticorps monoclonaux) sont moins coûteuses, et le délai de rendu de résultat est actuellement plus adapté à la recherche d'un impact sur la prise en charge clinique.

Il est donc nécessaire de développer des stratégies diagnostiques, s'adaptant aux évolutions technologiques, aux populations concernées, aux ressources disponibles, au nombre et à la nature des agents infectieux pouvant être couverts. Des études coût-efficacité devront être poursuivies pour répondre à cet objectif. Afin de concilier rapidité, contrôle des coûts et une forte sensibilité de détection des virus respiratoires, l'utilisation séquentielle des techniques de diagnostic rapides puis de la RT-PCR multiplex en cas de négativité, semble à ce jour la meilleure façon de progresser dans le diagnostic des maladies respiratoires de l'enfant. La collaboration entre cliniciens et biologistes demeure la priorité.

## Annexe 1. MODE OPERATOIRE : TRAITEMENT DES ASPIRATIONS NASALES



---

**Annexe 2. EXTRACTION DE L'ARN PAR CENTRIFUGATIONS  
KIT NUCLEOSPIN® RNA VIRUS MACHEREY NAGEL (& APPAREIL QIAVAC)**

Pièce d'extraction. Revêtir une casaque et travailler sous la hotte.

1. LYSE

- Décristalliser des aliquots de tampon de lyse RAV1 + « *carrier RNA* » (600 µl, conservés à -20°C) 5 min à 70°C, avec agitation régulière
- Incuber les tubes RAV1 contenant 150 µl de prélèvement et le témoin (eau RNase free) 5 min à 70°C (après vortex 10 à 15 secondes)
- Centrifuger les tubes 1 min à 10 000 tours/min

2. FIXATION DE L'ARN SUR LA COLONNE

- Prélever 600 µl d'éthanol absolu, mélanger doucement avec l'échantillon lysé ; prélever 700 µl du mélange et déposer dans la colonne fixée sur l'appareil QIAVAC ; fermer et attendre l'aspiration totale du liquide.

3. LAVAGES

- Déposer 500 µl de tampon de lavage RAW dans chaque colonne ; attendre l'aspiration totale du liquide ; ajouter ensuite 600 µl puis 200 µl de tampon de lavage RAV3 + éthanol dans chaque colonne ; attendre l'aspiration totale du liquide.
- Retirer la colonne du support, la placer dans un tube collecteur et centrifuger l'ensemble 5 min à 13000 tours/min

4. ELUTION DE L'ARN EXTRAIT

- Jeter le tube collecteur et placer la colonne dans un tube eppendorf de 1,5 ml.
- Incuber l'ensemble 5 min à 70°C (tube ouvert pour permettre l'évaporation de l'alcool résiduel).
- Déposer 50 µl d'eau RNase free (préchauffée à 70°C) ; laisser en contact 1 à 2 min à température ambiante.
- Centrifuger l'ensemble colonne+ tube collecteur à 13000 tours/min pendant 1 min.
- Jeter la colonne et fermer le tube eppendorf contenant l'ARN extrait.

Rincer l'appareil QIAVAC à l'eau puis au moins 15 min à l'eau de javel (1,2° chlorhydriques), rincer et sécher. Vider la poubelle dans le récipient des déchets cyanurés.

5. CONSERVATION

Les extraits ARN purifiés sont conservés à -20°C

---

### Annexe 3. ELECTROPHORESE DES PRODUITS DE PCR

#### 1. Tampon utilisé pour l'électrophorèse et la fabrication du gel = TBE 10X

TBE 10X	Tris Base	54 g
	Acide borique	27,5 g
	EDTA	4,65 g
	Eau distillée	qsp 1 litre

#### 2. Solution pour gel de polyacrylamide à 9%

Solution acrylamide bisacryl 37,5/1 9%	Acrylamide 37,5/1 40%	112 ml
	TBE 10X	50 ml
	Eau distillée	qsp 500 ml

#### 3. Gel de polyacrylamide à 9%

Pour un gel	Acrylamide bis acryl 37,5/1 9%	10 ml
	Ammonium persulfate	100 µl
	TEMED	10 µl

#### **Procédure :**

Dans un tube de 30 ml, préparer le mélange pour gel de polyacrylamide à 9% ; agiter par retournement. Couler le gel entre deux plaques de verre (séparées par des espaceurs et maintenues solidaires par des pinces) - attention à ne pas faire de bulles - ; puis placer un peigne permettant de créer des puits pour les dépôts, et laisser polymériser pendant 15 minutes.

Placer ensuite les plaques contenant le gel dans une cuve de migration ; remplir cette dernière de tampon TBE 1X, puis retirer le peigne.

Sur un Parafilm®, faire des dépôts de 2 µl de tampon de chargement, afin d'effectuer le mélange avec 5µl de produits de PCR, ce mélange étant destiné à être déposé dans les puits. Déposer également le marqueur de poids moléculaire (marqueur V de 8 à 587 paires de bases, Roche®, figure 15 page 58).

Faire migrer pendant 1 heure à 220 volts.

Placer le gel dans une solution de bromure d'éthidium, laisser tremper 10 à 15 minutes.

La visualisation se fera ensuite sous lampe UV.

#### Annexe 4. TABLEAU RECAPITULATIF DES DONNEES CLINIQUES POUR LES 27 PATIENTS hMPV POSITIFS

référence patient	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22a	22b	23	24	25	26	27
DATE	S10	S51	S10	S01	S52	S04	S06	S50	S08	S11	S06	S10	S02	S05	S45	S11	S09	S11	S13	S45	S49	S51	S13	S10	S13	S49	S12	S11
sexe	F	M	F	F	M	M	F	M	M	F	F	F	F	M	M	M	M	F	F	F	F	F	F	M	F	M	F	F
âge (mois)	11	5	22j	17	20	25	19j	33	7	25	4	9	3	6	6	11	21	5	2	14	3	6	10	1	4	1	13	29
atopie (pers / fam)	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ATCD prématurité	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
co-morbidités	-	-	-	T+A	-	A	-	T	C	+	-	A	-	-	-	-	-	anX	-	anX+C	anX+A	-	A	-	A	C	-	-
durée moy hospit. (j)	3	3	2	6	5	3	4		2	ONCO			3	2	4	4		4	2	18	10	7	3	3	11	3		
MOTIFS ADMISSION																												
dyspnée	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
fièvre (> 38°C)	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+
toux	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+
troubles digestifs	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
convulsions	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SIGNES CLINIQUES																												
toux	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+
sibilants	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-
signes de lutte	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-
rhinorrhée / rhinite	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+
fièvre (> 38°C)	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+
difficultés alimentaires	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+
PRISE EN CHARGE																												
O2 (SaO2 < 95%)	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-
ATB	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+
ventoline/célestène	-	Co	-	CoB2	-	CoB2	-	B2	Co	-	-	B2	-	-	CoB2	-	-	Co	-	CoB2	-	CoB2	-	-	CoB2	-	-	-
BIOLOGIE																												
anémie (Hb<11 g/dl)	+	+	-	-	+											+	+	+	+	+								-
neutropénie	-	-	-	-	-												+	-	-	-	-							-
synd inflammatoire	+	+	-	-	+	+							+	+	-	+	+	-	-	+								+
RADIO THORACIQUE		F		S	S	S		N	N					F	N	N	S				F	N	N	N	N	D	N	N

Risques liés au terrain : anX anomalie chromosomique ; C dysplasie cardiopulmonaire ; A épisode antérieur de bronchiolite ; T tabagisme passif.

Prise en charge : Co corticoïdes et B2 bronchodilatateurs (B2-mimétiques)

Commentaires radiographies : F foyer systématisé ; N normale ; S syndrome bronchoalvéolaire ; D distension thoracique

---

# **Bibliographie**

1. Monto, A.S., *Epidemiology of viral respiratory infections*. Am J Med, 2002. **112 Suppl 6A**: p. 4S-12S.
2. Davies, H.D., et al., *Prospective comparative study of viral, bacterial and atypical organisms identified in pneumonia and bronchiolitis in hospitalized Canadian infants*. Pediatr Infect Dis J, 1996. **15**(4): p. 371-5.
3. Ruiz, M., et al., *Etiology of community-acquired pneumonia: impact of age, comorbidity, and severity*. Am J Respir Crit Care Med, 1999. **160**(2): p. 397-405.
4. Nokso-Koivisto, J., et al., *Viral etiology of frequently recurring respiratory tract infections in children*. Clin Infect Dis, 2002. **35**(5): p. 540-6.
5. Drosten, C., et al., *Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome*. N Engl J Med, 2003. **348**(20): p. 1967-76.
6. Fouchier, R.A., et al., *A previously undescribed coronavirus associated with respiratory disease in humans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(16): p. 6212-6.
7. Ito, M., et al., *Isolation and identification of a novel human parechovirus*. J Gen Virol, 2004. **85**(Pt 2): p. 391-8.
8. Ksiazek, T.G., et al., *A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome*. N Engl J Med, 2003. **348**(20): p. 1953-66.
9. van der Hoek, L., et al., *Identification of a new human coronavirus*. Nat Med, 2004. **10**(4): p. 368-73.
10. van den Hoogen, B.G., et al., *A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease*. Nat Med, 2001. **7**(6): p. 719-24.
11. Kuiken, T., et al., *Experimental human metapneumovirus infection of cynomolgus macaques (Macaca fascicularis) results in virus replication in ciliated epithelial cells and pneumocytes with associated lesions throughout the respiratory tract*. Am J Pathol, 2004. **164**(6): p. 1893-900.
12. Boivin, G., et al., *Virological features and clinical manifestations associated with human metapneumovirus: a new paramyxovirus responsible for acute respiratory-tract infections in all age groups*. J Infect Dis, 2002. **186**(9): p. 1330-4.
13. Njenga, M.K., H.M. Lwamba, and B.S. Seal, *Metapneumoviruses in birds and humans*. Virus Res, 2003. **91**(2): p. 163-9.
14. Toquin, D., et al., *Subgroup C avian metapneumovirus (MPV) and the recently isolated human MPV exhibit a common organization but have extensive sequence divergence in their putative SH and G genes*. J Gen Virol, 2003. **84**(Pt 8): p. 2169-78.
15. Peret, T.C., et al., *Characterization of human metapneumoviruses isolated from patients in North America*. J Infect Dis, 2002. **185**(11): p. 1660-3.
16. Hamelin, M.E., Y. Abed, and G. Boivin, *Human metapneumovirus: a new player among respiratory viruses*. Clin Infect Dis, 2004. **38**(7): p. 983-90.
17. van den Hoogen, B.G., et al., *Analysis of the genomic sequence of a human metapneumovirus*. Virology, 2002. **295**(1): p. 119-32.
18. Biacchesi, S., et al., *Genetic diversity between human metapneumovirus subgroups*. Virology, 2003. **315**(1): p. 1-9.
19. Bossert, B. and K.K. Conzelmann, *Respiratory syncytial virus (RSV) nonstructural (NS) proteins as host range determinants: a chimeric bovine RSV with NS genes from human RSV is attenuated in interferon-competent bovine cells*. J Virol, 2002. **76**(9): p. 4287-93.
20. Govindarajan, D. and S.K. Samal, *Sequence analysis of the large polymerase (L) protein of the US strain of avian metapneumovirus indicates a close resemblance to that of the human metapneumovirus*. Virus Res, 2004. **105**(1): p. 59-66.
21. Jacobs, J.A., et al., *Subtype B avian metapneumovirus resembles subtype A more closely than subtype C or human metapneumovirus with respect to the*

- 
- phosphoprotein, and second matrix and small hydrophobic proteins*. Virus Res, 2003. **92**(2): p. 171-8.
22. Yunus, A.S., et al., *Deduced amino acid sequence of the small hydrophobic protein of US avian pneumovirus has greater identity with that of human metapneumovirus than those of non-US avian pneumoviruses*. Virus Res, 2003. **93**(1): p. 91-7.
  23. Bastien, N., et al., *Sequence analysis of the N, P, M and F genes of Canadian human metapneumovirus strains*. Virus Res, 2003. **93**(1): p. 51-62.
  24. van den Hoogen, B.G., et al., *Antigenic and genetic variability of human metapneumoviruses*. Emerg Infect Dis, 2004. **10**(4): p. 658-66.
  25. Boivin, G., et al., *Global genetic diversity of human metapneumovirus fusion gene*. Emerg Infect Dis, 2004. **10**(6): p. 1154-7.
  26. Peret, T.C., et al., *Sequence polymorphism of the predicted human metapneumovirus G glycoprotein*. J Gen Virol, 2004. **85**(Pt 3): p. 679-86.
  27. Ishiguro, N., et al., *High genetic diversity of the attachment (G) protein of human metapneumovirus*. J Clin Microbiol, 2004. **42**(8): p. 3406-14.
  28. Bastien, N., et al., *Genetic variability of the G glycoprotein gene of human metapneumovirus*. J Clin Microbiol, 2004. **42**(8): p. 3532-7.
  29. Huck, B., et al., *Novel human metapneumovirus sublineage*. Emerg Infect Dis, 2006. **12**(1): p. 147-50.
  30. Skiadopoulos, M.H., et al., *The two major human metapneumovirus genetic lineages are highly related antigenically, and the fusion (F) protein is a major contributor to this antigenic relatedness*. J Virol, 2004. **78**(13): p. 6927-37.
  31. Tang, R.S., et al., *Effects of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus antigen insertion in two 3' proximal genome positions of bovine/human parainfluenza virus type 3 on virus replication and immunogenicity*. J Virol, 2003. **77**(20): p. 10819-28.
  32. Biacchesi, S., et al., *Recombinant human Metapneumovirus lacking the small hydrophobic SH and/or attachment G glycoprotein: deletion of G yields a promising vaccine candidate*. J Virol, 2004. **78**(23): p. 12877-87.
  33. Skiadopoulos, M.H., et al., *Individual contributions of the human metapneumovirus F, G, and SH surface glycoproteins to the induction of neutralizing antibodies and protective immunity*. Virology, 2006. **345**(2): p. 492-501.
  34. Collins, P.L. and J.E. Crowe, Jr., eds. *Respiratory Syncytial Virus and Metapneumovirus*. 5th ed. Vol. 1. 2007, Lippincott Williams & Wilkins.
  35. Galiano, M., et al., *Evidence of human metapneumovirus in children in Argentina*. J Med Virol, 2004. **72**(2): p. 299-303.
  36. Bastien, N., et al., *Human metapneumovirus infection in the Canadian population*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(10): p. 4642-6.
  37. Biacchesi, S., et al., *Recovery of human metapneumovirus from cDNA: optimization of growth in vitro and expression of additional genes*. Virology, 2004. **321**(2): p. 247-59.
  38. Schickli, J.H., et al., *An S101P substitution in the putative cleavage motif of the human metapneumovirus fusion protein is a major determinant for trypsin-independent growth in vero cells and does not alter tissue tropism in hamsters*. J Virol, 2005. **79**(16): p. 10678-89.
  39. Biacchesi, S., et al., *Modification of the trypsin-dependent cleavage activation site of the human metapneumovirus fusion protein to be trypsin independent does not increase replication or spread in rodents or nonhuman primates*. J Virol, 2006. **80**(12): p. 5798-806.
  40. Buckland, R. and F. Wild, *Leucine zipper motif extends*. Nature, 1989. **338**(6216): p. 547.

- 
41. Chambers, P., C.R. Pringle, and A.J. Easton, *Heptad repeat sequences are located adjacent to hydrophobic regions in several types of virus fusion glycoproteins*. J Gen Virol, 1990. **71 ( Pt 12)**: p. 3075-80.
  42. Lamb, R.A., *Paramyxovirus fusion: a hypothesis for changes*. Virology, 1993. **197(1)**: p. 1-11.
  43. Russell, C.J., T.S. Jardetzky, and R.A. Lamb, *Membrane fusion machines of paramyxoviruses: capture of intermediates of fusion*. Embo J, 2001. **20(15)**: p. 4024-34.
  44. Hernandez, L.D., et al., *Virus-cell and cell-cell fusion*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1996. **12**: p. 627-61.
  45. Colman, P.M. and M.C. Lawrence, *The structural biology of type I viral membrane fusion*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4(4)**: p. 309-19.
  46. Dutch, R.E., T.S. Jardetzky, and R.A. Lamb, *Virus membrane fusion proteins: biological machines that undergo a metamorphosis*. Biosci Rep, 2000. **20(6)**: p. 597-612.
  47. Earp, L.J., et al., *The many mechanisms of viral membrane fusion proteins*. Curr Top Microbiol Immunol, 2005. **285**: p. 25-66.
  48. Jardetzky, T.S. and R.A. Lamb, *Virology: a class act*. Nature, 2004. **427(6972)**: p. 307-8.
  49. West, D.S., et al., *Role of the simian virus 5 fusion protein N-terminal coiled-coil domain in folding and promotion of membrane fusion*. J Virol, 2005. **79(3)**: p. 1543-51.
  50. Levine, S., R. Klaiber-Franco, and P.R. Paradiso, *Demonstration that glycoprotein G is the attachment protein of respiratory syncytial virus*. J Gen Virol, 1987. **68 ( Pt 9)**: p. 2521-4.
  51. Walsh, E.E. and J. Hruska, *Monoclonal antibodies to respiratory syncytial virus proteins: identification of the fusion protein*. J Virol, 1983. **47(1)**: p. 171-7.
  52. Wertz, G.W., et al., *Nucleotide sequence of the G protein gene of human respiratory syncytial virus reveals an unusual type of viral membrane protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82(12)**: p. 4075-9.
  53. Jentoft, N., *Why are proteins O-glycosylated?* Trends Biochem Sci, 1990. **15(8)**: p. 291-4.
  54. Laphorn, A.J., et al., *Cystine nooses and protein specificity*. Nat Struct Biol, 1995. **2(4)**: p. 266-8.
  55. Tripp, R.A., et al., *CX3C chemokine mimicry by respiratory syncytial virus G glycoprotein*. Nat Immunol, 2001. **2(8)**: p. 732-8.
  56. Roberts, S.R., et al., *The membrane-associated and secreted forms of the respiratory syncytial virus attachment glycoprotein G are synthesized from alternative initiation codons*. J Virol, 1994. **68(7)**: p. 4538-46.
  57. Cane, P.A. and C.R. Pringle, *Evolution of subgroup A respiratory syncytial virus: evidence for progressive accumulation of amino acid changes in the attachment protein*. J Virol, 1995. **69(5)**: p. 2918-25.
  58. Bukreyev, A., et al., *Recombinant respiratory syncytial virus from which the entire SH gene has been deleted grows efficiently in cell culture and exhibits site-specific attenuation in the respiratory tract of the mouse*. J Virol, 1997. **71(12)**: p. 8973-82.
  59. Teng, M.N. and P.L. Collins, *Identification of the respiratory syncytial virus proteins required for formation and passage of helper-dependent infectious particles*. J Virol, 1998. **72(7)**: p. 5707-16.
  60. Biacchesi, S., et al., *Infection of nonhuman primates with recombinant human metapneumovirus lacking the SH, G, or M2-2 protein categorizes each as a*

- 
- nonessential accessory protein and identifies vaccine candidates. J Virol*, 2005. **79**(19): p. 12608-13.
61. Faaberg, K.S. and M.E. Peeples, *Association of soluble matrix protein of Newcastle disease virus with liposomes is independent of ionic conditions. Virology*, 1988. **166**(1): p. 123-32.
  62. Lamb, R.A. and P.W. Choppin, *The synthesis of Sendai virus polypeptides in infected cells. II. Intracellular distribution of polypeptides. Virology*, 1977. **81**(2): p. 371-81.
  63. Nagai, Y., H. Ogura, and H. Klenk, *Studies on the assembly of the envelope of Newcastle disease virus. Virology*, 1976. **69**(2): p. 523-38.
  64. Yoshida, T., et al., *Membrane (M) protein of HVJ (Sendai virus): its role in virus assembly. Virology*, 1976. **71**(1): p. 143-61.
  65. Sanderson, C.M., H.H. Wu, and D.P. Nayak, *Sendai virus M protein binds independently to either the F or the HN glycoprotein in vivo. J Virol*, 1994. **68**(1): p. 69-76.
  66. Schmitt, A.P., B. He, and R.A. Lamb, *Involvement of the cytoplasmic domain of the hemagglutinin-neuraminidase protein in assembly of the paramyxovirus simian virus 5. J Virol*, 1999. **73**(10): p. 8703-12.
  67. Stricker, R., G. Mottet, and L. Roux, *The Sendai virus matrix protein appears to be recruited in the cytoplasm by the viral nucleocapsid to function in viral assembly and budding. J Gen Virol*, 1994. **75** ( Pt 5): p. 1031-42.
  68. Yoshida, T., et al., *Inhibition of the assembly of Newcastle disease virus by monensin. Virus Res*, 1986. **4**(2): p. 179-95.
  69. Morgan, E.M., G.G. Re, and D.W. Kingsbury, *Complete sequence of the Sendai virus NP gene from a cloned insert. Virology*, 1984. **135**(1): p. 279-87.
  70. Blumberg, B.M. and D. Kolakofsky, *Intracellular vesicular stomatitis virus leader RNAs are found in nucleocapsid structures. J Virol*, 1981. **40**(2): p. 568-76.
  71. Blumberg, B.M., M. Leppert, and D. Kolakofsky, *Interaction of VSV leader RNA and nucleocapsid protein may control VSV genome replication. Cell*, 1981. **23**(3): p. 837-45.
  72. Atreya, P.L., M.E. Peeples, and P.L. Collins, *The NS1 protein of human respiratory syncytial virus is a potent inhibitor of minigenome transcription and RNA replication. J Virol*, 1998. **72**(2): p. 1452-61.
  73. Fearn, R., M.E. Peeples, and P.L. Collins, *Increased expression of the N protein of respiratory syncytial virus stimulates minigenome replication but does not alter the balance between the synthesis of mRNA and antigenome. Virology*, 1997. **236**(1): p. 188-201.
  74. Kamer, G. and P. Argos, *Primary structural comparison of RNA-dependent polymerases from plant, animal and bacterial viruses. Nucleic Acids Res*, 1984. **12**(18): p. 7269-82.
  75. Poch, O., et al., *Sequence comparison of five polymerases (L proteins) of unsegmented negative-strand RNA viruses: theoretical assignment of functional domains. J Gen Virol*, 1990. **71** ( Pt 5): p. 1153-62.
  76. Stec, D.S., M.G. Hill, 3rd, and P.L. Collins, *Sequence analysis of the polymerase L gene of human respiratory syncytial virus and predicted phylogeny of nonsegmented negative-strand viruses. Virology*, 1991. **183**(1): p. 273-87.
  77. Poch, O., et al., *Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. Embo J*, 1989. **8**(12): p. 3867-74.
  78. Smallwood, S., et al., *Mutations in conserved domain II of the large (L) subunit of the Sendai virus RNA polymerase abolish RNA synthesis. Virology*, 1999. **262**(2): p. 375-83.

- 
79. Collins, P.L., et al., *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**(25): p. 11563-7.
  80. Fearn, R. and P.L. Collins, *Role of the M2-1 transcription antitermination protein of respiratory syncytial virus in sequential transcription.* J Virol, 1999. **73**(7): p. 5852-64.
  81. Hardy, R.W., S.B. Harmon, and G.W. Wertz, *Diverse gene junctions of respiratory syncytial virus modulate the efficiency of transcription termination and respond differently to M2-mediated antitermination.* J Virol, 1999. **73**(1): p. 170-6.
  82. Hardy, R.W. and G.W. Wertz, *The product of the respiratory syncytial virus M2 gene ORF1 enhances readthrough of intergenic junctions during viral transcription.* J Virol, 1998. **72**(1): p. 520-6.
  83. Ahmadian, G., P. Chambers, and A.J. Easton, *Detection and characterization of proteins encoded by the second ORF of the M2 gene of pneumoviruses.* J Gen Virol, 1999. **80** ( Pt 8): p. 2011-6.
  84. Collins, P.L., M.G. Hill, and P.R. Johnson, *The two open reading frames of the 22K mRNA of human respiratory syncytial virus: sequence comparison of antigenic subgroups A and B and expression in vitro.* J Gen Virol, 1990. **71** ( Pt 12): p. 3015-20.
  85. Zamora, M. and S.K. Samal, *Sequence analysis of M2 mRNA of bovine respiratory syncytial virus obtained from an F-M2 dicistronic mRNA suggests structural homology with that of human respiratory syncytial virus.* J Gen Virol, 1992. **73** ( Pt 3): p. 737-41.
  86. Bermingham, A. and P.L. Collins, *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**(20): p. 11259-64.
  87. Collins, P.L. and G.W. Wertz, *The envelope-associated 22K protein of human respiratory syncytial virus: nucleotide sequence of the mRNA and a related polytranscript.* J Virol, 1985. **54**(1): p. 65-71.
  88. Elango, N., M. Satake, and S. Venkatesan, *mRNA sequence of three respiratory syncytial virus genes encoding two nonstructural proteins and a 22K structural protein.* J Virol, 1985. **55**(1): p. 101-10.
  89. Lamb, R.A. and G.D. Parks, eds. *Paramyxoviridae : the viruses and their replication* ed. Fields Virology, 5th ed. L.W. Wilkins. Vol. 1. 2007.
  90. Teng, M.N., et al., *Recombinant respiratory syncytial virus that does not express the NS1 or M2-2 protein is highly attenuated and immunogenic in chimpanzees.* J Virol, 2000. **74**(19): p. 9317-21.
  91. Jin, H., et al., *Respiratory syncytial virus that lacks open reading frame 2 of the M2 gene (M2-2) has altered growth characteristics and is attenuated in rodents.* J Virol, 2000. **74**(1): p. 74-82.
  92. Buchholz, U.J., et al., *Deletion of M2 gene open reading frames 1 and 2 of human metapneumovirus: effects on RNA synthesis, attenuation, and immunogenicity.* J Virol, 2005. **79**(11): p. 6588-97.
  93. Takimoto, T. and A. Portner, *Molecular mechanism of paramyxovirus budding.* Virus Res, 2004. **106**(2): p. 133-45.
  94. Martinez, I. and J.A. Melero, *Binding of human respiratory syncytial virus to cells: implication of sulfated cell surface proteoglycans.* J Gen Virol, 2000. **81**(Pt 11): p. 2715-22.

- 
95. Collins, P.L. and G.W. Wertz, *cDNA cloning and transcriptional mapping of nine polyadenylylated RNAs encoded by the genome of human respiratory syncytial virus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(11): p. 3208-12.
  96. Kingsbury, D.W., C.H. Hsu, and K.G. Murti, *Intracellular metabolism of sendai virus nucleocapside*. Virology, 1978. **91**(1): p. 86-94.
  97. Roberts, S.R., R.W. Compans, and G.W. Wertz, *Respiratory syncytial virus matures at the apical surfaces of polarized epithelial cells*. J Virol, 1995. **69**(4): p. 2667-73.
  98. Nissen, M.D., et al., *Evidence of human metapneumovirus in Australian children*. Med J Aust, 2002. **176**(4): p. 188.
  99. Stockton, J., et al., *Human metapneumovirus as a cause of community-acquired respiratory illness*. Emerg Infect Dis, 2002. **8**(9): p. 897-901.
  100. Jartti, T., et al., *Metapneumovirus and acute wheezing in children*. Lancet, 2002. **360**(9343): p. 1393-4.
  101. Freymuth, F., et al., *Presence of the new human metapneumovirus in French children with bronchiolitis*. Pediatr Infect Dis J, 2003. **22**(1): p. 92-4.
  102. Esper, F., et al., *Human metapneumovirus infection in the United States: clinical manifestations associated with a newly emerging respiratory infection in children*. Pediatrics, 2003. **111**(6 Pt 1): p. 1407-10.
  103. Vicente, D., et al., *Human metapneumovirus and community-acquired respiratory illness in children*. Emerg Infect Dis, 2003. **9**(5): p. 602-3.
  104. Boivin, G., et al., *Human metapneumovirus infections in hospitalized children*. Emerg Infect Dis, 2003. **9**(6): p. 634-40.
  105. Rawlinson, W.D., et al., *Asthma exacerbations in children associated with rhinovirus but not human metapneumovirus infection*. J Infect Dis, 2003. **187**(8): p. 1314-8.
  106. Peiris, J.S., et al., *Children with respiratory disease associated with metapneumovirus in Hong Kong*. Emerg Infect Dis, 2003. **9**(6): p. 628-33.
  107. Falsey, A.R., et al., *Human metapneumovirus infections in young and elderly adults*. J Infect Dis, 2003. **187**(5): p. 785-90.
  108. Maggi, F., et al., *Human metapneumovirus associated with respiratory tract infections in a 3-year study of nasal swabs from infants in Italy*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(7): p. 2987-91.
  109. Viazov, S., et al., *High prevalence of human metapneumovirus infection in young children and genetic heterogeneity of the viral isolates*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(7): p. 3043-5.
  110. van den Hoogen, B.G., et al., *Prevalence and clinical symptoms of human metapneumovirus infection in hospitalized patients*. J Infect Dis, 2003. **188**(10): p. 1571-7.
  111. Freymuth, F., et al., *Le métapneumovirus humain*. Virologie, 2004. **8**(6): p. 413-23.
  112. Guyon, G., et al., *[Epidemiology of Human Metapneumovirus in respiratory tract diseases of children: preliminary results]*. Arch Pediatr, 2005. **12 Suppl 1**: p. S61-3.
  113. Mullins, J.A., et al., *Human metapneumovirus infection among children hospitalized with acute respiratory illness*. Emerg Infect Dis, 2004. **10**(4): p. 700-5.
  114. Laham, F.R., et al., *Differential production of inflammatory cytokines in primary infection with human metapneumovirus and with other common respiratory viruses of infancy*. J Infect Dis, 2004. **189**(11): p. 2047-56.
  115. Esper, F., et al., *A 1-year experience with human metapneumovirus in children aged <5 years*. J Infect Dis, 2004. **189**(8): p. 1388-96.
  116. Agapov, E., et al., *Genetic variability of human metapneumovirus infection: evidence of a shift in viral genotype without a change in illness*. J Infect Dis, 2006. **193**(3): p. 396-403.

- 
117. Vicente, D., et al., *Differences in clinical severity between genotype A and genotype B human metapneumovirus infection in children*. Clin Infect Dis, 2006. **42**(12): p. e111-3.
  118. Leung, J., et al., *Seroepidemiology of human metapneumovirus (hMPV) on the basis of a novel enzyme-linked immunosorbent assay utilizing hMPV fusion protein expressed in recombinant vesicular stomatitis virus*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(3): p. 1213-9.
  119. Ebihara, T., et al., *Seroprevalence of human metapneumovirus in Japan*. J Med Virol, 2003. **70**(2): p. 281-3.
  120. Wolf, D.G., et al., *High seroprevalence of human metapneumovirus among young children in Israel*. J Infect Dis, 2003. **188**(12): p. 1865-7.
  121. Hamelin, M.E. and G. Boivin, *Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for human metapneumovirus serology based on a recombinant viral protein*. Clin Diagn Lab Immunol, 2005. **12**(2): p. 249-53.
  122. Ebihara, T., et al., *Early reinfection with human metapneumovirus in an infant*. J Clin Microbiol, 2004. **42**(12): p. 5944-6.
  123. Pelletier, G., et al., *Respiratory tract reinfections by the new human Metapneumovirus in an immunocompromised child*. Emerg Infect Dis, 2002. **8**(9): p. 976-8.
  124. Williams, J.V., et al., *Human metapneumovirus and lower respiratory tract disease in otherwise healthy infants and children*. N Engl J Med, 2004. **350**(5): p. 443-50.
  125. Williams, J.V., et al., *The role of human metapneumovirus in upper respiratory tract infections in children: a 20-year experience*. J Infect Dis, 2006. **193**(3): p. 387-95.
  126. Kahn, J.S., *Epidemiology of human metapneumovirus*. Clin Microbiol Rev, 2006. **19**(3): p. 546-57.
  127. Bach, N., et al., *[Acute respiratory tract infections due to a human metapneumovirus in children: descriptive study and comparison with respiratory syncytial virus infections]*. Arch Pediatr, 2004. **11**(3): p. 212-5.
  128. Johnston, S.L., et al., *The relationship between upper respiratory infections and hospital admissions for asthma: a time-trend analysis*. Am J Respir Crit Care Med, 1996. **154**(3 Pt 1): p. 654-60.
  129. O'Gorman, C., E. McHenry, and P.V. Coyle, *Human metapneumovirus in adults: a short case series*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2006. **25**(3): p. 190-2.
  130. Hamelin, M.E., et al., *Human metapneumovirus infection in adults with community-acquired pneumonia and exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease*. Clin Infect Dis, 2005. **41**(4): p. 498-502.
  131. Rohde, G., et al., *Relevance of human metapneumovirus in exacerbations of COPD*. Respir Res, 2005. **6**: p. 150.
  132. Vicente, D., et al., *Human metapneumovirus and chronic obstructive pulmonary disease*. Emerg Infect Dis, 2004. **10**(7): p. 1338-9.
  133. Boivin, G., et al., *An outbreak of severe respiratory tract infection due to human metapneumovirus in a long-term care facility*. Clin Infect Dis, 2007. **44**(9): p. 1152-8.
  134. Cane, P.A., et al., *Human metapneumovirus in a haematopoietic stem cell transplant recipient with fatal lower respiratory tract disease*. Bone Marrow Transplant, 2003. **31**(4): p. 309-10.
  135. Englund, J.A., et al., *Brief communication: fatal human metapneumovirus infection in stem-cell transplant recipients*. Ann Intern Med, 2006. **144**(5): p. 344-9.
  136. Williams, J.V., et al., *A prospective study comparing human metapneumovirus with other respiratory viruses in adults with hematologic malignancies and respiratory tract infections*. J Infect Dis, 2005. **192**(6): p. 1061-5.

- 
137. Larcher, C., et al., *Human metapneumovirus infection in lung transplant recipients: clinical presentation and epidemiology*. J Heart Lung Transplant, 2005. **24**(11): p. 1891-901.
  138. Madhi, S.A., et al., *Human metapneumovirus-associated lower respiratory tract infections among hospitalized human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected and HIV-1-uninfected African infants*. Clin Infect Dis, 2003. **37**(12): p. 1705-10.
  139. van de Pol, A.C., et al., *Diagnostic value of real-time polymerase chain reaction to detect viruses in young children admitted to the paediatric intensive care unit with lower respiratory tract infection*. Crit Care, 2006. **10**(2): p. R61.
  140. Greensill, J., et al., *Human metapneumovirus in severe respiratory syncytial virus bronchiolitis*. Emerg Infect Dis, 2003. **9**(3): p. 372-5.
  141. Semple, M.G., et al., *Dual infection of infants by human metapneumovirus and human respiratory syncytial virus is strongly associated with severe bronchiolitis*. J Infect Dis, 2005. **191**(3): p. 382-6.
  142. Lazar, I., et al., *Human metapneumovirus and severity of respiratory syncytial virus disease*. Emerg Infect Dis, 2004. **10**(7): p. 1318-20.
  143. Chan, P.K., et al., *Human metapneumovirus detection in patients with severe acute respiratory syndrome*. Emerg Infect Dis, 2003. **9**(9): p. 1058-63.
  144. Lee, N., et al., *Co-circulation of human metapneumovirus and SARS-associated coronavirus during a major nosocomial SARS outbreak in Hong Kong*. J Clin Virol, 2007. **40**(4): p. 333-7.
  145. Fouchier, R.A., et al., *Aetiology: Koch's postulates fulfilled for SARS virus*. Nature, 2003. **423**(6937): p. 240.
  146. Heikkinen, T., M. Thint, and T. Chonmaitree, *Prevalence of various respiratory viruses in the middle ear during acute otitis media*. N Engl J Med, 1999. **340**(4): p. 260-4.
  147. Ruuskanen, O., et al., *Viruses in acute otitis media: increasing evidence for clinical significance*. Pediatr Infect Dis J, 1991. **10**(6): p. 425-7.
  148. Williams, J.V., et al., *Association of human metapneumovirus with acute otitis media*. Int J Pediatr Otorhinolaryngol, 2006. **70**(7): p. 1189-93.
  149. Schildgen, O., et al., *Human metapneumovirus RNA in encephalitis patient*. Emerg Infect Dis, 2005. **11**(3): p. 467-70.
  150. Moore, M.L. and R.S. Peebles, Jr., *Respiratory syncytial virus disease mechanisms implicated by human, animal model, and in vitro data facilitate vaccine strategies and new therapeutics*. Pharmacol Ther, 2006. **112**(2): p. 405-24.
  151. Stagnara, J., et al., *[Management of bronchiolitis in the infant. Short text]*. Arch Pediatr, 2001. **8 Suppl 1**: p. 3S-10S.
  152. Steele, R.W., *Reassessment of indications for ribavirin therapy in respiratory syncytial virus infection*. Clin Pediatr (Phila), 1996. **35**(7): p. 377.
  153. Wyde, P.R., et al., *Comparison of the inhibition of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus by ribavirin and immune serum globulin in vitro*. Antiviral Res, 2003. **60**(1): p. 51-9.
  154. Wyde, P.R., et al., *Comparison of the inhibition of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus by NMSO3 in tissue culture assays*. Antiviral Res, 2004. **63**(1): p. 51-9.
  155. van den Hoogen, B.G., et al., *Experimental infection of macaques with human metapneumovirus induces transient protective immunity*. J Gen Virol, 2007. **88**(Pt 4): p. 1251-9.

- 
156. Herfst, S. and R.A. Fouchier, *Vaccination approaches to combat human metapneumovirus lower respiratory tract infections*. J Clin Virol, 2008. **41**(1): p. 49-52.
  157. Yim, K.C., et al., *Human metapneumovirus: enhanced pulmonary disease in cotton rats immunized with formalin-inactivated virus vaccine and challenged*. Vaccine, 2007. **25**(27): p. 5034-40.
  158. Herfst, S., et al., *Immunization of Syrian golden hamsters with F subunit vaccine of human metapneumovirus induces protection against challenge with homologous or heterologous strains*. J Gen Virol, 2007. **88**(Pt 10): p. 2702-9.
  159. Cseke, G., et al., *Human metapneumovirus fusion protein vaccines that are immunogenic and protective in cotton rats*. J Virol, 2007. **81**(2): p. 698-707.
  160. Pham, Q.N., et al., *Chimeric recombinant human metapneumoviruses with the nucleoprotein or phosphoprotein open reading frame replaced by that of avian metapneumovirus exhibit improved growth in vitro and attenuation in vivo*. J Virol, 2005. **79**(24): p. 15114-22.
  161. Williams, J.V., et al., *A recombinant human monoclonal antibody to human metapneumovirus fusion protein that neutralizes virus in vitro and is effective therapeutically in vivo*. J Virol, 2007. **81**(15): p. 8315-24.
  162. Heikkinen, T., et al., *Nasal swab versus nasopharyngeal aspirate for isolation of respiratory viruses*. J Clin Microbiol, 2002. **40**(11): p. 4337-9.
  163. Chan, K.H., et al., *Comparison of nasopharyngeal flocced swabs and aspirates for rapid diagnosis of respiratory viruses in children*. J Clin Virol, 2008.
  164. van den Hoogen, B.G., D.M. Osterhaus, and R.A. Fouchier, *Clinical impact and diagnosis of human metapneumovirus infection*. Pediatr Infect Dis J, 2004. **23**(1 Suppl): p. S25-32.
  165. Abiko, C., et al., *Outbreak of human metapneumovirus detected by use of the Vero E6 cell line in isolates collected in Yamagata, Japan, in 2004 and 2005*. J Clin Microbiol, 2007. **45**(6): p. 1912-9.
  166. Deffrasnes, C., S. Cote, and G. Boivin, *Analysis of replication kinetics of the human metapneumovirus in different cell lines by real-time PCR*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(1): p. 488-90.
  167. Reina, J., et al., *Comparison of different cell lines and incubation times in the isolation by the shell vial culture of human metapneumovirus from pediatric respiratory samples*. J Clin Virol, 2007. **40**(1): p. 46-9.
  168. Landry, M.L., et al., *Detection of human metapneumovirus in clinical samples by immunofluorescence staining of shell vial centrifugation cultures prepared from three different cell lines*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(4): p. 1950-2.
  169. Ebihara, T., et al., *Detection of human metapneumovirus antigens in nasopharyngeal secretions by an immunofluorescent-antibody test*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(3): p. 1138-41.
  170. Henrickson, K.J., *Advances in the laboratory diagnosis of viral respiratory disease*. Pediatr Infect Dis J, 2004. **23**(1 Suppl): p. S6-10.
  171. Jennings, L.C., et al., *Viral etiology of acute respiratory tract infections in children presenting to hospital: role of polymerase chain reaction and demonstration of multiple infections*. Pediatr Infect Dis J, 2004. **23**(11): p. 1003-7.
  172. Murdoch, D.R., *Molecular genetic methods in the diagnosis of lower respiratory tract infections*. Apmis, 2004. **112**(11-12): p. 713-27.
  173. Arden, K.E., et al., *Frequent detection of human rhinoviruses, paramyxoviruses, coronaviruses, and bocavirus during acute respiratory tract infections*. J Med Virol, 2006. **78**(9): p. 1232-40.

- 
174. Weinberg, G.A., et al., *Superiority of reverse-transcription polymerase chain reaction to conventional viral culture in the diagnosis of acute respiratory tract infections in children.* J Infect Dis, 2004. **189**(4): p. 706-10.
  175. Kuypers, J., et al., *Comparison of real-time PCR assays with fluorescent-antibody assays for diagnosis of respiratory virus infections in children.* J Clin Microbiol, 2006. **44**(7): p. 2382-8.
  176. Leland, D.S. and C.C. Ginocchio, *Role of cell culture for virus detection in the age of technology.* Clin Microbiol Rev, 2007. **20**(1): p. 49-78.
  177. Saiki, R.K., et al., *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.* Science, 1985. **230**(4732): p. 1350-4.
  178. Wallace, R.B., et al., *Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to phi chi 174 DNA: the effect of single base pair mismatch.* Nucleic Acids Res, 1979. **6**(11): p. 3543-57.
  179. Kutuyavin, I.V., et al., *3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures.* Nucleic Acids Res, 2000. **28**(2): p. 655-61.
  180. Maertzdorf, J., et al., *Real-time reverse transcriptase PCR assay for detection of human metapneumoviruses from all known genetic lineages.* J Clin Microbiol, 2004. **42**(3): p. 981-6.
  181. Cote, S., Y. Abed, and G. Boivin, *Comparative evaluation of real-time PCR assays for detection of the human metapneumovirus.* J Clin Microbiol, 2003. **41**(8): p. 3631-5.
  182. Bouscambert-Duchamp, M., et al., *Detection of human metapneumovirus RNA sequences in nasopharyngeal aspirates of young French children with acute bronchiolitis by real-time reverse transcriptase PCR and phylogenetic analysis.* J Clin Microbiol, 2005. **43**(3): p. 1411-4.
  183. Manoha, C., et al., *Epidemiological and clinical features of hMPV, RSV and RVs infections in young children.* J Clin Virol, 2007. **38**(3): p. 221-6.
  184. Landry, M.L., S. Cohen, and D. Ferguson, *Prospective study of human metapneumovirus detection in clinical samples by use of light diagnostics direct immunofluorescence reagent and real-time PCR.* J Clin Microbiol, 2008. **46**(3): p. 1098-100.
  185. Brittain-Long, R., et al., *Multiplex real-time PCR for detection of respiratory tract infections.* J Clin Virol, 2008. **41**(1): p. 53-6.
  186. Templeton, K.E., et al., *Improved diagnosis of the etiology of community-acquired pneumonia with real-time polymerase chain reaction.* Clin Infect Dis, 2005. **41**(3): p. 345-51.
  187. Steininger, C., et al., *Effectiveness of reverse transcription-PCR, virus isolation, and enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of influenza A virus infection in different age groups.* J Clin Microbiol, 2002. **40**(6): p. 2051-6.
  188. Oosterheert, J.J., et al., *Impact of rapid detection of viral and atypical bacterial pathogens by real-time polymerase chain reaction for patients with lower respiratory tract infection.* Clin Infect Dis, 2005. **41**(10): p. 1438-44.
  189. Bosis, S., et al., *Association between high nasopharyngeal viral load and disease severity in children with human metapneumovirus infection.* J Clin Virol, 2008. **42**(3): p. 286-90.
  190. Syrmis, M.W., et al., *A sensitive, specific, and cost-effective multiplex reverse transcriptase-PCR assay for the detection of seven common respiratory viruses in respiratory samples.* J Mol Diagn, 2004. **6**(2): p. 125-31.

- 
191. Bellau-Pujol, S., et al., *Development of three multiplex RT-PCR assays for the detection of 12 respiratory RNA viruses*. J Virol Methods, 2005. **126**(1-2): p. 53-63.
  192. Heikkinen, T., et al., *Human metapneumovirus infections in children*. Emerg Infect Dis, 2008. **14**(1): p. 101-6.
  193. Gerna, G., et al., *Prospective study of human metapneumovirus infection: diagnosis, typing and virus quantification in nasopharyngeal secretions from pediatric patients*. J Clin Virol, 2007. **40**(3): p. 236-40.
  194. Li, H., et al., *Simultaneous detection and high-throughput identification of a panel of RNA viruses causing respiratory tract infections*. J Clin Microbiol, 2007. **45**(7): p. 2105-9.
  195. Ieven, M., *Currently used nucleic acid amplification tests for the detection of viruses and atypicals in acute respiratory infections*. J Clin Virol, 2007. **40**(4): p. 259-76.
  196. Gruteke, P., et al., *Practical implementation of a multiplex PCR for acute respiratory tract infections in children*. J Clin Microbiol, 2004. **42**(12): p. 5596-603.
  197. Gilbert, S.A., et al., *Typing of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses by a multiplex PCR assay*. J Clin Microbiol, 1997. **35**(1): p. 264-7.
  198. Freymuth, F., et al., *Detection of respiratory syncytial virus, parainfluenzavirus 3, adenovirus and rhinovirus sequences in respiratory tract of infants by polymerase chain reaction and hybridization*. Clin Diagn Virol, 1997. **8**(1): p. 31-40.
  199. Thibeault, R., et al., *Antibiotic use in children is not influenced by the result of rapid antigen detection test for the respiratory syncytial virus*. J Clin Virol, 2007. **39**(3): p. 169-74.
  200. Aslanzadeh, J., et al., *Prospective evaluation of rapid antigen tests for diagnosis of respiratory syncytial virus and human metapneumovirus infections*. J Clin Microbiol, 2008. **46**(5): p. 1682-5.

Nom – Prénom : **PIEL Elodie**

Titre de la thèse : **Développement et évaluation d'une technique de RT-PCR en temps réel pour la recherche du métapneumovirus humain dans des aspirations nasopharyngées.**

---

**Résumé du mémoire-thèse :** Découvert en 2001, le métapneumovirus humain (hMPV) est un virus de répartition ubiquitaire, désormais reconnu comme le deuxième agent viral responsable de la bronchiolite du nourrisson, après le VRS. Sa recherche lors du diagnostic des infections respiratoires du nourrisson est donc justifiée. Sa culture étant difficile, la technique diagnostique de référence est à ce jour l'amplification génique. Nous avons donc développé une technique de détection par RT-PCR en temps réel. Une fois notre technique mise au point, et validée sur le plan de ses performances analytiques, nous avons procédé à l'étude rétrospective des aspirations nasopharyngées d'enfants de moins de trois ans admis au CHU de Nantes au cours de l'hiver 2006-2007 pour un épisode infectieux respiratoire resté d'étiologie indéterminée. 28 échantillons positifs ont été retrouvés, soit une implication du hMPV dans 8% du total des viroses respiratoires caractérisées. Les isolats ont été séquencés, et leurs relations phylogéniques étudiées. L'épidémiologie locale est corrélée à celle établie dans les autres CHU français, avec une co-circulation des génotypes A et B tout au long de la période d'étude.

---

**Mots-clés :** METAPNEUMOVIRUS, RT-PCR TEMPS REEL, GENOTYPE, EPIDEMIOLOGIE

---

#### **JURY**

**PRESIDENTE :** Mme Berthe-Marie IMBERT, Professeur de Virologie  
Faculté de Pharmacie de Nantes

**ASSESEURS :** Mme Marianne COSTE-BUREL, Praticien Hospitalier  
Laboratoire de Virologie du CHU de Nantes  
M. Patrick LUSTENBERGER, Professeur de Biochimie  
Faculté de Médecine de Nantes  
M. Georges PICHEROT, Praticien Hospitalier - Pédiatre  
Clinique Médicale Pédiatrique HME - CHU de Nantes  
Mme Anne MOREAU-KLEIN, Praticien Attaché - Pharmacien  
Laboratoire de Virologie du CHU de Nantes

---

**Adresse de l'auteur :** 3 rue Porte Neuve 44000 NANTES