



**HAL**  
open science

# Prévalence et diversité génétique des virus respiratoires au Cameroun

Sebastien Kenmoe

► **To cite this version:**

Sebastien Kenmoe. Prévalence et diversité génétique des virus respiratoires au Cameroun. Virologie. Normandie Université; Université de Yaoundé I, 2017. Français. NNT: 2017NORMC417. tel-01954808

**HAL Id: tel-01954808**

**<https://theses.hal.science/tel-01954808>**

Submitted on 14 Dec 2018

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

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



Normandie Université

## THESE

**Pour obtenir le diplôme de doctorat**

**Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie**

**Préparée au sein de : l'Université de Caen Normandie**

**En partenariat international avec l'Université de Yaoundé I, Cameroun**

## Prévalence et diversité génétique des virus respiratoires au Cameroun

**Présentée et soutenue par  
Sebastien KENMOE**

**Thèse soutenue publiquement le 13 Decembre 2017  
devant le jury composé de**

M. Leopold TATSADJIEU NGOUNE	Professeur, Université de Ngaoundéré	Examineur
M. Jacques BROUARD	Professeur des Universités, Université de Caen Normandie	Examineur
M. Jérôme LE GOFF	Maîtres de Conférences, HDR, Université Paris Diderot	Examineur
Mme Véronique PENLAP BENG	Professeur, Université de Yaoundé I	Examineur
M. Nicolas NJINTANG YANOU	Professeur, Université de Ngaoundéré	Rapporteur
Mme Sylvie PILLET	Maîtres de Conférences, HDR, Université de Saint-Etienne	Rapporteur
M. Richard NJOUOM	Directeur de Recherche, Centre Pasteur du Cameroun	Directeur de thèse
Mme Astrid VABRET	Professeur des Universités, Université de Caen Normandie	Directeur de thèse

**Thèse dirigée par Astrid VABRET, GRAM**



**Logo Ecole Doctorale**



**Logo laboratoire**



## Dédicace

A mes parents **Nganawa Edouard** et **Tchongang Pauline !!!**

## Remerciements

*Au Docteur Richard Njouom, vous m'avez accueilli dans votre laboratoire et investi votre confiance en moi. Vous m'avez accordé des opportunités de participation à de multiples ateliers de formation et conférences internationales. Vous avez su par votre ardeur au travail m'insuffler un nouveau dynamisme et beaucoup de courage dans la préparation de cette thèse. Vous m'avez beaucoup appris et vous continuez de me guider au quotidien dans la préparation de mon insertion professionnelle. Recevez ici toute ma gratitude, ma reconnaissance et mon profond respect.*

*Au Professeur Astrid Vabret, vous avez accepté spontanément de co-encadrer ce travail de thèse et de m'accueillir dans votre laboratoire. Votre appui multidimensionnel a été d'une grande importance pour mon édification. Votre rigueur, vos remarques, vos réflexions, vos encouragements et échanges très productifs m'ont été d'un grand intérêt. Vos relectures attentives ont contribué à l'amélioration significative de ce manuscrit et des articles associés. Recevez ici, toute ma gratitude et ma reconnaissance. J'espère très vivement que nous allons poursuivre cette collaboration.*

*Au Professeur Véronique Penlap Beng, vous m'avez encadré depuis mon Master. Pour vos encouragements, vos conseils et votre disponibilité constante, merci du fond du cœur.*

*Au Docteur Marie Astrid Vernet, bien que n'étant pas listé comme encadreur, vous avez énormément influencé la conduite de ce travail de thèse. Votre expertise technique et vos commentaires ont facilité la mise en place des différentes techniques de laboratoire utilisées lors de ce travail de thèse.*

*Je remercie sincèrement les membres de mon Jury de thèse, son président, ses rapporteurs, ses examinateurs ainsi que mes directeurs de thèse pour leur participation. Vous avez apporté vos corrections et commentaires à ce manuscrit. Ces remarques permettront indubitablement à améliorer ce travail. Veuillez trouver ici le témoignage de notre profonde reconnaissance.*

*J'exprime toute ma gratitude au Centre Pasteur du Cameroun via son Directeur Général, le Pr Elisabeth Carniel, qui m'a accordé l'opportunité de bénéficier de sa plateforme pour les analyses de laboratoire et d'un environnement approprié pour la préparation de cette thèse.*



*C'est aussi l'occasion de remercier très sincèrement le Service de Coopération et d'action Culturelle de l'Ambassade de France au Cameroun pour la prise en charge de mes séjours à Caen, France, dans le cadre de cette thèse.*

*Mes sincères remerciements s'adressent également au personnel du Service de Virologie du CPC (Annicet, Arice, Bernadette, Carine, Daniel, Diane, Elise, Elodie, Emmanuel, Flore, Frédéric, Gwladys, Ingrid, Laure, Marie, Martial, Martin, Maurice, Paul Alain, Ripa, Robert, Serge, Serges, Sorelle) pour le réconfort que j'ai trouvé auprès d'eux et tous les moments passés ensemble.*

*Je suis aussi très reconnaissant au personnel du Service de Virologie du CHU de Caen pour l'accueil et l'appui technique qu'ils m'ont accordé pendant mes séjours à Caen, particulièrement Amélie, Catharine, Christine, Fabien, Florent, Julia, Martine, Nathalie et Sandrine.*

*Un merci particulier à ma fiancée Yolande et mon fils Ruben pour leur patience. Ils ont toujours su me donner le courage de continuer et un soutien inconditionnel dans cette expérience formidable.*

*Je remercie infiniment tous les membres de ma famille qui ont toujours été là à m'encourager et pour toutes ces années de sacrifices consacrés à mes études, merci de tout mon cœur. Particulièrement à mes cadets, puisse ce travail vous servir d'exemple dans vos différents parcours...*

*J'aimerais maintenant remercier le personnel du Centre Hospitalier d'Essos pour la bonne collaboration entretenue dans l'inclusion des participants de cette étude et aux parents ainsi qu'à leurs enfants pour avoir accepté de participer à ces travaux de recherche.*

*Cette liste ne saurait être exhaustive, pour tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail et dont je ne peux tous citer, à vous tous merci !!!*

## Sommaire

Dédicace .....	i
Remerciements .....	ii
Sommaire .....	iv
Résumé .....	viii
Abstract .....	ix
Liste des abréviations .....	x
Liste des tableaux .....	xi
Liste des figures .....	xii
Introduction générale.....	1
Chapitre 1 : Revue de la littérature.....	6
1. Historique des Paramyxovirus .....	6
2. Epidémiologie des infections respiratoires aiguës dans le monde .....	6
2.1. Epidémiologie du virus respiratoire syncytial .....	7
2.2. Epidémiologie du Metapneumovirus humain .....	7
3. Classification des paramyxovirus.....	7
3.1. Virus respiratoire syncytial .....	8
3.2. Metapneumovirus humain .....	12
4. Structure virale des Paramyxovirus.....	14
5. Génome des paramyxovirus .....	15
6. Protéines des paramyxovirus.....	16
6.1. Protéines structurales .....	16
6.2. Protéines non structurales .....	16
6.3. Protéines membranaires .....	17
7. Evolution .....	21
7.1. Virus respiratoire syncytial .....	21
7.2. Metapneumovirus humain .....	21

8.	Epidémiologie moléculaire .....	22
8.1.	Virus respiratoire syncytial .....	22
8.2.	Metapneumovirus humain .....	24
9.	Tableau clinique des infections respiratoires aiguës à Paramyxovirus .....	24
9.1.	Détection des Paramyxovirus chez des sujets asymptomatiques.....	25
9.2.	Infections respiratoires aiguës supérieures .....	25
9.3.	Infections respiratoires aiguës basses .....	25
10.	Facteurs de risque de sévérité des infections respiratoires aiguës.....	26
10.1.	Facteurs de risque de sévérité de l'hôte.....	26
10.2.	Facteurs de risque viral .....	27
11.	Diagnostic des infections respiratoires aiguës à Paramyxovirus.....	27
11.1.	Diagnostic clinique.....	28
11.2.	Diagnostic virologique .....	28
12.	Situation géographique du Cameroun .....	30
13.	Situation démographique du Cameroun .....	31
14.	Situation climatique du Cameroun .....	33
14.1.	Climat tropical.....	34
14.2.	Climat équatorial .....	35
Chapitre 2 : Matériels et méthodes.....		37
1.	Type, lieu et période de l'étude .....	37
2.	Population de l'étude.....	37
3.	Critères d'inclusion .....	37
4.	Critères de non inclusion et d'exclusion .....	38
5.	Considérations éthiques.....	38
6.	Prélèvement et transport des échantillons .....	38
7.	Analyses de laboratoire. ....	38
7.1.	Extraction des acides nucléiques.....	38

7.2.	Détection moléculaire et génotypage des virus respiratoires.....	40
7.3.	Séquençage par la méthode Sanger.....	45
7.4.	Analyse phylogénétique.....	46
8.	Analyse statistique.....	47
Chapitre 3 : Résultats .....		49
1.	Données démographiques .....	49
2.	Détection virale .....	49
3.	Présentation clinique .....	50
4.	Facteurs associés aux infections par le virus respiratoire syncytial humain et le Metapneumovirus humain.....	51
5.	Codétection de virus respiratoires .....	52
6.	Facteurs associés à la codétection HRSV et HMPV avec les autres virus respiratoires recherchés.....	52
7.	Saisonnalité .....	53
8.	Génotypage.....	54
8.1.	Virus respiratoire syncytial .....	54
8.2.	Metapneumovirus humain .....	56
9.	Séquençage.....	58
10.	Circulation des groupes A et B du Virus respiratoire syncytial et Metapneumovirus humain.....	58
11.	Circulation des sous groupes du HRSV-A (NA-1), HRSV-B (BA-9), HMPV-A (A2) et HMPV-B (B1 et B2).....	59
12.	Diagramme récapitulatif des résultats d'analyse de laboratoire .....	61
13.	Analyse phylogénétique .....	61
13.1.	Arbre phylogénétique .....	61
13.2.	Polymorphisme nucléotidique et protéique.....	67
13.3.	Analyses mutationnelles.....	74
13.4.	Profil de N-glycosylation .....	75

13.5. Profil de O-glycosylation .....	76
13.6. Analyse de la pression de sélection.....	77
Chapitre 4 : Discussion .....	78
1. Détection virale .....	78
2. Génotypage des souches de HRSV et HMPV.....	81
3. Epidémiologie moléculaire des souches de HRSV et HMPV.....	81
4. Analyse phylogénétique des souches de HRSV et HMPV .....	83
Conclusion générale .....	86
Perspectives .....	87
Bibliographie .....	88
Annexes .....	106
Publications et communications issues de la thèse .....	114

## Résumé

**Contexte :** Les infections respiratoires aiguës (ARI) sont reconnues comme une cause importante de morbidité, de mortalité et d'hospitalisation chez les enfants dans les pays en développement. Le virus respiratoire syncytial humain (HRSV) est l'agent étiologique principal de maladie sévère des voies respiratoires basses chez les nourrissons, les jeunes enfants et les personnes âgées. Identifié en 2001, le Metapneumovirus humain (HMPV) est un nouveau paramyxovirus. Le HMPV est cliniquement similaire au HRSV et est associé aux infections respiratoires aiguës supérieures et inférieures à tous les groupes d'âge et plus particulièrement chez les nourrissons, les personnes âgées et les sujets immunodéprimés. HRSV et HMPV sont des membres de la sous famille *Pneumovirinae* au sein de la famille *Paramyxoviridae*. Ces virus peuvent être divisés en sous-groupes en fonction des différences génétiques et/ou antigéniques. Deux groupes génétiques A et B de HRSV et HMPV ont été décrits. Ces groupes sont en outre divisés en plusieurs sous groupes et lignées génétiques. Les études ont montré la cocirculation des sous groupes de ces deux virus avec la domination de l'un des sous groupes selon les zones géographiques et selon les années. Ces deux virus codent pour deux glycoprotéines majeures de surface, la protéine de fusion hautement conservée F et la protéine d'attachement très variable G. Les données restent cependant limitées dans les pays de l'Afrique subsaharienne, sur la prévalence, la saisonnalité et la caractérisation génétique de ces deux virus respiratoires. Au Cameroun, ces deux virus ont été décrits seulement une seule fois (5,7 et 5% pour HRSV et HMPV respectivement) chez des patients présentant des syndromes grippaux en 2012.

**Objectif :** Cette étude rapporte la prévalence, la saisonnalité et la variabilité génétique des souches HRSV et HMPV chez des enfants camerounais pendant 3 saisons épidémiques consécutives (de Septembre 2011 à Octobre 2014). Par ailleurs, la diversité génétique d'autres virus respiratoires détectés au cours de ce travail est présentée comme objectif secondaire.

**Méthodes :** Une surveillance prospective a été menée pour identifier les enfants hospitalisés et ambulatoires âgés de moins de 15 ans présentant des symptômes respiratoires  $\leq 5$  jours. Les échantillons nasopharyngés ont été testés pour 17 virus respiratoires en utilisant une réaction multiplex de polymérisation en chaîne. La distribution virale et les données démographiques ont été analysées statistiquement. Les échantillons positifs du HRSV et HMPV ont été amplifiés par polymérisation en chaîne semi nichée puis séquencés partiellement au niveau du gène G. Des analyses phylogénétiques ont été effectuées sur les séquences nucléotidiques et protéiques partielles du gène G.

**Résultats :** De septembre 2011 à octobre 2014, 822 enfants âgés de moins de 15 ans ont été inscrits dans l'étude. Au moins un virus a été identifié chez chacun des 72,6% (597/822) d'enfants, dont 31,7% (189/597) étaient des codétectations; 28,5% (226/822) étaient positifs pour l'adénovirus humain, 21,4% (176/822) pour le virus Influenza, 15,5% (127/822) pour le rhinovirus/entérovirus, 9,4% (77/822) pour le bocavirus, 9% (74/822) pour le HRSV, 8,2% (67/822) pour les coronavirus humain, 6,2% (50/822) pour le parainfluenzavirus humain et 3,9% (32/822) pour le HMPV. L'infection HRSV était plus fréquente chez les enfants de moins de 2 ans (70,3% ; 52/74) et chez les participants hospitalisés (70,3% ; 52/74). Alors que le HRSV a montré un profil saisonnier avec une circulation de septembre à décembre, des cas sporadiques de HMPV ont été détectés tout au long de l'année. HRSV-A (19,1%, 9/47) et HRSV-B (17% ; 8/47) ont été observés relativement à la même fréquence avec (63,8% ; 30/47) de cas en codétection HRSV-A/HRSV-B alors que HMPV-A (71,4% ; 10/14) était majoritaire comparé à HMPV-B (28,6 ; 4/14). L'analyse phylogénétique a révélé que les souches HRSV de l'étude sont groupées au sein du sous groupe NA-1 (pour HRSV-A) et BA-9 (pour HRSV-B). Les souches HMPV camerounaises sont groupés parmi les membres du génotype A2b (pour HMPV-A), B1 et B2 (pour HMPV-B).

**Conclusion :** Cette étude suggère qu'environ 70% des ARI enregistrés chez des enfants au Cameroun sont causés par des virus. La présente étude est également le premier rapport sur la variabilité génétique du gène G des souches de HRSV et HMPV dans la région. Bien que ce travail comble partiellement certaines lacunes d'informations, des études supplémentaires sont requises pour une clarification de l'épidémiologie moléculaire et du mode d'évolution des virus respiratoires présents en Afrique subsaharienne en général et plus singulièrement au Cameroun.

**Mots clés :** Infections respiratoires aiguës, virus respiratoires, variabilité génétique, épidémiologie moléculaire, gène G, Afrique subsaharienne et Cameroun.

## Abstract

**Background:** Acute respiratory infections (ARI) are recognized as an important cause of morbidity, mortality and hospitalization among children in developing countries. Human respiratory syncytial virus (HRSV) is the main cause of severe lower respiratory tract disease in infants, young children and the elderly. Identified in 2001, Human Metapneumovirus (HMPV) is a new paramyxovirus. HMPV is clinically similar to HRSV and is associated with acute lower and upper respiratory infections in all age groups and especially in newborns, elderly and immunocompromised subjects. HRSV and HMPV are members of the *Pneumovirinae* subfamily within the *Paramyxoviridae* family. These viruses can be divided into subgroups based on genetic and/or antigenic differences. Two genetic groups A and B of HRSV and HMPV have been described. These groups are further divided into several subgroups and genetic lineages. Studies have shown the co-circulation of the subgroups of these two viruses with domination of one of the sub-groups according to the geographical zones and according of years. These two viruses encode two major surface glycoproteins, the highly conserved fusion F protein and the highly variable attachment G protein. Data are still limited in sub-Saharan African countries on prevalence, seasonality and genetic characterization of these two respiratory viruses. In Cameroon, these two viruses have been described only once (5.7 and 5% for HRSV and HMPV respectively) in patients with influenza-like illness in 2012.

**Objective:** This study reports the prevalence, seasonality and the genetic variability of HRSV and HMPV strains in Cameroonian children for 3 consecutive epidemic seasons (September 2011-October 2014). Moreover, the genetic diversity of other respiratory viruses detected during this work is presented as a secondary objective.

**Methods:** A prospective surveillance was conducted to identify inpatient and outpatient children less than 15 years with respiratory symptoms  $\leq 5$  days. The nasopharyngeal samples were tested for 17 respiratory viruses using a multiplex polymerase chain reaction. Viral distribution and demographic data were analyzed statistically. Positive samples for HRSV and HMPV were amplified by semi-nested polymerase chain reaction and then partially sequenced at the G gene. Phylogenetic analyses were performed on the partial nucleotide and protein sequences of the G gene.

**Results:** From September 2011 to October 2014, 822 children under 15 years were enrolled in the study. At least one virus was identified in each of 72.6% (577/822) of children, 31.7% (189/597) of whom were co-detections; 28.5% (226/822) were positive for human adenovirus, 21.4% (176/822) for influenza virus, 15.5% (127/822) for rhinovirus/enterovirus, 9.4% (77/822) for bocavirus, 9% (74/822) for HRSV, 8.2% (67/822) for human coronavirus, 6.2% (50/822) for human parainfluenzavirus, and 3.9% (32/822) for HMPV. HRSV infection was more frequent in children under 2 years (70.3%, 52/74) and hospitalized participants (70.3%, 52/74). While HRSV showed a seasonal pattern with circulation from September to December, sporadic cases of HMPV were detected throughout the year. HRSV-A (19.1%, 9/47) and HRSV-B (17%; 8/47) were observed relatively at the same frequency with (63.8%, 30/47) codetections of HRSV-A/HRSV-B. HMPV-A (71.4%; 10/14) was predominant compared to HMPV-B (28.6; 4/14). Phylogenetic analysis revealed that the HRSV strains of the study are grouped within subgroup NA-1 (for HRSV-A) and BA-9 (for HRSV-B). Cameroonian HMPV strains are grouped among the members of genotype A2b (for HMPV-A), B1 and B2 (for HMPV-B).

**Conclusion:** This study suggests that about 70% of ARI recorded in children in Cameroon are caused by viruses. The present study is also the first report on the genetic variability of the G gene of HRSV and HMPV strains in the region. Although this work partially fills gaps for some information, additional studies are required to clarify the molecular epidemiology and evolutionary pattern of respiratory viruses in sub-Saharan Africa in general and more particularly in Cameroon.

**Keywords:** Acute respiratory infections, respiratory viruses, genetic variability, molecular epidemiology, G gene, Sub-Saharan Africa and Cameroon.

## Liste des abréviations

ARI : Infections respiratoires aiguës

HRSV : Virus respiratoire syncytial humain

HMPV : Metapneumovirus humain

RV : Rhinovirus

HPIV : Parainfluenzavirus humains

EV : Entérovirus

HCoV : Coronavirus humain

AMPV : Metapneumovirus aviaire

HAdV : Adénovirus humain

HBoV : Bocavirus humain

ARN : Acide ribonucléique

HVR1 : Régions hypervariable 1

HVR2 : Régions hypervariable 2

URTI : *Upper Respiratory Tract Infections*

LRTI : *Low Respiratory Tract Infections*

ELISA : *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*

IFD : Immunofluorescence directe

CPC : Centre Pasteur du Cameroun

ADN : Acide désoxyribonucléique

rRT-PCR : *real-time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

RT-PCR : *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*

ddNTP : didésoxyribonucléotides triphosphate



## Liste des tableaux

Tableau I : Pourcentage d'une identité de séquence d'acides aminés ou de nucléotides entre les souches indiquées de HMPV ou de HRSV pour les protéines et ORF indiquées [12].	22
Tableau II : Données cliniques des participants de l'étude.	50
Tableau III : Facteurs associés aux infections HRSV et HMPV.	51
Tableau IV : Répartition des coinfections du HRSV et HMPV avec les autres virus respiratoires détectés.	52
Tableau V : Facteurs corrélés à la coinfection HMPV, HRSV et les autres virus respiratoires recherchés.	53
Tableau VI : Polymorphisme nucléotidique et protéique des souches de HRSV et HMPV camerounaises.	68
Tableau VII : Sites sélectionnés positivement et négativement dans les souches de HRSV-B camerounais.	77

## Liste des figures

Figure 1 : Schéma représentant les différents membres de la famille de <i>Paramyxoviridae</i> [76].	8
Figure 2 : Arbre phylogénétique des séquences de références, A : HRSV-A et B : HRSV-B.	11
Figure 3 : Schéma récapitulatif des études rapportant les différents génotypes HRSV-A et HRSV-B.	12
Figure 4 : Arbres phylogénétiques des groupes A et B et sous groupes A1/A2a/A2b et B1/B2 du Metapneumovirus humain. A : Gène partiel F (506 nucléotides) et B : Gène partiel N (424 nucléotides).	13
Figure 5 : (A) Morphologie du HRSV et HMPV à droite et image par microscopie électronique du HMPV à gauche ; (B) Structure génomique du HMPV ; structure génomique du HRSV.	14
Figure 6 : Variabilité des aminoacides dans la protéine G du Metapneumovirus humain.	18
Figure 7 : Neutralisation du HRSV, la reconnaissance de la protéine F dans sa conformation préfusion par l'anticorps humain D25 [108].	20
Figure 8 : Groupes HRSV en circulation au monde (1961–2014).	23
Figure 9 : Souches en circulation du HMPV en Allemagne de 2000 à 2010 [71].	24
Figure 10 : Carte politique et démographique du Cameroun en 2005 [168]	32
Figure 11 : Les zones climatiques au Cameroun [169].	34
Figure 12 : Algorithme des analyses du laboratoire des échantillons collectés dans l'étude.	42
Figure 13 : Régions amplifiées lors de la RT-PCR de génotypage HRSV et HMPV.	43
Figure 14 : Photo du gel d'électrophorèse de la PCR semi-nichée de génotypage du HRSV-B (15/09/2014).	44
Figure 15 : Fréquence de détection des virus respiratoires recherchés chez les 822 participants de l'étude.	49
Figure 16 : Distribution mensuelle de 74 cas de virus respiratoire syncytial humain et 32 cas de Metapneumovirus humain détectés parmi 822 enfants camerounais souffrant d'infections respiratoires aiguës.	54
Figure 17 : Résultat du génotypage de 57 positifs HRSV par amplification de la deuxième région hypervariable du gène G.	55
Figure 18 : Comparaison de la médiane et intervalle interquartile des échantillons amplifiés et non amplifiés en RT-PCR de génotypage.	56

Figure 19 : Résultat de la différenciation de 30 souches positives de HMPV par amplification du gène G. ....	57
Figure 20 : Comparaison de la médiane et intervalle interquartile des échantillons HMPV positifs amplifiés et non amplifiés en RT-PCR de génotypage. ....	57
Figure 21 : Période des groupes HRSV-A et B à Yaoundé, Cameroun entre 2011 et 2013....	58
Figure 22 : Fréquence de détection des groupes HMPV-A et B à Yaoundé, Cameroun en 2012 et 2013. ....	59
Figure 23 : Circulation des HRSV-A génotype NA-1 et HRSV-B génotype BA-9 à Yaoundé, Cameroun entre 2011 et 2013. ....	60
Figure 24 : Détection des sous-groupes HMPV-A2b, B1 et B2 à Yaoundé, Cameroun en 2012 et 2013. ....	60
Figure 25 : Diagramme récapitulatif des résultats de la RT-PCR de détection, génotypage et séquençage des souches de HRSV et HMPV à Yaoundé, Cameroun.....	61
Figure 26 : Arbre phylogénétique des souches HRSV détectés à Yaoundé au Cameroun de 2011 à 2013, A : HRSV-A et B : HRSV-B.....	64
Figure 27 : Arbre phylogénétique des souches HMPV-A et HMPV-B détectés à Yaoundé au Cameroun de 2011 à 2013.....	66
Figure 28 : Alignement d'acides aminés déduits de la seconde région hypervariable du gène G des séquences de HRSV de l'étude, A HRSV-A, B : HRSV-B, C : HMPV-A2b, D : HMPV-B1 et E : HMPV-B2. ....	73

# **Introduction Générale**

## Introduction générale

Les infections respiratoires aiguës (ARI) sont une des principales causes d'hospitalisation, de morbidité et de mortalité chez les enfants de moins de 5 ans dans le monde. Les données d'une étude de méta-analyse démontrent qu'environ 1 million (15%) d'enfants sont décédés en raison de ces infections en 2013 [1]. Le poids de ces infections est particulièrement important dans les pays en développement notamment l'Afrique Subsaharienne, qui a enregistré près de la moitié de tous ces décès (0,4 millions). Les ARI sont ainsi associées à des coûts sociaux substantiels en termes de mortalité, d'hospitalisation, de visite ambulatoire, de séquelles respiratoires à long terme, d'absence au travail, de jours d'école perdus et des coût de soins supplémentaires, en particulier chez les enfants au cours des 5 premières années de la vie [2,3].

Le virus respiratoire syncytial humain (HRSV) représente la cause majeure des bronchiolites et des pneumonies chez les nourrissons et les jeunes enfants à l'échelle mondiale. Sur la base des études publiées et non publiées, une méta-analyse réalisée par Nair et al., a révélé une incidence de 33,8 (IC95%, 19,3-46,2) millions de cas d'infections respiratoires aiguës basses associés au HRSV par an chez les enfants de moins de 5 ans [4]. Cette estimation représente ainsi près de 22% de tous les cas d'infections respiratoires aiguës basses chez les jeunes enfants. Un total de 3,4 (IC95%, 2,8-4,3) millions de ces infections étaient des cas graves nécessitant une hospitalisation. Environ 66 000 à 199 000 décès ont été estimés lors de cette méta-analyse. L'incidence dans les pays en développement était plus de deux fois supérieure à celle des pays développés. Un total de 91% des hospitalisations et la quasi-totalité des décès ont été enregistrés dans les pays en développement où l'accès aux soins de santé est limité.

Le Metapneumovirus humain (HMPV) est aussi un agent causal important des infections respiratoires aiguës dans le monde chez les personnes à risque particulièrement les enfants, les adultes et les immunodéprimés [5]. Selon une méta-analyse réalisée par Lefebvre et al., le HMPV représente 6,2% (IC 95% : 5,2-7,3%) des patients hospitalisés atteints d'infections aiguës des voies respiratoires [6].

Les HRSV et HMPV appartiennent à l'ordre des *Mononegavirales*, la famille des *Paramyxoviridae*, la sous famille des *Pneumovirinae* [7]. Le HRSV est membre du genre

Pneumovirus tandis que le HMPV est classé dans le genre *Metapneumovirus* [7,8]. Les virions de la famille *Paramyxoviridae* sont enveloppés avec un diamètre variant de 150-600 nm [9,10]. L'ARN viral linéaire d'environ 13 kilo bases (kb) pour le HMPV et 15 kb pour le HRSV est associé à la nucléoprotéine N, la phosphoprotéine P, la polymérase L et éventuellement les protéines M2-1 et M2-2 pour former une nucléocapside hélicoïdale [10–12]. Le génome de HMPV contient 8 gènes (3'-N-P-M-F-M2-SH-G-L-5') alors que celui de HRSV est formé de 10 gènes (3'-NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L-5'). L'enveloppe virale contient les glycoprotéines de surface transmembranaires, sous la forme de projections d'environ 13-17 nm. On distingue une protéine fortement glycosylée G, une protéine F et une petite protéine hydrophobe SH [11]. La protéine G assure la fixation du virus sur la cellule hôte et est également l'antigène majeur reconnu par l'immunité de l'hôte [13]. Les techniques utilisant la réactivité d'anticorps monoclonaux ciblant les épitopes sur les protéines G et F ont permis de décrire 2 groupes antigéniques majeurs : HRSV-A et HRSV-B [14–17]. Les techniques d'analyses phylogénétiques ont permis de subdiviser ces groupes en plusieurs génotypes et sous génotypes [16,18–27]. Le HMPV est classé en deux groupes distincts A et B sur la base principalement de l'analyse phylogénétique des séquences des gènes [8,12]. Chacun des groupes A et B du HMPV se sépare en deux sous-groupes distincts (A1 et A2) et (B1 et B2), respectivement [28–30]. En outre, des analyses phylogénétiques supplémentaires ont suggéré la scission des sous groupes A1 et A2 en lignées génétiques A1a/A1b et A2a/A2b, respectivement [31,32]. La grande variabilité génétique et antigénique entre les groupes de HRSV et HMPV sont localisés principalement sur le gène de surface G [12], alors que les autres gènes sont beaucoup plus conservés. Du fait de la forte variabilité de ce gène G, elle est la cible principale pour les études de caractérisation génétique des HRSV et HMPV.

Les infections répétées avec les souches homologues et hétérologues HRSV et HMPV sont communes tout au long de la vie dans une même saison ou au cours des saisons suivantes [33–35]. Ces réinfections seraient en partie dues à une immunité protectrice partielle liée à la variabilité génétique des antigènes viraux, particulièrement le gène G qui présente une pression de sélection positive importante. Par conséquent, l'élucidation des mécanismes génétiques et antigéniques sous-jacents à la capacité de réinfection et l'apparition de flambées annuelles par l'échappement de l'immunité préexistante de la protéine G de toutes les origines s'avère nécessaire [15,21,36–40].

Jusqu'à présent, aucun vaccin ou préparation d'immunoglobulines n'a été testé ou approuvé chez l'humain afin de prévenir les infections par le HMPV [41]. Cependant, plusieurs groupes de chercheurs ont testé une large gamme de stratégies vaccinales et d'anticorps monoclonaux. Plusieurs de ces approches ont montré des résultats encourageants dans la phase de développement préclinique. Malgré des efforts considérables, aucun vaccin efficace et approuvé n'est également disponible pour la prévention de l'infection par le HRSV [42]. Néanmoins de nombreux vaccins anti-HRSV sont actuellement testés dans des essais cliniques et certains d'entre eux pourraient être utilisés dans un avenir proche. Actuellement, plus de 50 programmes de développement de vaccin sont en cours à divers stades. Dans le contexte de variabilité génétique continue du HRSV et HMPV, le suivi des changements génétiques et antigéniques aidera à une meilleure compréhension pour la nécessité de modification annuelle de la composition d'un futur vaccin pour la prévention des infections à HRSV et HMPV.

Le nombre de séquences de grippe disponible sur Genbank est près de dix fois supérieure à celui combiné des autres virus respiratoires non grippaux communs y compris le HMPV et le HRSV [43]. Une recherche effectuée sur Genbank à la date du 05 Juin 2017 indiquait un nombre de 23222 génomes complets pour le virus influenza contre 1097 et 130 seulement pour le HRSV et HMPV respectivement. Pour les antigènes majeurs de surface, le virus Influenza présente 18628 et 5300 séquences dans Genbank pour les gènes de l'hémagglutinine et de la neuraminidase respectivement. Contrairement au virus Influenza, les virus HRSV et HMPV affichent 13352 et 1474 séquences pour le gène G ; 2503 et 3559 séquences pour le gène F respectivement. Par conséquent, il existe un manque de données considérable sur la diversité génétique mondiale des virus respiratoires non grippaux. Un approvisionnement supplémentaire de séquences génétiques originaires des régions multiples représentatives du globe terrestre stimulera certainement la recherche et l'élaboration des antiviraux et d'un vaccin efficace contre ces virus. Ces séquences virales d'origines multiples déboucheront naturellement sur une meilleure compréhension de la diversité génétique du HMPV et HRSV et concomitamment l'identification des régions conservées du génome qui pourraient être utilisées comme des cibles supplémentaires pour le développement des antiviraux et des vaccins durables contre ces virus.

Les anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine F de HRSV tels que le palivizumab ont été approuvés comme mesure prophylactique chez les nourrissons à haut

risque d'infections HRSV sévères au cours de la saison HRSV dans les pays industrialisés. Malgré cette utilisation relativement faible du palivizumab, des mutations dans le site de liaison de la protéine F associées qui pourraient entraîner une résistance ont été rapportées [44]. Ainsi la disposition d'informations génétiques pour ces virus contribuera à la surveillance continue de l'émergence de la résistance aux mesures prophylactiques ainsi qu'aux antiviraux.

La phylogénie permet également de suivre le mode de propagation spatio-temporelle des souches de HRSV et HMPV [5,45]. Des génotypes similaires présents simultanément dans les régions géographiques différentes suggèrent que les souches épidémiques peuvent se propager dans le monde entier [28–30,46–48].

Enfin, l'importance des enquêtes d'épidémiologie moléculaire réside aussi dans la capacité à détecter précocement des souches émergentes qui pourraient influencer la gravité de la maladie [17] et provoquer des flambées plus importantes [34].

Au Cameroun, un réseau sentinelle de surveillance de la grippe a été implémenté en 2007 par le Centre Pasteur du Cameroun et a été désigné plus tard comme Centre National de Référence de la Grippe pour le Cameroun par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Les premiers travaux sur les ARI au Cameroun ont été réalisés par Tchidjou et collaborateurs lors d'une étude réalisée à Yaounde par l'analyse des dossiers de 1306 patients ambulatoires et hospitalisés [49]. Cette étude avait révélé que le pic des cas enregistrés était corrélé aux faibles températures, forte pluviosité et forte humidité durant les mois d'octobre et novembre. En 2012, une étude de Njouom et al. a montré que les virus respiratoires jouaient un rôle important chez les patients ambulatoires recrutés dans le réseau de surveillance de l'activité grippale [50]. De façon globale, au moins un virus a été détecté chez 65,1% des 561 patients analysés. Hormis les virus grippaux A/B qui ont représentés 28,2% des virus détectés, les autres virus étaient : les Rhinovirus (RV) (17,4%), Parainfluenzavirus humains (HPIV) (7,5%), Entérovirus (EV) (5,9%), HRSV (5,7%), Coronavirus humain (HCoV) (5,3%) et HMPV (5,0%). Par ailleurs, les études de caractérisation moléculaire du virus Influenza ont permis d'évaluer la diversité génétique des souches du virus grippal ayant circulé au Cameroun au cours des années 2008 et 2009 et à déterminer la nature et la fréquence des marqueurs génétiques de la résistance aux antiviraux [51]. Ainsi l'étiologie virale des infections respiratoires au Cameroun reste encore largement inconnue notamment chez les



patients hospitalisés. En outre, à ce jour, hormis le virus de la grippe, les études sur la diversité génétique des autres virus respiratoires restent encore complètement inexplorées au Cameroun. D'où l'importance de ce travail qui nous servira à décrire les différentes souches de HRSV et HMPV en circulation au Cameroun entre 2011 et 2014.

L'objectif général de ce travail est de déterminer l'étiologie des IRA chez des enfants hospitalisés à Yaoundé, Cameroun et caractériser génétiquement les souches de HRSV et HMPV détectés. Plus spécifiquement :

- Déterminer l'étiologie virale des IRA chez les enfants hospitalisés et ambulatoires de moins de 15 ans à Yaoundé, Cameroun.
- Analyser génétiquement les souches de HRSV et HMPV détectées.

Les objectifs secondaires visaient également la caractérisation génétique des autres virus respiratoires (HAdV, HBoV, RV, EV, HPIV et HCoV) détectés lors de ce travail.

# Revue de la Littérature

## Chapitre 1 : Revue de la littérature

### 1. Historique des Paramyxovirus

La majorité des virus respiratoires a été découverte au courant des années 1950. Les virus respiratoires humains de la famille des *Paramyxoviridae* incluent le HPIV, le HRSV et le HMPV. Le virus respiratoire syncytial fut rapporté pour la première fois en 1956 par Morris et al., lors d'une épidémie d'infections respiratoires supérieures dans une population de chimpanzés et fut nommé Chimpanzee Coryza Agent (CCA) [52]. Le HRSV a été mise en évidence par la suite chez des nourissons en 1957 [53]. Les souches de HRSV avaient la caractéristique de produire de cellules géantes multinuclées appelées syncytia dans les cellules épithéliales, cellules KB, lors de leur identification, d'où le nom de virus respiratoire syncytial proposé par les auteurs de leur identification. Le HMPV a été découvert en 2001 [8]. Les données ont cependant montré que virus n'est pas un nouvel agent pathogène. En effet, les analyses sérologiques rétrospectives sur des échantillons stockés depuis plus de 20 ans démontrent que la présence de ce virus dans la communauté remonte au moins à 1958. Ce virus fut nommé HMPV à cause de sa forte proximité génétique à celle du Metapneumovirus Aviaire (AMPV) de type C. Le HMPV a été identifié lors de l'inoculation des cellules de reins de singes tertiaires, cellules tMK, avec des aspirations nasopharyngées négatives pour tous les autres virus respiratoires connus. La réplication virale de HMPV dans les cellules tMK est très lente et a été trouvée dépendante de la présence de la trypsine. Ces caractéristiques auraient probablement contribué à l'identification retardée du virus. En outre, de nombreuses lignées cellulaires de laboratoire utilisées pour l'isolement viral ne sont pas permissives pour l'infection HMPV.

### 2. Epidémiologie des infections respiratoires aiguës dans le monde

Les IRA surviennent dans tous les groupes d'âge, avec une prévalence élevée trouvée dans la population pédiatrique [50,54–58]. Les études de séroprévalence ont démontré que 60 à 84% des nourissons ont des niveaux significatifs d'anticorps dirigés contre les virus respiratoires communs [HMPV, HRSV, RV, Adénovirus humain (HAdV), Bocavirus humain (HBoV), EV, HCoV, HPIV...] à la naissance (vraisemblablement d'origine maternelle). Ces niveaux d'anticorps maternels baissent de 7-25% chez les sujets âgés de 6 mois à 1 an. La

séroprévalence augmente ensuite à 30-55% chez les patients ayant entre 1 à 2 ans, ce qui suggère l'acquisition d'une infection primaire. Environ 38-70% entre 2 à 5 ans et 75-100% pour les personnes de plus de 5 ans montrent des preuves sérologiques d'exposition aux virus respiratoires [10,59]. Les virus respiratoires sont ubiquitaires et sont présents dans toutes les régions à travers les 5 continents du monde [10,50,54–58].

### 2.1. Épidémiologie du virus respiratoire syncytial

Les épidémies HRSV surviennent chaque année pendant les saisons froides et humides. Dans les régions tempérées les infections se produisent d'Octobre à Mai (fin automne, hiver et début du printemps) dans l'hémisphère nord, avec un pic entre mi-décembre et début février [16,21,60–62]. Dans les zones tropicales et subtropicales les modèles de circulation HRSV sont moins connus. Les épidémies surviennent généralement pendant la saison pluvieuse et chaude, alors qu'au sud de l'équateur, le HRSV survient principalement pendant la saison sèche [18,63]. Cependant, une diffusion tout au long de l'année a également été observée [64].

### 2.2. Épidémiologie du Metapneumovirus humain

Les infections HMPV sont observées dans tous les groupes d'âge avec une incidence élevée dans les populations pédiatriques particulièrement les enfants de moins de 6 ans et d'autres populations à haut risque tels que les individus immunodéprimés [10,65–69]. Ce virus provoque des épidémies annuelles à la fin de l'hiver et au début du printemps dans les régions tempérées, alors que dans les régions subtropicales, il culmine au printemps et l'été [70–75].

## 3. Classification des paramyxovirus

L'ordre des *Mononegavirales* comprend quatre familles membres qui sont : les *Bornaviridae*, les *Filoviridae*, les *Rhabdoviridae* et les *Paramyxoviridae* [7]. Le nom de la famille *Paramyxoviridae* est originaire des mots grecs "para = à côté de" et "myxa = mucus" et signifie littéralement les virus situés à côté du mucus. Les *Paramyxoviridae* possèdent deux sous familles : les *Pneumovirinae* et les *Paramyxovirinae* (Figure 1). Depuis 1990, selon la classification de l'International Committee on Taxonomy of Viruses, les *Paramyxovirinae*

incluent 7 genres qui sont les Aquaparamyxovirus, les Avulavirus, les Ferlavirus, les Henipavirus, les Morbillivirus, les Respirivirus et les Rubulavirus. Les *Pneumovirinae* sont constitués de deux genres à savoir les Pneumovirus et les Metapneumovirus. Les HPIV-1 et 3 sont membres du genre Respirivirus alors que les HPIV-2 et 4 appartiennent au Genre Rubulavirus. Le HRSV est membre du genre Pneumovirus et le HMPV est classé dans le genre Metapneumovirus [8].

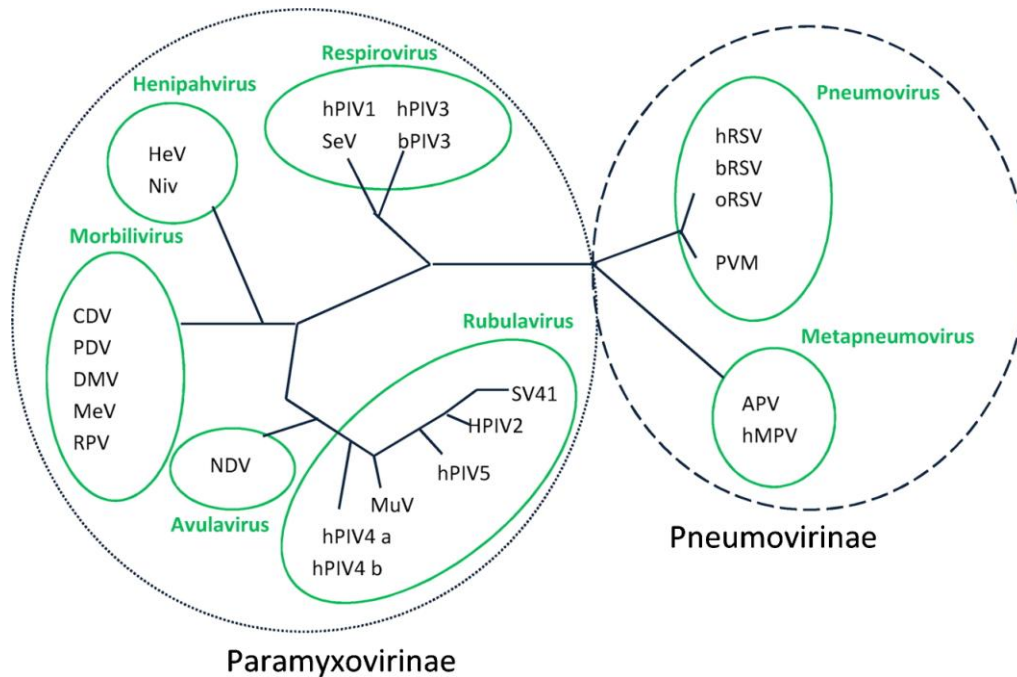


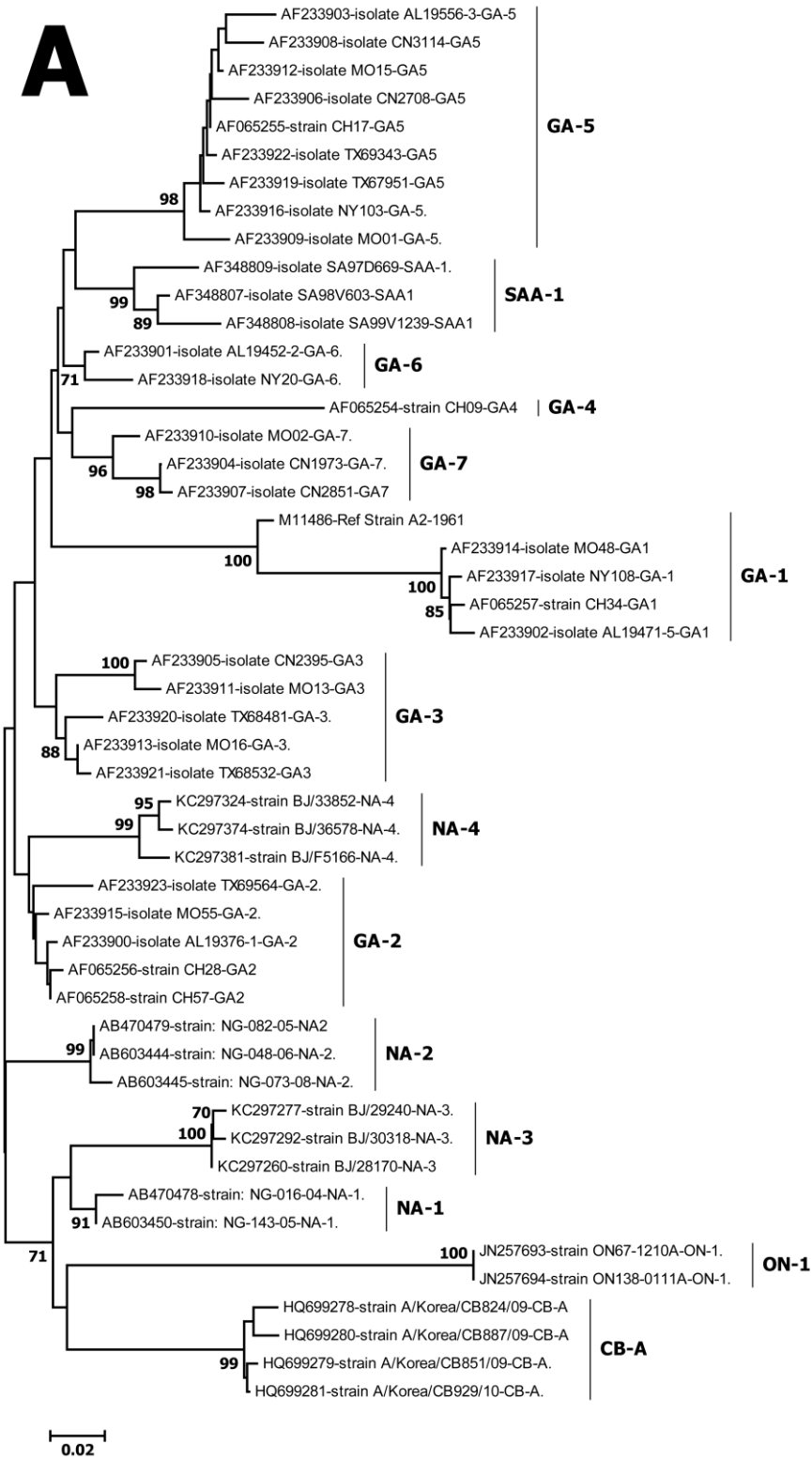
Figure 1 : Schéma représentant les différents membres de la famille de *Paramyxoviridae* [76].

*hRSV* (human respiratory syncytial virus), *bRSV* (bovine respiratory syncytial virus), *oRSV* (ovine respiratory syncytial virus), *PMV* (murine pneumovirus), *hMPV* (human metapneumovirus), *APV* (avian metapneumovirus), *hPIV2* (human parainfluenza virus type 2), *hPIV4a* et *b* (human parainfluenza virus types 4a et b), *hPIV5* (human parainfluenza virus type 5), *SV41* (simian virus 41), *MuV* (mumps virus), *NDV* (Newcastle disease virus), *MeV* (measles virus), *RPV* (Rinderpest virus), *DMV* (dolphin morbillivirus), *PDV* (phocine distemper virus), *CDV* (canine distemper virus), *TPMV* (*Tupaia paramyxovirus*), *heV* (Hendra virus), *NiV* (Nipah virus), *hPIV1* (human parainfluenza virus type 1), *hPIV3* (human parainfluenza virus type 3), *bPIV3* (bovine parainfluenza virus type 3), *seV* (Sendai virus).

### 3.1. Virus respiratoire syncytial

Les techniques utilisant la réactivité d'anticorps monoclonaux ciblant les epitopes sur les protéines G et F ont permis de décrire 2 groupes antigéniques majeurs : HRSV-A et

HRSV-B [14,15]. Les isolats de HRSV forment également deux groupes, HRSV-A et HRSV-B, sur la base de l'analyse génétique des séquences nucléotidiques du gène G. Les techniques d'analyses phylogénétiques ont permis de subdiviser ces groupes en génotypes (figure 2). Les premiers génotypes HRSV ont été rapportés par Peret *et al.*, en 1998 et 2000 aux USA [16,17]. Il s'agissait des génotypes GA-1 à 7 et GB-1 à 4 du groupe HRSV-A et HRSV-B respectivement (Figure 3). En 2001, les critères de définition de nouveaux génotypes pour ce virus ont été proposés par Venter *et al.*, lors de la description des génotypes SAA-1 (HRSV-A) et SAB-1 à 3 (HRSV-B) en Afrique du sud [26]. Ces critères recommandent de considérer comme nouveau génotype les séquences soutenues par un *bootstrap* compris entre 70 et 100% et avec une p-distance < 7% entre tous les membres du groupe. Par la suite, les génotypes du groupe HRSV-A : NA-1 et 2, ON1, CB-A et NA-3 et 4 ont été décrits au Japon, Canada, Corée et Chine respectivement [19–21,34]. Découverts dans plusieurs pays à travers le monde, les génotypes HRSV-B comprennent en outre, URU-1 et 2, BA-1 à 14, SAB-4, CB-B, BA-C, CB-1, GB5 et THB [18–20,22–25,27,63,77–79].



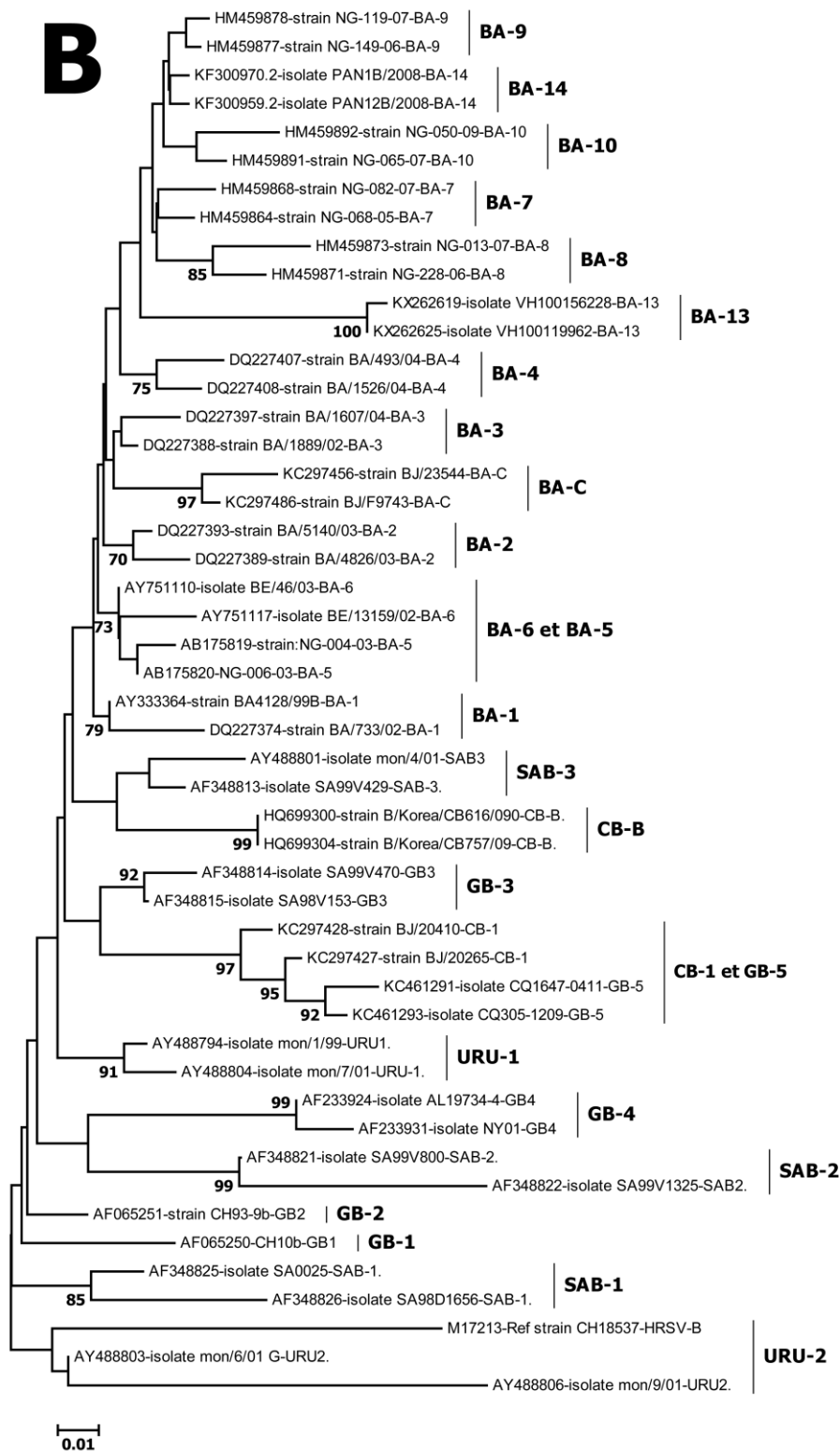


Figure 2 : Arbre phylogénétique des séquences de références, A : HRSV-A et B : HRSV-B.

Les arbres ont été générés sur la base des séquences nucléotidiques de la deuxième région hypervariable C-terminale du gène G (HRSV-A : 239 nucléotides, position 687-925 de la séquence de référence A2 numéro Genbank M11486 ; HRSV-B : 303 nucléotides position 664-966 de la séquence de la séquence de référence CH18537 numéro Genbank M17213). L'arbre a été généré en utilisant la méthode Neighbor-Joining. La barre d'échelle indique la proportion de substitutions de nucléotides. Les



numéros sur les branches sont des valeurs déterminées pour un *bootstrap* de 1000 répétitions. Seules les valeurs de *bootstrap* supérieures à 70% sont présentées. Les génotypes HRSV sont indiqués après la barre qui suit le nom de chaque souche. Les séquences de références établies pour HRSV-A et HRSV-B ont été obtenues sur Genbank (annexe 1 et 2).

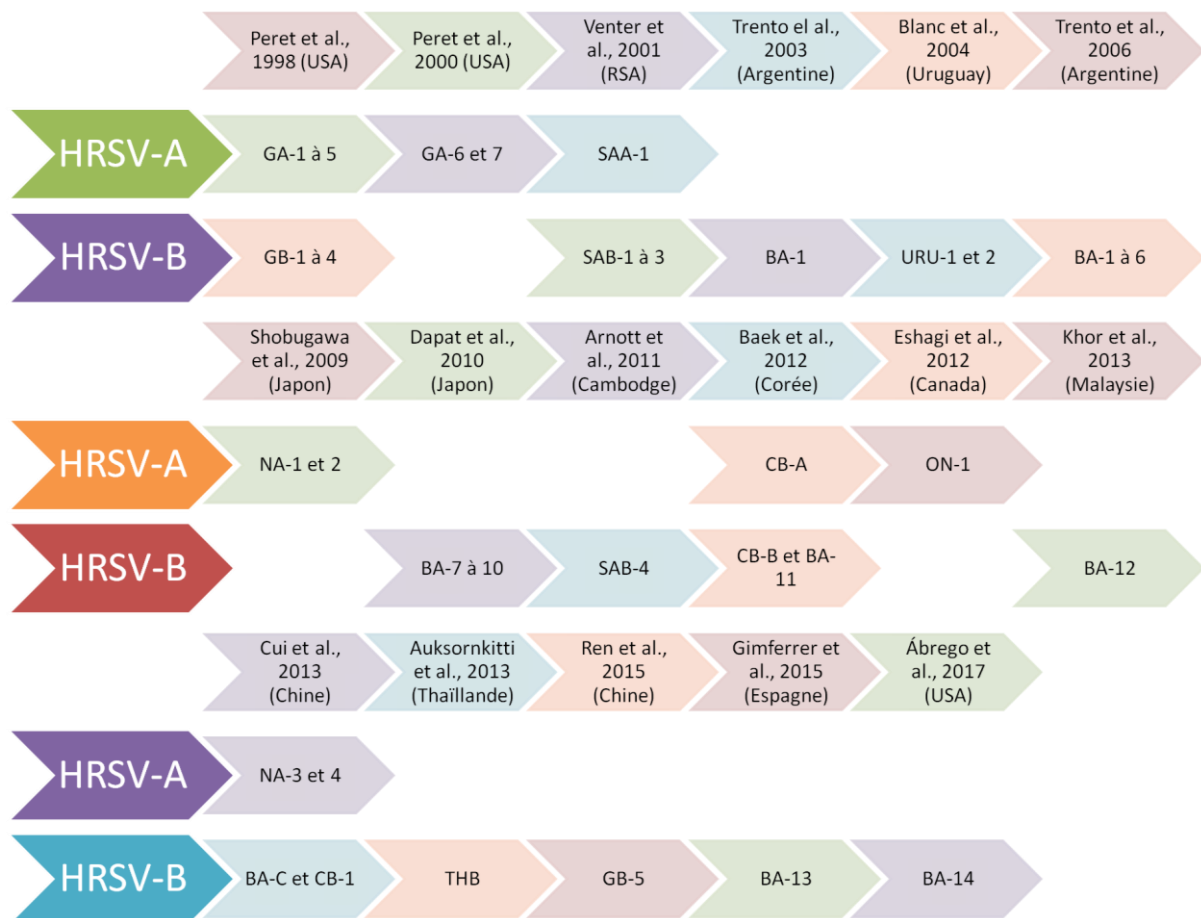


Figure 3 : Schéma récapitulatif des études rapportant les différents génotypes HRSV-A et HRSV-B.

### 3.2. Metapneumovirus humain

Le HMPV est classé en deux groupes distincts A et B sur la base principalement de l'analyse phylogénétique des séquences des gènes F et G principalement (Figure 4) [8,12,80]. Chacun des groupes A et B du HMPV se sépare en deux sous-groupes distincts (A1 et A2) et (B1 et B2) respectivement. En outre, des analyses phylogénétiques supplémentaires ont suggéré la scission des sous groupes A1 et A2 en lignées génétiques A1a/A1b et A2a/A2b, respectivement [12,31,32]. La question de savoir si les 2 lignées génétiques HMPV A et B sont antigéniquement distincts reste controversée. Selon certaines études les lignées génétiques A et B du HMPV représenteraient des sérotypes distincts [81,82]. Cependant,

d'autres travaux ont affirmé le contraire et stipulent qu'il y aurait seulement un groupe antigénique [83]. Ainsi, d'autres recherches sont nécessaires afin de confirmer s'il existerait une réactivité anticorps neutralisante croisée entre les groupes A et B du HMPV chez l'homme.

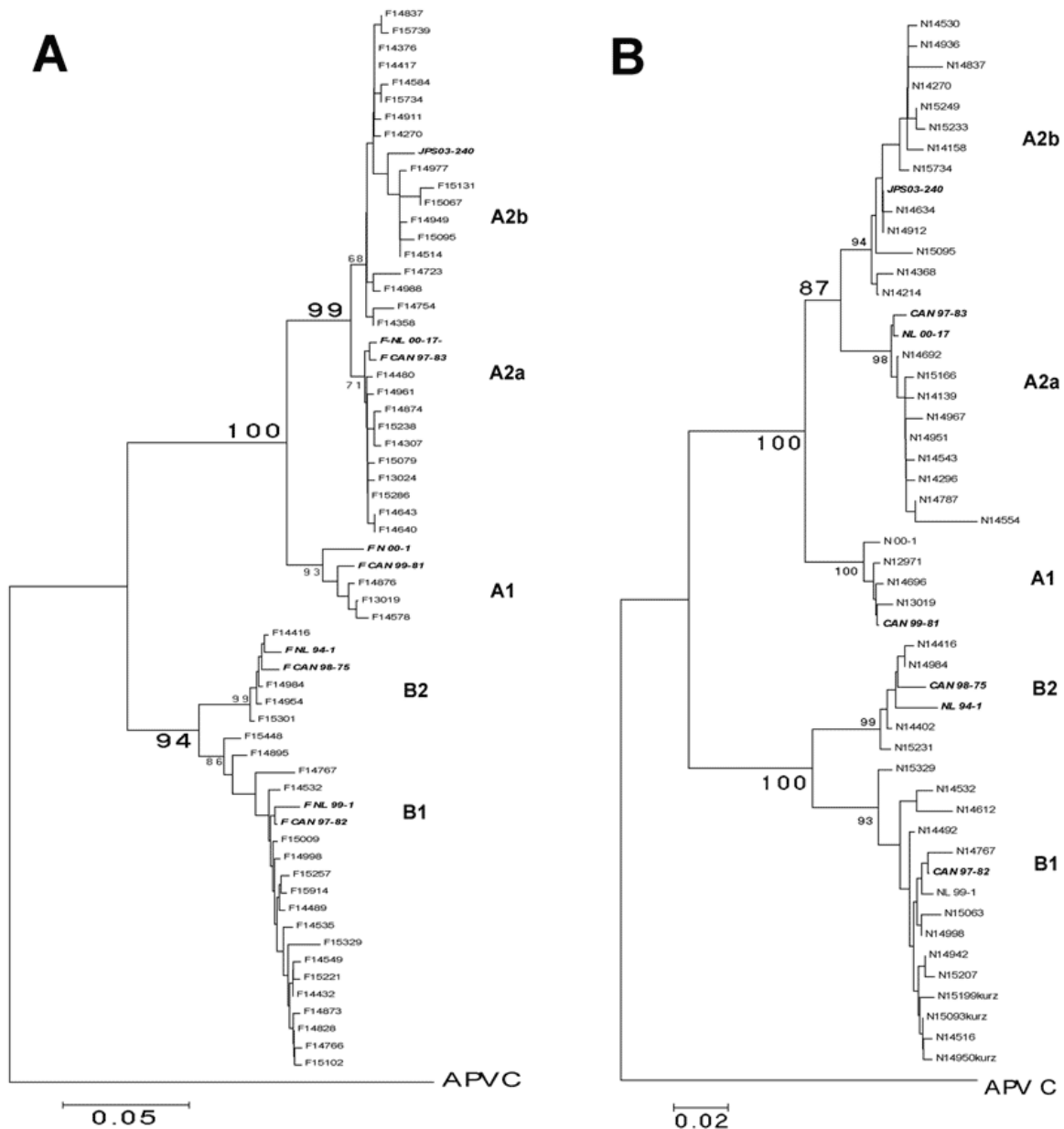


Figure 4 : Arbres phylogénétiques des groupes A et B et sous groupes A1, A2a, A2b, B1 et B2 du Metapneumovirus humain. A : Gène partiel F (506 nucléotides) et B : Gène partiel N (424 nucléotides).

Séquences de 191 souches HMPV récupérées en Allemagne pendant la saison 2003-2004. Les numéros sur les nœuds des branches sont des valeurs déterminées pour le ré-échantillonnage bootstrap après 1000 itérations. Une séquence du Metapneumovirus aviaire C a été utilisée comme groupe externe. Les séquences prototypes du Pays-Bas, du Japon et du Canada ont également été incluses dans l'arbre [32].

#### 4. Structure virale des Paramyxovirus

Les particules virales de la famille *Paramyxoviridae* sont enveloppées et composées d'environ 15 à 25% de lipides [84]. L'enveloppe virale est d'environ 12 nm de long et sa composition en acide gras reflète celle de la membrane de la cellule hôte dont elle est dérivée. Les virions présentent un diamètre variant de 150 à 600 nm, avec de courtes saillies de 13 à 17 nm [9,10]. Les virions sont composés de 3-6% en poids d'hydrate de carbone dont la composition dépend de la cellule hôte. Ces hydrates de carbone sont présents sous forme de chaînes glucidiques N et O-liés à des protéines de surface et des glycolipides. Les structures pléiomorphiques, généralement sphériques ou filamenteuses sont typiques des paramyxovirus. L'acide ribonucléique (ARN) viral est associé à la nucléoprotéine N, la phosphoprotéine P, la polymérase L et éventuellement les protéines M2-1 et M2-2 pour former la nucléocapside. Cette nucléocapside, d'environ 13 à 18 nm de diamètre possède une symétrie hélicoïdale (Figure 5 et 6). Le diamètre de la nucléocapside varie de 13-14 nm dans la sous famille des *Pneumovirinae* par rapport à 18 nm dans la sous-famille *Paramyxovirinae*.

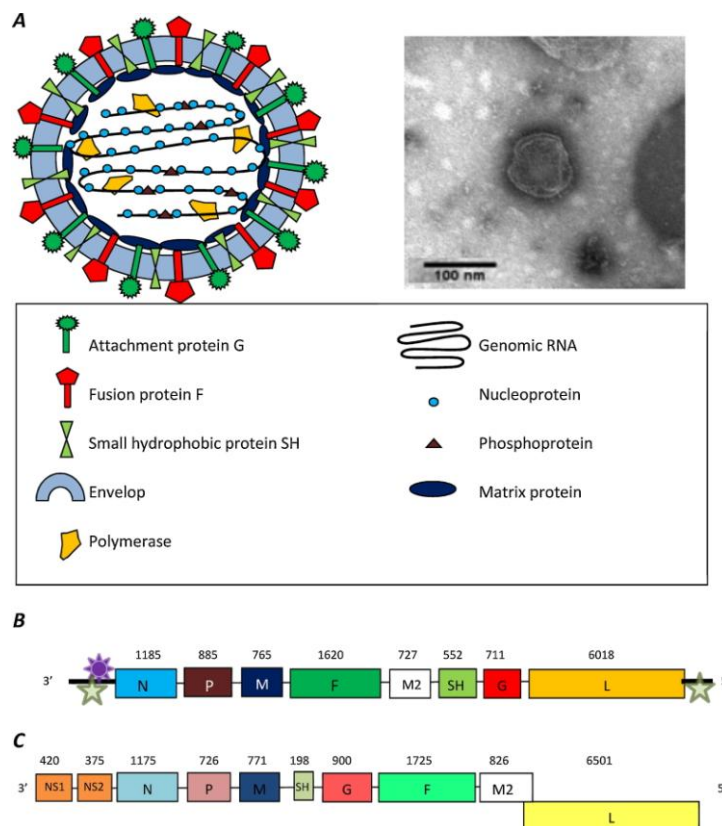


Figure 5 : (A) Morphologie du HRSV et HMPV à droite et image par microscopie électronique du HMPV à gauche ; (B) Structure génomique du HMPV ; (C) structure génomique du HRSV.

Sur la figure B l'étoile grise représente le signal d'initiation de la réplication et l'étoile pourpre le signal de transcription de l'ARN [76]. Sur la figure C les gènes M2 et L sont chevauchants. Sur les figures B et C, les gènes individuels sont indiqués par des boîtes. Le gène M2 code pour deux protéines prédites, M2-1 et M2-2, à partir d'un second cadre de lecture ouvert. Le nombre de nucléotides de chaque gène est indiqué au dessus de son cadre.

## 5. Génome des paramyxovirus

Le génome des Paramyxovirus est constitué d'ARN linéaire d'environ 13 000 pour les metapneumovirus à environ 15 000 nucléotides pour le virus respiratoire syncytial [10]. Les virions renferment ordinairement un ARN monocaténaire de polarité négative. Des virions avec une partie d'ARN de polarité positive ont cependant été rapportés. L'ARN des HMPV contient 8 gènes tandis que celui de HSRV est formé de 10 gènes (Figure 5). L'ARN viral des paramyxovirus est dépourvu d'une coiffe à l'extrémité 5' terminale ou une protéine associée de façon covalente. Les 20 premiers nucléotides à l'extrémité 3' sont très préservés parmi les paramyxovirus, suggérant leur signification biologique dans l'initiation de la transcription et la réplication du génome [11,12,85]. L'extrémité 3' de l'ARN viral est dépourvue d'une queue poly (A). Le génome contient en outre des régions non codantes entre chaque cadre de lecture ouvert dont la taille varie de deux à plusieurs centaines de nucléotides qui contiennent des signaux de fin et de début de gène. Ces régions intergéniques contrôlent la terminaison de la transcription et le réamorçage, conduisant à un gradient d'abondance d'ARN messagers qui diminue à partir de l'extrémité 3' du génome (N gène) vers l'extrémité 5' (gène L). Chaque gène des *Pneumovirinae* a un cadre de lecture ouvert, à l'exception du gène M2, qui possède deux cadres ouverts de lecture qui se chevauchent correspondant aux protéines M2-1 et M2-2 [11,12,85]. Les huit gènes (3'-N-P-M-F-M2-SH-G-L-5') du HMPV codent ainsi pour neuf protéines virales différentes : la nucléoprotéine (N), la phosphoprotéine (P), la protéine de matrice (M), la protéine de fusion (F), un facteur d'élongation de la transcription (M2-1), un facteur de régulation de la synthèse d'ARN (M2-2), la petite protéine hydrophobe de surface (SH), la glycoprotéine majeure d'attachement (G) et la protéine majeure de la polymérase (L) [8]. En plus des neuf protéines du HMPV, les 10 gènes du HRSV (3'-NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L-5'), codent pour deux protéines supplémentaires, les protéines non structurales NS1 et NS2. Par rapport au HMPV, le génome HRSV diffère dans l'organisation de SH et des protéines G et les cadres de lecture pour M2 et L se chevauchent.

## 6. Protéines des paramyxovirus

### 6.1. Protéines structurales

À l'intérieur de l'enveloppe l'ARN viral est encapsidé par la protéine de nucléocapside (N), la phosphoprotéine protéine (P), une grande protéine de polymérase (L) et la protéine M2-1 pour former une nucléocapside hélicoïdale de 17 nm de diamètre [10–12,85]. La protéine N est toujours étroitement attachée à l'ARN génomique et possède un rôle essentiel dans la stabilité de la nucléocapside [10–12,85]. Il a aussi été proposé que cette protéine puisse fonctionner comme facteur de commutation de changement dans la réplication et la transcription de l'ARN viral. La phosphoprotéine P est une protéine structurale qui joue le rôle de cofacteur pour stabiliser la polymérase qui permet la formation du complexe ribonucléoprotéine lors de la réplication [10–12,85]. La protéine de matrice M se trouve en étroite association avec l'enveloppe et assure la médiation de la connexion entre les pointes des glycoprotéines de surface et la nucléocapside [10–12,85]. Cette protéine est aussi requise dans l'assemblage et le bourgeonnement des particules virales néoformées. La haute conservation et l'association étroite des protéines M avec la nucléocapside dans les cellules infectées suggèrent qu'elles peuvent aussi jouer un rôle dans la régulation de la transcription et/ou la réplication de l'ARN viral. La protéine M2-1 intervient dans la transcription comme un facteur anti-terminaison [10–12,85]. La protéine M2-2 assure la régulation de réplication et la transcription de l'ARN virale [10–12,85]. Cette protéine joue également un rôle majeur dans la virulence en diminuant l'immunité innée de l'hôte. La protéine L (ARN Polymerase dépendante de l'ARN) assure la polymérisation de l'ARN [10–12,85]. Cette protéine est considérée comme étant responsable par activité transcriptase d'assurée la méthylation et polyadénylation de l'ARNm spécifique du virus.

### 6.2. Protéines non structurales

Les protéines non structurales (NS1 et NS2) ont été identifiées comme des anti-interférons de type 1 des voies de signalisation [10–12,85].

### 6.3. Protéines membranaires

Selon les genres de la famille *Paramyxoviridae*, l'enveloppe virale contient les glycoprotéines de surface transmembranaires, sous la forme de projections d'environ 13-17 nm. On distingue une protéine fortement glycosylée G, une protéine F, une petite protéine hydrophobe SH et une protéine HN [10–12,85].

#### 6.3.1. Protéine G

La protéine de fixation G est responsable de la fixation et pénétration virale dans la cellule hôte [10–13,85]. Cette protéine G est également l'antigène majeur responsable de l'induction de la synthèse d'anticorps neutralisants lors de la réponse immunitaire [10–12,14,85–87]. La protéine G possède une teneur élevée en résidus serine, threonine et proline qui sont des sites potentiellement accepteurs des chaînes glucidiques O et N-liées [11,24,28,30,38,82,88–91]. Les changements nucléotidiques qui se produisent au niveau de ces sites de glycosylations sont susceptibles de modifier les caractéristiques antigéniques des souches de HRSV et HMPV [92–94]. Cela pourrait constituer un mécanisme pour l'échappement des réponses immunitaires de l'hôte et conduire à un avantage évolutif.

##### 6.3.1.1. Virus respiratoire syncytial

La protéine G comporte un nombre variable d'acides aminés, de 282 à 321 en fonction des génotypes et contient un domaine cytoplasmique, un domaine transmembranaire et un ectodomaine. Les domaines cytoplasmiques et transmembranaires sont conservés tandis que l'ectodomaine possède deux régions hypervariables (HVR1 et HVR2) séparés par un segment central fortement conservé comprenant le site de liaison du récepteur de 13 acides aminés conservés (AA 164-176) [89,95]. Du fait de sa forte variabilité, le domaine HVR2 représente la cible principale pour les études de l'épidémiologie moléculaire et évolutive des HRSV [23,39,62,63,79,96–101]. Il existe également une forme soluble de la glycoprotéine G du HRSV qui est libérée dans les fluides des cellules infectées [102].

### 6.3.1.2. Metapneumovirus humain

Le codon d'initiation de la transcription du gène G est localisé à quatre nucléotides après la séquence de départ du gène (GGGACAAGT) qui est conservé parmi toutes les souches HMPV [91]. Excepté le sous-groupe A2, les souches de HMPV possèdent des codons alternatifs d'initiation de la transcription du gène G [103]. Néanmoins, un seul cadre de lecture ouvert potentiel conduit à des gènes G de longueur variable selon le sous groupe [30,31,81,88,90,103–105]. Ces variations de longueurs sont dues à des insertions et délétions de nucléotides dans la séquence. Les cadres alternatifs de lecture ouverte sont bloqués par des codons de terminaison [11,91]. Un événement de duplication de 180 nucléotides dans le gène G a été signalé en Espagne et au Japon pour les virus HMPV-A2b [46,106]. Elle présente aussi au sein du même sous groupe des gènes G plus courts en raison de l'existence de codons stops prématurés dus à des mutations [81,88,91]. La protéine G du Metapneumovirus humain possède également trois domaines : le domaine intracellulaire (32 premiers résidus d'acides aminés), le domaine transmembranaire (aminoacides 33 à 51) et le domaine extracellulaire [103]. La queue cytoplasmique et le domaine transmembranaire sont conservés au sein des deux groupes tandis que le domaine extracellulaire est très variable (Figure 6) [88,91,103]. Le pourcentage de similarité de la séquence des acides aminés est inférieure à celle des nucléotides [103].

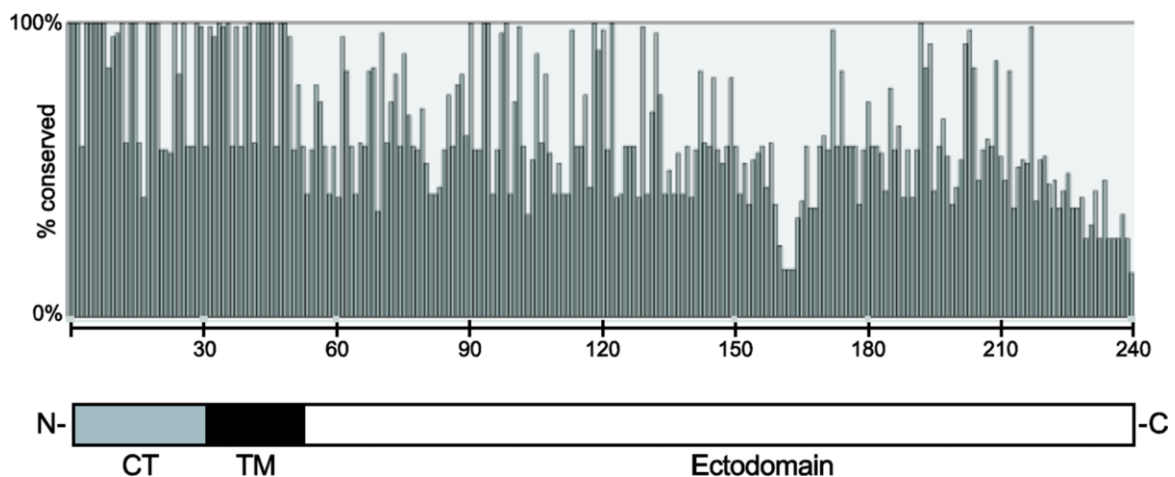


Figure 6 : Variabilité des aminoacides dans la protéine G du Metapneumovirus humain.

La figure représente l'alignement de 87 séquences protéiques complètes de G. L'axe des ordonnées indique le pourcentage d'identité entre les isolats. L'axe des abscisses indique la position des résidus d'acides aminés de l'extrémité N vers

l'extrémité C-terminal. La représentation schématique en dessous indique les extrémités amino et carboxy-terminale et les différents domaines de la protéine G. CT : domaine cytoplasmique et TM : domaine transmembranaire [107]

### 6.3.2. Protéine F

La protéine F est synthétisée sous forme d' une protéine précurseur F0 biologiquement inactive qui requiert un clivage post-traductionnel par une endopeptidase cellulaire pour obtenir deux sous unités F1 et F2 liées par un pont disulfure (amino-F2-s-s-F 1-carboxyle) [10–13,85]. Le gène de fusion comprend une queue cytoplasmique, un domaine transmembranaire et un domaine extracellulaire. La fixation et la fusion de l'enveloppe virale à celle de la cellule hôte sont facilitées par la protéine F. La protéine F est un déterminant antigénique majeur chez les *Paramyxoviridae* qui induit les anticorps neutralisants. Cette protéine subit un changement de conformation de la forme préfusion à la forme postfusion. La forme préfusion est métastable et subit un réarrangement dans la forme postfusion stable. Selon les espèces, un nombre variable de sites antigéniques ont été identifiés sur ces différentes formes de protéine de fusion (Figure 7) [108]. La protéine de fusion est la principale cible pour le développement des vaccins et des mesures prophylactiques passives [109–113]. Le site antigénique II présent dans les conformations pré et postfusion est la cible de l'anticorps monoclonal Palivizumab.



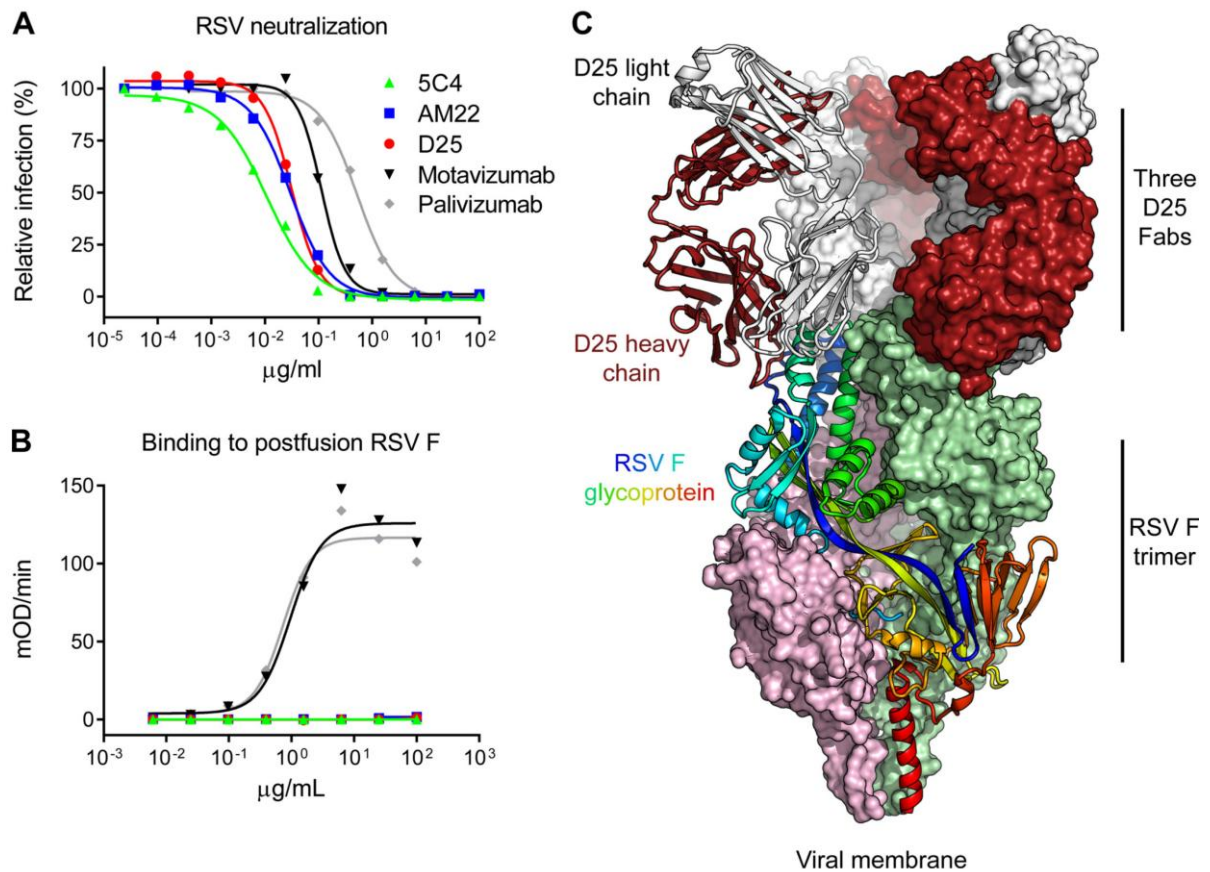


Figure 7 : Neutralisation du HRSV, la reconnaissance de la protéine F dans sa conformation préfusion par l'anticorps humain D25 [108].

(A) Neutralisation du HRSV par des anticorps. Un certain nombre d'anticorps, y compris D25, se lie à un site antigénique nouvellement révélé au sommet de la conformation de la forme préfusion de la glycoprotéine F. (B) Mesure de la liaison des anticorps à la forme postfusion de la glycoprotéine F par la technique ELISA. (C) Structure du complexe D25-glycoprotéine F de HRSV.

### 6.3.3. Protéine SH

Outre les protéines F et G, les virus des genres Pneumovirus, Metapneumovirus et Rubulavirus hébergent une troisième glycoprotéine de surface transmembranaire (SH) [10–12,85]. Bien que la fonction de la protéine SH soit peu claire, plusieurs études suggèrent qu'elle serait impliquée dans l'inhibition de la réponse immunitaire innée et acquise.

## 7. Evolution

### 7.1. Virus respiratoire syncytial

Le taux d'évolution estimé de la protéine G est supérieur à celui de l'ensemble du génome [114]. Les enquêtes suggèrent que la région hypervariable C-terminale du gène G évolue très rapidement avec une vitesse plus élevée pour les souches HRSV-B ( $4,56 \times 10^{-3}$  substitutions/site/an) comparé à HRSV-A ( $3,63 \times 10^{-3}$  substitutions/site/an) [99]. Par ailleurs, Hirano *et al.*, ont examiné la même région dans HRSV-A et ont constaté que le génotype ON1 a évolué à un rythme plus rapide que le génotype ancestral NA1 (ON1,  $6,03 \times 10^{-3}$  substitutions/site/an; NA1,  $4,61 \times 10^{-3}$  substitutions/site/an) [115].

L'émergence au fil du temps de nouveaux génotypes HRSV suggère que la protéine virale G est en évolution rapide et continue [22]. Les études ont contribué à montrer que de nombreux sites du gène G du HRSV, particulièrement la région hypervariable C-terminale, sont sous pression de sélection positive [21,24,99,116]. Il existe une corrélation forte entre les épitopes neutralisants et les sites sélectionnés positivement sur le gène G, ce qui suggère que la dérive génétique du gène G serait liée à la pression immunologique de l'hôte qui fonctionne comme une pression de sélection de l'évolution [45,117,118].

Le HRSV a présenté également un motif d'évolution dit « flip-flop ». C'est une tendance à la réversibilité vers le codon de départ dans les mutations des séquences du gène G [119].

### 7.2. Metapneumovirus humain

Bien que la classification soit concordante indépendamment du gène étudié, la grande variabilité génétique et antigénique entre les souches HMPV se retrouve principalement sur le gène de surface G (Tableau I) [12,32,75,88,104,107], alors que les autres gènes sont beaucoup plus conservés [12,85]. Les enquêtes sur le mode évolutif de HMPV et AMPV-C, à l'aide des gènes G, F et N, ont montré que le gène G possédait le taux de substitution le plus élevé ( $3,5 \times 10^{-3}$  substitution nucléotidique/site/an) comparé au gène N ( $9 \times 10^{-4}$  substitution nucléotidique/site/par an) et F ( $7,1 \times 10^{-4}$  à  $8,5 \times 10^{-4}$  substitution nucléotidique/site/an) [120,121]. Dans deux études, un nombre limité de sites sélectionnés positivement a été trouvé dans le gène F et aucun n'a été trouvé dans le gène N [120,121] alors que les mutations du

gène G étaient susceptibles d'être soit neutres, soit sélectionnés positivement. Bien qu'il existe des différences distinctes d'acides aminés dans le gène G de HMPV, ils ne présentent pas de dérive progressive substantielle et les quatre lignées ont été préservées au fil du temps [81,107].

Viruses compared	Percent amino acid sequence identity for indicated protein (percent nucleotide sequence identity for indicated ORF)									
	N	P	M	F	M2-1	M2-2	SH	G	L	
CAN97-83 vs CAN 98-75	96 (84)	85 (81)	97 (85)	95 (84)	96 (85)	89 (87)	59 (69)	37 (59)	94 (84)	
CAN97-83 vs 00-1	99 (94)	95 (92)	99 (94)	98 (94)	98 (94)	96 (95)	85 (88)	70 (77)	99 (95)	
HRSV A2 vs HRSV B1	95 (85)	90 (85)	91 (85)	89 (81)	91 (84)	61 (69)	72 (77)	55 (67)	92 (85)	

Tableau I : Pourcentage d'une identité de séquence d'acides aminés ou de nucléotides entre les souches indiquées de HMPV ou de HRSV pour les protéines et ORF indiquées [12].

Avec la mise à disposition d'un nombre croissant de séquences de gènes G de HMPV et AMPV dans les bases de données publiques, l'histoire de l'évolution et de la dynamique de HMPV ont été étudiés. L'AMPV-C est le plus proche parent génétique du HMPV avec qui il possède la même constellation de gènes [10]. Les volailles ne sont pas sensibles à HMPV et les anticorps anti-AMPV n'ont pas été retrouvés chez les humains, ce qui suggère que l'infection HMPV ne semble pas être une zoonose. Le virus aurait probablement divergé du AMPV-C [120,121]. Les analyses génétiques montrent que HMPV aurait divergé d'un ancêtre commun du AMPV-C il y'a 200-400 ans [81,91,107,120,121]. La diversité génétique actuelle du HMPV serait apparu il y'a 97-133 ans [120,121]. Ainsi, la diversité génétique du HMPV est d'origine très récente, avec plusieurs diversifications se produisant à peu près simultanément. Chacun des groupes HMPV-A et B semble être âgé de 34 à 51 ans, tandis que chacun des sous-groupes (A1, A2, B1 et B2) semble avoir moins de 30 ans [120,121].

## 8. Epidémiologie moléculaire

### 8.1. Virus respiratoire syncytial

La cocirculation des deux groupes HRSV-A et B pendant la même période épidémique a été décrite dans plusieurs études avec une alternance dans le motif de prédominance [20,24,34,63,78,97,122] (Figure 8). Les génotypes GA-2 et GA-5 du groupe HRSV-A et BA du groupe HRSV-B ont été les groupes prédominants en circulation dans le monde au cours

de la dernière décennie, ce qui indique la grande adaptation de ces génotypes [22,25,35,45,78,116,119,122]. Après son émergence en 1999 à Buenos Aires en Argentine [25], le génotype BA montre au fil du temps une grande diversification avec au moins 16 génotypes différents (BA-1 à 14, BA-C et CB-B) [79]. Ce génotype BA est défini par une duplication de 60 nucléotides commune dans le HVR-2. Les génotypes BA9 et BA10 sont les types les plus répandus dans le monde entier actuellement. Le génotype prédominant BA9 a permis de distinguer jusqu'à trois sous-groupes génétiques (BA-9a, BA-9b et BA-9c) [122]. Cependant, lors de l'expansion du génotype BA, une épidémie de GB5 a été enregistrée en 2010-2011 en Chine, suggérant une propagation avec fluctuation du génotype BA. D'autre part, une autre étude a indiqué que de nouvelles souches non-BA ont resurgi au Kenya [123]. Ces génotypes des groupes HRSV-A et B montrent un regroupement dans le temps par année de détection. Les différents génotypes du HRSV ne présentent pas une forte structure spatiale des arbres phylogénétiques, suggérant que l'évolution HRSV n'est pas régionalisée bien que le génotype GA-7 ait été identifié seulement aux États-Unis [21,23,40,116].

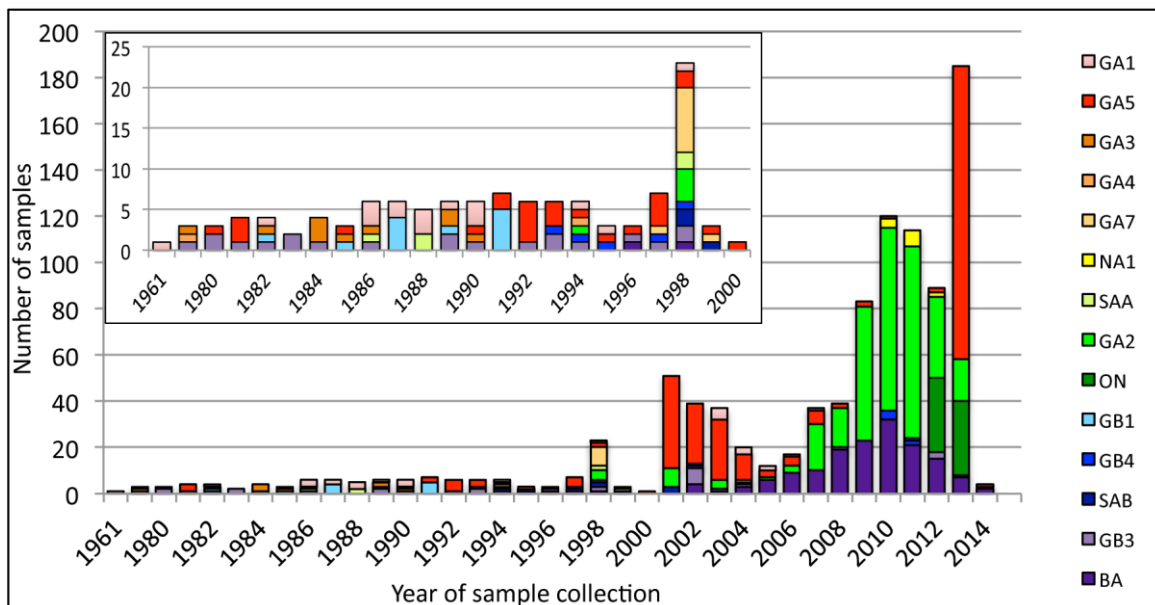


Figure 8 : Groupes HRSV en circulation au monde (1961–2014).

La représentation au sommet à gauche est un agrandissement de la figure principale pour les données de l'année 1961-2000 [124].

## 8.2. Metapneumovirus humain

La circulation des 4 groupes de HMPV a été confirmée dans des enquêtes à travers le monde entier [31,32,74,104]. Il a été montré que les 4 groupes génétiques du HMPV peuvent circuler simultanément au même endroit, la lignée prédominante pouvant varier dans les années consécutives et selon les zones géographiques. Il a été suggéré que la variation antigénique pourrait expliquer la cocirculation de plusieurs lignées génétiques différentes de HMPV chez l'être humain [81].

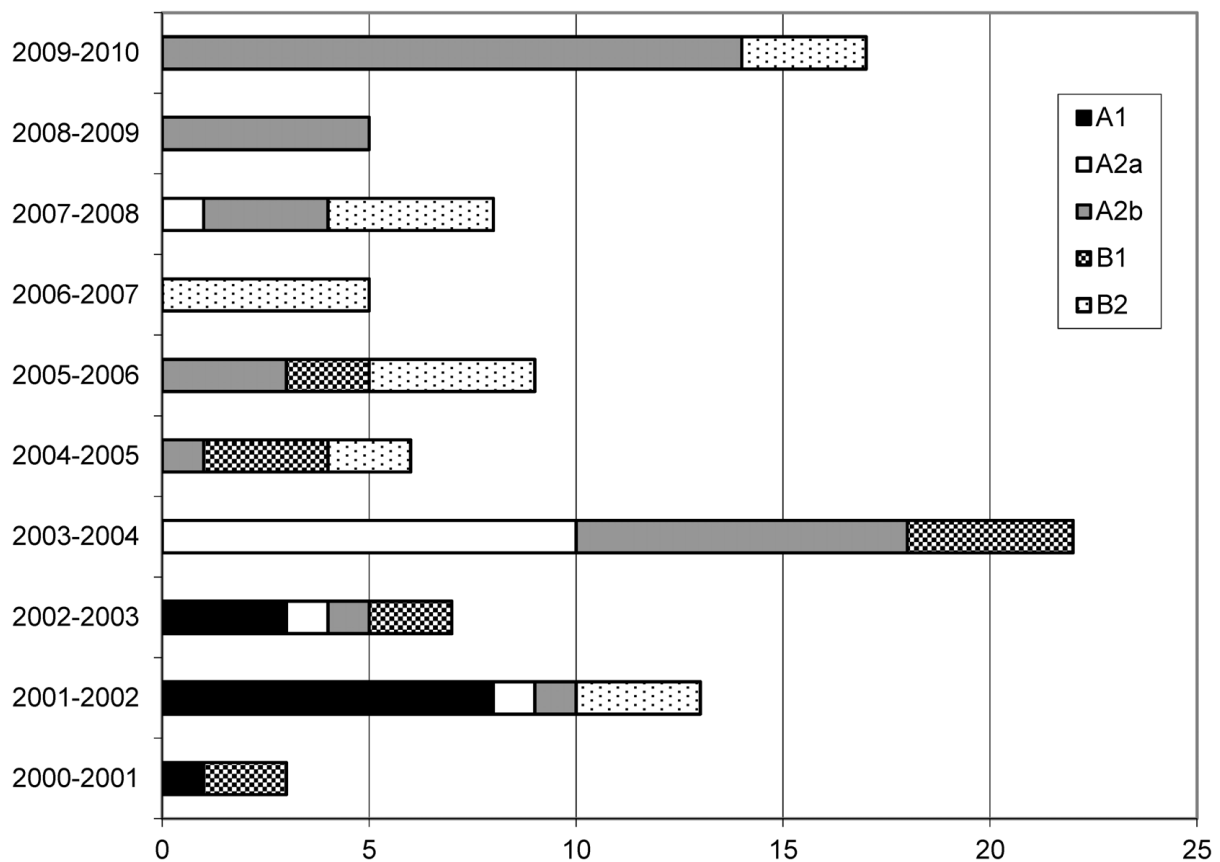


Figure 9 : Souches en circulation du HMPV en Allemagne de 2000 à 2010 [71].

## 9. Tableau clinique des infections respiratoires aiguës à Paramyxovirus

Les personnes immunocompétentes présentant une infection à paramyxovirus (HRSV et HMPV) peuvent être asymptomatiques ou présenter des symptômes allant d'une infection bénigne des voies respiratoires supérieures (URTI) à une maladie plus grave des voies respiratoires inférieures (LRTI) engageant le pronostic vital

[21,24,30,31,39,58,62,63,71,73,96,98,101,125–132]. La compréhension reste limitée en ce qui concerne les raisons pour lesquelles certaines infections restent confinées dans les voies respiratoires supérieures tandis que chez certaines personnes l'infection se propage aux voies respiratoires inférieures. Ces paramyxovirus ont aussi été associés aux infections respiratoires telles que les exacerbations d'asthme, l'otite moyenne aiguë et la maladie asthmatique [58,73,125,126,133].

### 9.1. Détection des Paramyxovirus chez des sujets asymptomatiques

La plupart des études ont contribué à montrer que la présence de l'ARN viral des paramyxovirus dans les sécrétions des personnes asymptomatiques était un phénomène rare [134,135].

### 9.2. Infections respiratoires aiguës supérieures

Les URTI enregistrées sont le rhume, la rhinite, la rhinopharyngite, la pharyngite, la laryngite ou le coryza. Ces URTI sont causées par les paramyxovirus chez les enfants, les adultes ainsi que les patients sains et ceux atteints de maladies sous-jacentes [21,29,47,63,105,125,130].

### 9.3. Infections respiratoires aiguës basses

Les LRTI le plus souvent causées par les paramyxovirus (HRSV, HMPV et HPIV) inclues la laryngite, la trachéite, la bronchite, la trachéobronchite, la bronchiolite, la bronchopneumonie ainsi que la pneumonie [24,30,75,131,132,135–138]. Les LRTI sont enregistrées principalement chez les personnes à risques notamment ceux ayant les âges extrêmes de la vie et les personnes immunodéprimées.

#### 9.3.1. Bronchiolite

En 2006, un sous-comité de l'American Academy of Pediatrics en collaboration avec l'European Respiratory Society a souligné que la bronchiolite est un diagnostic clinique, reconnue comme «une constellation de signes et symptômes cliniques, y compris un prodrome respiratoire viral des voies aériennes supérieures suivie par une augmentation de

l'effort respiratoire et une respiration sifflante chez les enfants de moins de 2 ans » [139]. Cette infection est l'une des situations d'urgence médicale les plus courantes et la principale cause d'hospitalisation dans la petite enfance portant des coûts énormes pour les systèmes de soins de santé dans les pays industrialisés et une grande mortalité dans les pays en voie de développement. Cette maladie représente 5 à 15% des hospitalisations des les nourrissons et les jeunes enfants [73,125,126,132]. Au moins 90% des cas de bronchiolites seraient d'origine virale, et un taux d'identification aussi élevé que 90% a été rapporté [132]. Des études ont confirmé que la cause virale de cette infection est dominée par le VRS (45-50%), suivie par rhinovirus (HRV), Metapneumovirus humain (HMPV) et l' adénovirus comme unique agents pathogènes [24,62,73,125,132,137,140]. En outre, les quatre types de HPIV peuvent causer des bronchiolites, mais HPIV-1 et HPIV-3 ont été rapportés le plus souvent.

### 9.3.2. Pneumonie

La pneumonie demeure la principale cause de mortalité, de morbidité et d'hospitalisation infantile à l'échelle mondiale. Les données d'une méta-analyse démontrent qu'environ 1 million (15%) d'enfants sont décédés en raison de ces infections en 2013 [1]. Le poids de cette infection est particulièrement important dans les pays en développement notamment l'Afrique Subsaharienne qui a enregistré près de la moitié de tous ces décès (0,4 millions). Les pneumonies sont causées par des bactéries, des virus ou une combinaison de ces agents pathogènes. De nombreux virus, y compris HMPV, HRSV, HPIV-1 et HPIV-3 ont été isolés à partir d'échantillons respiratoires des enfants et des adultes atteints de pneumonie [132,135].

## 10. Facteurs de risque de sévérité des infections respiratoires aiguës

### 10.1. Facteurs de risque de sévérité de l'hôte

Les enfants prématurés nés avant 37 semaines d'aménorrhée, les nourrissons des moins de 3 mois et les personnes âgées de plus de 65 ans sont à risque plus élevés d'être hospitalisés avec une insuffisance respiratoire aiguë lors des infections [2]. Egalement, les patients immunodéprimés (infection VIH, transplantation des cellules souches hématopoïétiques ou d'organes solides tels que les poumons) sont plus prédisposés à des infections graves [141]. Les patients présentant des antécédents d'asthme, de maladie cardiaque congénitale,

d'insuffisance cardiaque congestive, de maladie pulmonaire obstructive chronique, de bronchopneumonie chronique obstructive, des troubles neuroaux et musculaires, de cancer (leucémie et tumeur maligne hématologique) et de trisomie 21 sont aussi à haut risque pour le développement des infections graves par les virus respiratoires [2].

## 10.2. Facteurs de risque viral

Quant aux facteurs de risques viraux, pour le virus respiratoire syncytial par exemple, plusieurs enquêtes ont montré que le HRSV sous-type A était associé à une maladie plus sévère par rapport aux sous-type B [31]. A l'inverse, une plus grande sévérité du sous-type B par rapport au sous-type A a été aussi signalée dans d'autres études [104]. Pour ajouter à la confusion, d'autres études n'ont pas pu détecter de différence de sévérité entre les deux sous types [70,135]. Ainsi, l'évaluation de la gravité des symptômes causés par les infections avec les différents génotypes du HRSV est restée à ce jour sans réponse. Pour ce qui est de la charge virale, certaines études ont démontré qu'une charge virale respiratoire élevée est en corrélation avec la gravité de l'infection [142] tandis que d'autres auteurs indiquent que la charge virale n'est pas un facteur déterminant la gravité de la maladie [143,144]. La question de l'influence de la coinfection sur la gravité des symptômes est aussi restée hypothétique, puisque certains groupes de recherche ont démontré que, dans les cas de codétentions, les symptômes observés étaient plus sévères [145], alors que d'autres n'ont observé aucune différence [135,146]. De toute évidence, d'autres études sont nécessaires pour clarifier l'impact du génotype, de la charge virale respiratoire et de la coinfection sur la gravité des infections respiratoires aiguës.

## 11. Diagnostic des infections respiratoires aiguës à Paramyxovirus

Un diagnostic efficace des ARI est important pour un traitement approprié et spécifique du patient [147], la mise en œuvre des mesures de contrôle des infections telles que le regroupement des patients pour prévenir les infections nosocomiales [148] et revêt aussi un rôle central dans la surveillance en santé publique [149]. L'identification rapide des agents des ARI a également le potentiel d'améliorer les résultats cliniques et de réduire la durée du séjour à l'hôpital, ainsi que de minimiser l'utilisation inutile des tests de laboratoire, des examens d'imagerie et des antibiotiques [150].



### 11.1. Diagnostic clinique

A l'examen clinique, la température, la fréquence cardiaque, la fréquence respiratoire, la pression artérielle et la saturation en oxygène à l'air ambiant sont autant de paramètres cliniques qui permettent d'apprécier l'état du malade [139]. En outre, l'augmentation du travail respiratoire comme en témoigne l'utilisation de muscle accessoire ou rétractations et les résultats d'auscultation qui permet de détecter les sifflements de la respiration sont aussi des paramètres d'importance pour l'examen physique. L'examen du poumon permet de rechercher les signes cliniques, y compris la dyspnée, la toux, l'expectoration, douleur thoracique, la cyanose, l'apnée, le tirage, une cage thoracique déformée et les points douloureux. La radiographie du thorax révèle des signes évidents d'infection des voies respiratoires inférieures, généralement représentée par une infiltration périhilaire et lobaire, un menottage péribronchique, une atelectasie inégale et une hyperinflation bilatérale avec l'aplatissement du diaphragme [135]. Il n'existe aucun signe pathognomonique des infections respiratoires à paramyxovirus.

### 11.2. Diagnostic virologique

#### 11.2.1. Introduction

Le tableau clinique décrit plus haut n'est pas suffisant pour l'identification de l'agent pathogène impliqué dans l'infection observée en raison de la très faible spécificité des symptômes. Par conséquent, le diagnostic étiologique spécifique nécessite la détection de la réponse sérologique (anticorps) et/ou du virus infectieux ou de ses composantes (antigènes viraux ou génome). La technologie a fourni suffisamment de capacités pour la détection des virus respiratoires dans les différents types d'échantillons à différents stades de l'infection en utilisant un éventail de techniques.

#### 11.2.2. Diagnostic indirect

Les tests sérologiques pour la détection des anticorps sont utilisés principalement pour des études épidémiologiques et la mesure de la couverture vaccinale. Autrefois, une séroconversion (apparition des IgG ou augmentation d'au moins quatre fois des titres en anticorps) était utilisées pour confirmer une infection aiguë. Les principales méthodes de

détection d'anticorps utilisées jusqu'à présent sont l'immunofluorescence indirecte, des tests de microneutralisation, *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA), l'inhibition de l'héماغglutination (IHA), la fixation du complément, l'hémadsorption, la radioimmunoprécipitation et le western blot [8,59].

### 11.2.3. Diagnostic direct

Les procédés de détection d'antigène par immunofluorescence directe (IFD), ELISA et culture ont été mis au point et sont encore occasionnellement utilisés pour confirmer l'infection par les virus respiratoires [151]. Ces méthodes traditionnelles ont plusieurs limites. La culture virale nécessite de longs délais, beaucoup de main d'œuvre, une expertise technique significative et une gamme limitée de virus cultivables. L'IFD bien que rapide présente une faible sensibilité et une spécificité variable pour la détection de la plupart des virus. A l'heure actuelle les tests d'amplification des acides nucléiques sont des méthodes de choix pour le diagnostic des infections respiratoires [10,24,29,30,47,48,58,71,122,152]. Ces tests moléculaires sont largement reconnus pour contribuer à une meilleure efficacité, sensibilité et rapidité par rapport aux méthodes traditionnelles pour le diagnostic des infections respiratoires.

Récemment, de multiples méthodes commerciales ont été mises sur le marché pour le diagnostic des pathogènes respiratoires. Ces tests commerciaux diffèrent dans le nombre de pathogènes inclus, le débit de l'essai, le délai d'exécution, le besoin d'extraction d'acide nucléique, la plateforme, la performance, la reconnaissance (*Research Use Only* : RUO, *In vitro Diagnostics* : IVD, Approbation de la *Food and Drug Administration* : FDA, marquage Communauté Européenne : CE...), la complexité de la procédure, les risques de contamination, la disponibilité et le coût. Certains tests ne détectent qu'un seul type viral tel que le HPIV, le HMPV et le HAdV (Prodesse ProParaflu+, Prodesse Pro hMPV+ et Prodesse ProAdeno+) [153]. Cependant, la recherche de tous les agents pathogènes respiratoires en utilisant des *real-time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (rRT-PCR) individuelles est laborieuse, prend beaucoup de temps et est très coûteuse. Actuellement, d'autres panels multiplex moléculaires offrent la possibilité de détecter simultanément plus de trois pathogènes respiratoires sont largement disponibles : le Luminex NxTAG® Respiratory Pathogen Panel (Luminex Molecular Diagnostics, Austin, TX) [154], le FilmArray® Respiratory Panel (Biofire Diagnostics, Salt Lake City, UT) [155], le Verigene® Respiratory

Pathogens Flex Test (Nanosphere) [156], GenMarkDX eSensor® XT-8 (GenMark Dx, Carlsbad, CA) [157], le CLART® PneumoVir (Genomica) [158], le INFINITI Respiratory Viral Plus (AutoGenomics) [159], le Allplex and Anyplex Respiratory Virus Panel Assays (Seegene) [160], le RespFinder® SMART and 2SMART (Patho Finder) [158], le Respiratory Multi Well System MWS r-gene® Range (BioMérieux) [161], le Fast-Track Diagnostics FTD-21, -21+ & -33 (FTD) [160] et le TaqMan Array Card (Thermo Fischer Scientific) [162]. L'introduction de ces nouvelles méthodes multiplexes permet l'analyse d'une gamme élargie de pathogènes respiratoires couplés à une simplification des procédures, un raccourcissement des délais ainsi qu'une réduction des coûts et des risques de contamination. Le multiplexage de la rRT-PCR peut cependant réduire la sensibilité de l'amplification.

D'autres méthodes moléculaires telles que les puces à Acide désoxyribonucléique (ADN), le *Loop-mediated isothermal amplification* : LAMP et *Nucleic acid sequence based amplification* : NASBA ont également été utilisées. Il existe actuellement d'autres technologies nouvelles tels que les dosages à puce compatible microfluidiques [163], une RT-PCR couplée à la spectrométrie de masse électrospray [164] et des essais de spectroscopie Raman de surface améliorée [165] qui peuvent améliorer la sensibilité et la plage de détection des pathogènes.

## 12. Situation géographique du Cameroun

Le Cameroun est un pays d'Afrique Centrale situé au dessus de l'équateur. Avec une forme triangulaire, ce pays couvre une superficie de 475 442 km<sup>2</sup>. Ce triangle partage une frontière maritime au Sud-ouest avec l'océan Atlantique et une frontière terrestre avec 6 pays (à l'Ouest avec le Nigéria, au Nord avec le Tchad, à l'Est avec la République Centrafricaine et au Sud avec le Congo, la Guinée Equatoriale et le Gabon [166]). Très étiré en latitude (11°), le Cameroun s'étend en latitude Nord entre le 2<sup>ème</sup> degré et 13<sup>ème</sup> d'une part, et en longitude Est entre le 8<sup>ème</sup> et 16<sup>ème</sup> d'autre part. Très diversifié avec une grande variété de populations, écosystèmes et climats, le Cameroun représente l'Afrique en miniature. Le Cameroun est subdivisé en 10 régions administratives (Figure 10). La région du Centre est celle qui abrite la capitale politique, Yaoundé. La présence de l'ensemble des institutions, mais aussi de nombreuses sociétés font de Yaoundé un extraordinaire pôle d'attraction pour de nombreuses populations.

### 13. Situation démographique du Cameroun

En Juillet 2014, la population camerounaise était estimée à 21,6 millions d'habitants [167]. Les personnes de moins 15 ans représentaient 43% de la population alors que seulement 3,5% ont plus de 65 ans. La densité de la population était de 45 habitants au km<sup>2</sup>. Les populations sont concentrées dans les grandes agglomérations (Yaoundé, Douala, Ngaoundéré...) tandis que le reste du pays est faiblement peuplé. En 2005, le taux général de mortalité était de 13,6 pour 1000 avec une mortalité infantile élevée (77,2 pour 1000). L'espérance de vie à la naissance en 2015 était estimée à 54,8 ans.

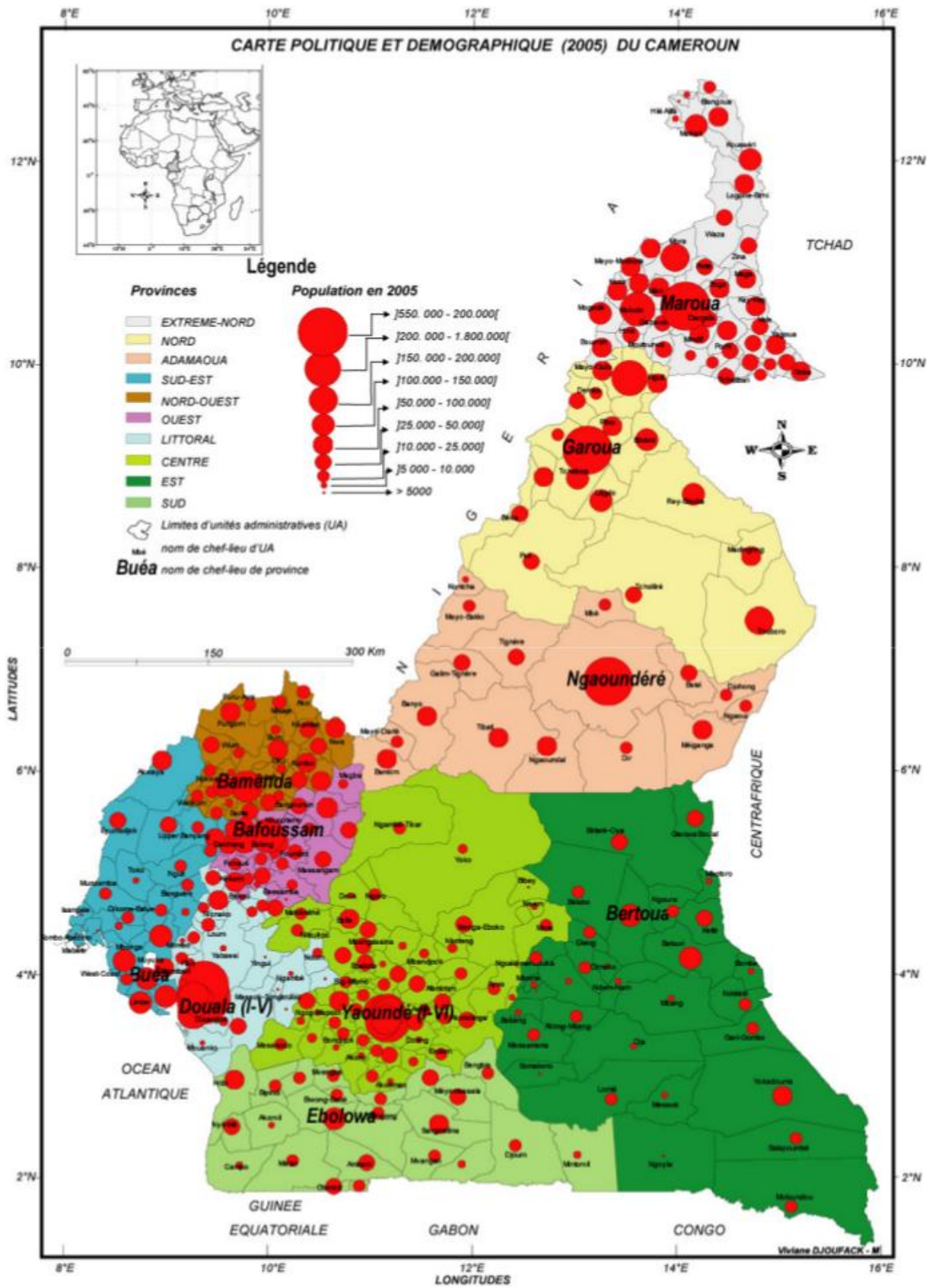


Figure 10 : Carte politique et démographique du Cameroun en 2005 [168] .

## 14. Situation climatique du Cameroun

Le climat camerounais est marqué par une forte diversité avec de grandes variations au niveau des précipitations, des températures, des vents et de la végétation. Cette variabilité est liée à son grand étirement du Sud au Nord sur environ 1200 km, le contraste de son relief et de sa proximité à la mer (400 km de frontière avec l'océan Atlantique). La répartition des pluies est irrégulière sur l'ensemble du territoire camerounais. La pluviométrie diminue selon la latitude du Sud au Nord et de l'Ouest vers l'Est selon la distance par rapport à la mer. La gamme des températures moyennes va de 18°C/an dans la région de l'Ouest à plus de 28°C dans le Nord du pays, soit une variation en latitude d'environ 10°C. L'humidité relative moyenne annuelle décroît suivant la latitude Sud-Nord avec en moyenne 85% sur la zone côtière Sud, elle passe à moins de 45% à la frontière avec le Tchad. La végétation est aussi variée, du sud au nord, on passe de la forêt dense équatoriale à la savane puis la steppe. La distribution des domaines climatiques camerounais varie selon les auteurs. Elle dépend des paramètres pris en compte dans l'analyse ainsi que de l'échelle spatio-temporelle d'approche. Le schéma de huit zones climatiques décrit par Olivry et al., en 1986 rend mieux compte des nuances du climat Camerounais (figure 11) [169]. Le climat camerounais possède deux grands domaines climatiques séparé approximativement par une ligne qui correspond à la latitude 4°30 N : le domaine tropical sec à deux saisons au Nord et le domaine équatorial humide à quatre saisons au Sud.

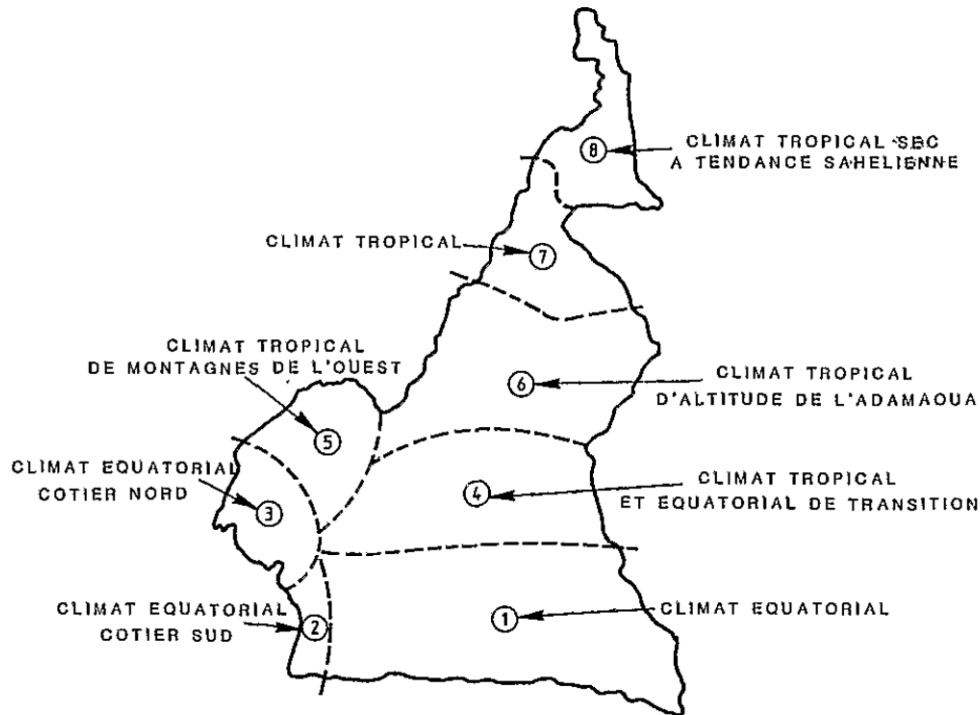


Figure 11 : Les zones climatiques au Cameroun [169].

#### 14.1. Climat tropical

Le domaine tropical est caractérisé par des températures élevées et des faibles précipitations et présente plusieurs nuances en fonction de la latitude. Du Sud au Nord, la pluviométrie s'abaisse, la durée de la saison sèche augmente ainsi que les températures. On distingue ainsi :

Zone 8 : Le climat tropical sec à tendance sahélienne avec des précipitations qui varient de 400 à 900 mm par an enregistrées essentiellement en juillet et août et une saison sèche qui s'étend de 7 à 9 mois. La température moyenne annuelle est de 29°C. Ce climat est compris entre le 10<sup>ème</sup> et le 12<sup>ème</sup> degré de latitude Nord allant de Maroua à Kousséri.

Zone 7 : Le climat tropical sec à tendance soudanienne qui est caractérisée par une saison pluvieuse de mai à octobre et une saison sèche qui va de novembre à avril (6 mois) s'étend du 7<sup>ème</sup> au 10<sup>ème</sup> degré de latitude Nord. Ce climat est situé dans la cuvette de la Bénoué. On enregistre une température moyenne de 28°C et 900 à 1500 mm de précipitations par an.

Zone 6 : Le climat tropical d'altitude de l'Adamaoua est caractérisé par des précipitations abondantes de l'ordre de 1500 mm par an (mars-novembre), une saison sèche d'au moins 4 mois allant de novembre à mars et une température moyenne annuelle plus fraîche aux alentours de 25°C. Ce climat est situé dans le plateau de l'Adamaoua entre le 6<sup>ème</sup> et le 8<sup>ème</sup> degré de latitude Nord.

Zone 5 : Le climat tropical de montagne de l'ouest allant de Dschang à Nkambe et Foumban. Elle intéresse la région entre 5° et 7° N, à l'ouest du 11e parallèle. C'est un régime tropical très humide avec uniquement 3 mois de saison sèche, des températures (entre 25 et 35 °C) nettement plus basses que dans le reste du pays. Elle présente un régime de précipitations surabondantes (plus de 1 000 mm de précipitations par an) qui tombent pendant 9 mois d'affilée de mars à novembre.

Zone 4 : Le climat équatorial et tropical de transition constitue la transition entre le climat tropical à deux saisons au nord et le climat équatorial à quatre saisons au sud. Elle est localisée dans la région comprise entre le 4<sup>ème</sup> et 6<sup>ème</sup> degré de latitude nord et à l'ouest du 10e parallèle, de Bafia à Garoua-Boulai en passant par Yoko et Bertoua. La saison pluvieuse s'étend de juillet à août. La saison sèche est centrée sur la période de novembre à mars.

#### 14.2. Climat équatorial

Le climat équatorial très humide à quatre saisons est présent dans les plateaux du centre et du sud Cameroun. Ce domaine est caractérisé par des précipitations abondantes atteignant une moyenne annuelle de 2000 mm de précipitations et des températures moyennes autour de 25°C. La saison pluvieuse s'étend de mars à juin suivi de la petite saison sèche de juillet à août, une deuxième saison pluvieuse de septembre à novembre et une grande saison sèche de décembre à février. Le domaine équatorial s'étend du 2<sup>ème</sup> au 6<sup>ème</sup> degré de latitude Nord. Le domaine équatorial comporte trois nuances :

Zone 3 : Le climat équatorial type côtier nord à 2 saisons. Le terme équatorial est conservé en dépit du fait qu'il comporte deux saisons à cause de la surabondance des précipitations. Certains climatologues l'ont plutôt appelée "climat tropical fortement humide type côtier". Elle intéresse la région côtière Nord et la partie sud-ouest du pays, entre le 4<sup>ème</sup>



et 6<sup>ème</sup> degré de latitude nord. Il est caractérisé par une surabondance des pluies dû à la proximité de la mer et un relief élevé. Débundsha sur le versant au vent du Mont Cameroun est ainsi l'un des endroits les plus arrosés du monde avec 10000 mm de précipitations moyennes par an. La plaine côtière autour de Douala connaît un climat dit "hyperhumide" avec absence totale de saison sèche ; au pied du Mont Cameroun, les précipitations connaissent des records : plus de 7 500 mm annuels à Limbé.

Zone 2 : Le climat équatorial type côtier sud à 4 saisons est beaucoup plus humide à cause des précipitations très abondantes dues à la proximité de la mer. Il couvre la frange côtière au sud du 4<sup>ème</sup> degré de latitude nord, jusqu'à la localité d'Edéa. Elle est caractérisée par deux saisons sèches (décembre – mars et juillet – août) et deux saisons pluvieuses (mars – juillet et septembre – novembre).

Zone 1 : Le climat équatorial à 4 saisons bien marquées ou climat type guinéen qui caractérise le bassin du Congo. Il couvre tout le sud du pays jusqu'aux environ de 4°30 N et au sud du 4e parallèle, région côtière non comprise. Les précipitations annuelles sont supérieures à 1500 mm. Les maxima se trouvent entre mars-avril et en septembre, et les minima entre décembre janvier et entre juillet-août. Les températures moyennes oscillent autour de 25°C.

# Matériels et Méthodes

## Chapitre 2 : Matériels et méthodes

### 1. Type, lieu et période de l'étude

Ce travail est une étude descriptive et transversale. Cette étude a été réalisée de façon conjointe dans le Laboratoire des Infections Respiratoires et Nouvelles Technologies Moléculaires du Service de Virologie du Centre Pasteur du Cameroun (CPC) et au Laboratoire de Virologie du Centre Hospitalier Universitaire de Caen, France. Le CPC est placé sous la tutelle du Ministère de la Santé Publique du Cameroun et est affilié au Réseau International des Instituts Pasteurs. Le Laboratoire des Infections Respiratoires et Nouvelles Technologies Moléculaires est le Laboratoire National de Référence pour la surveillance de la grippe tandis que le Laboratoire de Virologie du Centre Hospitalier Universitaire de Caen est le Centre National de Référence de la rougeole et des *Paramyxoviridae* en France. Les participants de l'étude ont été recrutés à l'Hôpital de la Caisse Nationale de Prévoyance Sociale, Yaoundé, Cameroun. La ville de Yaoundé est la capitale politique du Cameroun. Cette ville est la plus peuplée de l'Etat camerounais avec environ 2,8 millions d'habitants. La ville de Yaoundé est située dans la région du Centre et est couverte par un climat équatorial avec alternance de deux saisons sèches (mi-novembre à début mars et mi-juin à début septembre) et deux saisons pluvieuses (début mars à mi-juin et début septembre à mi-novembre). Les patients ont été inclus pendant 3 ans dans la période allant de Septembre 2011 à Octobre 2014.

### 2. Population de l'étude

L'étude a fait l'objet d'un échantillonnage non probabiliste de convenance par un recrutement consécutif. Les sujets inclus dans l'enquête étaient des enfants de moins de 15 ans ambulatoires ou hospitalisés consultant l'Hôpital de la Caisse Nationale de Prévoyance Sociale, Yaoundé, Cameroun, pour des infections des voies respiratoires aiguës.

### 3. Critères d'inclusion

Deux groupes d'individus ont été recrutés au cours de cette investigation. Le premier groupe était constitué des participants ambulatoires (patients externes) qui étaient admissibles s'ils avaient une fièvre d'apparition soudaine avec une température  $> 38^{\circ}\text{C}$  datant de moins de 5 jours accompagnée d'une toux et/ou un mal de gorge. Le second groupe quant à lui était

constitué d'individus présentant les critères précédents en plus d'une hospitalisation (patients internes).

#### 4. Critères de non inclusion et d'exclusion

Les enfants dont les parents ou tuteurs n'ont pas donné leurs consentements pour l'enquête n'ont pas été inclus dans l'étude. Les prélèvements dont le volume de l'échantillon n'était pas suffisant pour permettre les analyses de laboratoire prévues étaient exclus de l'étude.

#### 5. Considérations éthiques

Les prélèvements ont été soumis au Centre Pasteur du Cameroun, Laboratoire National de Référence OMS, dans le cadre de la surveillance de la grippe au Cameroun et du projet IMMI "Institut de Microbiologie et de Maladies Infectieuses". Le consentement éclairé écrit a été obtenu auprès des parents ou tuteurs des enfants recrutés dans l'étude (annexe 3). Les procédures de l'étude originale (projet IMMI) ont été évaluées et approuvées par le Comité National d'Ethique et Ministère de la Santé Publique du Cameroun (annexe 4). Un code numérique a été attribué à tous les individus inclus et aucune donnée confidentielle des participants n'a été divulgué dans ce travail.

#### 6. Prélèvement et transport des échantillons

Un écouvillon nasopharyngé recueilli soit au moment de la consultation à l'hôpital ou après l'hospitalisation a été introduit dans un tube contenant 1 mL de milieu de transport viral, transporté au moment propice dans des glacières au service de virologie du CPC et conservé à -80°C jusqu'au moment de l'analyse.

#### 7. Analyses de laboratoire.

##### 7.1. Extraction des acides nucléiques

Les acides nucléiques sont extraits selon le principe de la chromatographie d'échange d'ions. Les cellules sont initialement lysées pour libérer les acides nucléiques qui seront

précipités à l'éthanol par la suite. Ces acides nucléiques chargés négativement sont fixés à travers une colonne de silice chargée positivement puis élués à l'aide d'eau.

#### 7.1.1. Extraction de l'ARN

L'ARN viral a été extrait à l'aide du kit commercial "QIAamp VIRAL RNA MINI KIT" de QIAGEN selon les recommandations du fabricant (Qiagen, Hilden, Allemagne). Ce kit contient : le tampon de lyse AVL, les tampons de lavage : AW1 et AW2, le tampon d'éluion AVE et le RNA carrier. Tout d'abord, les particules virales contenues dans 140 µL de prélèvement sont inactivés par 560 µL de tampon de lyse pendant 10 minutes à température ambiante. Ensuite, 560 µL d'éthanol absolu sont ajoutés pour assurer la précipitation de l'ARN. Après l'ARN est adsorbé sur une colonne de silice chargée positivement par centrifugation du mélange à 6000 g pendant une minute. Puis la purification de L'ARN est assurée par deux lavages successifs. Le premier est effectué 500 µL de tampon AW1 à 6000 g pendant une minute et le second par 500 µL du tampon AW2 à 20000 g pendant 3 minutes. Cette purification est suivie d'une centrifugation à 20000 g pendant une minute pour éliminer toutes les traces de liquide. Enfin, les ARN purifiés sont élués dans 60 µL d'eau RNase/DNase free.

#### 7.1.2. Extraction de l'ADN

L'ADN viral a été extrait à l'aide du kit commercial "QIAamp DNA MINI KIT" de QIAGEN selon les recommandations du fabricant (Qiagen, Hilden, Allemagne). Ce kit contient : le tampon de lyse AL, la protéinase K, les tampons de lavage : AW1 et AW2 et le tampon d'éluion AVE. Tout d'abord, 20 µL de protéinase K sont additionnées à 200 µL d'échantillon. Par la suite, les particules virales sont inactivées par addition de 200 µL de tampon de lyse et incubation pendant 10 minutes à 56°C. Ensuite, 200 µL d'éthanol absolu sont ajoutés pour assurer la précipitation de l'ADN. Après l'ADN est adsorbé sur une colonne de silice chargée positivement par centrifugation du mélange à 6000 g pendant une minute. Puis la purification de L'ADN est assurée par deux lavages successifs. Le premier est effectué 500 µL de tampon AW1 à 6000 g pendant une minute et le second par 500 µL du tampon AW2 à 20000 g pendant 3 minutes. Cette purification est suivie d'une centrifugation à 20000 g pendant une minute pour éliminer toutes les traces de liquide. Enfin, les ADN purifiés sont élués dans 200 µL d'eau RNase/DNase free.

## 7.2. Détection moléculaire et génotypage des virus respiratoires

### 7.2.1. Principe des PCR/RT-PCR en temps réel

La recherche et le génotypage des virus respiratoires dans l'étude ont été effectués par *Polymerase Chain Reaction* (PCR). La PCR est une technique d'amplification *in vitro* de l'ADN qui se déroule selon un cycle de température répété n fois à trois étapes qui sont : la dénaturation de l'ADN bicaténaire en ADN monocaténaire à des températures avoisinant 94°C, l'hybridation des amorces par diminution de la température aux environs de 60°C et l'élongation des amorces par un ADN polymérase thermostable autour de 72°C. Le produit d'amplification est visualisé par électrophorèse à l'aide d'agent intercalant de l'ADN double brin tel que le bromure d'éthidium qui fluorescent sous la lumière ultra-violette lorsqu'il est situé entre les bases des acides nucléiques. L'électrophorèse permet également la séparation des ADN chargés négativement par migration différentielle de la borne négative vers la borne positive sous l'influence d'un champ électrique. La vitesse de migration de l'ADN est inversement proportionnelle à sa masse moléculaire exprimée généralement en nombre de bases ou paires de base. La migration électrophorétique est aussi fonction de la charge électrique de l'ADN et de la concentration du gel. Le gel est étalonné avec des fragments d'acides nucléiques de taille connue. L'électrophorèse est réalisée sur des supports gélatineux de type agarose ou acrylamide. Les gels d'acrylamide permettent d'analyser des fragments d'ADN de très petites tailles (moins de cent bases) alors que les gels d'agarose permettent d'analyser des fragments d'ADN comportant de cent à quelques dizaines de milliers de bases. Le gel d'agarose est couramment utilisé dans la révélation des produits de PCR alors que le gel d'acrylamide est utilisé dans la méthode de séquençage de l'ADN. Pour les pathogènes à ARN, une transcription inverse de l'ARN en ADN complémentaire par la reverse transcriptase est nécessaire avant le début de la PCR. En outre, pour augmenter la sensibilité de la PCR, il existe une autre variante appelé PCR nichée qui consiste à réaliser deux PCR successives en utilisant les produits de la première amplification comme matrice de départ pour la seconde amplification. La technique de PCR présente des avantages indéniables en termes de rapidité et de sensibilité. En revanche, cette technique est coûteuse et réalisable uniquement dans les laboratoires spécialisés équipés de thermocycleur. Utilisée sans le respect des bonnes pratiques de biologie moléculaire, la PCR peut conduire à des faux positifs à la suite d'une contamination.

La PCR en temps réel se déroule suivant le même principe que celle de la PCR conventionnelle à la seule différence que l'amplification est mesurée tout au long de la réaction. Plusieurs systèmes de révélation sont utilisés dans les PCR en temps réel : la détection par des agents intercalant, par des sondes ou par des balises moléculaires. La technologie de révélation par des sondes est la plus couramment utilisée. Cette technologie est basée sur la détection et la quantification d'un reporter fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction de PCR. La sonde Taqman est un exemple courant utilisé en PCR en temps réel. Cette sonde est un fragment d'ADN monobrin, non extensible par l'ADN polymérase, spécifique du fragment cible amplifié marquée d'un reporter et d'un quencher. Lorsque le reporter est excité par une énergie lumineuse, il émet un rayonnement fluorescent qui est détecté par l'appareil de PCR en temps réel. Lorsque la sonde se trouve libre dans le milieu réactionnel, le quencher absorbe l'énergie du reporter de par sa proximité l'empêchant ainsi d'émettre son signal. Ce processus de capture et de transfert d'énergie lumineuse est appelé quenching ou FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer). Au cours de la polymérisation, la Taq polymérase déplace et hydrolyse la sonde par son activité 5'→3' exonucléasique. Le reporter est ainsi libéré de l'environnement inhibiteur du quencher permettant l'émission de la fluorescence qui augmente à chaque cycle de la PCR. Les sondes fluorescentes présentent une capacité de multiplexage en utilisant des fluorochromes émetteurs différents dans une même réaction de PCR. Malgré leur coût important, cette technique permet de s'affranchir des manipulations post-amplification et de réduire considérablement le risque de contamination. En outre, la PCR en temps réel Singleplex permet la semi quantification qui peut être un indicateur pour le suivi des patients.

### 7.2.2. PCR/RT-PCR en temps réel de détection des virus respiratoires

Les acides nucléiques (ADN et ARN) extraits ont été criblés en utilisant 4 kits duplex commerciaux d'amplification en temps réel r-gene (bioMérieux, Lyon, France) pour la recherche des virus respiratoires courants comprenant HMPV, HRSV, HPIV, HCoV, HAdV, HBoV, RV et EV (Figure 12). Les kits r-gene utilisés ciblaient les régions conservées M (160 pb), N (184 pb), N (51 pb), HN (188 pb), NP (142 pb), P (181 pb), N (123, 128, 135 et 154 pb), NS1 ou VP1 (77 ou 87 pb), Hexon (138 pb) et 5'-UTR (146 et 157 pb) pour les virus HMPV, HRSV, HPIV-1, HPIV-2, HPIV-3, HPIV-4, HCoV (229E, HKU1, OC43 et NL63),

HBoV, HAdV et RV/EV respectivement. Les virus grippaux A et B ont été recherchés par RT-PCR en temps réel suivant le protocole décrit par le CDC Atlanta. Toutes les amplifications ont été effectuées à l'aide du thermocycleur ABI 7500 et suivant les recommandations du fabricant.

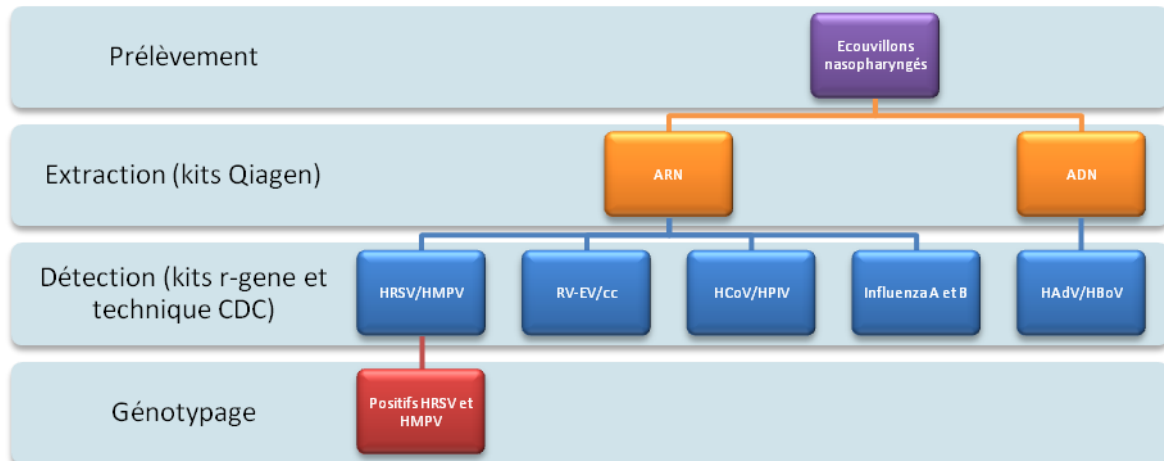


Figure 12 : Algorithme des analyses du laboratoire des échantillons collectés dans l'étude.

### 7.2.3. RT-PCR conventionnelle de génotypage des positifs HRSV

Tous les spécimens positifs HRSV ont été testés par une seconde amplification par *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) semi nichée à l'aide des amorces précédemment décrites et ciblant la région HVR2 du gène G [39,99,127,129,152]. La réaction de RT-PCR a été réalisée avec le kit SuperScript® III One-Step RT-PCR System suivant les instructions du fabricant. Brièvement, 5 µL d'ARN ont été ajoutés à un mélange réactionnel de PCR de 45 µL contenant du 16 µL d'eau, 25 µL de 2X réaction mix, 1 µL d'amorce sens ABG490 (5'-ATGATTWYCAYTTTGAAGTGTTTC-3') à 10 µM, 1 µL d'amorces antisens F164 (5'-GTTATGACACTGGTATAACCAACC-3') à 10 µM et 2 µL de Platinum® Taq DNA Polymerase. L'amorce ABG490 correspond à la position 497-519 et 491-513 du gène G sur les séquences de références A2 et CH18597, respectivement (Figure 13). L'amorce F164 est localisé aux nucléotides 164-186 du gène F des séquences de références A2 et CH18597. Le profil thermique utilisé consistait en une transcription inverse à 55°C pendant 30 minutes, une première dénaturation à 94°C pendant 2 minutes ; suivi de 40 cycles à 94°C pendant 15 secondes, 55°C pendant 30 secondes et 68°C pendant une minute ; enfin une extension finale à 68°C pendant 5 minutes. Pour améliorer la sensibilité, une



deuxième réaction d'amplification semi-nichée a été réalisée avec le kit Taq DNA Polymerase suivant les instructions du fabricant (Invitrogen). Brièvement, 2,5 µL d'ADN de la RT-PCR a été ajouté à un mélange réactionnel de PCR de 45 µL contenant 32 µL d'eau, 5 µL du tampon de PCR 10X, 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub> à 50 mM, 1 µL de dNTPs à 10 mM, 2,5 µL de la solution W1 à 1%, 0,5 µL de l'enzyme, 2,5 µL d'amorce sens [AG655 (5'-GATCYCAAACCTCAAACCAC-3') à 10 µM pour HRSV-A et BG517 (5'-TTYGTTCCCTGTAGTATATGTG-3') à 10 µM pour HRSV-B] et 2,5 µL d'amorces antisens F164 (5'-GTTATGACACTGGTATAACCAACC-3') à 10 µM. L'amorce AG655 se trouve à la position 655-674 du gène G de la souche de référence A2 et la BG517 à la position 517-538 de la souche de référence CH18537. Le profil thermique comprenait une activation enzymatique et dénaturation initiale de 94°C (3 minutes) ; 40 cycles de dénaturation à 94°C (45 secondes), l'hybridation des amorces à 50°C (30 secondes) et l'élongation à 72°C (1 minute 30 secondes) ; une extension finale à 72°C (10 minutes) et un maintien à 4°C à l'infini. L'ARN viral a été amplifié en utilisant un thermocycleur GeneAmp PCR 9700 (Applied Biosystems).

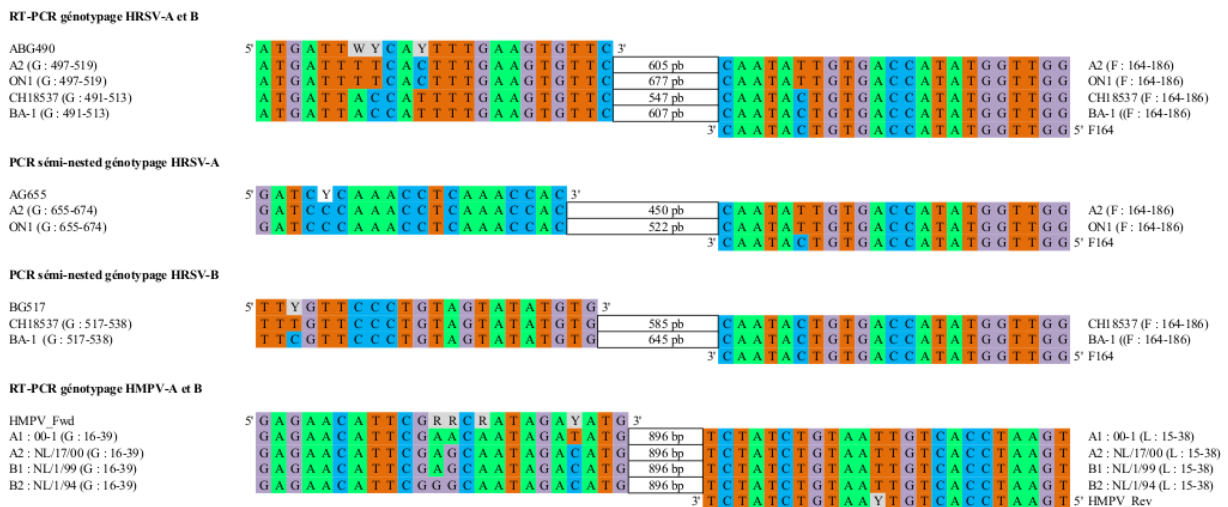


Figure 13 : Régions amplifiées lors de la RT-PCR de génotypage HRSV et HMPV.

#### 7.2.4. RT-PCR de génotypage des positifs Metapneumovirus humain

Les échantillons positifs HMPV ont été testés par une seconde amplification par RT-PCR à l'aide des amorces décrits précédemment et ciblant le gène G [31,90]. La réaction de RT-PCR a été réalisée avec le kit SuperScript® III One-Step RT-PCR System suivant les

instructions du fabricant. Brièvement, 5 µL d'ARN ont été ajoutés à un mélange réactionnel de PCR de 45 µL contenant du 16 µL d'eau, 25 µL de 2X réaction mix, 1 µL d'amorce sens HMPVG Fwd (5'- GAGAACATTCGRRCRATAGAYATG-3') à 10 µM, 1 µL d'amorces antisens HMPVG Rev (5'- AGATAGACATTRACAGTGGATTCA-3') à 10 µM et 2 µL de Platinum® Taq DNA Polymerase. L'amorce HMPVG Fwd correspond à la position 6262–6285 du génome de la séquence de référence 001 tandis que l'amorce HMPVG Rev est localisé aux nucléotides 7181–7204 (Figure 13). Le profil thermique utilisé consistait en une transcription inverse à 55°C pendant 30 minutes, une première dénaturation à 94°C pendant 2 minutes ; suivi de 40 cycles à 94°C pendant 15 secondes, 55°C pendant 30 secondes et 68°C pendant une minute ; enfin une extension finale à 68°C pendant 5 minutes.

### 7.2.5. Electrophorèse sur gel d'agarose

Cinq µL de chaque produit d'amplification ont été visualisés sur un gel d'agarose à 1,5 % (P/V) en présence de deux µL de gel green. La migration lors de l'électrophorèse a été réalisée à 100 mV dans un tampon Tris borate EDTA, 1X, pH 8,0. Le DNA Ladder 100 bp (Invitrogen) a été utilisé comme référence de poids moléculaire. Les gels ont été photographiés via un transilluminateur UV (Figure 14).

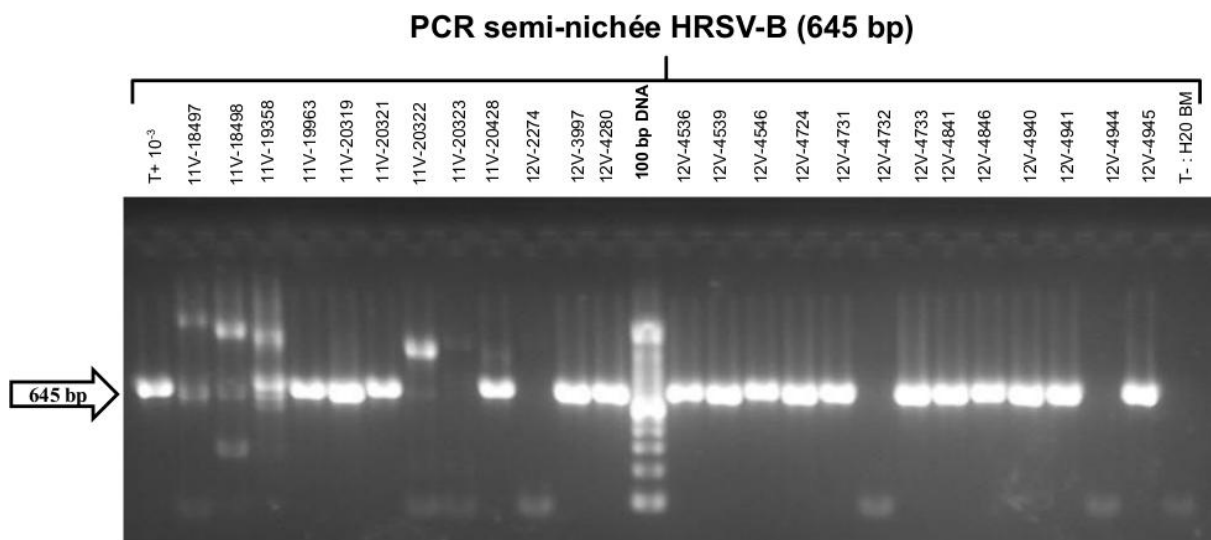


Figure 14 : Photo du gel d'électrophorèse de la PCR semi-nichée de génotypage du HRSV-B (15/09/2014).

### 7.3. Séquençage par la méthode Sanger

Le séquençage de l'ADN consiste à déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides pour un fragment d'ADN donné. La méthode de séquençage de Sanger repose sur l'allongement par l'ADN polymérase d'un brin à partir d'une amorce, en utilisant un autre brin d'ADN comme matrice. Cet allongement est réalisé par la formation d'un pont phosphodiester entre le 3'-OH de la chaîne et le 5'-phosphate du dNTP suivant. La méthode de Sanger consiste en l'incorporation aléatoire de quatre analogues didésoxyribonucléotides triphosphate (ddNTP) : ddATP, ddTTP, ddGTP et ddCTP associé chacun à un marqueur fluorescent différent qui jouent le rôle d'interrupteur de chaîne. Les ddNTP sont différents des dNTP par leur extrémité 3' où la fonction 3'-OH est remplacée par une fonction 3'-H. Cette modification empêche ainsi la formation de la liaison phosphodiester entre le ddNTP incorporé dans la chaîne et le nucléotide suivant. Du fait de l'incorporation spécifique de l'analogue par la polymérase, on obtient un mélange de fragments qui se terminent sélectivement aux positions correspondant au nucléotide choisi. Une migration électrophorétique du produit de cette réaction de séquence sur un gel de polyacrylamide va séparer tous les fragments présents en fonction de leur masse moléculaire. L'identification du ddNTP présent à l'extrémité 3' de chaque fragment déterminera la séquence nucléotidique du brin matrice initial. Les séquenceurs automatiques modernes utilisent un système de détection in situ pendant l'électrophorèse. Pendant la migration, lorsqu'une bande d'ADN passe devant le faisceau, un signal de fluorescence est émis. Le signal est transmis à l'ordinateur de contrôle pour un traitement bioinformatique que permet de reconstruire la séquence entière à partir de tous les fragments séquencés. Les fragments amplifiés lors des PCR de génotypage HRSV et HMPV ont été séquencés de façon bidirectionnelle. Les amorces utilisées pour le séquençage étaient les mêmes que celle utilisées pour les PCR de génotypage.

#### 7.3.1. Purification des produits d'amplification

La purification des produits d'amplification a été réalisée avec le mélange enzymatique exo-sap IP® permettant l'élimination des amorces et des désoxyribonucléotides triphosphate en excès. La réaction de purification a été réalisée avec 2 µL d'enzyme et 5 µL d'amplicon sur thermocycleur GeneAmp® PCR System 2700 Applied Biosystems selon le programme : 37°C pendant 15 minutes, 80°C pendant 15 minutes et 4°C infini.

### 7.3.2. Marquage des produits d'amplification

La réaction de marquage a été réalisée avec le kit BigDye Terminator 1.1®. Le volume réactionnel était de 19 µL auquel a été ajouté 1 µL de produit d'amplification purifié. La réaction a été réalisée sur le thermocycleur GeneAmp® PCR System 2700 Applied Biosystems selon le programme suivant : 96°C pendant 10 secondes, 60°C pendant 5 secondes et 60°C pendant 4 minutes.

### 7.3.3. Purification des produits d'amplification marqués et séquençage

La purification a été réalisée avec la résine Séphadex® G50, qui permet de dé-saler les produits d'amplification et d'éliminer les nucléotides non incorporés ainsi que les amorces en excès. La limite d'exclusion de la résine est d'environ 20 nucléotides. Dans une plaque de 96 puits MultiScreen HV® ont été distribués 250 µL de solution de Séphadex® à 5% deux fois et centrifugés à 910 g pendant 5 minutes. Ce processus permet d'éliminer l'eau en excès et de compacter les colonnes du gel. Les produits d'amplifications marqués ont été déposés au centre de ces mini colonnes et centrifugés 5 minutes à 910 g. Ces produits ont été récupérés dans une plaque et 10 µL de Formamide HDI® ont été additionnés pour la rupture des liaisons hydrogènes entre les acides nucléiques. La plaque contenant les produits marqués a été enfin insérée dans le séquenceur Applied 3500® pour le séquençage.

## 7.4. Analyse phylogénétique

L'analyse phylogénétique des séquences obtenues a été réalisée sur la région HVR2 du génome des HRSV. Les séquences obtenues ont été étudiées en termes d'homologie la plus proche à l'aide de l'outil de recherche BLAST sur le site du NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Les séquences AB1 sens et antisens de nos souches ont été éditées par élimination des pics de bases de faible qualité à la fin du chromatogramme et assemblées en un seul consensus. Les discordances de paires de bases ont été corrigées. Les séquences nucléotidiques prédites ont été traduites en séquence de protéine. Les séquences consensus de cette étude ainsi que les séquences de références d'autres études à travers le monde ont été alignées en utilisant l'algorithme CLUSTAL W [170]. La comparaison des proportions de similarités a été effectuée entre nos isolats et les souches de références A2 et BA-9. Un arbre phylogénétique a été construit avec la méthode de distance, l'algorithme statistique du neighbor-joining et le modèle de substitution de Kimura à 2 paramètres. La

robustesse de l'arbre a été évaluée avec 1.000 ré échantillonnages *bootstrap*. Les séquences ont été assemblées et éditées à l'aide du programme EDITSEQ dans le logiciel Seqman™ II Lasergene (DNA, Madison, WI, USA) et les analyses phylogénétiques ont été exécutées à l'aide du logiciel MEGA version 6 [171]. Les sites potentiels de N-glycosylation (NXT, où X est différente de la proline) et les résidus sérine et thréonine susceptibles d'avoir des chaînes latérales O-liés ont été prédits en utilisant les serveurs NetNGlyc 1.0 [172] et NetOGlyc 1.0,[173] respectivement. Les sites O-glycosylés ont été prédits en utilisant un score > 0,5 [174]. Les sites sélectionnés positivement et négativement sur le fragment HVR2 ont été identifiés en utilisant la méthode de comptage (SLAC), les probabilités à effets aléatoires (REL) et probabilités à effets fixe (FEL) [175]. Les analyses ont été effectuées sur l'interface du site web Datamonkey [176]. Le niveau de significativité a été retenu à 1%. Les séquences nucléotidiques de cette enquête ont été soumises à GenBank et enregistrées avec les numéros d'accèsion KU928193 à KU928238.

## 8. Analyse statistique

A l'admission du patient, les caractéristiques cliniques et démographiques ont été recueillies sur un formulaire de collecte standard par un personnel soignant (annexe 5). Les données collectées ont été enregistrées dans une base Access une fois au laboratoire. La base de donnée à été exportée sous un tableur Excel et analysée à l'aide du logiciel R version 2.15.1. Les variables quantitatives ont été présentées en médiane et intervalle interquartile (IQR). Les variables catégorielles ont été exprimées en effectifs et proportions. L'analyse a évalué les facteurs (sexe, âge et sévérité) associés aux infections à HRSV et HMPV en utilisant le test d'indépendance Khi-carré de Pearson avec un niveau de signification inférieur à 5%.

# Résultats

## Chapitre 3 : Résultats

### 1. Données démographiques

Un total de 822 enfants a été recruté à l'hôpital de la Caisse Nationale de Prévoyance Sociale entre septembre 2011 et octobre 2014. Ces enfants présentaient des symptômes correspondant à la définition clinique des cas de syndromes grippaux d'après les critères de l'OMS. L'âge médian des participants de l'étude était de 19 mois IQR [9-36]. L'âge des patients variait de 1 mois à 15 ans. Parmi les 822 enfants recrutés, 12,5% avaient moins de 6 mois ; 50,6% entre 6 et 24 mois ; 25,7% entre 2 et 5 ans et 11,3% entre 5 et 15 ans. L'étude a inclus 437 (53,2%) garçons et 384 (46,7%) filles, soit un sexe ratio de 1,1 (437/384). Parmi les enfants, 436 (53%) étaient hospitalisés tandis que 386 (47%) étaient ambulatoires.

### 2. Détection virale

Au moins un virus recherché a été détecté dans 597 (72,6%, IC 95% : 69,4-75,6%) des 822 analysés avec 74 HRSV (9%, IC 95% : 7-11%) et 32 HMPV (3,9%, IC 95% : 2,6-5,4%) (Figure 15). Les autres virus trouvés dans cette étude comprenaient 226 (28,5%) HAdV, 176 (21,4%) Influenza (96 Influenza A/H3N2, 56 Influenza B et 24 Influenza A/H1N1/2009), 127 (15,5%) RV/EV, 77 (9,4%) HBoV, 67 (8,2%) HCoV, et 50 (6,2%) HPIV.

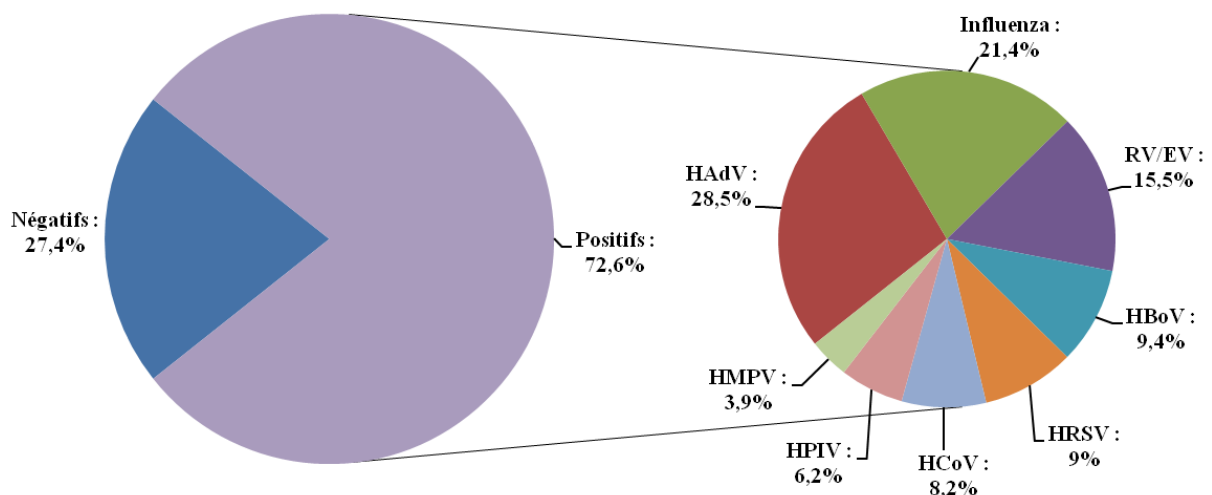


Figure 15 : Fréquence de détection des virus respiratoires recherchés chez les 822 participants de l'étude.

HAdV : Adénovirus humain, RV/EV : Rhinovirus/Entérovirus, HRSV : Virus respiratoire syncytial, HBoV : Bocavirus humain, HCoV : Coronavirus humain, HPIV : Parainfluenza virus humain et HMPV : Metapneumovirus humain.

### 3. Présentation clinique

Les symptômes les plus fréquents étaient la toux, la rhinorrhée, la fatigue et la respiration sifflante (Tableau II). Les symptômes observés n'étaient pas corrélés aux infections HRSV et HMPV. En dehors du HRSV et HMPV, les autres virus recherchés n'étaient pas associés à la présentation clinique observée (données non présentés).

Tableau II : Données cliniques des participants de l'étude.

Caractéristiques	Total No : 822	HMPV		HRSV	
		Négatif 790	Positif 32	Négatif 748	Positif 74
Symptômes					
Toux	691 (84,1)	664 (84,1)	27 (84,4)	620 (82,9)	71 (95,9)
Rhinorrhée	660 (80,3)	637 (80,6)	23 (71,9)	592 (79,1)	68 (91,9)
Fatigue	475 (57,8)	456 (57,7)	19 (59,4)	415 (55,5)	60 (81,1)
Respiration sifflante	295 (35,9)	281 (35,6)	14 (43,8)	252 (33,7)	33 (44,6)
Vomissement	252 (30,7)	243 (30,8)	9 (28,1)	220 (29,4)	32 (43,2)
Essoufflement	170 (20,7)	161 (20,4)	9 (28,1)	139 (18,6)	31 (41,9)
Diarrhée	168 (20,4)	161 (20,4)	7 (21,9)	149 (19,9)	19 (25,7)
Mal de gorge	140 (17)	137 (17,3)	3 (9,4)	136 (18,2)	4 (5,4)
Céphalées	102 (12,4)	100 (12,7)	2 (6,3)	95 (12,7)	7 (9,5)
Conjonctivite	85 (10,3)	82 (10,4)	3 (9,4)	80 (10,7)	5 (6,8)
Eruption cutanée	58 (7,1)	54 (6,8)	4 (12,5)	55 (7,4)	3 (4,1)
Arthralgies	47 (5,7)	45 (5,7)	2 (6,3)	45 (6)	2 (2,7)
Douleurs auriculaires	32 (3,9)	31 (3,9)	1 (3,1)	30 (4)	2 (2,7)
Myalgies	24 (2,9)	23 (2,9)	1 (3,1)	22 (2,9)	2 (2,7)

HMPV : Metapneumovirus humain, HRSV : Virus respiratoire syncytial. Les données présentées sont les effectifs (n) et les pourcentages (%) entre parenthèses (% = n X 100/ Total vertical).



#### 4. Facteurs associés aux infections par le virus respiratoire syncytial humain et le Metapneumovirus humain

La majorité des patients infectés par le HRSV était ceux âgés de moins de 6 mois ( $p < 0,001$ ) (Tableau III). La fréquence d'infection HRSV était significativement plus importante chez les patients hospitalisés ( $p < 0,01$ ). Le genre des enfants n'était pas corrélé à l'infection HRSV. Le sexe, l'âge et le statut hospitalisé/ambulatoire des enfants n'étaient pas associés aux cas d'infections HMPV.

Tableau III : Facteurs associés aux infections HRSV et HMPV.

Caractéristiques	Total No : 822	HMPV		HRSV	
		Négatif	Positif	Négatif	Positif
		790 (96,1)	32 (3,9)	748 (91)	74 (9)
<b>Genre</b>					
Male	437	423 (96,8)	14 (3,2)	399 (91,3)	38 (8,7)
Femelle	384	366 (95,3)	18 (4,7)	348 (90,6)	36 (9,4)
NA	1	1 (100)		1 (100)	
p-value			0,3		0,8
<b>Age</b>					
]0-6] Mois	102	99 (97,1)	3 (2,9)	85 (83,3)	17 (16,7)
]6-24] Mois	413	394 (95,4)	19 (4,6)	368 (89,1)	45 (10,9)
]2-5] Années	210	203 (96,7)	7 (3,3)	200 (95,2)	10 (4,8)
]5-15] Années	92	90 (97,8)	2 (2,2)	91 (98,9)	1 (1,1)
NA	5	4 (80)	1 (20)	4 (80)	1 (20)
p-value			0,6		<0,001
<b>Patient</b>					
Internes	436	419 (96,1)	17 (3,9)	384 (88,1)	52 (11,9)
Externes	386	371 (96,1)	15 (3,9)	364 (94,3)	22 (5,7)
p-value			1		0,002

HMPV : Metapneumovirus humain, HRSV : Virus respiratoire syncytial. Les données présentées sont les effectifs (n) et les pourcentages (%) entre parenthèses, % =  $n \times 100 / \text{total horizontal}$ .

## 5. Codétection de virus respiratoires

Parmi les prélèvements positifs, les monodétectations ont été observées pour 68,3% (408/597) des cas, tandis que les détections de virus multiples ont été enregistrées dans 31,7% (189/597), soit 148 doubles détections, 39 triples détections et 2 quadruples détections (Tableau IV). Parmi les échantillons HRSV positifs, 35 (47,3%) étaient mono-infectés alors que 39 (52,7%) contenaient au moins deux virus [33(44,6%) doubles détections et 6 (8,1%) triples détections]. Le virus prédominant dans la codétection avec HRSV était le virus Influenza (17), suivis par HAdV (13) et RV/EV (9). Pour les patients HMPV positifs, les mono-infections étaient enregistrées chez 16 (46,9%) tandis que les détections multiples étaient observées chez les 17 (53,1%) restants, y compris 10 (31,3%) doubles détections et 7 (21,9%) triples détections. HAdV et RV/EV étaient les virus les plus courants dans les détections multiples avec HMPV.

Tableau IV : Répartition des codétections du HRSV et HMPV avec les autres virus respiratoires détectés.

	HAdV	RV.EV	H3N2	HBoV	HRSV	HCoV	Inf B	HPIV	HMPV	H1N1p	Total (N=597)
HAdV	108	26	6	16	10	9	3	7	4	3	226 (27,5)
RV.EV		51	3	7	5	7	0	1	2	1	127 (15,5)
H3N2			67	4	10	1	0	0	1	0	96 (11,7)
HBoV				21	1	4	0	3	1	0	77 (9,4)
HRSV					35	1	6	0	0	0	74 (9)
HCoV						26	2	1	0	0	67 (8,2)
Inf B							41	1	1	0	56 (6,8)
HPIV								24	1	0	50 (6,2)
HMPV									15	0	32 (3,9)
H1N1p										20	24 (2,9)
1 virus	108	51	67	21	35	26	41	24	15	20	408 (68,3)
2 virus	84	52	25	36	33	25	13	14	10	4	148 (24,8)
3 virus	32	22	4	19	6	15	1	11	7	0	39 (6,5)
4 virus	2	2	0	1	0	1	1	1	0	0	2 (0,3)

Les données présentées sont les monodétectations sur la diagonale et les détections mixtes dans la matrice. HAdV : Adénovirus humain, RV/EV : Rhinovirus/Entérovirus, H3N2 : Virus Influenza sous type H3N2, HRSV : Virus respiratoire syncytial, HBoV : Bocavirus humain, HCoV : Coronavirus humain, Inf B : Virus Influenza type B, HPIV : Parainfluenza virus humain, HMPV : Metapneumovirus humain et H1N1p : Virus Influenza H1N1 pandémique 2009.

## 6. Facteurs associés à la codétection HRSV et HMPV avec les autres virus respiratoires recherchés

La majorité des patients HRSV-positifs ambulatoires affichait une codétection avec d'autres virus respiratoires ( $p=0,04$ ) (Tableau V). Ni le genre ni l'âge des participants étaient

associés à la coinfection HRSV/autres virus respiratoires. Aucune différence entre les classes d'âge, le sexe, le statut ambulatoire/hospitalisé et le taux de codétection avec HMPV n'a été enregistrée.

Tableau V : Facteurs corrélés à la coinfection HMPV, HRSV et les autres virus respiratoires recherchés.

Caractéristiques	HRSV			HMPV		
	Positif	Mono infection	Co infection	Positif	Mono infection	Co infection
	74	35 (47.3)	39 (52.7)	32	16 (50)	16 (50)
Genre						
Male	38	21 (55.3)	17 (44.7)	14	6 (42.9)	8 (50)
Femelle	36	14 (38.9)	22 (61.1)	18	10 (55.6)	8 (50)
p-value			0.2			0.7
Age						
]0-6] Mois	17	10 (58,8)	7 (41,2)	3	2 (66.7)	1 (33.3)
]6-24] Mois	45	21 (46,7)	24 (53,3)	19	11 (57.9)	8 (42,1)
]2-5] Ans	10	3 (30)	7 (70)	7	2 (28.6)	5 (71.4)
]5-15] Ans	1	0 (0)	1 (100)	2	1 (50)	1 (50)
NA				1		1 (10)
p-value			0.3			0.1
Patient						
Internes	52	29 (55.8)	23 (44.2)	17	9 (56.3)	8 (47,1)
Externes	22	6 (27.3)	16 (72.7)	15	7 (43.8)	8 (53,3)
p-value			0.04			1

HMPV : Metapneumovirus humain, HRSV : Virus respiratoire syncytial. Les données présentées sont les effectifs (n) et les pourcentages (%) entre parenthèses, %= n x 100/total horizontal.

## 7. Saisonnalité

Durant ces trois années d'enquête, les infections HRSV apparaissaient durant la grande saison de pluie de septembre en décembre. Un seul cas sporadique a été retrouvé en dehors de cette période épidémique, en mai 2012. La distribution mensuelle des infections HRSV est illustrée sur la figure 16. En 2012 et 2013 HMPV à été détecté presque tout au long de l'année tandis qu'aucun cas en 2011 et deux cas sporadiques en 2014 ont été détectés.



Figure 16 : Distribution mensuelle de 74 cas de virus respiratoire syncytial humain et 32 cas de Metapneumovirus humain détectés parmi 822 enfants camerounais souffrant d'infections respiratoires aiguës.

## 8. Génotypage

### 8.1. Virus respiratoire syncytial

Parmi les 74 prélèvements positifs HRSV, 57 ont été analysés par une RT-PCR point final d'amplification de la deuxième région hypervariable du gène G. Les patients présentant les codétéctions HRSV et Influenza non pas été testés en génotypage. Quarante-sept des 57 échantillons testés en génotypage étaient positifs avec 9 HRSV-A et 8 HRSV-B (Figure 17). Trente échantillons étaient affichaient une double détection HRSV-A/HRSV-B.

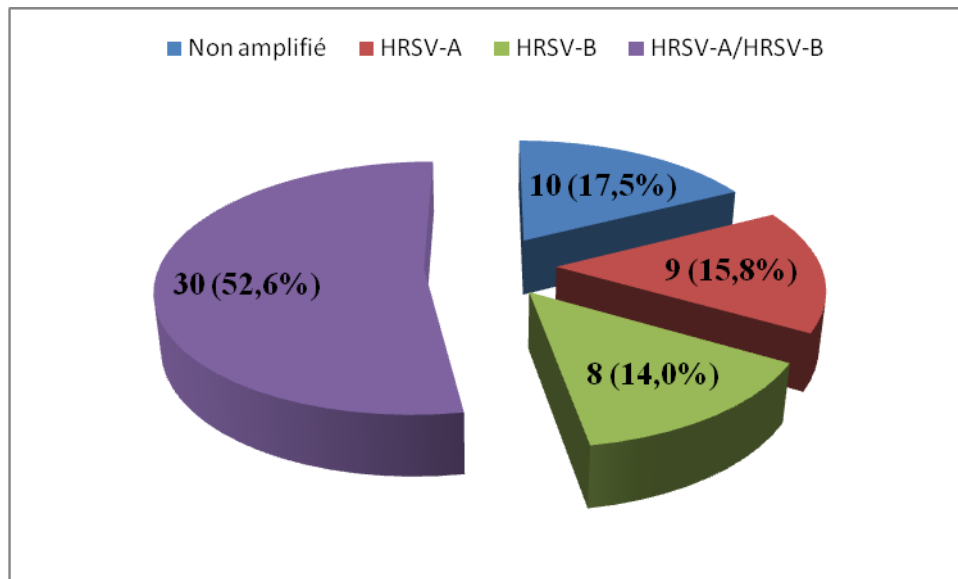


Figure 17 : Résultat du génotypage de 57 positifs HRSV par amplification de la deuxième région hypervariable du gène G.

Un groupe de 17,5% (10/57) des échantillons positifs en RT-PCR générique de détection n'avait pas été amplifié par RT-PCR semi-nichée pour le génotypage. La médiane du cycle seuil de ces échantillons non amplifiés était significativement plus élevée que celui des échantillons amplifiés (33,4 ; IQR [30,4-35,1] vs 22,8 ; IQR [20,5-27,2] ;  $p < 0,01$ ) (Figure 18).

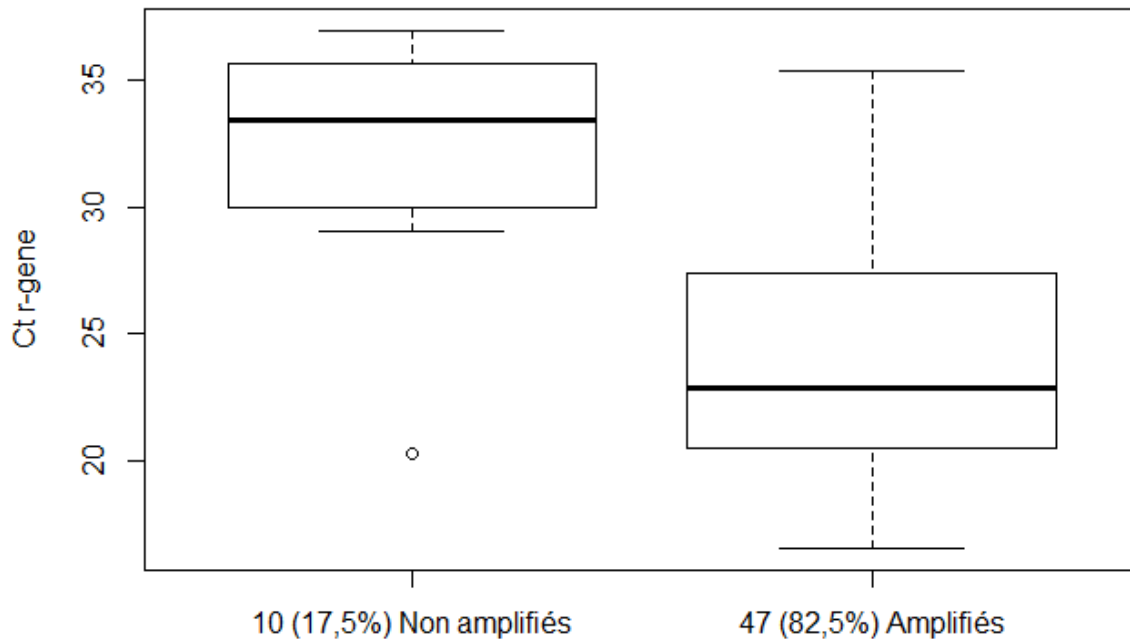


Figure 18 : Comparaison de la médiane et intervalle interquartile des échantillons amplifiés et non amplifiés en RT-PCR de génotypage.

## 8.2. Metapneumovirus humain

Pour différencier les souches positives de HMPV, un fragment de 870 nucléotides du gène G a été amplifié pour 14/30 (46,7%) échantillons positifs HMPV testés (Figure 19). Les 16 (53,3%) échantillons restant n'ont pas pu être amplifiés. La charge virale de ces échantillons non amplifiés était significativement plus faible que celle des échantillons amplifiés (33,3 ; IQR [31,7-35,1] vs 23,9 ; IQR [21,5-27,6] ;  $p < 0,01$ ) (Figure 20). Les deux patients restants testés positifs pour HMPV et le virus Influenza n'ont pas été analysés en PCR de génotypage HMPV.

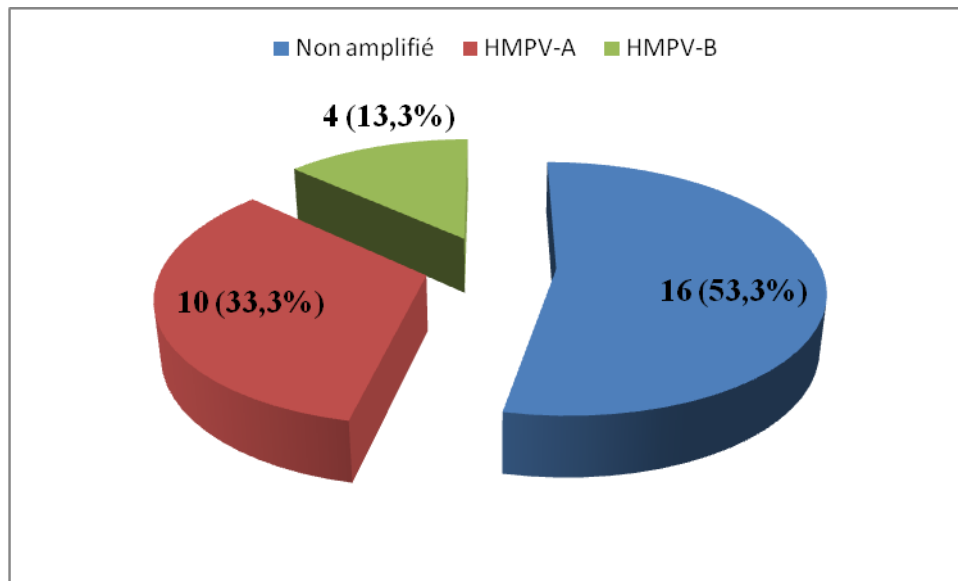


Figure 19 : Résultat de la différenciation de 30 souches positives de HMPV par amplification du gène G.

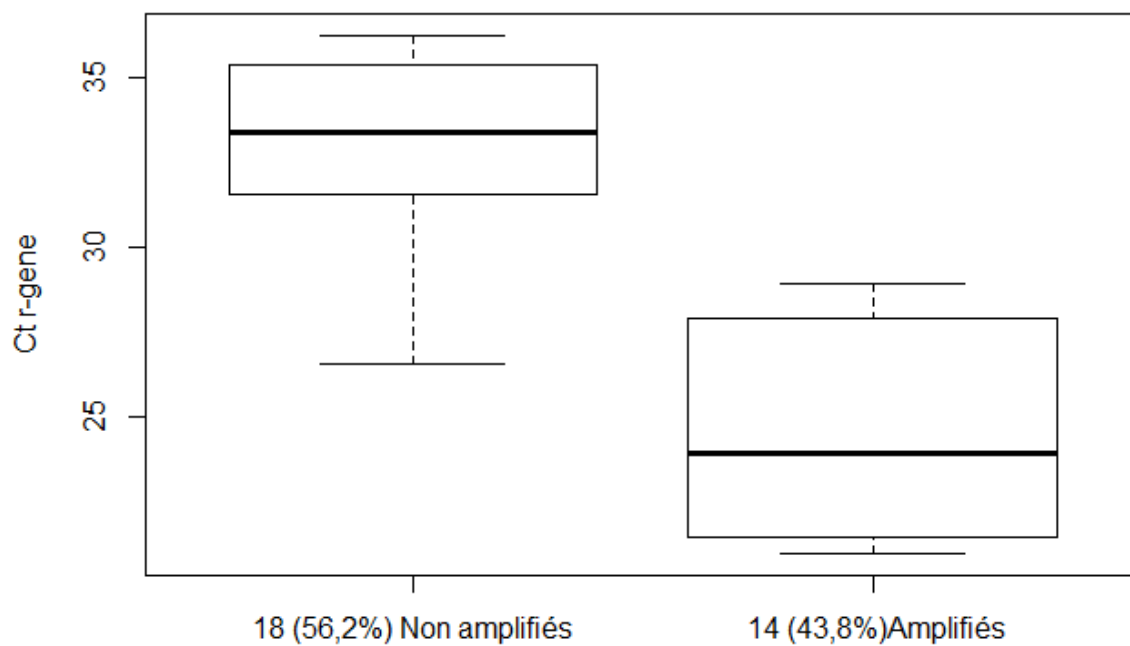


Figure 20 : Comparaison de la médiane et intervalle interquartile des échantillons HMPV positifs amplifiés et non amplifiés en RT-PCR de génotypage.

## 9. Séquençage

Seulement 8/39 (20,5%) prélèvements positifs HRSV-A ont été séquencés avec succès. Tous les prélèvements coinfectés (30) ont donné des mauvais chromatogrammes après séquençages pour HRSV-A. Les 38 échantillons HRSV-B amplifiés ont été séquencés avec succès.

Les gènes G partiels des 14 échantillons HMPV amplifiés en RT-PCR de génotypage ont été séquencés avec succès.

## 10. Circulation des groupes A et B du Virus respiratoire syncytial et Metapneumovirus humain

Durant les trois saisons épidémiques les souches de HRSV-A et HRSV-B ont co-circulées relativement à la même fréquence. HRSV-A représentait 50% (4/8), 48,8% (21/43) et 53,8% (14/26) des souches détectées en 2011, 2012 et 2013 respectivement (Figure 21). HRSV-B représentait 50% (4/8), 51,2% (22/43) et 46,2% (12/26) des cas d'infections HRSV en 2011, 2012 et 2013 respectivement.

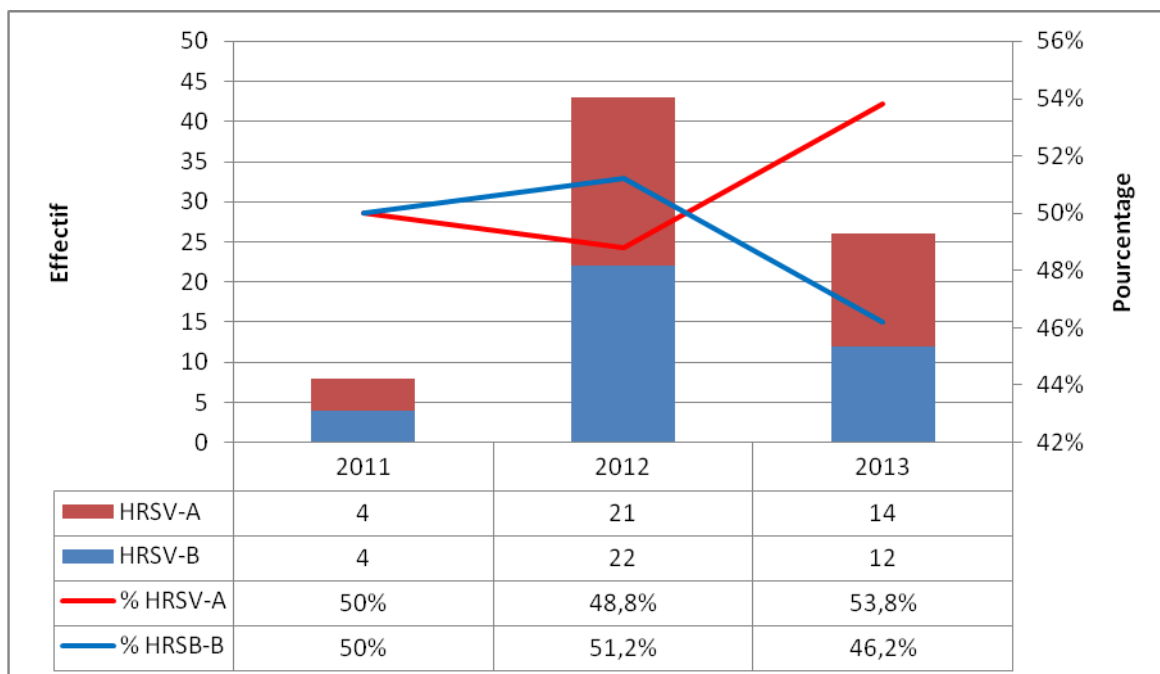


Figure 21 : Période des groupes HRSV-A et B à Yaoundé, Cameroun entre 2011 et 2013.



Les groupes A et B du HMPV étaient détectés au courant des années 2012 et 2013 avec une prédominance du groupe A 9/11 (81,8%) en 2013 (Figure 22).

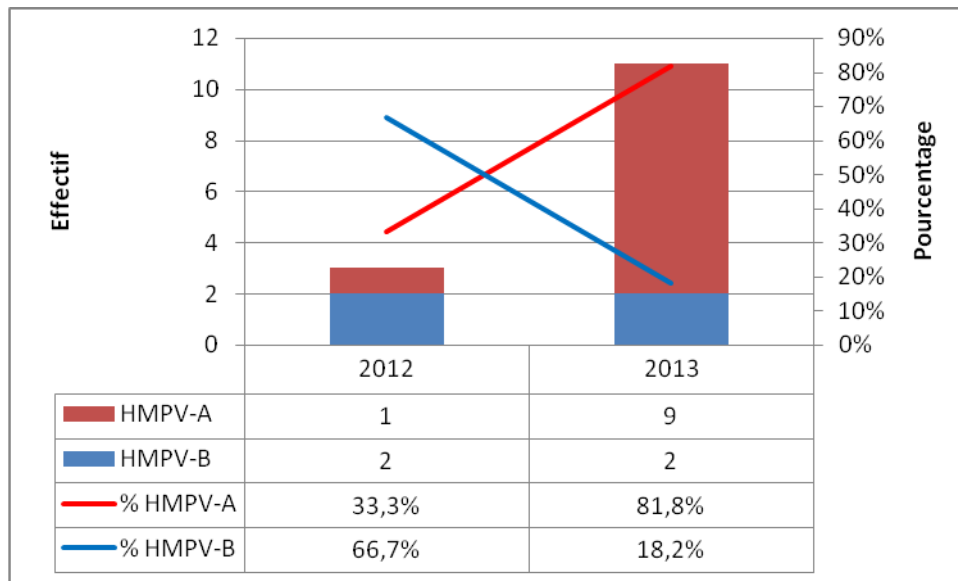


Figure 22 : Fréquence de détection des groupes HMPV-A et B à Yaoundé, Cameroun en 2012 et 2013.

#### 11. Circulation des sous groupes du HRSV-A (NA-1), HRSV-B (BA-9), HMPV-A (A2) et HMPV-B (B1 et B2)

Un seul génotype pour HRSV-A (NA-1) et HRSV-B (BA-9) a été détecté au cours de cette période d'étude parmi les échantillons séquencés (Figure 23). Le génotype BA-9 du groupe HRSV-B a été en outre classé en 2 sous-branches qui ont été étiquetées comme sous-types BA-9a et BA-9b. Les tendances temporelles montrent qu'uniquement les virus BA-9a ont été détectés en 2011 suivi en 2012 par la domination du sous type BA-9a sur BA-9b qui par la suite va voir uniquement la circulation en 2013 du sous type BA-9b.

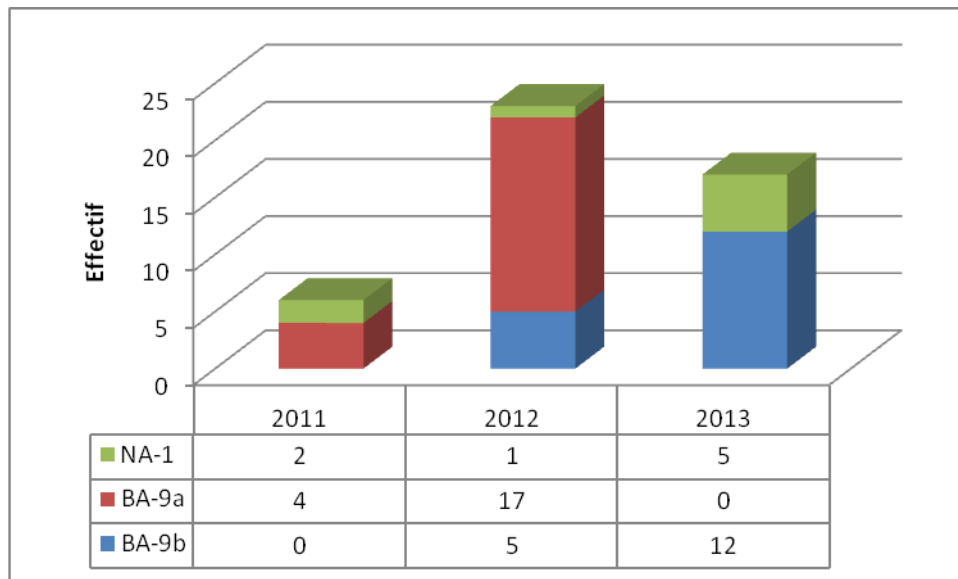


Figure 23 : Circulation des HRSV-A génotype NA-1 et HRSV-B génotype BA-9 à Yaoundé, Cameroun entre 2011 et 2013.

Les cas sporadiques du sous-groupe HMPV-A2b et B2 ont été détectés en 2012 (Figure 24). L'année 2013 a révélé l'apparition de deux cas de HMPV-B1 et B2 et une domination du sous groupe HMPV-A2b.

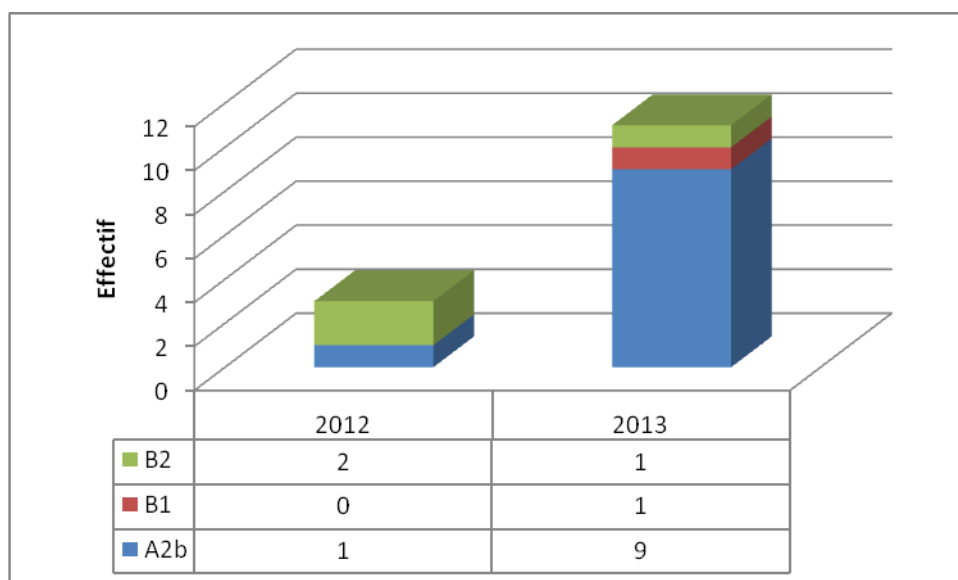


Figure 24 : Détection des sous-groupes HMPV-A2b, B1 et B2 à Yaoundé, Cameroun en 2012 et 2013.

## 12. Diagramme récapitulatif des résultats d'analyse de laboratoire

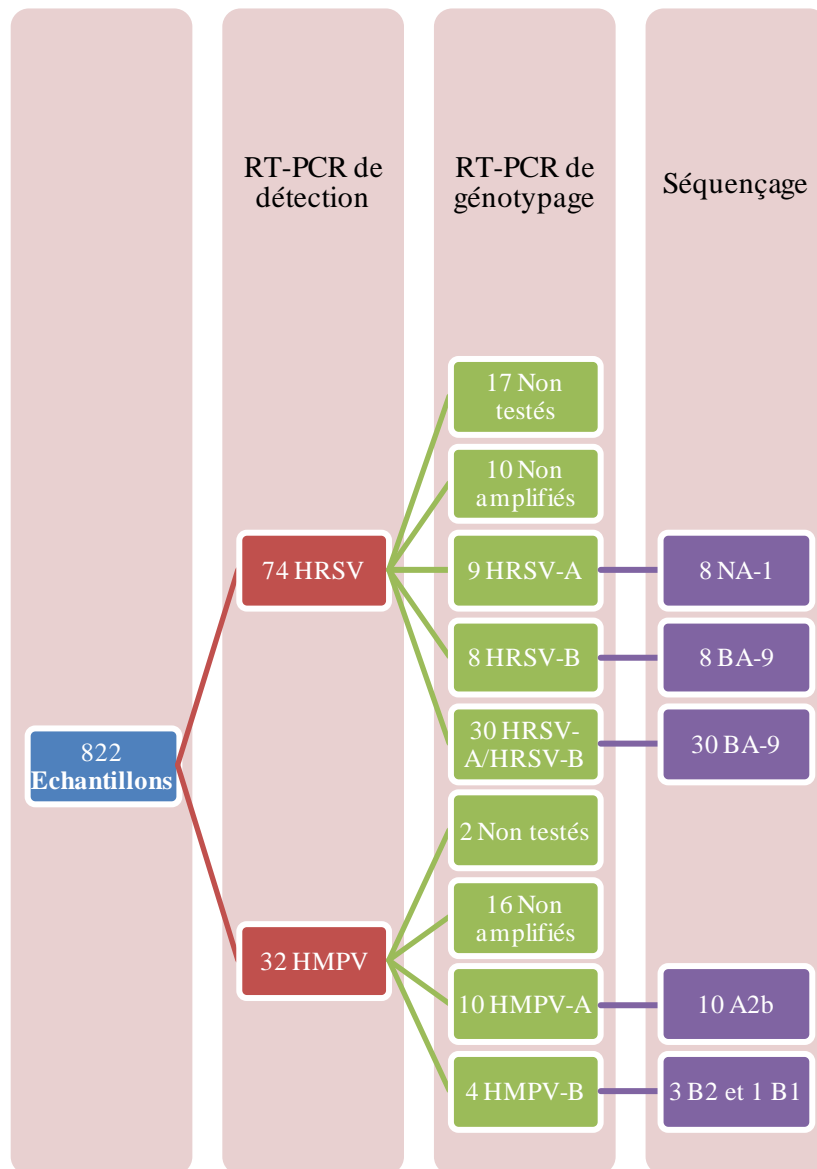


Figure 25 : Diagramme récapitulatif des résultats de la RT-PCR de détection, génotypage et séquençage des souches de HRSV et HMPV à Yaoundé, Cameroun.

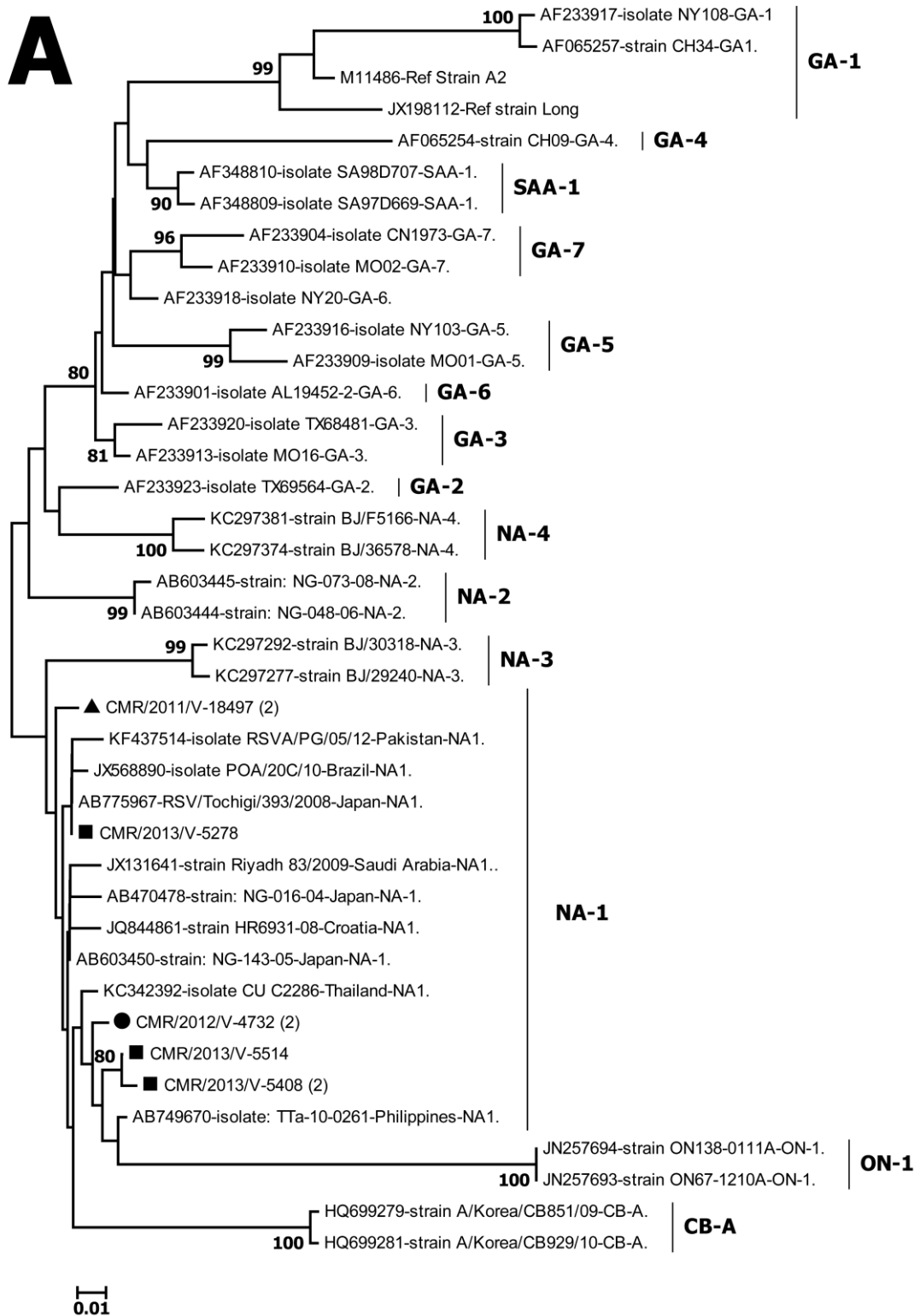
## 13. Analyse phylogénétique

### 13.1. Arbre phylogénétique

Les 8 échantillons HRSV-A séquencés se sont regroupés avec le génotype NA1 (Figure 26A). L'arbre phylogénétique des deuxièmes régions variables du gène G (195

nucléotides) des séquences de HRSV-A a montré que les 5 séquences distinctes de l'étude et les génotypes NA-1 détectées dans 11 autres pays à travers le monde sont regroupés sur un même clade monophylétique.

L'analyse phylogénétique de la séquence C-terminale du gène G de 38 positifs HRSV-B a permis de les classer dans le génotype BA-9 (Figure 26B). L'arbre phylogénétique des deuxièmes régions variables du gène G (304 nucléotides) de 22 séquences uniques des HRSV-B camerounaises a montré que les séquences camerounaises et les génotypes BA-9 détectées dans 14 autres pays à travers le monde sont regroupés sur un même clade monophylétique. Ce groupe a été en outre classé en 2 sous-branches qui ont été étiquetées comme sous-types BA-9a et BA-9b. Les tendances temporelles pour les détectations de virus BA-9 à Yaoundé montraient que les virus BA-9a et BA-9b étaient détectés au cours des saisons épidémiques 2011/12 et 2012/13 respectivement.



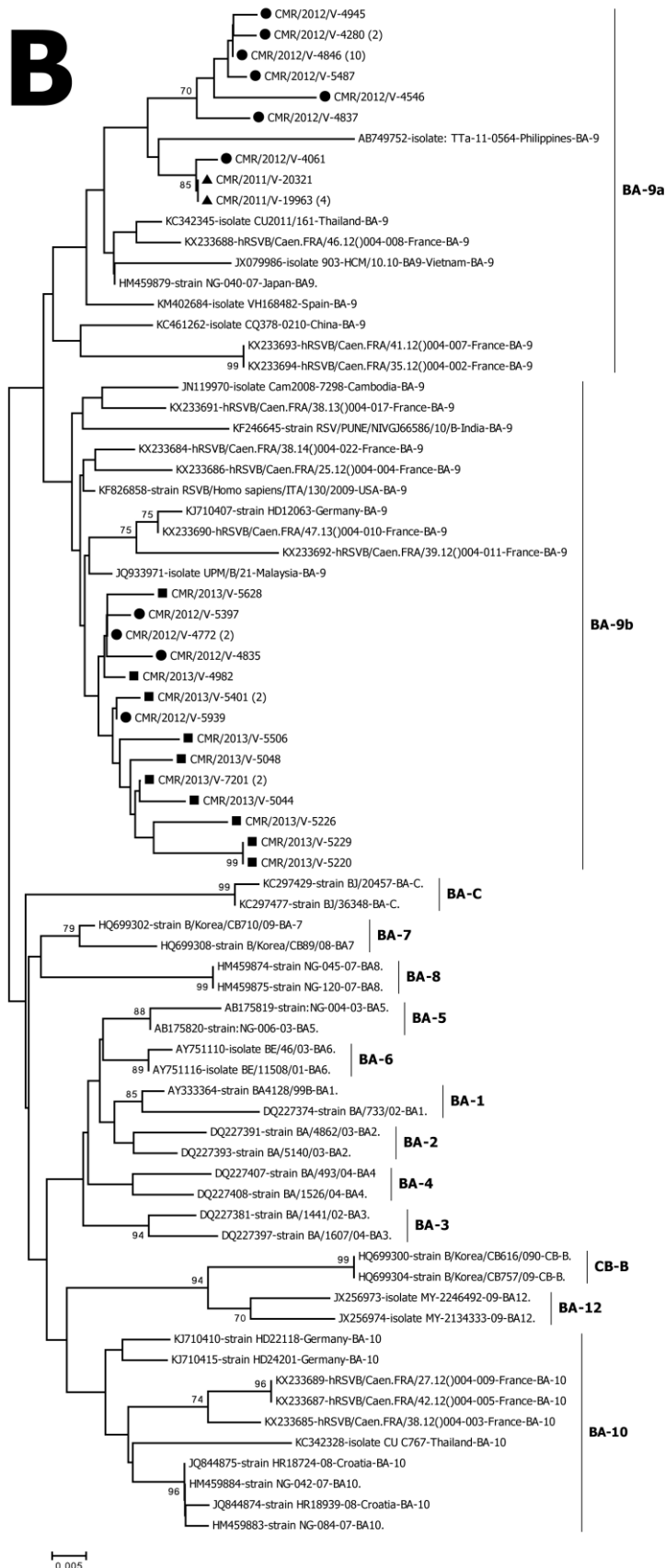


Figure 26 : Arbre phylogénétique des souches HRSV détectés à Yaoundé au Cameroun de 2011 à 2013, A : HRSV-A et B : HRSV-B.

L'alignement multiple des séquences a été réalisé avec Clustal W. Les arbres déracinés ont été générés sur la base des séquences nucléotidiques de la deuxième région hypervariable C-terminale du gène G (HRSV-A, 195 nucléotides, positions 715-909 séquence de référence A2 ; HRSV-B, 333 nucléotides, positions 556-888 séquence de référence CH18537). L'arbre a été construit en utilisant l'algorithme du neighbor-joining et le modèle de substitution de Kimura-2-paramètre dans MEGA, version 6. Les barres d'échelle représentent la fréquence de substitutions des nucléotides et les numéros sur les nœuds des branches sont des valeurs déterminées pour le ré-échantillonnage *bootstrap* après 1000 itérations. Seules les valeurs supérieures ou égales à 70% sont présentées. Les séquences de références de différents continents, obtenues sur Genbank, sont identifiées de la gauche vers la droite avec le numéro d'accès, le nom de la souche, le pays d'origine et le génotype (annexe 6 et 7). Les souches de l'étude actuelle sont désignées de la gauche vers la droite par CMR (Cameroun), l'année de détection et le numéro de laboratoire. Les séquences du Cameroun sont indiqués avec (▲), (●) et (■) pour les séquences de 2011, 2012 et 2013, respectivement. Le nombre de séquences identiques est indiqué entre parenthèse à la suite du nom de la souche. Les génotypes assignés aux branches sont indiqués à droite après les barres.

L'arbre phylogénétique des souches HMPV du Cameroun basé sur 467 bp du gène G, sont groupés sur trois branches monophylétiques, HMPV-A2b (10), B1 (1) et B2 (3) avec les souches de références des autres pays (Figure 27). Les branches spécifiques du temps ou de l'espace n'ont pas été observées.

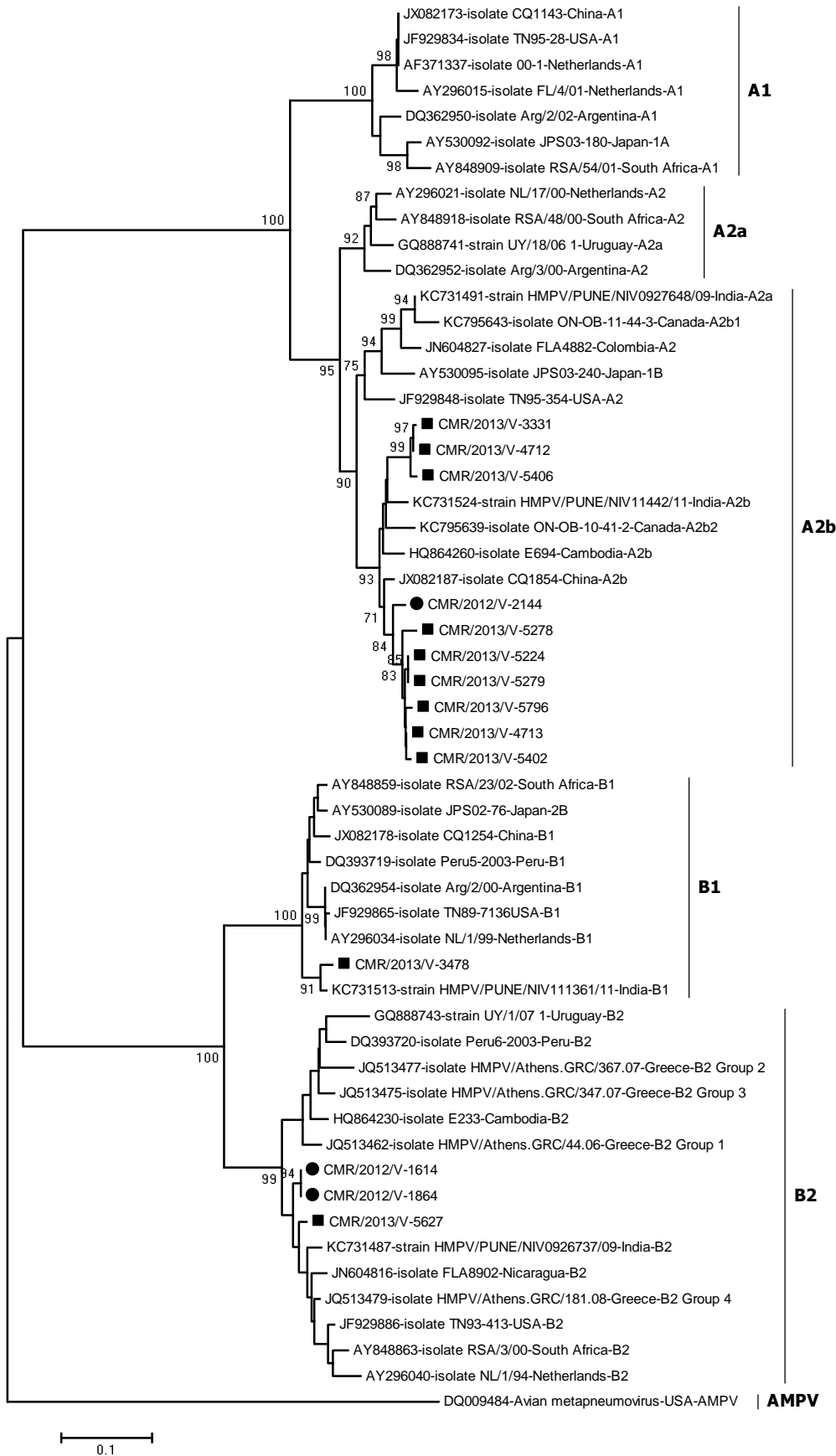


Figure 27 : Arbre phylogénétique des souches HMPV-A et HMPV-B détectés à Yaoundé au Cameroun de 2011 à 2013.



L'alignement multiple des séquences a été réalisé avec Clustal W. Les arbres déracinés ont été générés sur la base des séquences nucléotidiques du gène G (364 nucléotides de la position 6397-6759 de la séquence de référence 00-1 numéro Genbank AF371337) en utilisant l'algorithme du neighbor-joining et le modèle de substitution de Kimura-2-paramètre dans MEGA, version 6. Les barres d'échelle représentent la fréquence de substitutions des nucléotides et les numéros sur les nœuds des branches sont des valeurs déterminées pour le ré-échantillonnage *bootstrap* après 1000 itérations. Seules les valeurs supérieures ou égales à 70% sont présentées. Les séquences de références de différents continents, obtenues sur Genbank, sont identifiées de la gauche vers la droite avec le numéro d'accès, le nom de la souche, le pays d'origine et le génotype (annexe 8). Les souches de l'étude actuelle sont désignées de la gauche vers la droite par CMR (Cameroun), l'année de détection et le numéro de laboratoire. Les séquences du Cameroun sont indiqués avec (●) et (■) pour les séquences de 2012 et 2013, respectivement.

### 13.2. Polymorphisme nucléotidique et protéique

La description des séquences d'acides aminés déduites des souches HRSV-NA-1, HRSV-BA-9, HMPV-A2b, HMPV-B1 et HMPV-B2 camerounaises a été effectuée en référence à la séquence partielle des gènes G des prototypes A2 (M74568, 66 résidus : positions 234 à 300), BA4128/99B (AY333362, 136 résidus : positions 185 à 321), NL/17/00 (AY296021, 190 résidus : positions 31 à 221), NL/1/99 (AY296034, 209 résidus : positions 25 à 233) et NL/1/94 (AY296040, 218 résidus : positions 25 à 243), respectivement (Tableau VI). Les gènes G des virus HRSV-NA-1, HRSV-BA-9, HMPV-A2b, HMPV-B1 et HMPV-B2 camerounais présentaient des taux de divergence allant de 13,8 à 15%, 3,5 à 5,4%, 12,3 à 15%, 6,1% et 6,2 à 6,8% au niveau nucléotidique et 24,5 à 28,8%, 5,4 à 10,3%, 23,4 à 26,9%, 15,5% et 10,2 à 12,5% au niveau des acides aminés, respectivement. Les transitions étaient plus courantes que les transversions pour toutes les séquences HRSV et HMPV camerounaise avec un ratio transition/transversion de 1,3 ; 8,8 ; 7 ; 25 et 7,8 pour HRSV-NA-1, HRSV-BA-9, HMPV-A2b, HMPV-B1 et HMPV-B2, respectivement. Un total de 30, 48, 80, 26 et 34 mutations nucléotidiques ayant conduit à 18, 25, 45, 15 et 21 mutations d'acides aminés était enregistré pour les souches camerounaises HRSV-NA-1, HRSV-BA-9, HMPV-A2b, HMPV-B1 et HMPV-B2, respectivement. Une insertion de 12 nucléotides (4 acides aminés) a été observée dans les séquences de HMPV-B2 camerounaises.

Tableau VI : Polymorphisme nucléotidique et protéique des souches de HRSV et HMPV camerounaises.

Séquences camerounaises	5 HRSV (NA-1)	38 HRSV (BA-9)	10 HMPV (A2b)	1 HMPV (B1)	3 HMPV (B2)
Séquence de référence	A2	BA3833/99B	NL/17/00	NL/1/99	NL/1/94
Numéro Genbank	M74568	AY333362	AY296021	AY296034	AY296040
Nombres de nucléotides	200	411	575	629	659
% de divergence nucléotidique	13,8 à 15%	3,5 à 5,4%	11 à 13,5%	8%	5,8 à 7,6%
Sites variables	30	48	94	47	53
Insertions	0	0	0	0	12 nt
Transitions	18	44	82	42	46
Transversions	14	5	12	5	8
Transitions/Transversions	1,3	8,8	6,8	8,4	5,7
Nombres d'acides aminés	66	136	191	209	219
Positions	234-300	185-321	31-221	25-233	25-243
% de divergence protéique	24,7 à 28,8%	5,4 à 10,3%	21 à 23,6%	14,5%	10,3 à 15,1%
Mutations non synonymes	18	25	52	28	34
Insertions	0	0	0	0	4

Les séquences partielles des gènes G de 5 souches HRSV-NA-1, 22 souches HRSV-BA-9 représentatives de l'étude, toutes les souches de HMPV-A2b, HMPV-B1 et HMPV-B2 ont été alignées avec les séquences des autres pays du monde et les séquences de référence (Figure 27).

**A**

	P	T	I	N	T	T	K	T	N	I	I	T	L	L	T	S	N	T	T	G	N	P	E	L	T	S	Q	M	E	T	F	H	S		
M11486-Ref Strain A2	L	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
CMR/2012/V-4732 (2)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
CMR/2013/V-5408 (2)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
CMR/2013/V-5514	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
CMR/2011/V-18497 (2)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
CMR/2013/V-5278	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
KC476772-isolate SA01-04291-South Africa-NA1.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
KJ658820-isolate SH11081503NA1-China-NA1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
AB749670-isolate: TTa-10-0261-Philippines-NA1.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
AB470478-strain: NG-016-04-Japan-NA-1.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
JF714706-strain Riyadh 91/2009-Saudi Arabia-NA1.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
JQ844861-strain HR6931-08-Croatia-NA1.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
KC342391-isolate CU C2277-Thailand-NA1.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
KJ710381-strain HD12188-Germany-NA1.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
JX131638-strain Riyadh 38/2008-Saudi Arabia-NA1.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
JX568890-isolate POA/20C/10-Brazil-NA1.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
KF246617-strain RSV/PUNE/NIV1062994/10/A-India-NA1.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
KF437514-isolate RSVa/PG/05/12-Pakistan-NA1.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

	T	S	S	E	G	N	P	S	P	S	Q	V	S	T	T	S	E	Y	P	S	Q	P	S	S	P	P	N	T	P	R	Q	* L			
M11486-Ref Strain A2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
CMR/2012/V-4732 (2)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
CMR/2013/V-5408 (2)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
CMR/2013/V-5514	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
CMR/2011/V-18497 (2)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
CMR/2013/V-5278	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
KC476772-isolate SA01-04291-South Africa-NA1.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
KJ658820-isolate SH11081503NA1-China-NA1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
AB749670-isolate: TTa-10-0261-Philippines-NA1.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
AB470478-strain: NG-016-04-Japan-NA-1.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
JF714706-strain Riyadh 91/2009-Saudi Arabia-NA1.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
JQ844861-strain HR6931-08-Croatia-NA1.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
KC342391-isolate CU C2277-Thailand-NA1.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
KJ710381-strain HD12188-Germany-NA1.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
JX131638-strain Riyadh 38/2008-Saudi Arabia-NA1.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
JX568890-isolate POA/20C/10-Brazil-NA1.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
KF246617-strain RSV/PUNE/NIV1062994/10/A-India-NA1.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
KF437514-isolate RSVa/PG/05/12-Pakistan-NA1.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

**B**

	220	230	240	
AY333364-strain BA4128/99B-BA1	K R D P K K L A K T	L K K E T T I N P T K K P T P K T	T E R D T S T S Q S	
CMR/2011/V-20321		P	P	
CMR/2011/V-19963 (4)		P	P	
CMR/2012/V-4061		P	P	
CMR/2012/V-4837	T P		P	
CMR/2012/V-4546		P	P	
CMR/2012/V-5487		P	P	
CMR/2012/V-4846 (10)		P	P	
CMR/2012/V-4280	I	P	P	
CMR/2012/V-4945		P	P	
KC461262-isolate CQ378-0210-China-BA-9		P	P	
KM402684-isolate VH168482-Spain-BA-9		P	P	
HM459879-strain NG-040-07-Japan-BA9		P	P	
JX079986-isolate 903-HCM/10.10-BA9-Vietnam-BA-9		P	P	
KC342345-isolate CU2011/161-Thailand-BA-9		P	P	
AB749752-isolate: TTA-11-0564-Philippines-BA-9		P	P	
CMR/2012/V-4772 (2)		P	P	
CMR/2012/V-4835	T P		P	
CMR/2012/V-5397		P	P	
CMR/2012/V-5939		P	P	
CMR/2013/V-4982		P	P	
CMR/2013/V-5044		P	P	
CMR/2013/V-5048		P	P	
CMR/2013/V-5226	T P		P	
CMR/2013/V-5401 (2)		P	P	
CMR/2013/V-5506		P	P	
CMR/2013/V-5628		P	P	
CMR/2013/V-7201 (2)		P	P	
CMR/2013/V-5220	T P		P	
CMR/2013/V-5229	T P		P	
JN119970-isolate Cam2008-7298-Cambodia-BA-9		P	P	
KF246645-strain RSV/PUNE/INIVGJ66586/10/B-India-BA-9		P	P	
KF826858-strain RSVB/Homo sapiens/ITA/130/2009-USA-BA-9		P	P	
KJ710407-strain HD12063-Germany-BA-9	S		P	
JQ933971-isolate UPM/B/21-Malaysia-BA-9		P	P	

	250	260	270	280	
AY333364-strain BA4128/99B-BA1	T V L D T T T S K H	T E R D T S T S Q S	T V L D T T T S K H	T I Q Q Q S L	
CMR/2011/V-20321			I	T	
CMR/2011/V-19963 (4)			P	T	
CMR/2012/V-4061			A	T	
CMR/2012/V-4837			A	T	
CMR/2012/V-4546			A	T	
CMR/2012/V-5487			A	T	
CMR/2012/V-4846 (10)			A	T	
CMR/2012/V-4280			A	T	
CMR/2012/V-4945			A	T	
KC461262-isolate CQ378-0210-China-BA-9			A	T	
KM402684-isolate VH168482-Spain-BA-9			A	T	
HM459879-strain NG-040-07-Japan-BA9			A	T	
JX079986-isolate 903-HCM/10.10-BA9-Vietnam-BA-9	N		A	T	
KC342345-isolate CU2011/161-Thailand-BA-9			F	T	
AB749752-isolate: TTA-11-0564-Philippines-BA-9	G	P	A	T	F
CMR/2012/V-4772 (2)			A	T	
CMR/2012/V-4835			A	T	
CMR/2012/V-5397			A	T	
CMR/2012/V-5939			A	T	
CMR/2013/V-4982			A	T	
CMR/2013/V-5044			A	T	
CMR/2013/V-5048			A	T	
CMR/2013/V-5226			A	T	
CMR/2013/V-5401 (2)			A	T	
CMR/2013/V-5506			A	T	
CMR/2013/V-5628			A	T	
CMR/2013/V-7201 (2)			A	T	
CMR/2013/V-5220			A	T	
CMR/2013/V-5229			A	T	
JN119970-isolate Cam2008-7298-Cambodia-BA-9			A P	T	
KF246645-strain RSV/PUNE/INIVGJ66586/10/B-India-BA-9			A	T	
KF826858-strain RSVB/Homo sapiens/ITA/130/2009-USA-BA-9		G	P	A	
KJ710407-strain HD12063-Germany-BA-9			A	T	
JQ933971-isolate UPM/B/21-Malaysia-BA-9			A	T	

	290	300	310	320	
AY333364-strain BA4128/99B-BA1	H S T T P E N T P I N S T	Q T P T A S E P S T S	N S T I Q K L S Y A	L	
CMR/2011/V-20321	Y		*	Q	
CMR/2011/V-19963 (4)	Y		*	Q	
CMR/2012/V-4061	Y		*	Q	
CMR/2012/V-4837	Y		*	Q	
CMR/2012/V-4546	Y		*	Q	
CMR/2012/V-5487	Y		*	Q	
CMR/2012/V-4846 (10)	Y		*	Q	
CMR/2012/V-4280	Y		*	Q	
CMR/2012/V-4945	Y		*	Q	
KC461262-isolate CQ378-0210-China-BA-9	Y		*	Q	
KM402684-isolate VH168482-Spain-BA-9	Y	L		Q	
HM459879-strain NG-040-07-Japan-BA9	Y		*	Q	
JX079986-isolate 903-HCM/10.10-BA9-Vietnam-BA-9	Y		*	Q	
KC342345-isolate CU2011/161-Thailand-BA-9	Y		*	Q	
AB749752-isolate: TTA-11-0564-Philippines-BA-9	Y		*	Q	
CMR/2012/V-4772 (2)	Y	L		Q	
CMR/2012/V-4835	Y	L		Q	
CMR/2012/V-5397	Y	L		Q	
CMR/2012/V-5939	Y	L		Q	
CMR/2013/V-4982	Y	L		Q	
CMR/2013/V-5044	Y	L	K	Q	P
CMR/2013/V-5048	Y	L	K	Q	
CMR/2013/V-5226	Y	L	K	Q	
CMR/2013/V-5401 (2)	Y	L		Q	
CMR/2013/V-5506	Y	L		Q	
CMR/2013/V-5628	Y	L		Q	
CMR/2013/V-7201 (2)	Y	L	K	Q	
CMR/2013/V-5220	Y	L	K	Q	
CMR/2013/V-5229	Y	L	K	Q	
JN119970-isolate Cam2008-7298-Cambodia-BA-9	Y	L		Q	
KF246645-strain RSV/PUNE/INIVGJ66586/10/B-India-BA-9	Y	L	K	Q	
KF826858-strain RSVB/Homo sapiens/ITA/130/2009-USA-BA-9	Y	L		Q	
KJ710407-strain HD12063-Germany-BA-9	Y	I	L	Q	
JQ933971-isolate UPM/B/21-Malaysia-BA-9	Y	L		Q	



**D**

AY296034-isolate NL/1/99-Netherlands-B1	S	R	C	Y	R	N	A	T	L	I	L	I	G	L	T	A	L	S	M	A	L	N	I	F	L	I	I	D	H	A	T	L	R	N	M		
CMR/2013/V-3478	.	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
AY848859-isolate RSA/23/02-South Africa-B1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
AY530089-isolate JPS02-76-Japan-2B	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
KC731513-strain HMPV/PUNE/NIV111361/11-l	.	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
JF929865-isolate TN89-7136USA-B1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
JX082178-isolate CQ1254-China-B1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
DQ393719-isolate Peru5-2003-Peru-B1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
DQ362954-isolate Arg/2/00-Argentina-B1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
AY296034-isolate NL/1/99-Netherlands-B1	I	K	T	E	N	C	A	N	M	P	S	A	E	P	S	K	K	T	P	M	T	S	T	A	G	P	N	T	K	P	N	P	Q	Q	A		
CMR/2013/V-3478	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	
AY848859-isolate RSA/23/02-South Africa-B1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	
AY530089-isolate JPS02-76-Japan-2B	.	.	.	.	.	.	.	.	.	L	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
KC731513-strain HMPV/PUNE/NIV111361/11-l	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	
JF929865-isolate TN89-7136USA-B1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
JX082178-isolate CQ1254-China-B1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.		
DQ393719-isolate Peru5-2003-Peru-B1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
DQ362954-isolate Arg/2/00-Argentina-B1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
AY296034-isolate NL/1/99-Netherlands-B1	T	Q	W	T	T	E	N	S	T	S	P	V	A	T	P	E	G	H	P	Y	T	G	T	T	Q	T	S	D	T	T	A	P	Q	Q	T		
CMR/2013/V-3478	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	F	S	A	.	L	.	.	.	.	.	.	.	E	.	.	.	P	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
AY848859-isolate RSA/23/02-South Africa-B1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	P	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
AY530089-isolate JPS02-76-Japan-2B	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	P	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
KC731513-strain HMPV/PUNE/NIV111361/11-l	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	F	S	A	.	L	.	.	.	.	.	.	.	E	.	.	.	P	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
JF929865-isolate TN89-7136USA-B1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	P	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
JX082178-isolate CQ1254-China-B1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	L	A	.	L	.	.	.	.	.	.	.	I	.	.	.	P	.	.	.	.	.	L	.	.		
DQ393719-isolate Peru5-2003-Peru-B1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	L	.	.	.	.	.	.	.	E	.	.	.	P	.	.	.	.	.	.	.	.		
DQ362954-isolate Arg/2/00-Argentina-B1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	P	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
AY296034-isolate NL/1/99-Netherlands-B1	T	D	K	H	T	A	P	L	K	S	T	N	E	Q	I	T	Q	T	T	T	E	K	K	T	I	R	A	T	T	Q	K	R	E	K	G		
CMR/2013/V-3478	.	.	.	.	.	.	.	L	P	.	I	Y	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
AY848859-isolate RSA/23/02-South Africa-B1	.	.	.	.	.	.	.	L	P	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R	-	T	.	.	.	P	.	K	G	.	R		
AY530089-isolate JPS02-76-Japan-2B	.	.	.	.	.	.	.	L	P	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
KC731513-strain HMPV/PUNE/NIV111361/11-l	.	.	.	.	.	.	.	L	P	.	I	Y	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	V	.	.	.	.	.	.	.	R	.	
JF929865-isolate TN89-7136USA-B1	.	.	.	.	.	.	P	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
JX082178-isolate CQ1254-China-B1	.	.	.	.	.	.	.	L	P	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	P	.	.	K	.	.	.		
DQ393719-isolate Peru5-2003-Peru-B1	.	.	.	.	.	.	.	L	P	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	K	
DQ362954-isolate Arg/2/00-Argentina-B1	.	.	.	.	.	.	.	L	P	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
AY296034-isolate NL/1/99-Netherlands-B1	K	E	N	T	N	Q	T	T	S	T	A	A	T	Q	T	T	N	T	T	N	Q	I	R	N	A	S	E	T	I	T	T	S	D	R	P		
CMR/2013/V-3478	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
AY848859-isolate RSA/23/02-South Africa-B1	.	.	.	.	.	.	.	P	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
AY530089-isolate JPS02-76-Japan-2B	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
KC731513-strain HMPV/PUNE/NIV111361/11-l	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	N	
JF929865-isolate TN89-7136USA-B1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
JX082178-isolate CQ1254-China-B1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
DQ393719-isolate Peru5-2003-Peru-B1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
DQ362954-isolate Arg/2/00-Argentina-B1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
AY296034-isolate NL/1/99-Netherlands-B1	R	T	D	T	T	Q	S	S	E	Q	T	T	R	A	T	D	P	S	S	P	P	H	H	A	*	R	G	A	K	L	K	*	A				
CMR/2013/V-3478	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	E	G	S	.	.	.	.	N	V	R	K	S	.	G	P	R	.	T			
AY848859-isolate RSA/23/02-South Africa-B1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	E	G	S	.	.	.	.	.	R	.	.	.	G	P	R	.	.	.	T		
AY530089-isolate JPS02-76-Japan-2B	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	E	G	S	.	.	.	.	.	R	.	.	D	G	P	R	.	.	.	.		
KC731513-strain HMPV/PUNE/NIV111361/11-l	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	W	.	.	E	G	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	P	R	.	.	.	.	.		
JF929865-isolate TN89-7136USA-B1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	E	G	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	P	R	.	.	.	.		
JX082178-isolate CQ1254-China-B1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	E	G	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	P	R	.	.	.	.		
DQ393719-isolate Peru5-2003-Peru-B1	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	E	G	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	P	R	.	.	.	.	.		
DQ362954-isolate Arg/2/00-Argentina-B1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	E	G	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	P	R	.	.	.	.	.		

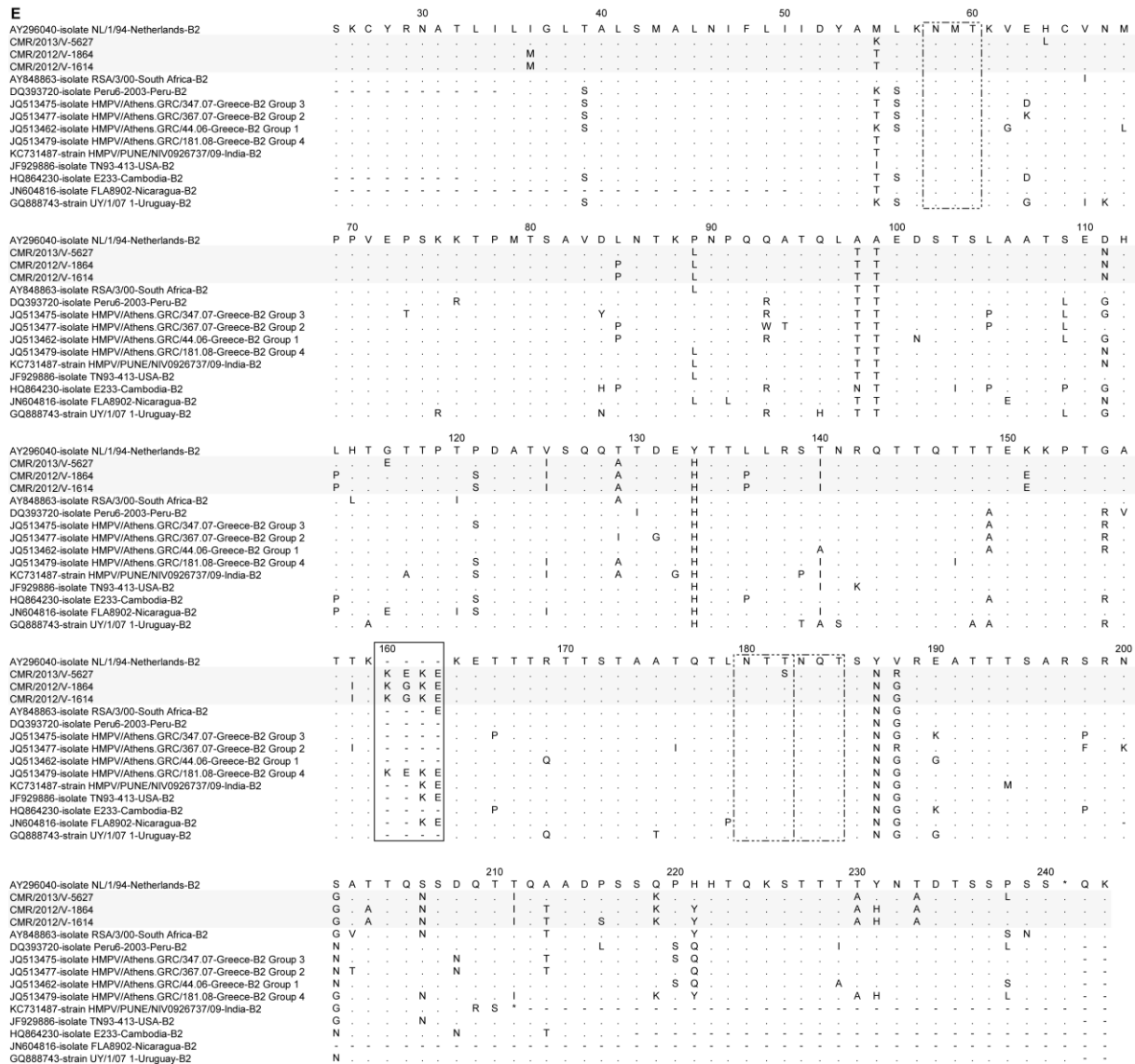


Figure 28 : Alignement d'acides aminés déduits de la seconde région hypervariable du gène G des séquences de HRSV de l'étude, A HRSV-A, B : HRSV-B, C : HMPV-A2b, D : HMPV-B1 et E : HMPV-B2.

Les alignements sont présentés selon les séquences de références A2 (M11486, position 234-300), BA4128/99B (AY333364, position 213-321), NL/17/00 (AY296021, position 31-221), NL/1/99 (AY296034, position 25-233) et NL/1/94 (AY296040, position 25-243) pour les HRSV-A, HRSV-B, HMPV-A2b, HMPV-B1 et HMPV-B2 respectivement. Les résidus identiques sont représentés par des points et les codons stops sont indiqués par des astérisques. L'absence d'acide aminé est représentée par des tirets. Les sites potentiels de N-glycosylation (NXT/S, où X n'est pas une proline) sont indiqués par des rectangles en doubles lignes. Les génotypes/sous génotypes sont présentés à droite. Les hachures gris claires délimitent les bordures entre les séquences camerounaises et celles d'autres études. Les séquences de références sont désignées de la gauche vers la droite par leur numéro d'accès Genbank, le nom de la souche, le pays d'origine et le génotype. Les séquences camerounaises sont nommées de la gauche vers la droite par CMR (Cameroun), l'année de détection et le numéro de laboratoire. Dans la figure 28B, les deux copies de la région dupliquée de 20 acides aminés sont représentées par des rectangles en simple ligne. Dans la figure 28E le rectangle en simple ligne représente une insertion de 12 nucléotides soit 4 aminoacides.

### 13.3. Analyses mutationnelles

#### 13.3.1. Virus respiratoire syncytial génotype NA-1

Pour 5 séquences d'acides aminés NA1 camerounaises, une mutation nucléotidique a conduit à l'apparition d'un codon stop prématuré résultant en une séquence de 64 aminoacides. Les trois dernières séquences camerounaises avaient une longueur de 65 aminoacides comme la séquence A2 (Figure 28A). Les souches NA1 camerounaises présentaient les substitutions d'acides aminées : P234L, N237D, I244R, L258H, M262E, F265L, S269T, N273Y, P274L, S280Y, P286L, P289S, S290P, P292S, P293S, P296T, R297K, R297I, Q298L et Q298Stop. Les substitutions I244R, L258H, M262E, S269T, S280Y, P289S, S290P, P292S et P293S sont partagées par toutes les séquences camerounaises et les séquences des autres pays.

#### 13.3.2. Virus respiratoire syncytial génotype BA-9

Dix-neuf séquences d'acides aminés BA-9 camerounaises portant une mutation nucléotidique a conduit à l'apparition d'un codon stop prématuré résultant en une séquence de 127 aminoacides. Les deux dernières (12V-4772 et 13V-4982) séquences camerounaises avaient une longueur de 134 aminoacides à cause d'une mutation conduisant au remplacement du codon stop de BA4128/99B par une glutamine à la position 316 (figure 28B). Les souches BA-9 camerounaises affichaient les mutations d'acides aminées : I200T, P202S, R214I, K218T, L219P, L223P, L223S, I229T, P231S, K233I/T, K238R, E241K, S247P, H259R, S267P, T270I, V271A, I281T, Q284R, H287Y, S288L, P291L, E305K, S309P et T312I. Les substitutions E241K, S247P, H259R et S267P, T270I, V271A étaient présentes dans la première et deuxième région dupliquée de 20 aminoacides spécifique des génotypes BA du gène G respectivement. Deux séquences camerounaises du sous génotype BA-9b possédaient en outre 4 mutations caractéristiques : P231S, K233T, P238R et S309P.

#### 13.3.3. Metapneumovirus humain génotype A2b

Toutes les souches camerounaises de génotype A2b avaient une longueur de 190 aminoacides comme la séquence de référence NL/17/00 avec un codon stop à la position 220 (Figure 28C). Les substitutions d'acides aminées : T40A, N52S, I55K, T59A, P73S, A77I/T,



S81P, T82I, N84S, S90N, S91P, H93L/P, N101S, P102L, P106S, A107T, A110V, P112S, A118T, T120A, P121S, L127P, D131N, A135T, S140N, P146N, V148A, T150K, I151R, N153I, N155S, T156A, A157V, S159R, P164S, R165W/Q, T166A, I171A/V, R172P, F177L, M179P, T182A, G183R, K184R/G, T188A, L190S, T197I, T199A, E203G, A208V, T216A et N219K ont été enregistrées sur les souches A2b camerounaises. Les substitutions S90N, I151R et N155S étaient partagées par toutes les séquences camerounaises et les séquences des autres études.

#### 13.3.4. Metapneumovirus humain génotype B1

La souche camerounaise de génotype B1 avait une longueur de 208 aminoacides comme la séquence de référence NL/1/99 avec un codon stop à la position 232 (Figure 28D). Cette souche B1 camerounaise présentait les substitutions d'acides aminées : N30Y, I50V, A83V, S104F, P105S, V106A, P109L, G116E, S121P, P136L, L137P, T140I, N141Y, I154T et K163R.

#### 13.3.5. Metapneumovirus humain génotype B2

Toutes les souches camerounaises de génotype B2 avaient une longueur de 217 aminoacides comme la séquence de référence NL/1/94 avec un codon stop à la position 241 (Figure 28E). Ces séquences B2 de l'étude présentaient les substitutions d'acides aminées : I36M, M55K/T, H64L, L85P, P89L, A98T, A99T, D111N, L113P, P121S, V125I, T129A, Y133H, L136P, T140I, K151E, T158I, T152S, Y187N, V188R/G, S201G, T203A, S206N, T211I, A213T, P216S, Q219K, H229Y, T230A, Y231H, T233A et P238L. Les substitutions A99T, Y133H, Y197N et R198G sont partagées par toutes les séquences camerounaises et les autres séquences de références Genbank. Une insertion de 4 acides aminés a été observée à la position 160.

### 13.4. Profil de N-glycosylation

#### 13.4.1. Virus respiratoire syncytial humain

Les sites potentiels de N-glycosylation (NXS/T où X différent de T) prédits par le serveur NetNglyc 1.0 sont illustrés par des rectangles en tirets figures 28A et B. Les souches

de génotypes NA1 camerounaises ont présentés 3 sites prédits de N-glycosylation. Le premier site était situé à la position 237. En dehors d'une séquence camerounaise et d'autres séquences de références Genbank qui ont perdu ce site de glycosylation à cause de la substitution N237D, ce site est observé dans toutes les autres séquences NA1. Les deux autres sites étaient situés aux positions 251 et 294 et sont partagés par toutes les séquences camerounaises. Pour les souches HRSV-B camerounaises deux sites de N-glycosylation putatifs étaient identifiés aux acides aminés 296 et 310. Deux séquences camerounaises du sous génotypes BA-9b présentaient 1 site additionnel localisé sur le résidu 230. Cette N-glycosylation supplémentaire a été observée à cause de la substitution caractéristique K233T observé uniquement pour ces séquences.

#### 13.4.2. Metapneumovirus humain

Les sites potentiels de N-glycosylation ont été observés sur les séquences de protéines G de l'étude (Figure 28C, D et E). Une séquence amino acide du sous groupe HMPV-A2b présentait un site potentiel de accepteur de N-glycosylation à la position 52-54. Trois sites potentiels de N-glycosylation aux positions 101-103, 169-171 et 188-190 ont été identifiés sur la séquence HMPV-B1 de cette étude. Pour les protéines G du sous groupe HMPV-B2 trois sites potentiels de N-glycosylation ont été identifiés : acides aminés 68-60, 180-182 et 183-185. Des mutations dans les séquences de cette étude ont également conduit à des gains ou à des pertes de sites potentiels de N-glycosylation. Au total, trois sites de N-glycosylation supplémentaires étaient présents sur certaines souches camerounaises HMPV-A2b aux acides aminés 105-107 (1/10), 131-133 (3/10) et 140-142 (3/10). Les séquences de l'étude avaient perdu les sites potentiels de N-glycosylation aux positions d'acides aminés 88-90 et 101-103 pour HMPV-A2b et 181-183 pour HMPV-B1.

#### 13.5. Profil de O-glycosylation

Le programme NetOglyc a prédit 9 à 22 et 2 à 4 résidus serine et threonine comme potentiellement O-glycosylées pour les séquences pour les HRSv-B et HRSV-A camerounaises respectivement. Le nombre de résidus sérine et thréonine, accepteurs probables de O-glycosylation variait de 52 à 60, 59 et 63 à 64 pour les séquences HMPV-A2b, B1 et B2 de l'étude respectivement.

### 13.6. Analyse de la pression de sélection

Dans la deuxième région variable du gène G des séquences HRSV-B, cinq sites sous sélection positive ont été trouvés aux positions I200, L219, T270, V271 et H287 et 4 sites sous sélection négative aux positions P216, L252, P295 et T302. (Tableau VI)

Tableau VII : Sites sélectionnés positivement et négativement dans les souches de HRSV-B camerounais.

Type de sélection	SLAC	REL	FEL
HRSV-B			
Pression positive			
	L219P	I200T	
		L219P	
		T270I	T270I
		V271A	
		H287Y	
Pression négative			
	P216		P216
			L252
			P295
			T302

Les nombres sont les positions du gène G en référence au BA4148/99B,  $p < 0.1$ .

# Discussion

## Chapitre 4 : Discussion

Au cours de cette étude, nous avons déterminé l'épidémiologie et effectué pour la première fois la caractérisation moléculaire de la séquence nucléotidique et aminoacide prédite du gène partiel G des HRSV et HMPV isolés dans des aspirations nasopharyngées d'enfants Camerounais de Septembre 2011 à Octobre 2014 à Yaoundé, Capitale du Cameroun.

### 1. Détection virale

Sur 822 échantillons testés, au moins un virus respiratoire a été détecté dans 597 (72,6%). Ce taux de détection est cohérent avec les résultats d'autres études étiologiques menées sur des enfants dans des contextes similaires [177–181]. Néanmoins, cette proportion semble varier considérablement d'un pays à l'autre. Kwofie et al. ont enregistré un pourcentage aussi faible que 25,7% au Ghana et Khor et al. 26,4% en Malaisie [55,182]. Des pourcentages plus élevés de 94,2% en Chine, 91% en France, et 90% en Alaska ont été signalés par Zhang et al. Singleton et al. et Huguenin et al. respectivement [57,132,183]. La comparaison entre les études est toujours difficile. Les raisons possibles de ces résultats variables entre les études incluent des différences réelles dans l'épidémiologie, les différences dans les critères d'inclusion pour la population étudiée, les méthodes diagnostiques utilisées, le panel d'agents viraux testés, le climat, la durée de l'étude et l'âge des patients. Considérant les études ci-dessus la faible prévalence enregistrée par Khor et al. pourrait être dû à leurs méthodes de détection (IFD et isolement viral) qui sont connus pour être moins sensibles que les techniques moléculaires [182].

Le virus majoritaire dans notre étude était HAdV, soit 28,5% du nombre total de virus observés. Cette valeur est supérieure à celle (0,8-13,3%) rapportée dans la plupart des autres études similaires [56,58,178,180,182,184]. Il est néanmoins similaire à ce qui a été noté en Alaska et au Mozambique par Singleton et al. (30%) et O'Callaghan-Gordo et al. (21%) respectivement [132,185]. Les sérotypes B (3,7,21) et E (4) du HAdV ont été impliqués dans des maladies plus sévères, y compris la bronchite ou la pneumonie chez l'hôte immunodéprimé et les enfants en particulier [186]. Cette constatation montre que HAdV pourrait jouer un rôle plus important que celui initialement examiné. En conséquence, des efforts supplémentaires décrivant nos sérotypes associés aideront à mieux comprendre

combien ce virus contribue à la gravité de la maladie. Dans cette étude, le virus Influenza était le deuxième virus le plus fréquent après HAdV avec 21,4% des 822 participants testés positifs. Cette fréquence est similaire à celle rapporté lors d'une première étude réalisée au Cameroun [50]. Contrairement à nos résultats, la plupart des autres études ont montré des proportions plus faible du virus Influenza (0,3% à 17%) [54,57,58,184,187,188]. Contrairement aux études antérieures similaires, le RV/EV représentait seulement 15,6% de positivité dans notre étude [132,179,180,184,185]. HRSV était le quatrième virus le plus fréquent avec une fréquence de 9% de positivité. Ce résultat corrobore les taux rapportés par d'autres auteurs [56,178,185,189]. HBoV était le cinquième virus le plus courant avec une prévalence de 8,3% dans tous les cas. Ce résultat est en ligne avec les résultats d'autres auteurs, qui ont signalé un taux de détection mondial de hBoV varie entre 2 et 19% dans les échantillons nasopharyngés [190]. Les étiologies virales restantes ont été identifiées dans 6,2%, 6,2% et 3,9% pour HCoV, HPIV et HMPV respectivement. Ces résultats correspondent à ceux rapportés par d'autres auteurs [54,57,58,188,191,192].

Comme rapporté lors de notre première étude et par la plupart des autres études, la majorité 83,8% (62/74,  $p < 0,001$ ) des infections HRSV a été observée chez les enfants ayant moins de 2 ans [18,19,21,62,63,122,127,128,130,131]. Ce taux élevé d'infection chez les enfants est dû à l'immaturité de leurs systèmes immunitaires [86]. Comme dans les rapports précédents, la plupart des positifs HMPV a été observée principalement chez les individus ayant entre 6 et 24 mois (68,8%, 22/32) [28,135,193]. Egalement compatible avec les autres études, aucune différence de taux d'infection n'a été enregistrée entre les groupes d'âge ( $p=0,6$ ) [194,195]. En effet, des études ont montrées que les infections se produisent dans toutes les tranches d'âge probablement en raison de la protection immunitaire partielle ou l'acquisition de nouveaux génotypes [29,30]. Comme rapportés dans les études précédentes les individus positifs pour HRSV étaient significativement plus jeunes que ceux positifs pour le HMPV [125,193,196–199]. L'infection HRSV était associée à l'hospitalisation ( $p < 0,01$ ). En effet, il a été montré par Nair et collègues que 91% des hospitalisations HRSV-associés étaient enregistrés dans les pays à ressources limités comme le Cameroun [4]. Contrairement à l'étude de Wang et al. où la majorité des participants HMPV positifs étaient hospitalisés, il n'y'avait pas de différence entre le taux de positivité HMPV et l'hospitalisation dans cette étude [74].

Contrairement aux rapports des autres pays un fort taux de coinfection HRSV-A/HRSV-B a été enregistré lors de cette étude (63,8%, 30/47) [21,24,39,62,97,122,127,152,200]. Ceci pourrait être dû à la co-circulation au cours de l'étude des groupes HRSV-A et B à une fréquence relativement égale. Certaines études ont montré un taux de codétection HMPV-autres virus respiratoires variant de 0,8 à 58% [28,31,135,136,140]. Dans ce travail, la codétection HMPV et d'autres pathogènes respiratoires supplémentaires a été observée dans 50% des participants HMPV-positifs. Cette forte fréquence de codétection n'est pas surprenante en raison du chevauchement partiel dans la distribution saisonnière des virus respiratoires recherchés au cours de l'année. En accord avec les rapports précédents, HAdV (28,1%; 9/32) et RV/EV (15,6%; 5/32) étaient les virus majoritaires dans les codetections avec HMPV dans le présent travail [31,195,201]. Alors que les études précédentes ont noté une prédilection des codetections HRSV-HMPV [135], nous avons observé une seule codétection HMPV-HRSV dans cette étude. Les données sur l'influence des codetections des autres virus respiratoires et le HMPV sur la sévérité de l'infection sont contradictoires [202,203]. Dans cette étude, aucune différence significative dans les symptômes cliniques, l'âge ou le sexe entre les infections simples et les infections multiples n'a été observé. Contrairement à d'autres études [136], aucune codétection HMPV-A/HMPV-B n'a été observée.

Cette étude a été effectuée pendant 3 saisons épidémiques, de septembre 2011 à octobre 2014. Les infections HRSV ont été observées lors de la grande saison de pluie de septembre à décembre avec un pic au cours du mois de septembre et octobre comme ce fut le cas dans nos premiers rapports sur l'infection HRSV au Cameroun [50]. Ce mode de diffusion de HRSV au Cameroun est aussi conforme à celui rapporté au Gabon, un autre pays frontalier du Cameroun [204]. Dans les régions tempérées, les infections HMPV sont distribués principalement à la fin de l'hiver et au début du printemps [70–73]. Certaines études ont cependant montré que HMPV peut être détecté tout au long de l'année [72,73,205]. Pour créer davantage de confusion certaines études ont montré que HMPV circule aussi en été [74,75]. Les études de longue durée ont également mis en évidence un motif de circulation biennale avec des taux de positif bas et élevé dans les années paires et impaires [71]. En outre le pic de l'activité HMPV a été montré variable selon les années dans certaines études [75]. Il existe très peu de données sur la saisonnalité de HMPV dans les régions tropicales. Au cours de cette étude nous sommes incapables d'émettre des analyses sur la saisonnalité HMPV à cause du très faible nombre d'échantillons positifs détectés HMPV au cours du travail. Cependant,

de façon similaire à HRSV et en accord avec d'autres pays tropicaux, les pics de circulation ont été observés en saison pluvieuse (septembre à décembre) [31]. Par conséquent, pour élucider le motif de circulation de HMPV au Cameroun, d'autres études de longue durée plus approfondies sont garanties.

## 2. Génotypage des souches de HRSV et HMPV

Comme signalés dans d'autres études [28–30,97,98,100,122,125,201], 17,5% (10/57) des positifs HRSV et 53,3% (16/30) des positifs HMPV n'ont pas été amplifiés par RT-PCR pour le séquençage. Ce résultat serait dû à une faible charge virale dans les prélèvements. En effet la charge virale les échantillons non amplifiés était significativement plus faible que celle des échantillons amplifiés. Uniquement 8/39 HRSV-A amplifiés en RT-PCR de génotypage ont pu être séquencés avec succès. Les chromatogrammes obtenus après séquençage pour les HRSV-A étaient de faible qualité. Pour ce résultat, nous soupçonnons la codétection et la dégradation des acides nucléiques comme étant les causes. La quasi-totalité de ces échantillons non séquencés (30/31) étaient des cas de codétection HRSV-A/HRSV-B et ont été affectés par des amplifications non spécifiques. Par ailleurs, ces échantillons ont également subi environ 3 cycles congélation/décongélation qui auraient pu contribuer à la dégradation des acides nucléiques dans l'échantillon. De ce fait, ces échantillons n'ont pas été inclus dans les analyses phylogénétiques.

## 3. Epidémiologie moléculaire des souches de HRSV et HMPV

Dans l'étude actuelle, tous les virus HRSV-B portaient la duplication de 60 nucléotides caractéristique des génotypes BA. Plus de 15 ans après la première détection des virus HRSV BA à Buenos Aires en Argentine, la large diffusion des virus BA est l'affirmation de leur grande adaptation à leurs hôtes humains. Les premiers membres du génotype BA ont été initialement définis par une reproduction identique de 60 nucléotides dans la deuxième région hypervariable du gène G [25]. La variabilité génétique supplémentaire et continue de ces virus leur confère probablement un avantage de *fitness* considérable. Aujourd'hui près de 15 génotypes différents de ces virus ont été rapportés à travers le monde. Cette forte divergence génétique serait favorisée par l'immunité de l'hôte, qui agit comme une pression de sélection de l'évolution [18–20,23,25,39,62,79,98,100,101,122,129–131,152,200]. Une duplication de 72 nucléotides



semblable à celle du génotype BA a été également rapportée par Eshaghi au Canada en 2010 pour les membres du génotype ON1 du groupe HRSV-A. Inversement, la majorité des études ont rapportés que les virus ON1 étaient conservés et aucun autre génotype dérivé de ce virus n'a encore été décrit 5 ans après sa première description [18,20,23,62,100,122,127,130,131]. Une étude globale menée par Ren et collègues a permis de montrer que l'ensemble des séquences ON-1 publiées sur Genbank en Décembre 2013 formaient uniquement deux branches monophylétiques ne remplissant pas les critères d'attribution de nouveau génotype proposés par Venter et al [127]. Comme observé dans plusieurs autres études le génotype BA-9 décrit pour la première fois par Dapat et al. en 2010 est très diversifié et a été classifié en sous groupes dans différentes études [62,101,122,200]. Lors de ce travail également la comparaison des séquences BA-9 camerounaises avec d'autres séquences de références a révélé que BA-9 était divisé en deux clusters différents dénommés BA-9a et BA-9b.

Les données précédentes ont montrés que deux ou plusieurs sous groupes de HMPV peuvent cocirculer dans les régions où HMPV est endémique [31,46,71,75,126,136,137,140,201,206]. L'analyse phylogénétique des séquences partielles du gène G dans la présente étude démontre la cocirculation au Cameroun des deux groupes HMPV-A et B repartis en trois sous-groupes A2b, B1 et B2 durant la période d'étude. De façon similaire aux études antécédentes [31,48,137,140], les virus de génotype A1 qui étaient détectés au cours des années 2000-2003 [85,90,207], ne sont pas identifiés dans la présente étude.

Le groupe HMPV-A est prédominant sur le groupe HMPV-B dans la plupart des études [47,48,75,88,136,140]. De façon compatible à d'autres études, parmi les 14 virus HMPV de cette étude, 10 (71,4%) souches ont été regroupés comme HMPV-A (sous groupe A2b) et 4 (28,6%) souches ont été regroupés comme HMPV-B (3 B2 et 1 B1). Au sein du groupe HMPV-A, le sous groupe A2b a été plus fréquemment détecté au cours des études [48,73,75,88,137]. Récemment une duplication de 180 nucléotides dans le gène G des virus du sous groupe A2b ont été rapportés au Japon et en Espagne [46,106].

Les analyses phylogénétiques ont montré que les sous groupes du virus HMPV ne sont ni temporairement ni spatialement limités et sont aléatoirement repartis au cours des années et dans les différents pays [48,208]. Les données ont également montré que les sous groupes HMPV cocirculent avec un remplacement des sous groupes dominants tous les 1-3 ans [71].

De façon similaire au HRSV [16,17,26], cette alternance dans le modèle de domination des sous groupes HMPV peut être due au développement d'une immunité communautaire en réponse au groupe virale majoritaire d'année en année. Ce schéma complexe de circulation de HMPV pose un réel défi pour le développement d'un futur vaccin qui repose sur les études d'épidémiologie moléculaire. Très peu d'études ont rapporté la distribution des sous groupes HMPV en Afrique subsaharienne [30,136]. Au cours de cette étude, les virus A2b (1) et B2 (2) ont cocirculé en 2012. En plus des virus HMPV-B2 détecté en 2013, une forte augmentation des virus A2b (9) et une apparition des virus B1 (1) ont été mis en évidence. Nous devons faire preuve de prudence au moment de commenter sur les variations des sous groupes de HMPV au Cameroun. En effet, bien que trois sous groupes de HMPV aient été détectés lors de cette étude, seulement 43% (14/32) d'échantillons positifs HMPV ont été caractérisés à partir d'un échantillonnage non représentatif. Par conséquent, il est impossible de dire si cela représenterait le motif d'alternance ou de prédominance des sous groupes HMPV au Cameroun pendant la période de l'étude. Il est donc nécessaire de mener des études à long terme au Cameroun pour pouvoir clarifier le modèle de circulation de HMPV.

#### 4. Analyse phylogénétique des souches de HRSV et HMPV

De façon similaire aux études d'autres pays, le taux de divergence des séquences camerounaises HRSV et HMPV était plus élevé au niveau protéique qu'au niveau nucléotidique [16,29,39,63,78,96,104,129,130,152].

De façon similaire aux études antérieures, des longueurs différentes du polypeptide G dans des souches HRSV appartenant au même sous-groupe ont été observées en raison de l'utilisation de différents codons d'arrêt [105,206]. Comme observées dans les études précédentes [206], les protéines G des virus camerounais du sous groupe B2 avaient une longueur différente de la souche de référence. Cette longueur plus importante était attribuée à une insertion de 12 nucléotides supplémentaires dans les séquences G camerounaises.

Les substitutions N237D, S269T, P274L, P286L, P289S, P292S, R297K et Q298stop (5/8), rapportées précédemment comme spécifiques au génotype NA-1 [21,63,101,129,152], ont été retrouvées dans les séquences HRSV-A de l'étude actuelle. La substitution S247P spécifique de tous les virus de type BA à l'exception de BA-1 et la substitution K218T sont retrouvées dans toutes les séquences camerounaises [78]. Les mutations spécifiques du

génotype BA-9, T270I, V271A et H287Y, rapportées par des études antérieures ont également été enregistrées au cours de ce travail [18,39,79,101,129]. Les séquences camerounaises BA-9 qui n'ont pas été affectées par ces mutations spécifiques possèdent soit l'acide aminé de la séquence de référence BA4128/99B soit un autre acide aminé différent. La mutation S269F distincte des séquences BA-9 des souches japonaises de Dapat et collègues était absente dans les séquences de ce travail [79]. Les substitutions I281T et P291L étaient spécifiques des sous groupes BA-9a et BA-9b respectivement. Ces changements avaient été rattachés également aux sous groupes du génotype BA-9 de l'étude de Tabatabai en Allemagne [62]. La variation K233I, par ailleurs signalée récemment comme spécifique du génotype BA-13, a été notée uniquement dans les séquences du génotype BA-9b de la présente étude [22]. Deux autres mutations attribuées au génotype BA-13, Q284R et P291L, ont également été observés dans les séquences BA-9 analysées dans l'étude actuelle. Il convient de noter que le changement P231S observé sur deux séquences camerounaises de génotypes BA-9b avait été déjà relevé chez les virus HRSV BA-10 [63,152].

Comme observé dans les études précédentes [31,48,75,90,107,206,209], les mutations S90N, I151R et N155S étaient présentes dans toutes les séquences camerounaises.

Les sites de N-glycosylation N237, N251, N274 et N294, antérieurement rapportés chez les HRSV-A génotype NA1 [18,19,21,34,62,63,129], ont été observés dans (7/8), (8/8), (2/8) et (8/8) des séquences de l'étude actuelle, respectivement. Les sites de N-glycosylation N237 et N274 ont été perdus dans (1/8) et (6/8) séquences du présent travail à cause des changements N237D et N274Y, respectivement. Les sites de glycosylation caractéristiques des HRSV-B [18,19,34,62,63,96,129,152], N296 et N310, ont été observés dans toutes les séquences de cette étude. Un site de N-glycosylation additionnel, N230, a été observé dans les séquences de deux séquences du sous groupe BA-9b à cause de la mutation P231S. Ce site supplémentaire a également été rapporté pour des séquences de génotypes BA-10 [63,152]. L'acquisition de ce site supplémentaire de N-glycosylation pour les virus de génotype BA-9b pourrait leur conférer un avantage sélectif supplémentaire. En effet, il a été décrit que des variations dans la chaîne latérale glucidique de la protéine G pourrait contribuer à un changement antigénique du virus à travers l'activation ou l'inhibition de la liaison des anticorps spécifiques.

Comme rapportés précédemment [31,48,75,105,107,195,206], les sites de glycosylation N52 pour A2b (4/10) ; N101, N169 et N188 pour B1 ; N58, N180 et N183 pour B2 ont été observés dans les séquences camerounaises. Comparé à la séquence de référence de référence hollandaise (NL/17/00) [81], les séquences camerounaises ont perdu les site de N-glycosylation N88 et N101 et acquis 3 sites supplémentaires N105 (1/10), N131 (3/10) et N140 (3/10). En outre, la séquence B1 de cette étude a perdu le site de N-glycosylation N181 observé dans la souche de référence hollandaise [81].

Il a été estimé que les méthodes de comptage SLAC et à effets fixes FEL étaient adaptés pour des jeux de données > 50 et 20 séquences, respectivement. Il est également connu que le modèle à effet aléatoire REL souffre d'un grand taux de faux positifs pour les petits jeux de données.[175] En raison des limites ci-dessus, les séquences distinctes HRSV-A et HMPV de ce travail n'ont pas été analysées pour la recherche des sites sous pression de sélection. Comme rapporté par d'autres études [24,99,131], l'analyse de l'évolution site par site dans la région HVR2 de la protéine G entre les isolats HRSV-B camerounais a révélé 5 sites sélectionnés positivement (I200, L219, T270, V271 et H287) et 4 sites sélectionnés négativement (P216, L252, P295 et T302) pour les souches HRSV-B. Cette pression de sélection peut être expliquée par le caractère antigénique de la région hypervariable C-terminal qui contient plusieurs epitopes reconnus par les anticorps neutralisants [117,118].

Notre étude est cependant entachée de plusieurs limites. La récolte des données cliniques, les facteurs de risques potentiels (malnutrition, immunodépression, l'encombrement...), et le devenir des patients inclus n'a pas été exhaustive. De ce fait, l'évaluation du fardeau, des facteurs de risque et de la pathogénicité des infections à HRSV et HMPV au Cameroun restent incomplètes.

# Conclusion Générale

## Conclusion générale

En conclusion, il s'agit de la première étude réalisée au Cameroun pour caractériser 17 virus respiratoires communs (Influenza, HAdV, HBoV, HMPV-A et B, HRSV-A et B, HPIV-1, 2, 3 et 4, HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63 et HCoV-HKU1, RV et EV) en pédiatrie chez des patients hospitalisés et ambulatoires pendant une période de 2 années consécutives. En utilisant les nouvelles techniques moléculaires de rRT-PCR multiplex, nous avons identifié une grande variété de ces virus avec des infections mixtes et leurs modèles saisonniers. L'association entre l'infection à HRSV aux jeunes enfants et l'hospitalisation, suggère que ce virus possède un impact significatif sur la santé infantile au Cameroun.

En outre, les résultats acquis dans l'étude actuelle fournissent également pour la première fois des données sur les géotypes HRSV et HMPV circulant au Cameroun, voir dans la sous région Afrique Centrale. La caractérisation génétique de la glycoprotéine G, principale cible de nombreux vaccins en cours de développement, a indiqué que deux sous groupes HRSV (NA-1 et BA-9) et trois sous groupes HMPV (A2, B1 et B2) ont co-circulés au cours de l'étude. Contrairement, à la grande variabilité du gène G du HRSV celui du HMPV est relativement plus conservée.

# Perspectives

## Perspectives

Cette étude met en exergue l'importance de mettre en œuvre d'autres études à grande échelle basée sur la population générale dans des pays à ressources limités comme le Cameroun où les données sont encore très rares. Bien que trois sous groupes de HMPV aient été détectés lors de cette étude, seulement 43% (14/32) d'échantillons positifs HMPV ont été caractérisés à partir d'un échantillonnage non représentatif. Par conséquent, il est impossible de dire si cela représenterait le motif d'alternance ou de prédominance des sous groupes HMPV au Cameroun pendant la période de l'étude. Il est donc nécessaire de mener des études à long terme au Cameroun pour pouvoir clarifier le modèle de circulation de HMPV. Il a été estimé que les méthodes de comptage SLAC et à effets fixes FEL étaient adaptés pour des jeux de données > 50 et 20 séquences, respectivement. Il est également connu que le modèle à effet aléatoire REL souffre d'un grand taux de faux positifs pour les petits jeux de données [175]. En raison des limites ci-dessus, les séquences distinctes HRSV-A et HMPV de ce travail n'ont pas été analysées pour la recherche des sites sous pression de sélection. De ce fait, la pression de sélection et le modèle évolutif des séquences HRSV et HMPV camerounaises demeurent inconnues. D'autres études sont donc nécessaires pour pouvoir déterminer ces caractéristiques pour les lignées HRSV et HMPV au Cameroun. Egalement, des études de grande envergure sont nécessaires pour évaluer le fardeau, les facteurs de risque et la pathogénicité des infections à HRSV et HMPV au Cameroun.



# **Bibliographie**

## Bibliographie

1. Liu L, Oza S, Hogan D, Perin J, Rudan I, Lawn JE, et al. Global, regional, and national causes of child mortality in 2000–13, with projections to inform post-2015 priorities: an updated systematic analysis. *The Lancet*. 2015;385:430–40.
2. Edwards KM, Zhu Y, Griffin MR, Weinberg GA, Hall CB, Szilagyi PG, et al. Burden of Human Metapneumovirus Infection in Young Children. *N. Engl. J. Med.* 2013;368:633–43.
3. Hall CB, Weinberg GA, Iwane MK, Blumkin AK, Edwards KM, Staat MA, et al. The Burden of Respiratory Syncytial Virus Infection in Young Children. *N. Engl. J. Med.* 2009;360:588–98.
4. Nair H, Nokes DJ, Gessner BD, Dherani M, Madhi SA, Singleton RJ, et al. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2010;375:1545–55.
5. Panda S, Mohakud NK, Pena L, Kumar S. Human metapneumovirus: review of an important respiratory pathogen. *Int. J. Infect. Dis. IJID Off. Publ. Int. Soc. Infect. Dis.* 2014;25:45–52.
6. Lefebvre A, Manoha C, Bour J-B, Abbas R, Fournel I, Tiv M, et al. Human metapneumovirus in patients hospitalized with acute respiratory infections: A meta-analysis. *J. Clin. Virol.* 2016;81:68–77.
7. Easton AJ, Pringle CR. Order - Mononegavirales. In: Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ, editors. *Virus Taxon.* [Internet]. San Diego: Elsevier; 2012 [cited 2016 Apr 4]. p. 653–7. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123846846000537>
8. van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, Kuiken T, de Groot R, Fouchier RAM, et al. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat. Med.* 2001;7:719–24.
9. Peret TCT, Boivin G, Li Y, Couillard M, Humphrey C, Osterhaus ADME, et al. Characterization of human metapneumoviruses isolated from patients in North America. *J. Infect. Dis.* 2002;185:1660–3.
10. van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, Kuiken T, de Groot R, Fouchier RA, et al. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat. Med.* 2001;7:719–24.
11. van den Hoogen BG, Bestebroer TM, Osterhaus ADME, Fouchier RAM. Analysis of the Genomic Sequence of a Human Metapneumovirus. *Virology*. 2002;295:119–32.
12. Biacchesi S, Skiadopoulos MH, Boivin G, Hanson CT, Murphy BR, Collins PL, et al. Genetic diversity between human metapneumovirus subgroups. *Virology*. 2003;315:1–9.
13. Smith EC, Popa A, Chang A, Masante C, Dutch RE. Viral entry mechanisms: the increasing diversity of paramyxovirus entry. *FEBS J.* 2009;276:7217–27.
14. Anderson LJ, Hierholzer JC, Tsou C, Hendry RM, Fernie BF, Stone Y, et al. Antigenic Characterization of Respiratory Syncytial Virus Strains with Monoclonal Antibodies. *J. Infect. Dis.* 1985;151:626–33.

15. Mufson MA, Orvell C, Rafnar B, Norrby E. Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.* 1985;66 ( Pt 10):2111–24.
16. Peret TC, Hall CB, Schnabel KC, Golub JA, Anderson LJ. Circulation patterns of genetically distinct group A and B strains of human respiratory syncytial virus in a community. *J. Gen. Virol.* 1998;79 ( Pt 9):2221–9.
17. Peret TCT, Hall CB, Hammond GW, Piedra PA, Storch GA, Sullender WM, et al. Circulation Patterns of Group A and B Human Respiratory Syncytial Virus Genotypes in 5 Communities in North America. *J. Infect. Dis.* 2000;181:1891–6.
18. Auksornkitti V, Kamprasert N, Thongkomplew S, Suwannakarn K, Theamboonlers A, Samransamruajkij R, et al. Molecular characterization of human respiratory syncytial virus, 2010-2011: identification of genotype ON1 and a new subgroup B genotype in Thailand. *Arch. Virol.* 2013;159:499–507.
19. Baek YH, Choi EH, Song M-S, Pascua PNQ, Kwon H, Park S-J, et al. Prevalence and genetic characterization of respiratory syncytial virus (RSV) in hospitalized children in Korea. *Arch. Virol.* 2012;157:1039–50.
20. Cui G, Zhu R, Qian Y, Deng J, Zhao L, Sun Y, et al. Genetic Variation in Attachment Glycoprotein Genes of Human Respiratory Syncytial Virus Subgroups A and B in Children in Recent Five Consecutive Years. *PLoS ONE* [Internet]. 2013 [cited 2015 Oct 17];8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3775769/>
21. Eshaghi A, Duvvuri VR, Lai R, Nadarajah JT, Li A, Patel SN, et al. Genetic Variability of Human Respiratory Syncytial Virus A Strains Circulating in Ontario: A Novel Genotype with a 72 Nucleotide G Gene Duplication. *PLoS ONE* [Internet]. 2012 [cited 2015 Oct 17];7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3314658/>
22. Gimferrer L, Andrés C, Campins M, Codina MG, Rodrigo JA, Melendo S, et al. Circulation of a novel human respiratory syncytial virus Group B genotype during the 2014-2015 season in Catalonia (Spain). *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2015;
23. Khor C-S, Sam I-C, Hooi P-S, Chan Y-F. Displacement of predominant respiratory syncytial virus genotypes in Malaysia between 1989 and 2011. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* 2013;14:357–60.
24. Ren L, Xiao Q, Zhou L, Xia Q, Liu E. Molecular characterization of human respiratory syncytial virus subtype B: A novel genotype of subtype B circulating in China. *J. Med. Virol.* 2015;87:1–9.
25. Trento A, Galiano M, Videla C, Carballal G, García-Barreno B, Melero JA, et al. Major changes in the G protein of human respiratory syncytial virus isolates introduced by a duplication of 60 nucleotides. *J. Gen. Virol.* 2003;84:3115–20.
26. Venter M, Madhi SA, Tiemessen CT, Schoub BD. Genetic diversity and molecular epidemiology of respiratory syncytial virus over four consecutive seasons in South Africa: identification of new subgroup A and B genotypes. *J. Gen. Virol.* 2001;82:2117–24.

27. Ábrego LE, Delfraro A, Franco D, Castillo J, Castillo M, Moreno B, et al. Genetic Variability of Human Respiratory Syncytial Virus Group B in Panama Reveals a Novel Genotype BA14. *J. Med. Virol.* 2017;
28. Amer HM. Molecular Epidemiology of Human Metapneumovirus in Riyadh Province, Saudi Arabia. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2016;26:414–21.
29. Chow WZ, Chan YF, Oong XY, Ng LJ, Nor'E SS, Ng KT, et al. Genetic diversity, seasonality and transmission network of human metapneumovirus: identification of a unique sub-lineage of the fusion and attachment genes. *Sci. Rep.* [Internet]. 2016 [cited 2016 Jun 18];6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4899729/>
30. Owor BE, Masankwa GN, Mwangi LC, Njeru RW, Agoti CN, Nokes DJ. Human metapneumovirus epidemiological and evolutionary patterns in Coastal Kenya, 2007-11. *BMC Infect. Dis.* 2016;16:301.
31. Arnott A, Vong S, Sek M, Naughtin M, Beauté J, Rith S, et al. Genetic variability of human metapneumovirus amongst an all ages population in Cambodia between 2007 and 2009. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* 2013;15:43–52.
32. Huck B, Scharf G, Neumann-Haefelin D, Puppe W, Weigl J, Falcone V. Novel Human Metapneumovirus Sublineage. *Emerg. Infect. Dis.* 2006;12:147–50.
33. Houspie L, Lemey P, Keyaerts E, Reijmen E, Vergote V, Vankeerberghen A, et al. Circulation of HRSV in Belgium: From Multiple Genotype Circulation to Prolonged Circulation of Predominant Genotypes. *PLoS ONE* [Internet]. 2013 [cited 2015 Oct 30];8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3618235/>
34. Shobugawa Y, Saito R, Sano Y, Zaraket H, Suzuki Y, Kumaki A, et al. Emerging Genotypes of Human Respiratory Syncytial Virus Subgroup A among Patients in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 2009;47:2475–82.
35. Zlateva KT, Vijgen L, Dekeersmaecker N, Naranjo C, Van Ranst M. Subgroup Prevalence and Genotype Circulation Patterns of Human Respiratory Syncytial Virus in Belgium during Ten Successive Epidemic Seasons. *J. Clin. Microbiol.* 2007;45:3022–30.
36. Agoti CN, Mwiwuri AG, Sande CJ, Onyango CO, Medley GF, Cane PA, et al. Genetic Relatedness of Infecting and Reinfesting Respiratory Syncytial Virus Strains Identified in a Birth Cohort From Rural Kenya. *J. Infect. Dis.* 2012;206:1532–41.
37. Etemadi MR, Sekawi Z, Othman N, Lye M-S, Moghaddam FY. Circulation of Human Respiratory Syncytial Virus Strains Among Hospitalized Children with Acute Lower Respiratory Infection in Malaysia. *Evol. Bioinforma. Online.* 2013;9:151–61.
38. Faghihloo E, Yavarian J, Jandaghi NZS, Shadab A, Azad TM. Genotype circulation pattern of human respiratory syncytial virus in Iran. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* 2014;22:130–3.
39. Tran DN, Pham TMH, Ha MT, Tran TTL, Dang TKH, Yoshida L-M, et al. Molecular Epidemiology and Disease Severity of Human Respiratory Syncytial Virus in Vietnam. *PLoS ONE* [Internet]. 2013 [cited 2015 Oct 30];8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3551923/>

40. Yamaguchi M, Sano Y, Dapat IC, Saito R, Suzuki Y, Kumaki A, et al. High Frequency of Repeated Infections Due to Emerging Genotypes of Human Respiratory Syncytial Viruses among Children during Eight Successive Epidemic Seasons in Japan<sup>▽</sup>. *J. Clin. Microbiol.* 2011;49:1034–40.
41. Márquez-Escobar VA. Current developments and prospects on human metapneumovirus vaccines. *Expert Rev. Vaccines.* 2017;
42. PATH. RSV Vaccine Snapshot - PATH Vaccine Resource Library [Internet]. 2016 [cited 2016 Nov 19]. Available from: <http://www.path.org/vaccineresources/details.php?i=1562>
43. Tang JW, Lam TT, Zaraket H, Lipkin WI, Drews SJ, Hatchette TF, et al. Global epidemiology of non-influenza RNA respiratory viruses: data gaps and a growing need for surveillance. *Lancet Infect. Dis.* 2017;
44. Bates JT, Keefer CJ, Slaughter JC, Kulp DW, Schiefel WR, Crowe JE. Escape from neutralization by the respiratory syncytial virus-specific neutralizing monoclonal antibody palivizumab is driven by changes in on-rate of binding to the fusion protein. *Virology.* 2014;0:139–44.
45. Trento A, Casas I, Calderón A, Garcia-Garcia ML, Calvo C, Perez-Breña P, et al. Ten Years of Global Evolution of the Human Respiratory Syncytial Virus BA Genotype with a 60-Nucleotide Duplication in the G Protein Gene. *J. Virol.* 2010;84:7500–12.
46. Saikusa M, Kawakami C, Nao N, Takeda M, Usuku S, Sasao T, et al. 180-Nucleotide Duplication in the G Gene of Human metapneumovirus A2b Subgroup Strains Circulating in Yokohama City, Japan, since 2014. *Front. Microbiol.* 2017;8:402.
47. Al-Turab M, Chehadeh W, Al-Nakib W. Phylogenetic analysis of human metapneumovirus detected in hospitalized patients in Kuwait during the years 2009–2011. *J. Infect. Public Health.* 2015;8:448–57.
48. Neemuchwala A, Duvvuri VR, Marchand-Austin A, Li A, Gubbay JB. Human metapneumovirus prevalence and molecular epidemiology in respiratory outbreaks in Ontario, Canada. *J. Med. Virol.* 2015;87:269–74.
49. Tchidjou HK, Vescio F, Boros S, Guemkam G, Minka E, Lobe M, et al. Seasonal pattern of hospitalization from acute respiratory infections in Yaoundé, Cameroon. *J. Trop. Pediatr.* 2010;56:317–20.
50. Njouom R, Yekwa EL, Cappy P, Vabret A, Boisier P, Rousset D. Viral Etiology of Influenza-Like Illnesses in Cameroon, January–December 2009. *J. Infect. Dis.* 2012;206:S29–35.
51. Heraud J-M, Njouom R, Rousset D, Kadjo H, Caro V, Ndiaye MN, et al. Spatiotemporal Circulation of Influenza Viruses in 5 African Countries During 2008–2009: A Collaborative Study of the Institut Pasteur International Network. *J. Infect. Dis.* 2012;206:S5–13.
52. Morris JA, Blount RE, Savage RE. Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y. N.* 1956;92:544–9.

53. Chanock R, Roizman B, Myers R. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). I. Isolation, properties and characterization. *Am. J. Hyg.* 1957;66:281–90.
54. Do AHL, van Doorn HR, Nghiem MN, Bryant JE, Hoang TH thi, Do QH, et al. Viral Etiologies of Acute Respiratory Infections among Hospitalized Vietnamese Children in Ho Chi Minh City, 2004–2008. *PLoS ONE* [Internet]. 2011 [cited 2015 Nov 26];6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3063798/>
55. Kwofie TB, Anane YA, Nkrumah B, Annan A, Nguah SB, Owusu M. Respiratory viruses in children hospitalized for acute lower respiratory tract infection in Ghana. *Virol. J.* 2012;9:78.
56. Pretorius MA, Madhi SA, Cohen C, Naidoo D, Groome M, Moyes J, et al. Respiratory Viral Coinfections Identified by a 10-Plex Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction Assay in Patients Hospitalized With Severe Acute Respiratory Illness—South Africa, 2009–2010. *J. Infect. Dis.* 2012;206:S159–65.
57. Zhang C, Zhu N, Xie Z, Lu R, He B, Liu C, et al. Viral Etiology and Clinical Profiles of Children with Severe Acute Respiratory Infections in China. *PLoS ONE* [Internet]. 2013 [cited 2015 Nov 27];8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3750056/>
58. Sentilhes A-C, Choumlivong K, Celhay O, Sisouk T, Phonekeo D, Vongphrachanh P, et al. Respiratory virus infections in hospitalized children and adults in Lao PDR. *Influenza Other Respir. Viruses.* 2013;7:1070–8.
59. Lüsebrink J, Wiese C, Thiel A, Tillmann R-L, Ditt V, Müller A, et al. High Seroprevalence of Neutralizing Capacity against Human Metapneumovirus in All Age Groups Studied in Bonn, Germany. *Clin. Vaccine Immunol. CVI.* 2010;17:481–4.
60. Panayiotou C, Richter J, Koliou M, Kalogirou N, Georgiou E, Christodoulou C. Epidemiology of respiratory syncytial virus in children in Cyprus during three consecutive winter seasons (2010–2013): age distribution, seasonality and association between prevalent genotypes and disease severity. *Epidemiol. Infect.* 2014;142:2406–2411.
61. Reiche J, Schweiger B. Genetic Variability of Group A Human Respiratory Syncytial Virus Strains Circulating in Germany from 1998 to 2007. *J. Clin. Microbiol.* 2009;47:1800–10.
62. Tabatabai J, Prifert C, Pfeil J, Grulich-Henn J, Schnitzler P. Novel Respiratory Syncytial Virus (RSV) Genotype ON1 Predominates in Germany during Winter Season 2012–13. *PLoS ONE* [Internet]. 2014 [cited 2015 Oct 30];9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4188618/>
63. Arnott A, Vong S, Mardy S, Chu S, Naughtin M, Sovann L, et al. A Study of the Genetic Variability of Human Respiratory Syncytial Virus (HRSV) in Cambodia Reveals the Existence of a New HRSV Group B Genotype<sup>▽</sup>. *J. Clin. Microbiol.* 2011;49:3504–13.
64. Piedimonte G, Perez MK. Respiratory Syncytial Virus Infection and Bronchiolitis. *Pediatr. Rev.* 2014;35:519–30.

65. Liao RS, Appelgate DM, Pelz RK. An outbreak of severe respiratory tract infection due to human metapneumovirus in a long-term care facility for the elderly in Oregon. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 2012;53:171–3.
66. Souza JS, Watanabe A, Carraro E, Granato C, Bellei N. Severe metapneumovirus infections among immunocompetent and immunocompromised patients admitted to hospital with respiratory infection. *J. Med. Virol.* 2013;85:530–6.
67. Syha R, Beck R, Hetzel J, Ketelsen D, Grosse U, Springer F, et al. Humane metapneumovirus (HMPV) associated pulmonary infections in immunocompromised adults—Initial CT findings, disease course and comparison to respiratory-syncytial-virus (RSV) induced pulmonary infections. *Eur. J. Radiol.* 2012;81:4173–8.
68. Te Wierik MJ, Nguyen DT, Beersma MF, Thijsen SF, Heemstra KA. An outbreak of severe respiratory tract infection caused by human metapneumovirus in a residential care facility for elderly in Utrecht, the Netherlands, January to March 2010. *Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull.* 2012;17.
69. Widmer K, Zhu Y, Williams JV, Griffin MR, Edwards KM, Talbot HK. Rates of Hospitalizations for Respiratory Syncytial Virus, Human Metapneumovirus, and Influenza Virus in Older Adults. *J. Infect. Dis.* 2012;206:56–62.
70. Agapov E, Sumino KC, Gaudreault-Keener M, Storch GA, Holtzman MJ. Genetic Variability of Human Metapneumovirus Infection: Evidence of a Shift in Viral Genotype without a Change in Illness. *J. Infect. Dis.* 2006;193:396–403.
71. Reiche J, Jacobsen S, Neubauer K, Hafemann S, Nitsche A, Milde J, et al. Human Metapneumovirus: Insights from a Ten-Year Molecular and Epidemiological Analysis in Germany. *PLoS ONE [Internet]*. 2014 [cited 2015 Nov 2];9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3914980/>
72. Sloots TP, Mackay IM, Bialasiewicz S, Jacob KC, McQueen E, Harnett GB, et al. Human Metapneumovirus, Australia, 2001–2004. *Emerg. Infect. Dis.* 2006;12:1263–6.
73. Zappa A, Canuti M, Frati E, Pariani E, Perin S, Ruzza ML, et al. Co-circulation of genetically distinct human metapneumovirus and human bocavirus strains in young children with respiratory tract infections in Italy. *J. Med. Virol.* 2011;83:156–64.
74. Wang H-C, Huang S-W, Wang S-W, Tsai H-P, Kiang D, Wang S-M, et al. Co-circulating genetically divergent A2 human metapneumovirus strains among children in southern Taiwan. *Arch. Virol.* 2008;153:2207–13.
75. Zhang C, Du L-N, Zhang Z-Y, Qin X, Yang X, Liu P, et al. Detection and Genetic Diversity of Human Metapneumovirus in Hospitalized Children with Acute Respiratory Infections in Southwest China. *J. Clin. Microbiol.* 2012;50:2714–9.
76. Feuillet F, Lina B, Rosa-Calatrava M, Boivin G. Ten years of human metapneumovirus research. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 2012;53:97–105.

77. Blanc A, Delfraro A, Frabasile S, Arbiza J. Genotypes of respiratory syncytial virus group B identified in Uruguay. *Arch. Virol.* 2004;150:603–9.
78. Trento A, Viegas M, Galiano M, Videla C, Carballal G, Mistchenko AS, et al. Natural History of Human Respiratory Syncytial Virus Inferred from Phylogenetic Analysis of the Attachment (G) Glycoprotein with a 60-Nucleotide Duplication. *J. Virol.* 2006;80:975–84.
79. Dapat IC, Shobugawa Y, Sano Y, Saito R, Sasaki A, Suzuki Y, et al. New Genotypes within Respiratory Syncytial Virus Group B Genotype BA in Niigata, Japan. *J. Clin. Microbiol.* 2010;48:3423–7.
80. Peret TCT, Boivin G, Li Y, Couillard M, Humphrey C, Osterhaus ADME, et al. Characterization of Human Metapneumoviruses Isolated from Patients in North America. *J. Infect. Dis.* 2002;185:1660–3.
81. van den Hoogen BG, Herfst S, Sprong L, Cane PA, Forleo-Neto E, de Swart RL, et al. Antigenic and Genetic Variability of Human Metapneumoviruses. *Emerg. Infect. Dis.* 2004;10:658–66.
82. Bastien N, Liu L, Ward D, Taylor T, Li Y. Genetic Variability of the G Glycoprotein Gene of Human Metapneumovirus. *J. Clin. Microbiol.* 2004;42:3532–7.
83. Skiadopoulos MH, Biacchesi S, Buchholz UJ, Riggs JM, Surman SR, Amaro-Carambot E, 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;78:6927–37.
84. Wang LF, Collins PL, Fouchier RAM, Kurath G, Lamb RA, Randall RE, et al. Family - Paramyxoviridae. *Virus Taxon.* [Internet]. San Diego: Elsevier; 2012 [cited 2016 Apr 4]. p. 672–85. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123846846000562>
85. Bastien N, Normand S, Taylor T, Ward D, Peret TCT, Boivin G, et al. Sequence analysis of the N, P, M and F genes of Canadian human metapneumovirus strains. *Virus Res.* 2003;93:51–62.
86. Borchers AT, Chang C, Gershwin ME, Gershwin LJ. Respiratory Syncytial Virus—A Comprehensive Review. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 2013;45:331–79.
87. Piedimonte G. RSV infections: State of the art. *Cleve. Clin. J. Med.* 2015;82:S13-18.
88. Agrawal AS, Roy T, Ghosh S, Chawla-Sarkar M. Genetic variability of attachment (G) and Fusion (F) protein genes of human metapneumovirus strains circulating during 2006-2009 in Kolkata, Eastern India. *Virol. J.* 2011;8:67.
89. Johnson PR, Spriggs MK, Olmsted RA, Collins PL. The G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses of subgroups A and B: extensive sequence divergence between antigenically related proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1987;84:5625–9.
90. Ludewick HP, Abed Y, van Niekerk N, Boivin G, Klugman KP, Madhi SA. Human Metapneumovirus Genetic Variability, South Africa. *Emerg. Infect. Dis.* 2005;11:1074–8.
91. Peret TCT, Abed Y, Anderson LJ, Erdman DD, Boivin G. Sequence polymorphism of the predicted human metapneumovirus G glycoprotein. *J. Gen. Virol.* 2004;85:679–86.



92. García-Beato R, Martínez I, Francí C, Real FX, García-Barreno B, Melero JA. Host cell effect upon glycosylation and antigenicity of human respiratory syncytial virus G glycoprotein. *Virology*. 1996;221:301–9.
93. Palomo C, Cane PA, Melero JA. Evaluation of the antibody specificities of human convalescent-phase sera against the attachment (G) protein of human respiratory syncytial virus: Influence of strain variation and carbohydrate side chains. *J. Med. Virol.* 2000;60:468–74.
94. Palomo C, García-Barreno B, Peñas C, Melero JA. The G protein of human respiratory syncytial virus: significance of carbohydrate side-chains and the C-terminal end to its antigenicity. *J. Gen. Virol.* 1991;72 ( Pt 3):669–75.
95. Sullender WM, Mufson MA, Anderson LJ, Wertz GW. Genetic diversity of the attachment protein of subgroup B respiratory syncytial viruses. *J. Virol.* 1991;65:5425–34.
96. Aamir UB, Alam MM, Sadia H, Zaidi SSZ, Kazi BM. Molecular Characterization of Circulating Respiratory Syncytial Virus (RSV) Genotypes in Gilgit Baltistan Province of Pakistan during 2011-2012 Winter Season. *PLoS ONE* [Internet]. 2013 [cited 2015 Oct 30];8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3772930/>
97. de-Paris F, Beck C, de Souza Nunes L, Machado ABMP, Paiva RM, da Silva Menezes D, et al. Evaluation of respiratory syncytial virus group A and B genotypes among nosocomial and community-acquired pediatric infections in southern Brazil. *Virol. J.* 2014;11:36.
98. Hirsh S, Hindiyeh M, Kolet L, Regev L, Sherbany H, Yaary K, et al. Epidemiological Changes of Respiratory Syncytial Virus (RSV) Infections in Israel. *PLoS ONE* [Internet]. 2014 [cited 2015 Oct 30];9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3940902/>
99. Kushibuchi I, Kobayashi M, Kusaka T, Tsukagoshi H, Ryo A, Yoshida A, et al. Molecular evolution of attachment glycoprotein (G) gene in human respiratory syncytial virus detected in Japan 2008-2011. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* 2013;18:168–73.
100. Liu J, Mu Y, Dong W, Yao F, Wang L, Yan H, et al. Genetic variation of human respiratory syncytial virus among children with fever and respiratory symptoms in Shanghai, China, from 2009 to 2012. *Infect. Genet. Evol.* 2014;27:131–6.
101. Ohno A, Suzuki A, Lupisan S, Galang H, Sombrero L, Aniceto R, et al. Genetic characterization of human respiratory syncytial virus detected in hospitalized children in the Philippines from 2008 to 2012. *J. Clin. Virol.* 2013;57:59–65.
102. Hendricks DA, Baradaran K, McIntosh K, Patterson JL. Appearance of a soluble form of the G protein of respiratory syncytial virus in fluids of infected cells. *J. Gen. Virol.* 1987;68 ( Pt 6):1705–14.
103. Piyaratna R, Tollefson SJ, Williams JV. Genomic analysis of four human metapneumovirus prototypes. *Virus Res.* 2011;160:200–5.
104. Papenburg J, Carbonneau J, Isabel S, Bergeron MG, Williams JV, De Serres G, et al. Genetic diversity and molecular evolution of the major human metapneumovirus surface glycoproteins over a decade. *J. Clin. Virol.* 2013;58:541–7.

105. Pogka V, Moutousi A, Kossyvakis A, Kalliaropoulos A, Sgouras DN, Giannaki M, et al. Genetic variability of human metapneumo- and bocaviruses in children with respiratory tract infections. *Influenza Other Respir. Viruses*. 2014;8:107–15.
106. Piñana M, Vila J, Gimferrer L, Valls M, Andrés C, Ramón J, et al. Genetic variability of human metapneumovirus A strain circulating in Catalonia during the 2014–2015 and 2015–2016 seasons: A 180-nucleotide G gene duplication reported. *J. Clin. Virol.* 2016;82:S125.
107. Yang C-F, Wang CK, Tollefson SJ, Lintao LD, Liem A, Chu M, et al. Human metapneumovirus G protein is highly conserved within but not between genetic lineages. *Arch. Virol.* 2013;158:1245–52.
108. McLellan JS, Chen M, Leung S, Graepel KW, Du X, Yang Y, et al. Structure of RSV Fusion Glycoprotein Trimer Bound to a Prefusion-Specific Neutralizing Antibody. *Science*. 2013;340:1113–7.
109. Bates JT, Pickens JA, Schuster JE, Johnson M, Tollefson SJ, Williams JV, et al. Immunogenicity and efficacy of alphavirus-derived replicon vaccines for respiratory syncytial virus and human metapneumovirus in nonhuman primates. *Vaccine*. 2016;34:950–6.
110. Corti D, Bianchi S, Vanzetta F, Minola A, Perez L, Agatic G, et al. Cross-neutralization of four paramyxoviruses by a human monoclonal antibody. *Nature*. 2013;501:439–43.
111. Falloon J, Ji F, Curtis C, Bart S, Sheldon E, Krieger D, et al. A phase 1a, first-in-human, randomized study of a respiratory syncytial virus F protein vaccine with and without a toll-like receptor-4 agonist and stable emulsion adjuvant. *Vaccine*. 2016;34:2847–54.
112. Gilman MSA, Moin SM, Mas V, Chen M, Patel NK, Kramer K, et al. Characterization of a Prefusion-Specific Antibody That Recognizes a Quaternary, Cleavage-Dependent Epitope on the RSV Fusion Glycoprotein. *PLoS Pathog.* [Internet]. 2015;11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4498696/>
113. Rostad CA, Stobart CC, Gilbert BE, Pickles RJ, Hotard AL, Meng J, et al. A Recombinant Respiratory Syncytial Virus Vaccine Candidate Attenuated by a Low-Fusion F Protein Is Immunogenic and Protective against Challenge in Cotton Rats. *J. Virol.* 2016;90:7508–18.
114. Tan L, Coenjaerts FEJ, Houspie L, Viveen MC, van Bleek GM, Wiertz EJHJ, et al. The Comparative Genomics of Human Respiratory Syncytial Virus Subgroups A and B: Genetic Variability and Molecular Evolutionary Dynamics. *J. Virol.* 2013;87:8213–26.
115. Hirano E, Kobayashi M, Tsukagoshi H, Yoshida LM, Kuroda M, Noda M, et al. Molecular evolution of human respiratory syncytial virus attachment glycoprotein (G) gene of new genotype ON1 and ancestor NA1. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* 2014;28:183–91.
116. Bose ME, He J, Shrivastava S, Nelson MI, Bera J, Halpin RA, et al. Sequencing and Analysis of Globally Obtained Human Respiratory Syncytial Virus A and B Genomes. *PLoS ONE* [Internet]. 2015 [cited 2015 Oct 30];10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4368745/>
117. Cane PA. Analysis of linear epitopes recognised by the primary human antibody response to a variable region of the attachment (G) protein of respiratory syncytial virus. *J. Med. Virol.* 1997;51:297–304.

118. Norrby E, Mufson MA, Alexander H, Houghten RA, Lerner RA. Site-directed serology with synthetic peptides representing the large glycoprotein G of respiratory syncytial virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1987;84:6572–6.
119. Botosso VF, de A. Zanotto PM, Ueda M, Arruda E, Gilio AE, Vieira SE, et al. Positive Selection Results in Frequent Reversible Amino Acid Replacements in the G Protein Gene of Human Respiratory Syncytial Virus. *PLoS Pathog.* [Internet]. 2009 [cited 2015 Nov 7];5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2603285/>
120. de Graaf M, Osterhaus ADME, Fouchier RAM, Holmes EC. Evolutionary dynamics of human and avian metapneumoviruses. *J. Gen. Virol.* 2008;89:2933–42.
121. Yang C-F, Wang CK, Tollefson SJ, Piyaratna R, Lintao LD, Chu M, et al. Genetic diversity and evolution of human metapneumovirus fusion protein over twenty years. *Virol. J.* 2009;6:138.
122. Gimferrer L, Campins M, Codina MG, Martín M del C, Fuentes F, Esperalba J, et al. Molecular epidemiology and molecular characterization of respiratory syncytial viruses at a tertiary care university hospital in Catalonia (Spain) during the 2013–2014 season. *J. Clin. Virol.* 2015;66:27–32.
123. Agoti CN, Gitahi CW, Medley GF, Cane PA, Nokes DJ. Identification of group B respiratory syncytial viruses that lack the 60-nucleotide duplication after six consecutive epidemics of total BA dominance at coastal Kenya. *Influenza Other Respir. Viruses.* 2013;7:1008–12.
124. Hause AM, Henke DM, Avadhanula V, Shaw CA, Tapia LI, Piedra PA. Sequence variability of the respiratory syncytial virus (RSV) fusion gene among contemporary and historical genotypes of RSV/A and RSV/B. *PLoS One.* 2017;12:e0175792.
125. Williams JV, Edwards KM, Weinberg GA, Griffin MR, Hall CB, Zhu Y, et al. Population-Based Incidence of Human Metapneumovirus in Hospitalized Children. *J. Infect. Dis.* 2010;201:1890–8.
126. Legrand L, Vabret A, Dina J, Petitjean-Lecherbonnier J, Stéphanie G, Cuvillon D, et al. Epidemiological and phylogenetic study of human metapneumovirus infections during three consecutive outbreaks in Normandy, France. *J. Med. Virol.* 2011;83:517–24.
127. Ren L, Xia Q, Xiao Q, Zhou L, Zang N, Long X, et al. The genetic variability of glycoproteins among respiratory syncytial virus subtype A in China between 2009 and 2013. *Infect. Genet. Evol.* 2014;27:339–47.
128. Almajhdi FN, Farrag MA, Amer HM. Genetic diversity in the G protein gene of group A human respiratory syncytial viruses circulating in Riyadh, Saudi Arabia. *Arch. Virol.* 2013;159:73–81.
129. Forcic D, Ivancic-Jelecki J, Mlinaric-Galinovic G, Vojnovic G, Babic-Erceg A, Tabain I. A study of the genetic variability of human respiratory syncytial virus in Croatia, 2006–2008. *J. Med. Virol.* 2012;84:1985–92.
130. Choudhary ML, Anand SP, Wadhwa BS, Chadha MS. Genetic variability of human respiratory syncytial virus in Pune, Western India. *Infect. Genet. Evol.* 2013;20:369–77.

131. Pretorius MA, Niekerk S van, Tempia S, Moyes J, Cohen C, Madhi SA, et al. Replacement and Positive Evolution of Subtype A and B Respiratory Syncytial Virus G-Protein Genotypes From 1997–2012 in South Africa. *J. Infect. Dis.* 2013;208:S227–37.
132. Singleton RJ, Bulkow LR, Miernyk K, DeByle C, Pruitt L, Hummel KB, et al. Viral respiratory infections in hospitalized and community control children in Alaska. *J. Med. Virol.* 2010;82:1282–90.
133. Régnier S, Huels J. Association between Respiratory Syncytial Virus Hospitalizations in Infants and Respiratory Sequelae: Systematic Review and Meta-Analysis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2013;1.
134. Boivin G, De Serres G, Côté S, Gilca R, Abed Y, Rochette L, et al. Human metapneumovirus infections in hospitalized children. *Emerg. Infect. Dis.* 2003;9:634–641.
135. Williams JV, Harris PA, Tollefson SJ, Halburnt-Rush LL, Pingsterhaus JM, Edwards KM, et al. Human metapneumovirus and lower respiratory tract disease in otherwise healthy infants and children. *N. Engl. J. Med.* 2004;350:443–450.
136. Embarek Mohamed MS, Reiche J, Jacobsen S, Thabit AG, Badary MS, Brune W, et al. Molecular Analysis of Human Metapneumovirus Detected in Patients with Lower Respiratory Tract Infection in Upper Egypt. *Int. J. Microbiol.* [Internet]. 2014 [cited 2015 Nov 18];2014. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3941176/>
137. Velez Rueda AJ, Mistchenko AS, Viegas M. Phylogenetic and Phylodynamic Analyses of Human Metapneumovirus in Buenos Aires (Argentina) for a Three-Year Period (2009–2011). *PLoS ONE* [Internet]. 2013 [cited 2015 Nov 2];8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3639999/>
138. Arnott A, Sek M, Vong S, Buchy P. Molecular epidemiology of human metapneumovirus (hMPV) in Cambodia. *BMC Proc.* 2011;5:P71.
139. Subcommittee on Diagnosis and Management of Bronchiolitis. Diagnosis and Management of Bronchiolitis. *Pediatrics.* 2006;118:1774–93.
140. Xiao N, Zhang B, Xie Z, Zhou Q, Zhang R, Zhong L, et al. Prevalence of human metapneumovirus in children with acute lower respiratory infection in Changsha, China. *J. Med. Virol.* 2013;85:546–53.
141. Dokos C, Masjosthusmann K, Rellensmann G, Werner C, Schuler-Lüttmann S, Müller K-M, et al. Fatal human metapneumovirus infection following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transpl. Infect. Dis.* 2013;15:E97–101.
142. Simões EAF, Mutyara K, Soh S, Agustian D, Hibberd ML, Kartasasmita CB. The epidemiology of respiratory syncytial virus lower respiratory tract infections in children less than 5 years of age in Indonesia. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2011;30:778–84.
143. Fodha I, Vabret A, Ghedira L, Seboui H, Chouchane S, Dewar J, et al. Respiratory syncytial virus infections in hospitalized infants: Association between viral load, virus subgroup, and disease severity. *J. Med. Virol.* 2007;79:1951–8.

144. Houben M I., Coenjaerts F e. j., Rossen J w. a., Belderbos M e., Hofland R w., Kimpen J I. I., et al. Disease severity and viral load are correlated in infants with primary respiratory syncytial virus infection in the community. *J. Med. Virol.* 2010;82:1266–71.
145. Foulongne V, Guyon G, Rodière M, Segondy M. Human metapneumovirus infection in young children hospitalized with respiratory tract disease. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2006;25:354–359.
146. Fouchier RAM, Kuiken T, Schutten M, van Amerongen G, van Doornum GJJ, van den Hoogen BG, et al. Aetiology: Koch's postulates fulfilled for SARS virus. *Nature.* 2003;423:240–240.
147. Lehtinen P, Ruohola A, Vanto T, Vuorinen T, Ruuskanen O, Jartti T. Prednisolone reduces recurrent wheezing after a first wheezing episode associated with rhinovirus infection or eczema. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2007;119:570–5.
148. Bordley W, Viswanathan M, King VJ, et al. Diagnosis and testing in bronchiolitis: A systematic review. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* 2004;158:119–26.
149. Svraka S, Rosario K, Duizer E, van der Avoort H, Breitbart M, Koopmans M. Metagenomic sequencing for virus identification in a public-health setting. *J. Gen. Virol.* 2010;91:2846–56.
150. Rogers BB, Shankar P, Jerris RC, Kotzbauer D, Anderson EJ, Watson JR, et al. Impact of a Rapid Respiratory Panel Test on Patient Outcomes. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2014;139:636–41.
151. Ginocchio CC. Detection of respiratory viruses using non-molecular based methods. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 2007;40 Suppl 1:S11-14.
152. Tuan TA, Thanh TT, Hai N thi T, Tinh LBB, Kim L thi N, Do LAH, et al. Characterization of hospital and community-acquired respiratory syncytial virus in children with severe lower respiratory tract infections in Ho Chi Minh City, Vietnam, 2010. *Influenza Other Respir. Viruses.* 2015;9:110–9.
153. Loeffelholz MJ, Pong DL, Pyles RB, Xiong Y, Miller AL, Bufton KK, et al. Comparison of the FilmArray Respiratory Panel and Prodesse Real-Time PCR Assays for Detection of Respiratory Pathogens. *J. Clin. Microbiol.* 2011;49:4083–8.
154. Lee CK, Lee HK, Ng CWS, Chiu L, Tang JWT, Loh TP, et al. Comparison of Luminex NxTAG Respiratory Pathogen Panel and xTAG Respiratory Viral Panel FAST Version 2 for the Detection of Respiratory Viruses. *Ann. Lab. Med.* 2017;37:267–71.
155. Andersson ME, Olofsson S, Lindh M. Comparison of the FilmArray assay and in-house real-time PCR for detection of respiratory infection. *Scand. J. Infect. Dis.* 2014;46:897–901.
156. Hwang SM, Lim MS, Han M, Hong YJ, Kim TS, Lee HR, et al. Comparison of xTAG respiratory virus panel and Verigene Respiratory Virus Plus for detecting influenza virus and respiratory syncytial virus. *J. Clin. Lab. Anal.* 2015;29:116–21.
157. Ruggiero P, McMillen T, Tang Y-W, Babady NE. Evaluation of the BioFire FilmArray Respiratory Panel and the GenMark eSensor Respiratory Viral Panel on Lower Respiratory Tract Specimens. *J. Clin. Microbiol.* 2014;52:288–90.

158. Salez N, Vabret A, Leruez-Ville M, Andreoletti L, Carrat F, Renois F, et al. Evaluation of Four Commercial Multiplex Molecular Tests for the Diagnosis of Acute Respiratory Infections. Chan KH, editor. PLOS ONE. 2015;10:e0130378.
159. Al-Turab M, Chehadeh W, Al-Mulla F, Al-Nakib W. Evaluation of the PrimerDesign™ genesig real-time reverse transcription–polymerase chain reaction assay and the INFINITI® Respiratory Viral Panel Plus assay for the detection of human metapneumovirus in Kuwait. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2012;72:358–62.
160. Barratt K, Anderson TP, Fahey JA, Jennings LC, Werno AM, Murdoch DR. Comparison of the fast track diagnostics respiratory 21 and Seegene Allplex multiplex polymerase chain reaction assays for the detection of respiratory viruses. *Br. J. Biomed. Sci.* 2017;74:85–9.
161. Paba P, Farchi F, Mortati E, Ciccozzi M, Piperno M, Perno CF, et al. Screening of respiratory pathogens by Respiratory Multi Well System (MWS) r-gene™ assay in hospitalized patients. *New Microbiol.* 2014;37:231–6.
162. Wolff BJ, Bramley AM, Thurman KA, Whitney CG, Whitaker B, Self WH, et al. Improved Detection of Respiratory Pathogens by Use of High-Quality Sputum with TaqMan Array Card Technology. *J. Clin. Microbiol.* 2017;55:110–21.
163. Burton RE, White EJ, Foss TR, Phillips KM, Meltzer RH, Kojanian N, et al. A microfluidic chip-compatible bioassay based on single-molecule detection with high sensitivity and multiplexing. *Lab. Chip.* 2010;10:843–51.
164. Chen K-F, Blyn L, Rothman RE, Ramachandran P, Valsamakis A, Ecker D, et al. Reverse transcription polymerase chain reaction and electrospray ionization mass spectrometry for identifying acute viral upper respiratory tract infections. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2011;69:179–86.
165. Shanmukh S, Jones L, Zhao Y-P, Driskell JD, Tripp RA, Dluhy RA. Identification and classification of respiratory syncytial virus (RSV) strains by surface-enhanced Raman spectroscopy and multivariate statistical techniques. *Anal. Bioanal. Chem.* 2008;390:1551–5.
166. international M des A étrangères et du D. Géographie et histoire [Internet]. Fr. Dipl. Ministère Aff. Étrangères Dév. Int. 2016 [cited 2017 Jan 19]. Available from: <http://www.diplomatie.gouv.fr/fr/dossiers-pays/cameroun/presentation-du-cameroun/article/geographie-et-histoire-8432>
167. Institut National de la Statistique. Annuaire Statistique du Cameroun , édition 2015 [Internet]. 2015 [cited 2017 Feb 28]. Available from: <http://www.statistics-cameroon.org/manager.php?id=6>
168. Djoufack-Manetsa V. Etude multi-échelles des précipitations et du couvert végétal au Cameroun : analyses spatiales, tendances temporelles, facteurs climatiques et anthropiques de variabilité du NDVI [Internet] [phdthesis]. Université de Bourgogne ; UNIVERSITE DE YAOUNDE; 2011 [cited 2017 Mar 2]. Available from: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00704629/document>

169. Olivry JC. Fleuves et Rivières du Cameroun. Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique au Cameroun; 1986.
170. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 1994;22:4673–80.
171. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 2013;30:2725–9.
172. NetNGlyc 1.0 Server [Internet]. [cited 2015 Oct 23]. Available from: <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>
173. NetOGlyc 4.0 Server [Internet]. [cited 2015 Oct 23]. Available from: <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>
174. Julenius K, Mølgaard A, Gupta R, Brunak S. Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. *Glycobiology.* 2005;15:153–64.
175. Pond SLK, Frost SDW. Not So Different After All: A Comparison of Methods for Detecting Amino Acid Sites Under Selection. *Mol. Biol. Evol.* 2005;22:1208–22.
176. Adaptive Evolution Server @ Datamonkey.org [Internet]. [cited 2015 Oct 23]. Available from: <http://www.datamonkey.org/>
177. Bonzel L, Tenenbaum T, Schrotten H, Schildgen O, Schweitzer-Krantz S, Adams O. Frequent detection of viral coinfection in children hospitalized with acute respiratory tract infection using a real-time polymerase chain reaction. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2008;27:589–94.
178. Nascimento-Carvalho CM, Ribeiro CT, Cardoso MRA, Barral A, Araújo-Neto CA, Oliveira JR, et al. The role of respiratory viral infections among children hospitalized for community-acquired pneumonia in a developing country. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2008;27:939–41.
179. Rhedin S, Hamrin J, Naucler P, Bennet R, Rotzén-Östlund M, Färnert A, et al. Respiratory Viruses in Hospitalized Children with Influenza-Like Illness during the H1n1 2009 Pandemic in Sweden. *PLoS ONE* [Internet]. 2012 [cited 2015 Nov 26];7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3522717/>
180. Suzuki A, Lupisan S, Furuse Y, Fuji N, Saito M, Tamaki R, et al. Respiratory viruses from hospitalized children with severe pneumonia in the Philippines. *BMC Infect. Dis.* 2012;12:267.
181. Yoshida LM, Suzuki M, Yamamoto T, Nguyen HA, Nguyen CD, Nguyen AT, et al. Viral pathogens associated with acute respiratory infections in central vietnamese children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2010;29:75–7.
182. Khor C-S, Sam I-C, Hooi P-S, Quek K-F, Chan Y-F. Epidemiology and seasonality of respiratory viral infections in hospitalized children in Kuala Lumpur, Malaysia: a retrospective study of 27 years. *BMC Pediatr.* 2012;12:32.

183. Huguenin A, Moutte L, Renois F, Leveque N, Talmud D, Abely M, et al. Broad respiratory virus detection in infants hospitalized for bronchiolitis by use of a multiplex RT-PCR DNA microarray system. *J. Med. Virol.* 2012;84:979–85.
184. Uršič T, Jevšnik M, Zigon N, Krivec U, Beden AB, Praprotnik M, et al. Human bocavirus and other respiratory viral infections in a 2-year cohort of hospitalized children. *J. Med. Virol.* 2012;84:99–108.
185. O’Callaghan-Gordo C, Bassat Q, Morais L, Díez-Padrisa N, Machevo S, Nhampossa T, et al. Etiology and epidemiology of viral pneumonia among hospitalized children in rural Mozambique: a malaria endemic area with high prevalence of human immunodeficiency virus. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2011;30:39–44.
186. Hierholzer JC. Adenoviruses in the immunocompromised host. *Clin. Microbiol. Rev.* 1992;5:262–74.
187. Broor S, Dawood FS, Pandey BG, Saha S, Gupta V, Krishnan A, et al. Rates of respiratory virus-associated hospitalization in children aged <5 years in rural northern India. *J. Infect.* 2014;68:281–9.
188. Jennings LC, Anderson TP, Werno AM, Beynon KA, Murdoch DR. 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;23:1003–7.
189. Mathisen M, Basnet S, Sharma A, Shrestha PS, Sharma BN, Valentiner-Branth P, et al. RNA viruses in young Nepalese children hospitalized with severe pneumonia. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2011;30:1032–6.
190. Jartti T, Hedman K, Jartti L, Ruuskanen O, Allander T, Söderlund-Venermo M. Human bocavirus—the first 5 years. *Rev. Med. Virol.* 2012;22:46–64.
191. Noyola DE, Rodríguez-Moreno G, Sánchez-Alvarado J, Martínez-Wagner R, Ochoa-Zavala JR. Viral etiology of lower respiratory tract infections in hospitalized children in Mexico. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2004;23:118–23.
192. Yin CC, Huah LW, Lin JTP, Goh A, Ling H, Moh CO. Lower respiratory tract infection in hospitalized children. *Respirol. Carlton Vic.* 2003;8:83–9.
193. Mullins JA, Erdman DD, Weinberg GA, Edwards K, Hall CB, Walker FJ, et al. Human metapneumovirus infection among children hospitalized with acute respiratory illness. *Emerg Infect Dis.* 2004;10:700–5.
194. Bastien N, Ward D, Van Caesele P, Brandt K, Lee SHS, McNabb G, et al. Human Metapneumovirus Infection in the Canadian Population. *J. Clin. Microbiol.* 2003;41:4642–6.
195. Garcia J, Sovero M, Kochel T, Laguna-Torres VA, Gamero ME, Gomez J, et al. Human metapneumovirus strains circulating in Latin America. *Arch. Virol.* 2011;157:563–8.
196. Dollner H, Risnes K, Radtke A, Nordb?? SA. Outbreak of Human Metapneumovirus Infection in Norwegian Children: *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2004;23:436–40.



197. Hoogen BG van den, Doornum GJJ van, Fockens JC, Cornelissen JJ, Beyer WEP, Groot R de, et al. Prevalence and Clinical Symptoms of Human Metapneumovirus Infection in Hospitalized Patients. *J. Infect. Dis.* 2003;188:1571–7.
198. McAdam AJ, Hasenbein ME, Feldman HA, Cole SE, Offermann JT, Riley AM, et al. Human metapneumovirus in children tested at a tertiary-care hospital. *J. Infect. Dis.* 2004;190:20–26.
199. Peiris JS, Tang WH, Chan KH, Khong PL, Guan Y, Lau YL, et al. Children with respiratory disease associated with metapneumovirus in Hong Kong. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2003 [cited 2016 May 10];9. Available from: [http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/9/6/03-0009\\_article.htm](http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/9/6/03-0009_article.htm)
200. Gimferrer L, Andrés C, Campins M, Codina MG, Rodrigo JA, Melendo S, et al. Circulation of a novel human respiratory syncytial virus group B genotype during the 2014-2015 season in Catalonia (Spain). *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2015;
201. Kim HR, Cho AR, Lee M-K, Yun SW, Kim T-H. Genotype variability and clinical features of human metapneumovirus isolated from Korean children, 2007 to 2010. *J. Mol. Diagn. JMD.* 2012;14:61–4.
202. Semple MG, Cowell A, Dove W, Greensill J, McNamara PS, Halfhide C, et al. Dual Infection of Infants by Human Metapneumovirus and Human Respiratory Syncytial Virus Is Strongly Associated with Severe Bronchiolitis. *J. Infect. Dis.* 2005;191:382–6.
203. van Woensel JBM, Bos AP, Lutter R, Rossen JWA, Schuurman R. Absence of human metapneumovirus co-infection in cases of severe respiratory syncytial virus infection. *Pediatr. Pulmonol.* 2006;41:872–4.
204. Lekana-Douki SE, Nkoghe D, Drosten C, Ngoungou EB, Drexler JF, Leroy EM. Viral etiology and seasonality of influenza-like illness in Gabon, March 2010 to June 2011. *BMC Infect. Dis.* 2014;14:373.
205. Smuts H, Workman L, Zar HJ. Role of human metapneumovirus, human coronavirus NL63 and human bocavirus in infants and young children with acute wheezing. *J. Med. Virol.* 2008;80:906–12.
206. Choudhary ML, Anand SP, Sonawane NS, Chadha MS. Development of real-time RT-PCR for detection of human metapneumovirus and genetic analysis of circulating strains (2009-2011) in Pune, India. *Arch. Virol.* 2014;159:217–25.
207. Mackay IM, Bialasiewicz S, Jacob KC, McQueen E, Arden KE, Nissen MD, et al. Genetic Diversity of Human Metapneumovirus over 4 Consecutive Years in Australia. *J. Infect. Dis.* 2006;193:1630–3.
208. Pizzorno A, Masner M, Médici C, Sarachaga M j., Rubio I, Mirazo S, et al. Molecular detection and genetic variability of human metapneumovirus in Uruguay. *J. Med. Virol.* 2010;82:861–5.
209. Ishiguro N, Ebihara T, Endo R, Ma X, Kikuta H, Ishiko H, et al. High Genetic Diversity of the Attachment (G) Protein of Human Metapneumovirus. *J. Clin. Microbiol.* 2004;42:3406–14.
210. PATH. RSV Vaccine and mAb Snapshot - PATH Vaccine Resource Library [Internet]. 2017 [cited 2017 Aug 15]. Available from: <http://www.path.org/vaccineresources/details.php?i=1562>

211. Agoti CN, Otieno JR, Ngama M, Mwiwuri AG, Medley GF, Cane PA, et al. Successive Respiratory Syncytial Virus Epidemics in Local Populations Arise from Multiple Variant Introductions, Providing Insights into Virus Persistence. *J. Virol.* 2015;89:11630–42.
212. Fall A, Dia N, Cisse EHAK, Kiori DE, Sarr FD, Sy S, et al. Epidemiology and Molecular Characterization of Human Respiratory Syncytial Virus in Senegal after Four Consecutive Years of Surveillance, 2012–2015. *PLoS One.* 2016;11:e0157163.
213. Kenmoe S, Tchendjou P, Vernet M-A, Moyo-Tetang S, Mossus T, Njankouo-Ripa M, et al. Viral etiology of Severe Acute Respiratory Infections in hospitalized children in Cameroon, 2011–2013. *Influenza Other Respir. Viruses.* 2016;n/a-n/a.
214. Kholy AAE, Mostafa NA, Ali AA, El-Sherbini SA, Ismail RI, Magdy RI, et al. Risk factors of prolonged hospital stay in children with viral severe acute respiratory infections. *J. Infect. Dev. Ctries.* 2014;8:1285–93.
215. Lekana-Douki SE, Nkoghe D, Drosten C, Ngoungou EB, Drexler JF, Leroy EM. Viral etiology and seasonality of influenza-like illness in Gabon, March 2010 to June 2011. *BMC Infect. Dis.* 2014;14:373.
216. Breiman RF, Cosmas L, Njenga MK, Williamson J, Mott JA, Katz MA, et al. Severe acute respiratory infection in children in a densely populated urban slum in Kenya, 2007–2011. *BMC Infect. Dis.* [Internet]. 2015 [cited 2015 Sep 4];15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4351931/>
217. Hindiyeh MY, Keller N, Mandelboim M, Ram D, Rubinov J, Regev L, et al. High rate of human bocavirus and adenovirus coinfection in hospitalized Israeli children. *J. Clin. Microbiol.* 2008;46:334–7.
218. Li Y, Zhou W, Zhao Y, Wang Y, Xie Z, Lou Y, et al. Molecular typing and epidemiology profiles of human adenovirus infection among paediatric patients with severe acute respiratory infection in China. *PLoS One.* 2015;10:e0123234.
219. McMorrow ML, Wemakoy EO, Tshilobo JK, Emukule GO, Mott JA, Njuguna H, et al. Severe Acute Respiratory Illness Deaths in Sub-Saharan Africa and the Role of Influenza: A Case Series From 8 Countries. *J. Infect. Dis.* 2015;212:853–60.
220. Harrach B, Benkö M, Both G, Brown M, Davison A, Echavarría M, et al. Family Adenoviridae. In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ, editors. *Virus Taxonomy. 9th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* N. Y. Elsevier. 2011;125–141.
221. Seto D, Chodosh J, Brister JR, Jones MS. Using the Whole-Genome Sequence To Characterize and Name Human Adenoviruses<sup>▽</sup>. *J. Virol.* 2011;85:5701–2.
222. Radin JM, Hawksworth AW, Blair PJ, Faix DJ, Raman R, Russell KL, et al. Dramatic Decline of Respiratory Illness Among US Military Recruits After the Renewed Use of Adenovirus Vaccines. *Clin. Infect. Dis.* 2014;59:962–8.
223. Wold WS, Toth K. New drug on the horizon for treating adenovirus. *Expert Opin. Pharmacother.* 2015;0:1–5.

224. Ghanaïem H, Averbuch D, Koplewitz BZ, Yatsiv I, Braun J, Dehtyar N, et al. An outbreak of adenovirus type 7 in a residential facility for severely disabled children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2011;30:948–52.
225. Kenmoe S, Tchendjou P, Moyo Tetang S, Mossus T, Njankouo Ripa M, Guillet M, et al. Evaluating the performance of a rapid antigen test for the detection of influenza virus in clinical specimens from children in Cameroon. *Influenza Other Respir. Viruses.* 2014;8:131–4.
226. Sriwanna P, Chieochansin T, Vuthitanachot C, Vuthitanachot V, Theamboonlers A, Poovorawan Y. Molecular characterization of human adenovirus infection in Thailand, 2009–2012. *Viol. J.* 2013;10:193.
227. Leruez-Ville M, Minard V, Lacaille F, Buzyn A, Abachin E, Blanche S, et al. Real-Time Blood Plasma Polymerase Chain Reaction for Management of Disseminated Adenovirus Infection. *Clin. Infect. Dis.* 2004;38:45–52.
228. Watzinger F, Suda M, Preuner S, Baumgartinger R, Ebner K, Baskova L, et al. Real-Time Quantitative PCR Assays for Detection and Monitoring of Pathogenic Human Viruses in Immunosuppressed Pediatric Patients. *J. Clin. Microbiol.* 2004;42:5189–98.
229. Demian PN, Horton KC, Kajon A, Siam R, Hasanin AMN, Elgohary Sheta A, et al. Molecular identification of adenoviruses associated with respiratory infection in Egypt from 2003 to 2010. *BMC Infect. Dis.* 2014;14:50.
230. Qurei L, Seto D, Salah Z, Azzeh M. A Molecular Epidemiology Survey of Respiratory Adenoviruses Circulating in Children Residing in Southern Palestine. *PLoS ONE* [Internet]. 2012 [cited 2015 Sep 4];7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3411832/>
231. Wang S-L, Chi C-Y, Kuo P-H, Tsai H-P, Wang S-M, Liu C-C, et al. High-Incidence of Human Adenoviral Co-Infections in Taiwan. *PLoS ONE* [Internet]. 2013 [cited 2015 Sep 4];8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3779158/>
232. Chen M, Zhu Z, Huang F, Liu D, Zhang T, Ying D, et al. Adenoviruses associated with acute respiratory diseases reported in Beijing from 2011 to 2013. *PloS One.* 2015;10:e0121375.
233. Ishiko H, Aoki K. Spread of Epidemic Keratoconjunctivitis Due to a Novel Serotype of Human Adenovirus in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 2009;47:2678–9.
234. Jones MS, Harrach B, Ganac RD, Gozum MMA, dela Cruz WP, Riedel B, et al. New Adenovirus Species Found in a Patient Presenting with Gastroenteritis. *J. Virol.* 2007;81:5978–84.
235. Walsh MP, Chintakuntlawar A, Robinson CM, Madisch I, Harrach B, Hudson NR, et al. Evidence of Molecular Evolution Driven by Recombination Events Influencing Tropism in a Novel Human Adenovirus that Causes Epidemic Keratoconjunctivitis. *PLoS ONE* [Internet]. 2009 [cited 2015 Sep 5];4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2685984/>
236. Walsh MP, Seto J, Jones MS, Chodosh J, Xu W, Seto D. Computational Analysis Identifies Human Adenovirus Type 55 as a Re-Emergent Acute Respiratory Disease Pathogen. *J. Clin. Microbiol.* 2010;48:991–3.

237. Abbas KZ, Lombos E, Duvvuri VR, Olsha R, Higgins RR, Gubbay JB. Temporal changes in respiratory adenovirus serotypes circulating in the greater Toronto area, Ontario, during December 2008 to April 2010. *Virology*. 2013;10:15.
238. Ampuero JS, Ocaña V, Gómez J, Gamero ME, Garcia J, Halsey ES, et al. Adenovirus Respiratory Tract Infections in Peru. *PLoS ONE* [Internet]. 2012 [cited 2015 Sep 4];7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3466214/>
239. Lynch JP, Fishbein M, Echavarria M. Adenovirus. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 2011;32:494–511.
240. Robinson CM, Singh G, Henquell C, Walsh MP, Peigue-Lafeuille H, Seto D, et al. Computational analysis and identification of an emergent human adenovirus pathogen implicated in a respiratory fatality. *Virology*. 2011;409:141–7.
241. Mandelboim M, Dror P, Azar R, Bromberg M, Mendelson E. Adenovirus infections in hospitalized patients in Israel: epidemiology and molecular characterization. *J. Clin. Microbiol.* 2011;49:597–601.

# **Annexes**

## Annexes

### Annexe 1 : Séquences de références utilisées pour la figure 2A

Nombre	Numéro Genbank	Virus	Génotype	Origine
1	HQ699278	A/Korea/CB824/09	CBA	Corée du Sud
2	HQ699279	A/Korea/CB851/09	CBA	Corée du Sud
3	HQ699280	A/Korea/CB887/09	CBA	Corée du Sud
4	HQ699281	A/Korea/CB929/10	CBA	Corée du Sud
5	AF065257	CH34	GA1	USA
6	AF233902	AL19471-5	GA1	USA
7	AF233914	MO48	GA1	USA
8	AF233917	NY108	GA1	USA
9	M11486	Ref_Strain_A2	GA1	USA
10	AF065256	CH28	GA2	USA
11	AF065258	CH57	GA2	USA
12	AF233900	AL19376-1	GA2	USA
13	AF233915	MO55	GA2	USA
14	AF233923	TX69564	GA2	USA
15	AF233905	CN2395	GA3	USA
16	AF233911	MO13	GA3	USA
17	AF233913	MO16	GA3	USA
18	AF233920	TX68481	GA3	USA
19	AF233921	TX68532	GA3	USA
20	AF065254	CH09	GA4	USA
21	AF065255	CH17	GA5	USA
22	AF233903	AL19556-3	GA5	USA
23	AF233906	CN2708	GA5	USA
24	AF233908	CN3114	GA5	USA
25	AF233909	MO01	GA5	USA
26	AF233912	MO15	GA5	USA
27	AF233916	NY103	GA5	USA
28	AF233919	TX67951	GA5	USA
29	AF233922	TX69343	GA5	USA
30	AF233901	AL19452-2	GA6	USA
31	AF233918	NY20	GA6	USA
32	AF233904	CN1973	GA7	USA
33	AF233907	CN2851	GA7	USA
34	AF233910	MO02	GA7	USA
35	AB470478	NG-016-04	NA1	Japon
36	AB603450	NG-143-05	NA1	Japon
37	AB470479	NG-082-05	NA2	Japon
38	AB603444	NG-048-06	NA2	Japon
39	AB603445	NG-073-08	NA2	Japon
40	KC297260	BJ/28170	NA3	Chine
41	KC297277	BJ/29240	NA3	Chine
42	KC297292	BJ/30318	NA3	Chine
43	KC297324	BJ/33852	NA4	Chine
44	KC297374	BJ/36578	NA4	Chine
45	KC297381	BJ/F5166	NA4	Chine
46	JN257693	ON67-1210A	ON1	Canada
47	JN257694	ON138-0111A	ON1	Canada
48	AF348807	SA98V603	SAA1	Afrique du Sud
49	AF348808	SA99V1239	SAA1	Afrique du Sud
50	AF348809	SA97D669	SAA1	Afrique du Sud

Annexe 2 : Séquences de références utilisées pour la figure 2B

Nombre	Numéro Genbank	Virus	Génotype	Origine
1	AY333364	BA4128/99B	BA1	Argentine
2	DQ227374	BA/733/02	BA1	Argentine
3	HM459892	NG-050-09	BA10	Japon
4	HM459891	NG-065-07	BA10	Japon
5	KX262619	VH100156228	BA13	Espagne
6	KX262625	VH100119962	BA13	Espagne
7	KF300970.2	PAN1B/2008	BA14	Panama
8	KF300959.2	PAN12B/2008	BA14	Panama
9	DQ227393	BA/5140/03	BA2	Argentine
10	DQ227389	BA/4826/03	BA2	Argentine
11	DQ227397	BA/1607/04	BA3	Argentine
12	DQ227388	BA/1889/02	BA3	Argentine
13	DQ227407	BA/493/04	BA4	Argentine
14	DQ227408	BA/1526/04	BA4	Argentine
15	AB175819	NG-004-03	BA5	Japon
16	AB175820	NG-006-03	BA5	Japon
17	AY751117	BE/13159/02	BA6	Belgique
18	AY751110	BE/46/03	BA6	Belgique
19	HM459868	NG-082-07	BA7	Japon
20	HM459864	NG-068-05	BA7	Japon
21	HM459873	NG-013-07	BA8	Japon
22	HM459871	NG-228-06	BA8	Japon
23	HM459878	NG-119-07	BA9	Japon
24	HM459877	NG-149-06	BA9	Japon
25	KC297456	BJ/23544	BAC	Chine
26	KC297486	BJ/F9743	BAC	Chine
27	KC297428	BJ/20410	CB1	Chine
28	KC297427	BJ/20265	CB1	Chine
29	HQ699300	B/Korea/CB616/090	CBB	Corée du Sud
30	HQ699304	B/Korea/CB757/09	CBB	Corée du Sud
31	AF065250	CH10b	GB1	USA
32	AF065251	CH93-9b	GB2	USA
33	AF348814	SA99V470	GB3	Afrique du Sud
34	AF348815	SA98V153	GB3	Afrique du Sud
35	AF233924	AL19734-4	GB4	USA
36	AF233931	NY01	GB4	USA
37	KC461291	CQ1647-0411	GB5	Chine
38	KC461293	CQ305-1209	GB5	Chine
39	AF348825	SA0025	SAB1	Afrique du Sud
40	AF348826	SA98D1656	SAB1	Afrique du Sud
41	AF348821	SA99V800	SAB2	Afrique du Sud
42	AF348822	SA99V1325	SAB2	Afrique du Sud
43	AY488801	mon/4/01	SAB3	Uruguay
44	AF348813	SA99V429	SAB3	Afrique du Sud
45	AY488804	mon/7/01	URU1	Uruguay
46	AY488794	mon/1/99	URU1	Uruguay
47	M17213	Ref_strain_CH18537	URU2	USA
48	AY488803	mon/6/01	URU2	Uruguay
49	AY488806	mon/9/01	URU2	Uruguay

Annexe 3 : Formulaire de consentement éclairé du projet

**Projet de recherche : Facteurs associés aux formes sévères de grippe à Yaoundé Cameroun**

Lettre de consentement

Etude des facteurs associés aux formes sévères de grippe à Yaoundé Cameroun.

Je soussigné..... (nom et prénom), certifie que j'ai lu et compris le formulaire de consentement éclairé que j'ai reçu du Dr .....

.....  
Je comprends les objectifs, les contraintes, les risques et les avantages potentiels - *liés à ma participation - ou à la participation de mon enfant - (rayer la mention inutile)* à cette étude sur les facteurs associés à la gravité de la grippe. J'ai reçu l'assurance que toutes les décisions prises concernant les soins de santé seront conformes aux lignes directrices actuelles des connaissances médicales de la grippe. Je suis d'accord pour fournir les échantillons nasopharyngés, de sang veineux, d'urine et de selles pour la réalisation de l'étude et de prendre le traitement préconisé si la grippe est confirmée. Si je veux, je recevrai les résultats de tous les tests effectués sur ces échantillons qui peuvent aider la prise en charge clinique. J'ai reçu la garantie que dans le cas de résultats positifs pour le paludisme, les infections parasitaires du tube digestif, ou une tuberculose pulmonaire active, un traitement curatif approprié sera prescrit. Je donne mon accord pour une hospitalisation si l'état de santé l'exige. Si l'état de santé ne s'est pas amélioré suite au traitement, je consens également à retourner à l'hôpital pour des tests supplémentaires. Les tests peuvent inclure, en fonction de mon état de santé, deux crachats, deux prélèvements nasopharyngés, deux prélèvements de sang, deux échantillons d'urine et une radiographie pulmonaire. Les prélèvements (nasopharyngés et sanguins) seront conservés au Centre Pasteur du Cameroun pendant dix ans. Ces échantillons seront utilisés pour la recherche immunologique et virologique. Je peux demander au médecin de détruire ces échantillons à tout moment. Je recevrai une copie signée, datée de ce formulaire de consentement. J'ai reçu la garantie que tous les renseignements permettant de *m'identifier (ou d'identifier mon enfant)* resteront confidentiels et seront conservés sur un ordinateur protégé par un mot de passe, et que mon nom n'apparaîtra pas sur les données archivées en format numérique. Je peux avoir accès à *mes données (ou aux données de mon enfant)* et demander au médecin de les détruire à tout moment. Je suis d'accord pour que tous les médecins ou les scientifiques participant à cette étude aient accès à ces informations, mais ils sont tenus de conserver les données strictement confidentielles. J'accepte librement la participation à cette étude à ces conditions. J'ai le droit de me retirer de l'étude à tout moment, sans fournir de justification de mon retrait. Mon retrait ne portera pas préjudice sur le traitement actuel ou futur. J'exprimerai le retrait de l'étude tout simplement en informant le médecin traitant verbalement ou par écrit.

Lieu : .....

Nom et signature du participant : .....

Nom et signature du médecin qui a obtenu le consentement : .....

Fait en trois exemplaires à .....



## Annexe 4 : Clairance éthique du projet



### COMITÉ NATIONAL D'ÉTHIQUE NATIONAL ETHICS COMMITTEE



- N° d'enregistrement : IORG0006538-IRB00007847-FWA00016054 BP 1937, Yaoundé, Tel: (237) 22 21 12 84  
- Arrêté N° 079/A/MSP/DS du 22 octobre 1987 portant création et organisation d'un Comité d'Éthique de la Recherche (CER) impliquant les êtres humains  
[cnecprot@yahoo.fr](mailto:cnecprot@yahoo.fr)

Yaoundé, le 23 mai 2011

#### AUTORISATION N°121/CNE/SE/2011

### CLAIRANCE ETHIQUE

Le Comité National d'Éthique a examiné ce 23 mai 2011, le projet de recherche intitulé: **"FACTEURS ASSOCIES AUX FORMES SEVERES DE GRIPPE A YAOUNDE-CAMEROUN"** soumis par le **Dr NJOUOM Richard**, Centre Pasteur du Cameroun.

Le projet est d'un grand intérêt épidémiologique et scientifique. Sa mise en œuvre contribuerait à la lutte contre la grippe au Cameroun. La procédure de recherche présume un projet scientifiquement valide. Elle expose les participants aux risques physiques liés aux prélèvements nasopharyngés et sanguins. Toutefois, ces gestes médicaux seront faits par un personnel médico-sanitaire qualifié, sous procédures stériles. Par ailleurs, les procédures d'obtention du consentement éclairé et de protection de la confidentialité des données respectent les normes éthiques. Les CVs des investigateurs les décrivent capables de mettre en œuvre l'étude. Pour toutes ces raisons, le Comité National d'Éthique approuve pour une période d'un an, la mise en œuvre de la présente version du protocole.

**Le Dr NJOUOM Richard** est responsable du respect scrupuleux du protocole approuvé au Cameroun et ne devra y apporter aucun amendement aussi mineur qu'il soit sans avis favorable du Comité National d'Éthique. Il devra admettre toute descente du Comité National d'Éthique pour suivi de la mise en œuvre dudit protocole. Les rapports annuel et final du projet devront être soumis au Comité National d'Éthique et aux autorités sanitaires du Cameroun.

La mise en œuvre du projet peut être suspendue en cas de non respect de la réglementation en vigueur et des recommandations sus-mentionnées.

En foi de quoi la présente Clairance Ethique est délivrée pour servir et valoir ce que de droit.



LE PRESIDENT

Pr. Lazare KAPTUE

## Annexe 5 : Fiche de collecte des données épidémiolo-cliniques des participants de l'étude.

Surveillance des syndromes grippaux et autres infections respiratoires aiguës virales sévères

### Fiche de recueil épidémiolo-clinique

#### Critères d'inclusion :

##### 1- ILI

Tout patient avec une affection fébrile à début brutal depuis moins de 5 jours avec fièvre >38°C ET Toux ou mal de gorge qui **ne** nécessite **pas** une hospitalisation.

##### 2- SARI

Patient âgé de 5 ans ou plus

Affection fébrile à début brutal depuis moins de 5 jours avec fièvre >38°C ET Toux ou mal de gorge Et Essoufflement ou difficultés respiratoires ET Nécessitant une Hospitalisation

Patient âgé de moins 5 ans.

Tout enfant âgé de moins de 5 ans, malade depuis moins de 5 jours avec une toux ou respirant difficilement ET présentant une polypnée ET nécessitant une hospitalisation

Formation sanitaire _____		Date d'examen _____		Numéro d'inclusion _____	
Né le _____ Ou Age _____ ans		Sexe <input type="checkbox"/> Masculin <input type="checkbox"/> Féminin		Numéro de téléphone du patient: _____	
Date des premiers symptômes _____		Température axillaire corrigée (+0,5°C) ou rectale brute _____ °C		STATUT DU CAS ILI <input type="checkbox"/> SARI <input type="checkbox"/>	
Sous antipyrétique <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non		Diagnostic clinique _____		Date d'hospitalisation ____/____/____	
<b>Signes cliniques</b> Toux <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non Mal de gorge <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Inconnu Rhinorrhée <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non Conjonctivite <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non Douleurs de l'oreille <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Inconnu Essoufflement <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non Respiration sifflante <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non Céphalées <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Inconnu Myalgies <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Inconnu Arthralgies <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Inconnu Asthénie <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non Eruption cutanée <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non Diarrhée <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non Vomissements <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non Autre <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non Préciser _____		<b>Signes de gravité enfant de moins de 5 ans</b> Fréquence respiratoire _____ par minute Vomissement incoercibles <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Oui Léthargie ou inconscience <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Oui Convulsion <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Oui Incapable de boire ou prendre le sein <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Oui Tirage sous-costal <sup>1</sup> <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Oui Stridor <sup>2</sup> <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Oui		<b>Pour tout patient</b> Poids _____ Fréquence cardiaque _____ SO <sub>2</sub> _____	
Cas semblable dans l'entourage <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Inconnu		<b>Pour tout patient</b> <b>Co-morbidités</b> Asthme Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Inconnu <input type="checkbox"/> Diabète Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Inconnu <input type="checkbox"/> Co-morbidité cardiovasculaire Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Inconnu <input type="checkbox"/> Co-morbidité rénale: Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Inconnu <input type="checkbox"/> Immunodépression Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Inconnu <input type="checkbox"/> Autres co-morbidités _____		<b>Traitement prescrit</b> Antipyrétique Non <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Anti-viral Non <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Antibiotique Non <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Antipaludique Non <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/>	
<b>Echantillons</b> Ecouvillon nasopharyngé <input type="checkbox"/> Ecouvillon gorge <input type="checkbox"/>					

Fiche renseigné par \_\_\_\_\_ Tel \_\_\_\_\_

<sup>1</sup> Le tirage sous-costal est le mouvement vers l'intérieur de la structure osseuse de la paroi thoracique à l'inspiration. Le tirage sous costal ne devrait être considéré présent qu'il est constamment présent chez un enfant calme. L'agitation, le nez bouché ou la tétée peuvent causer un tirage sous-costal temporaire

<sup>2</sup> Le stridor est un bruit aigu fait par l'enfant à l'inspiration (inhalation). Le stridor chez l'enfant calme révèle un risque marqué d'obstruction

Annexe 6 : Séquences de références utilisées pour la figure 26A

Nombre	Numéro Genbank	Virus	Génotype	Origine
1	HQ699281	A/Korea/CB929/10 G	CBA	Corée du Sud
2	HQ699279	A/Korea/CB851/09 G	CBA	Corée du Sud
3	M11486	Ref_Strain_A2	GA1	USA
4	AF233917	NY108	GA1	USA
5	AF065257	CH34	GA1	USA
6	JX198112	Long	GA-1	USA
7	AF233923	TX69564	GA2	USA
8	AF233920	TX68481	GA3	USA
9	AF233913	MO16	GA3	USA
10	AF065254	CH09	GA4	USA
11	AF233916	NY103	GA5	USA
12	AF233909	MO01	GA5	USA
13	AF233918	NY20	GA6	USA
14	AF233901	AL19452-2	GA6	USA
15	AF233910	MO02	GA7	USA
16	AF233904	CN1973	GA7	Canada
17	KF437514	RSVA/PG/05/12	NA1	Pakistan
18	KC342392	CU_C2286	NA1	Thaïlande
19	JX568890	POA/20C/10	NA1	Brésil
20	JX131641	Riyadh 83/2009	NA1	Arabie Saoudite
21	JQ844861	HR6931-08	NA1	Croatie
22	AB775967	RSV/Tochigi/393/2008	NA1	Japon
23	AB749670	TTa-10-0261	NA1	Philippines
24	AB603450	NG-143-05	NA1	Japon
25	AB470478	NG-016-04	NA1	Japon
26	AB603445	NG-073-08	NA2	Japon
27	AB603444	NG-048-06	NA2	Japon
28	KC297292	BJ/30318	NA3	Chine
29	KC297277	BJ/29240	NA3	Chine
30	KC297381	BJ/F5166	NA4	Chine
31	KC297374	BJ/36578	NA4	Chine
32	JN257694	ON138-0111A	ON1	Canada
33	JN257693	ON67-1210A	ON1	Canada
34	AF348810	SA98D707	SAA1	Afrique du Sud
35	AF348809	SA97D669	SAA1	Afrique du Sud

Annexe 7 : Séquences de références utilisées pour la figure 26B

Nombre	Numéro Genbank	Virus	Génotype	Origine
1	DQ227374	BA/733/02	BA1	Argentine
2	AY333364	BA4128/99B	BA1	Argentine
3	KX233689	Caen.FRA/27.12-004-009	BA10	France
4	KX233687	Caen.FRA/42.12-004-005	BA10	France
5	KX233685	Caen.FRA/38.12-004-003	BA10	France
6	KJ710415	HD24201	BA10	Allemagne
7	KJ710410	HD22118	BA10	Allemagne
8	KC342328	CU_C767	BA10	Thaïlande
9	JQ844875	HR18724-08	BA10	Croïtie
10	JQ844874	HR18939-08	BA10	Croïtie
11	HM459884	NG-042-07	BA10	Japon
12	HM459883	NG-084-07	BA10	Japon
13	JX256974	MY-2134333-09	BA12	Malaisie
14	JX256973	MY-2246492-09	BA12	Malaisie
15	DQ227393	BA/5140/03	BA2	Argentine
16	DQ227391	BA/4862/03	BA2	Argentine
17	DQ227397	BA/1607/04	BA3	Argentine
18	DQ227381	BA/1441/02	BA3	Argentine
19	DQ227408	BA/1526/04	BA4	Argentine
20	DQ227407	BA/493/04	BA4	Argentine
21	AB175820	NG-006-03	BA5	Japon
22	AB175819	NG-004-03	BA5	Japon
23	AY751116	BE/11508/01	BA6	Belgique
24	AY751110	BE/46/03	BA6	Belgique
25	HQ699308	B/Korea/CB89/08	BA7	Corée du Sud
26	HQ699302	B/Korea/CB710/09	BA7	Corée du Sud
27	HM459875	NG-120-07	BA8	Japon
28	HM459874	NG-045-07	BA8	Japon
29	KX233694	Caen.FRA/35.12-004-002	BA9	France
30	KX233693	Caen.FRA/41.12-004-007	BA9	France
31	KX233692	Caen.FRA/39.12-004-011	BA9	France
32	KX233691	Caen.FRA/38.13-004-017	BA9	France
33	KX233690	Caen.FRA/47.13-004-010	BA9	France
34	KX233688	Caen.FRA/46.12-004-008	BA9	France
35	KX233686	Caen.FRA/25.12-004-004	BA9	France
36	KX233684	Caen.FRA/38.14-004-022	BA9	France
37	KM402684	VH168482	BA9	Espagne
38	KJ710407	HD12063	BA9	Allemagne
39	KF826858	RSVB/Homo sapiens/ITA/130/2009	BA9	Italie
40	KF246645	RSV/PUNE/NIVGJ66586/10/B	BA9	Inde
41	KC461262	B CQ378-0210	BA9	Chine
42	KC342345	CU2011/161	BA9	Thaïlande
43	JX079986	903-HCM/10.10-BA9	BA9	Vietnam
44	JQ933971	UPM/B/21	BA9	Malaisie
45	JN119970	Cam2008-7298	BA9	Cambodge
46	HM459879	NG-040-07	BA9	Japon
47	AB749752	TTa-11-0564	BA9	Philippines
48	KC297477	B BJ/36348	BAC	Chine
49	KC297429	B BJ/20457	BAC	Chine
50	HQ699304	B/Korea/CB757/09	CBB	Corée du Sud
51	HQ699300	B/Korea/CB616/090	CBB	Corée du Sud

Annexe 8 : Séquences de références utilisées pour la figure 27

Nombre	Numéro Genbank	Virus	Génotype	Origine
1	AF371337	00-1	A1	Netherlands
2	AY296015	FL/4/01	A1	Netherlands
3	AY530092	JPS03-180	A1	Japan
4	AY848909	RSA/54/01	A1	South_Africa
5	DQ362950	Arg/2/02	A1	Argentina
6	JF929834	TN95-28	A1	USA
7	JX082173	CQ1143	A1	China
8	AY296021	NL/17/00	A2	Netherlands
9	AY530095	JPS03-240	A2	Japan
10	AY848918	RSA/48/00	A2	South_Africa
11	DQ362952	Arg/3/00	A2	Argentina
12	JF929848	TN95-354	A2	USA
13	JN604827	FLA4882	A2	Colombia
14	KC795639	ON-OB-10-41-2	A2	Canada
15	KC795643	ON-OB-11-44-3	A2	Canada
16	GQ888741	UY/18/06_1	A2a	Uruguay
17	KC731491	HMPV/PUNE/NIV0927648/09	A2a	India
18	HQ864260	E694	A2b	Cambodia
19	JX082187	CQ1854	A2b	China
20	KC731524	HMPV/PUNE/NIV11442/11	A2b	India
21	DQ009484	Avian_metapneumovirus	AMPV	USA
22	AY296034	NL/1/99	B1	Netherlands
23	AY848859	RSA/23/02	B1	South_Africa
24	DQ362954	Arg/2/00	B1	Argentina
25	DQ393719	Peru5-2003	B1	Peru
26	JF929865	TN89-713	B1	USA
27	JX082178	CQ1254	B1	China
28	KC731513	HMPV/PUNE/NIV111361/11	B1	India
29	AY296040	NL/1/94	B2	Netherlands
30	AY530089	JPS02-76	B2	Japan
31	AY848863	RSA/3/00	B2	South_Africa
32	DQ393720	Peru6-2003	B2	Peru
33	GQ888743	UY/1/07_1	B2	Uruguay
34	HQ864230	E233	B2	Cambodia
35	JF929886	TN93-413	B2	USA
36	JN604816	FLA8902	B2	Nicaragua
37	JQ513462	HMPV/Athens.GRC/44.06	B2	Greece
38	JQ513475	HMPV/Athens.GRC/347.07	B2	Greece
39	JQ513477	HMPV/Athens.GRC/367.07	B2	Greece
40	JQ513479	HMPV/Athens.GRC/181.08	B2	Greece
41	KC731487	HMPV/PUNE/NIV0926737/09	B2	India

# **Publications et communications issues de la thèse**

## Publications et communications issues de la thèse

### 1. Communications orales

- **Communication orale au "Cameroon Health Research Forum 2016 (CaHReF 2016)", 23-26 Août 2016.**

**Sebastien Kenmoe**, Marie-Astrid Vernet, Véronique Penlap Beng, Astrid Vabret, Richard Njouom, Phylogenic analysis of Human Bocavirus Virus detected in children with Acute Respiratory Infection in Yaounde, Cameroun, 2011-2014.

- **Communication orale au "Journées Scientifiques du Centre Pasteur du Cameroun 2016 (JSCPC 2016)", 28-30 Septembre 2016.**

**Sebastien Kenmoe**, Marie-Astrid Vernet, Patrice Tchendjou, Suzie Moyo Tetang, Mohammed Ripa Njankouo, Angeladine Kenne, Véronique Penlap Beng, Astrid Vabret, Richard Njouom, Molecular characterization of newly discovered respiratory viruses in Cameroon between 2011 and 2014: Human Metapneumovirus and Human Bocavirus.

## 2. Communications affichées

- **Trois posters au 5th African Network for Influenza Surveillance and Epidemiology (ANISE) Meeting, March 9-11, 2016, Kigali, Rwanda.**

**Sebastien Kenmoe**, Marie-Astrid Vernet, Patrice Tchendjou, Suzie Moyo Tetang, Mohammed Ripa Njankouo, Angeladine Kenne, Fabien Mischczak, Julia Dina, Véronique Penlap Beng, Astrid Vabret, Richard Njouom, Identification of a novel group B genotype of Human Respiratory Syncytial Virus during a three-year study period in Cameroonian children

**Sebastien Kenmoe**, Marie-Astrid Vernet, Patrice Tchendjou, Suzie Moyo Tetang, Mohammed Ripa Njankouo, Angeladine Kenne, Jerome Le Goff, Véronique Penlap Beng, Astrid Vabret, Richard Njouom, Molecular characterization of human adenovirus associated with acute respiratory infections in Cameroon from 2011 to 2014

**Sebastien Kenmoe**, Marie-Astrid Vernet, Patrice Tchendjou, Suzie Moyo Tetang, Mohammed Ripa Njankouo, Angeladine Kenne, Véronique Penlap Beng, Astrid Vabret, Richard Njouom, Epidemiology and phylogenetic analysis of Human Bocavirus Virus isolated in children with Acute Respiratory Infection in Cameroun, 2011-2014

- **Présentation Poster au 4th African Network for Influenza Surveillance and Epidemiology (ANISE) Meeting, December 4-5, 2014, Cape Town, South Africa.**

**Sébastien Kenmoe**, Marie-Astrid Vernet, Suzie Moyo Tetang, Tatiana Mossus, Angeladine Kenne, Mohammed Ripa Njankouo, Patrice Tchendjou, Richard Njouom, Viral Etiology of Severe Acute Respiratory Infections in hospitalized children in Cameroon, 2011-2013.

- **Présentation Poster au Symposium of the Institut Pasteur International Network, September 10-13, 2014, Institut Pasteur de Paris, France.**

**Sébastien Kenmoe**, Marie-Astrid Vernet, Suzie Moyo Tetang, Tatiana Mossus, Angeladine Kenne, Mohammed Ripa Njankouo, Patrice Tchendjou, Richard Njouom, Viral Etiology of Severe Acute Respiratory Infections in hospitalized children in Cameroon, 2011-2013.



### 3. Article publié 1

# Viral etiology of severe acute respiratory infections in hospitalized children in Cameroon, 2011–2013

Sebastien Kenmoe,<sup>a,c,d</sup> Patrice Tchendjou,<sup>a</sup> Marie-Astrid Vernet,<sup>a</sup> Suzie Moyo-Tetang,<sup>b</sup> Tatiana Mossus,<sup>a</sup> Mohamadou Njankouo-Ripa,<sup>a</sup> Angeladine Kenne,<sup>a</sup> Véronique Penlap Beng,<sup>c</sup> Astrid Vabret,<sup>d</sup> Richard Njouom<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Centre Pasteur of Cameroon, International Network of Pasteur Institutes, Yaounde, Cameroon. <sup>b</sup>Essos Hospital Center, Yaounde, Cameroon. <sup>c</sup>Département de Biochimie, Université de Yaoundé 1, Yaounde, Cameroon. <sup>d</sup>Virology Service, Pôle de Biologie, CHU de Caen, Caen, France. *Correspondence:* Richard Njouom, Centre Pasteur Cameroon, P.O Box: 1274 Yaoundé, Cameroon. E-mail: njouom@pasteur-yaounde.org / njouom@yahoo.com

Accepted 25 February 2016.

**Background** Severe acute respiratory illness (SARI) is recognized as an important cause of morbidity, mortality, and hospitalization among children in developing countries. Little is known, however, in tropical countries like Cameroon about the cause and seasonality of respiratory infections, especially in hospitalized settings. **Objectives:** Our study investigates the viral etiology and seasonality of SARI in hospitalized children in Yaounde, Cameroon.

**Methods** Prospective clinic surveillance was conducted to identify hospitalized children aged  $\leq 15$  years presenting with respiratory symptoms  $\leq 5$ -day duration. Demographic and clinical data, and respiratory specimens were collected. Nasopharyngeal samples were tested for 17 respiratory viruses using a multiplex polymerase chain reaction. The viral distribution and demographic data were statistically analyzed.

**Results** From September 2011 through September 2013, 347 children aged  $\leq 15$  years were enrolled. At least one virus was identified in each of 65.4% children, of which 29.5% were

coinfections; 27.3% were positive for human adenovirus (hAdV), 13.2% for human respiratory syncytial virus (hRSV), 11.5% for rhinovirus/enterovirus (RV/EV), 10.6% for human bocavirus (hBoV), 9.8% for influenza virus (Inf), 6.6% for human parainfluenza virus (hPIV), 5.7% for human coronavirus (hCoV), and 2.3% for human metapneumovirus (hMPV). While hRSV showed seasonal patterns, hAdV and RV/EV were detected throughout the year and no evident temporal patterns were observed for the remaining viruses.

**Conclusion** Respiratory viruses were associated with a high burden of hospitalizations among children in Cameroon. Nevertheless, additional studies evaluating asymptomatic Cameroonian children will be important in understanding the relationship between viral carriage and disease.

**Keywords** Africa, Cameroon, etiology, severe acute respiratory infections, virus.

*Please cite this paper as:* Kenmoe *et al.* (2016) Viral etiology of Severe Acute Respiratory Infections in hospitalized children in Cameroon, 2011–2013. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 10(5), 386–393.

## Introduction

Severe acute respiratory illness (SARI) is the leading cause of hospitalization, morbidity, and mortality in children younger than 5 years throughout the world. The burden of these infections is particularly important in developing countries with a meta-analysis estimating that 265 000 (95% CI 160 000–450 000) in-hospital deaths took place in 2010 with 99% of those deaths occurring in developing countries.<sup>1</sup> Although there is little information on the causes of these respiratory illnesses in developing countries, available data indicate that viral agents play an important role globally.<sup>2</sup> A meta-analysis estimates that hRSV causes 33.8 million infections each year among children younger than 5 years.

About 3–4 million of these cases require hospital admission, and an estimated 66 000–199 000 of children die with 99% of deaths occurring in developing countries.<sup>3</sup> Many other viruses such as influenza viruses, rhinoviruses (RV), human parainfluenza viruses (hPIV), human adenoviruses (hAdV), human coronaviruses (hCoV-OC43, hCoV-229E, hCoV-NL63, and hCoV-HKU1), and enteroviruses (EV) have also been implicated worldwide.<sup>2,4,5</sup> Discovered recently, human metapneumoviruses (hMPVs) and human bocaviruses (hBoVs) are viruses resulting in similar symptoms. Other emergent viruses such as SARS-CoV and MERS-CoV are responsible for more severe symptoms like respiratory distress syndrome.<sup>6–8</sup> Real-time reverse-transcription polymerase chain reaction (rRT-PCR) assays have been shown to

be a sensitive and specific tool for the detection of these viruses. Furthermore, the introduction of multiplex rRT-PCR enables the set-up of assays detecting two or more targets in single clinical specimen.<sup>9,10</sup>

In 2007, the Centre Pasteur du Cameroun (CPC) began implementing sentinel surveillance for influenza in Cameroon. This surveillance system has enabled a better understanding of the epidemiology of influenza in the country.<sup>11,12</sup> Even though our recent publication has demonstrated that those respiratory viruses play an important role in patients consulting our sentinel sites,<sup>13</sup> there remains a lack of information regarding patients hospitalized with SARI.

This study was conducted to gain new insights into the timeliness of virus circulation and viral etiology among children aged  $\leq 15$  years, hospitalized for SARI.

## Materials and methods

### Study design

This prospective observational study was conducted in the pediatric service of 'Centre Hospitalier d'Essos' in Yaounde, Cameroon. This central region has an equatorial climate with a defined moderate rainfall during March–June and intense precipitation during September–November.

### Subjects

Children aged less than or equal to 15 years hospitalized for SARI were daily recruited in our study. A total of 347 patients were enrolled by experienced nurses or physicians during a 2-year period between September 2011 and September 2013. SARI was defined according to a previously suggested WHO case definition<sup>14</sup> with a history of symptoms of  $< 5$  days. These criteria of hospitalized patient inclusion were as follows: fever  $> 38^{\circ}\text{C}$  and cough and/or sore throat.

### Ethical considerations

Children were enrolled only after an informed written consent was obtained from their parents or legal guardians. This study was part of a global study aimed at assessing risk factors associated with severe influenza in Cameroon (IMMI Project), which was reviewed and approved by the National Research Ethics Committee and the Ministry of Health of Cameroon.

### Study and laboratory procedures

Demographic and clinical information was obtained from participants using a standardized questionnaire.

Nasopharyngeal swab specimens were collected from hospitalized children and transported to the CPC as previously described.<sup>13</sup> Viral RNA and DNA were extracted using QIAamp Viral RNA Mini kit and QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany), respectively, following the

manufacturers' instructions. A final elution volume of 60  $\mu\text{l}$  of RNA and 200  $\mu\text{l}$  of DNA were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  till testing by multiplex PCR/RT-PCR. Testing for influenza A and B viruses were conducted, and influenza A virus-positive specimens were subtyped according to the method developed by US Centers for Disease Control and Prevention (CDC).<sup>15</sup> Then, the detection of 14 non-influenza respiratory viruses, including hMPV, hRSV, hPIV (1–4), EV, RV, hCoV-OC43, hCoV-229E, hCoV-NL63, hCoV-HKU1, hAdV, and hBoV were performed by 4 duplex rRT-PCR, using a commercially available Respiratory Multi Well System r-gene<sup>TM</sup> (bioMérieux, Lyon, France) following the manufacturer's instructions. PCR amplifications were performed on ABI 7500 Fast (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A patient was considered to have a single viral infection if only one pathogen was detected in the specimens. In case of more than one viral pathogen detected, patients were considered to have viral coinfections.

### Statistical analysis

The data obtained and the laboratory results were anonymized and entered into a database prepared with Microsoft<sup>®</sup> Excel (Microsoft, Washington, DC, USA). The database was then checked and cleaned for abnormal wrongful entries. We analyzed the demographics of the study subjects and the positive cases, as well as the clinical characteristics of all respiratory viruses. Proportions were compared using a chi-squared or the Fisher exact test. We analyzed the clinical and coinfection characteristics of positive according to the negative patients for respiratory viruses using a stepwise logistic regression model. Uncertainty was expressed as 95% confidence intervals (CIs). Statistical analysis was performed with the R program version 2.15.1, and *P*-values of 0.05 or less were considered statistically significant.

## Results

### Demographic characteristics

During the study period, 374 hospitalized children with SARI aged 0–15 years were enrolled. As 27 patients were excluded due to insufficient material for analysis of all viruses, 347 (92.8%) subjects were analyzed. The median age of the patients was 1.5 years (IQR: 0.75–3.0 years). Most patients (88.4%) were below 5 years of age, with 131 (37.8%) children  $\leq 1$  year, 100 (28.8%) children aged [1–2] years, 76 (21.9%) children aged [2–5] years, and 40 (11.5%) children aged [5–15] years. Half of patients (180 [51.9%]) were male. Among the 347 hospitalized participants with SARI, the most common respiratory symptoms were cough (85.9%, 298/347), rhinorrhea (78.4%, 272/347), fatigue (57.9%, 201/347), and wheezing (41.8%, 145/347). Demographic data and clinical characteristics of the 347 cases studied are summarized in Table 1.

**Table 1.** Demographic and clinical characteristics of all participants ( $N = 347$ )

Characteristics	SARI recruited ( $n = 347$ )	Negative samples ( $n = 120$ )	Respiratory viruses detected		
			Total ( $n = 227$ )	1 ( $n = 160$ )	>1 ( $n = 67$ )
Sex					
Male	180 (51.9)	61 (50.8)	119 (52.4)	85 (53.1)	34 (50.8)
Female	167 (48.1)	59 (49.2)	108 (47.6)	75 (46.9)	33 (49.2)
Age					
$\geq 1$ Year	131 (37.8)	43 (35.8)	88 (38.8)	59 (36.9)	29 (43.3)
[1–2] years	100 (28.8)	32 (26.7)	68 (30.0)	50 (31.2)	18 (26.9)
[2–5] years	76 (21.9)	26 (21.7)	50 (22.0)	35 (21.9)	15 (22.4)
[5–15] years	40 (11.5)	19 (15.8)	21 (9.2)	16 (10.0)	5 (7.4)
Symptoms					
Cough	298 (85.9)	99 (82.5)	199 (87.7)	137 (85.6)	62 (92.5)
Rhinorrhea	272 (78.4)	89 (74.2)	183 (80.6)	129 (80.6)	54 (80.6)
Fatigue	201 (57.9)	60 (50)	141 (62.1)	104 (65.0)	37 (55.2)
Wheezing	145 (41.8)	49 (40.8)	96 (42.3)	67 (41.9)	29 (43.3)
Vomiting	131 (37.8)	42 (35)	89 (39.2)	63 (39.4)	26 (38.8)
Diarrhea	100 (28.8)	37 (30.8)	63 (27.8)	46 (28.8)	17 (25.4)
Sore throat	75 (21.6)	39 (32.5)	36 (15.9)	26 (16.3)	10 (14.9)
Headache	46 (13.3)	23 (19.2)	23 (10.1)	21 (13.1)	2 (3.0)
Conjunctivitis	36 (10.4)	12 (10)	24 (10.6)	185 (11.3)	6 (9.0)
Arthralgia	29 (8.4)	12 (10)	17 (7.5)	16 (10.0)	1 (1.5)
Cutaneous rash	26 (7.5)	11 (9.2)	15 (6.6)	14 (8.8)	1 (1.5)
Myalgia	17 (4.9)	10 (8.3)	7 (3.1)	6 (3.8)	1 (1.5)
Earache	13 (3.7)	5 (4.2)	8 (3.5)	6 (3.8)	2 (3.0)

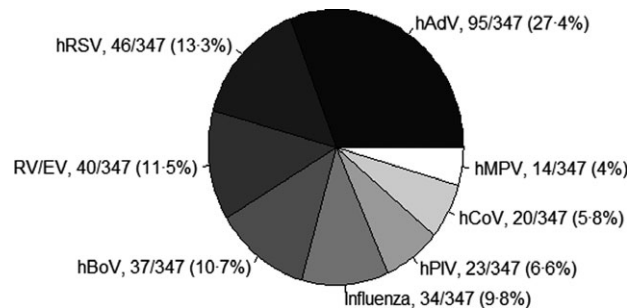
Data are number and percentage in brackets.

### Clinical characteristics and viral agents identified

Respiratory viruses were observed in 227 [65.4%; 95%CI: 60.1–70.4] of the 347 samples analyzed for the 17 respiratory viruses tested. The most frequently identified pathogen was hAdV (27.4%, 95/347) followed by hRSV (13.3%, 46/347), EV/RV (11.5%, 40/347), hBoV (10.7%, 37/347), influenza (9.8%, 34/347; consisted of influenza A/H3N2 [6.3%, 22/347], influenza B [2.3%, 8/347], influenza A/H1N1/2009 [1.2%, 4/347]), hPIV (6.6%, 23/347), hCoV (5.8%, 20/347), and hMPV (4%, 14/347) (Figure 1).

A majority of SARI was observed among children aged  $\leq 5$  years (90.7%, 206/227), and the proportions infected were significantly negatively associated with age (odds ratio [OR], 0.91; 95% CI, 0.84–0.99,  $P = 0.03$ ). There were no significant differences in terms of gender between patients infected with different viruses. Influenza virus were more frequently detected in the individuals over 1 year ( $P = 0.04$ ). For the remaining viruses, there was no difference between rate of infection and age (Table 2).

Among positive samples, single viral infection accounted for 70.5% (160/227) of cases, whereas infections with multiple viruses were observed in 29.5% (67/227), including 53 double infections, 13 triple infections, and one quadruple infection. Specific viruses detected in the study population



**Figure 1.** Detection rate of each virus or group of viruses in 347 respiratory samples. Positive cases are the sum of single and mixed infections for each virus or group of viruses.

of 347 hospitalized children are listed in Table 3, in descending detection rate. The mean age and age group distribution of patients with multiple viral infections were not significantly different from those of group with single infection (Table 2). hAdV, hRSV, Influenza and hMPV were more frequent in single infections whereas RV/EV, hBoV, hPIV, and hCoV were more frequent in mixed infections (Figure 2).

**Table 2.** Detection rate and age-specific distribution of each virus or group of viruses detected and rate of coinfection

	Total	[0–1] year	[1–2] years	[2–5] years	[5–15] years	P-value
N	347	131	100	76	40	
HAdV	95 (27.4)	40 (30.5)	27 (27)	20 (26.3)	8 (20)	0.61
HRSV	46 (13.3)	20 (15.3)	11 (11)	12 (15.8)	3 (7.5)	0.47
RV/EV	40 (11.5)	16 (12.2)	15 (15)	7 (9.2)	2 (5)	0.37
HBoV	37 (10.7)	16 (12.2)	9 (9)	8 (10.5)	4 (10)	0.88
Influenza	34 (9.8)	6 (4.6)	15 (15)	9 (11.8)	4 (10)	0.04
HPIV	23 (6.6)	9 (6.9)	4 (4)	8 (10.5)	2 (5)	0.39
HCoV	20 (5.8)	8 (6.1)	5 (5)	4 (5.3)	3 (7.5)	0.94
HMPV	14 (4.0)	5 (3.8)	6 (6)	0 (0)	3 (7.5)	0.14
Coinfection	67 (29.5)	29 (33)	18 (26.5)	15 (30)	5 (31.3)	0.76
Any viral infection	227 (65.4)	88 (67.2)	68 (68)	50 (65.8)	21 (52.5)	0.33

hAdV, human adenovirus; hRSV, human respiratory syncytial virus; RV/EV, rhinovirus/enterovirus; hBoV, human bocavirus; hPIV, human parainfluenza virus; hCoV, human coronavirus; hMPV, human metapneumovirus.

Data are number and percentage in brackets.

**Table 3.** Contribution of respiratory viruses to severe acute respiratory illness among hospitalized patients in Cameroon as mono-infection or coinfection

	AdV	RSV	RV/EV	hBoV	PIV	A/H3N2	hCoV	hMPV	Inf B	A/H1N1p	Total (N = 225)
AdV	49	9	8	9	4	1	2	2	0	0	95 (27.3)
RSV		26	2	1	0	3	1	0	0	0	46 (13.2)
RV/EV			17	4	0	0	1	1	0	0	40 (11.5)
hBoV				13	0	1	0	1	0	0	37 (10.6)
PIV					11	0	1	0	0	0	23 (6.6)
A/H3N2						16	0	0	0	0	22 (6.3)
hCoV							9	0	1	0	20 (5.7)
hMPV								8	0	0	14 (4.0)
Inf B									7	0	8 (2.3)
A/H1N1p										4	4 (1.1)
1 Virus	49	26	17	13	11	16	9	8	7	4	160 (70.5)
2 viruses	35	16	16	17	6	5	6	4	1	0	53 (23.3)
3 Viruses	10	4	6	7	5	1	4	2	0	0	13 (5.7)
4 Viruses	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1 (0.4)

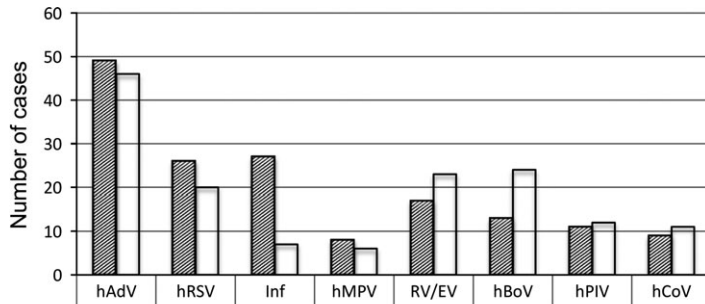
hAdV, human adenovirus; hRSV, human respiratory syncytial virus; RV/EV, rhinovirus/enterovirus; hBoV, human bocavirus; hPIV, human parainfluenza virus; hCoV, human coronavirus; hMPV, human metapneumovirus.

Data are number and percentage in brackets.

In a binary logistic regression, positive samples was negatively associated only with headaches ( $P = 0.003$ , odds ratio [OR], 0.08; 95% CI, 0.01–0.3). No other clinical symptoms were associated with the positive patients, nor with any other specific viruses detected or coinfections. Seasonality.

The study also investigated the monthly distribution of viruses. The seasonal variations of the viral respiratory infections are shown in figure 2. In the first period from September 2011 to November 2012, the average number of

samples collected monthly was 18.7, whereas in the second period from December 2012 to September 2013 the number of enrolled cases was much lower, the average number of samples collected monthly being 6.6. However, hRSV showed a pronounced seasonality, with peaks during the rainy season from September to December. The circulation of influenza viruses was similar to hRSV although a few cases were detected outside the rainy season peak. RV/EV was detected almost year-round with peak activity in the rainy season between September and December corresponding to a higher



	hAdV	hRSV	Inf	hMPV	RV/EV	hBoV	hPIV	hCoV
160 single infections	49	26	27	8	17	13	11	9
67 multiple infections	46	20	7	6	23	24	12	11

Figure 2. Number of each respiratory virus/group of viruses detected as single or mixed infections.

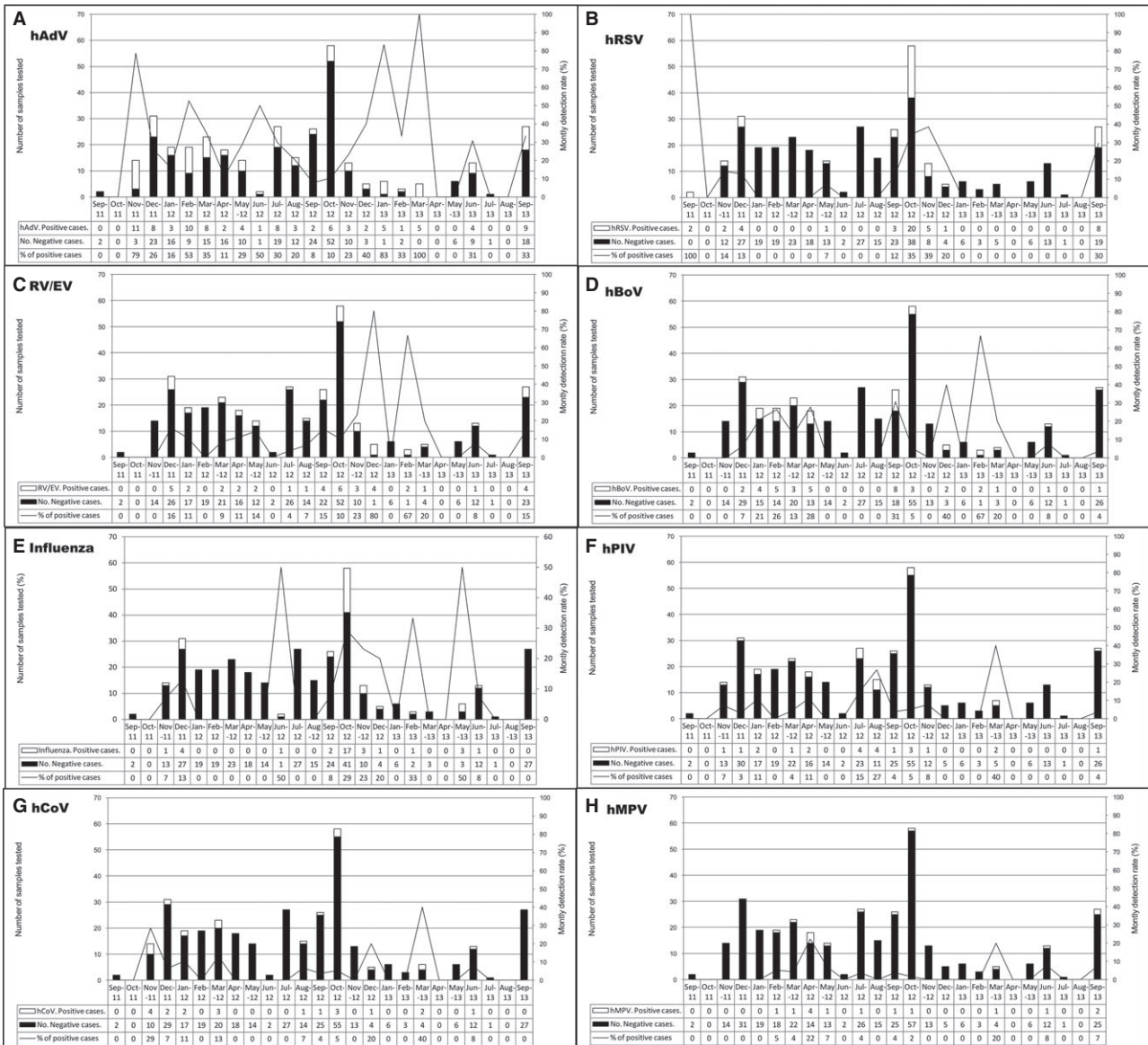


Figure 3. Seasonal distribution of respiratory viruses or group of viruses detected in children with SARI during September 2011 till September 2013. Primary y-axis and bars describe the number of cases, while secondary y-axis and lines describe the monthly detection rate.



number of samples collected during that period. On the other hand, hAdV occurred throughout the study period with no evident temporal patterns. hBoV occurred intermittently all over the study period, while the prevalence of remaining viral etiologies was low, ranging from 0 to 5 positive samples per month for each virus, numbers which appeared insufficient to allow for the description of seasonal patterns. Coinfections were observed throughout the study period.

## Discussion

The aim of this study has been to determine the viral panorama of SARI in 374 hospitalized children during a 2-year period in Cameroon. The data presented here are unique, to the best of our knowledge. It represents viral etiologies (17 respiratory viral targets) in children aged  $\leq 15$  years hospitalized for SARI in Cameroon. More importantly, this study describes the incidence of AdV and the recently discovered hBoV in Cameroon for the first time.<sup>8</sup> Our results demonstrate the potential importance of respiratory viruses in the etiology of hospitalized children with SARI in Cameroon.

Of 347 samples tested, at least one respiratory virus was detected in 227 (64.5%). This detection rate is consistent with results of other etiologic studies of hospitalized children conducted in similar settings.<sup>16–20</sup> Nonetheless, this proportion appears to vary largely between countries. Kwofie *et al.* recorded a lower percentage of 25.7% in Ghana<sup>21</sup> and Khor *et al.* recorded 26.4% in Malaysia.<sup>22</sup> Higher percentages 94.2% in China,<sup>23</sup> 91% in France,<sup>24</sup> and 90% in Alaska<sup>25</sup> were reported by Zhang *et al.*, Singleton *et al.*, and Huguenin *et al.*, respectively. Comparison among published studies is always difficult. Possible reasons for these varying outcomes among studies include true differences in epidemiology, differences in the inclusion criteria for study population, diagnostic methods used, panel of viral agents tested, climate, study duration, and patients' ages. Consider that all the above studies included hospitalized children; lower prevalence recorded by Khor *et al.* might have been due to their 27-year study duration and laboratory methods (direct IF and viral isolation) which are known to be less sensitive than molecular techniques.<sup>25</sup>

The most prevalent virus detected in our study was AdV, representing 27.3% of the total number of viruses observed. This value is higher than that (0.8–13.3%) reported in most other similar studies.<sup>16,17,22,26–28</sup> It is nonetheless similar to what was noted in Alaska<sup>24</sup> and in Mozambique<sup>29</sup> by Singleton *et al.* (30%) and O'Callaghan-Gordo *et al.* (21%). The serotypes B(3,7,21) and E(4) of AdV have been implicated in more severe diseases including bronchitis or pneumonia<sup>30</sup> in the immunocompromised host and children

particularly. This finding shows that AdV could play a more significant role than originally thought. Accordingly, additional efforts describing our associated serotypes will help to further understand how much this virus contributes to disease severity.

Unlike our results, most similar studies showed that hRSV was the most prevalent viral pathogen.<sup>22,31–33</sup> In our study, hRSV was the second most frequent pathogen after hAdV with merely 13.2% of 347 hospitalized children testing positive. However, this proportion was similar to that reported in other studies (5.7–15%).<sup>16,28,29,34</sup> Unlike previous similar studies, RV/EV accounted for only 11.5% of positivity in our study.<sup>17,18,24,26,29</sup> HBoV was the fourth most common virus with a prevalence of 10.6% in all cases. This result is in line with the results of others authors, who have reported a worldwide detection rate of hBoV ranges between 2 and 19% in nasopharyngeal samples.<sup>35</sup> The remaining viral etiologies were identified in 9.8%, 6.6%, 5.7%, and 2.3% for influenza, HPIV, HCoV, and HMPV, respectively. These results correspond with those reported by other authors.<sup>23,27,32,33,36,37</sup>

As previously shown, we also found that virus-associated hospitalization figures were significantly higher among children ( $P = 0.03$ ).<sup>27,28,38</sup> According to reports, there is always a higher incidence of viral respiratory infection in children than in adults. This may be partially explained by the lower detection rate of respiratory viruses in the elderly due to reduced viral shedding in older age groups.<sup>39</sup> HRSV, the second most commonly virus detected in this study, has been reported to be the leading cause of SARI in young children.<sup>19,22,36</sup> Nevertheless, we did not find a significant age-specific prevalence in HRSV detection during this study. This was probably due to the fact that our statistical analysis was hampered by the limited size of study participants older than 5 years. Headaches were negatively associated with positives samples ( $P = 0.003$ ). However, as a majority of our study population was made up of children unable to report headaches, only 46 patients (13.3%) were taken into account in the analysis. Multiple viral infections were observed in 29.5% of the patients with positive viral detection. This is a very similar percentage to the one found by others researchers.<sup>22,26,37</sup> Bocavirus has been frequently implicated in coinfections.<sup>17,19,25</sup> Our results reflect those of other studies in which hBoV was associated (35.8% versus 8.1%,  $P < 0.001$ ) with multiple infections. Surprisingly, AdV and picornaviruses were also most frequently involved in coinfections, which probably resulted from the fact that they were detected throughout the year and were among the most prevalent.

In spite of our intensive surveillance strategy with daily recruitment, the number of inclusions was not stable over the study period. Notwithstanding this lack of uniformity in number of samples collected during the first (September

2011 to November 2012) and second (December 2012 to September 2013) periods, we were able to detect a seasonal pattern thanks to the sufficient number of enrolled patients during two consecutive years. We found that RSV cases were detected mainly during the major rainfalls from September to November, which is consistent with the data in the literature.<sup>22,23,31</sup> The seasonality of influenza virus is very uncertain in tropical areas. The current study did not confirm that influenza circulated between September and November, as shown in our previous studies.<sup>13</sup> This fact might have contributed to the reduction in the inclusion rate during the second period due to a true change in the epidemiology of SARI. Indeed, that would have contributed to reduce the numbers eligible patients in the second period of the study. RV/EV and AdV circulated year-round, a finding reported in other studies.<sup>17,23,28</sup> For the remaining viruses, no evident temporal patterns were observed. This study is ongoing, however, and any changes in the seasonal circulation will be detected.

Several points must be taken into consideration when looking at our findings. Firstly, our study was conducted at only one site, which might have underestimated the overall detection rate for selected viruses. Likewise, the enrolled cases may not be generalizable for the entire population of children in Cameroon. Subsequently, as discussed by Broor *et al.*,<sup>38</sup> there is no denial that some respiratory viruses can be detected in asymptomatic children<sup>24,40,41</sup> or shed for long periods of time after infection.<sup>24,42</sup> Hence, the role played by the viruses detected in these SARI cases is less clear considering that we did not evaluate respiratory specimens from asymptomatic children without respiratory symptoms. Otherwise, despite tests for a large panel of respiratory viruses we did not evaluate bacterial etiologies, due to the difficulty in obtaining adequate samples for culture. It has been shown that bacterial pathogens may have been responsible for SARI symptoms<sup>16</sup>; further studies will thus be required to specify their role in SARI in Cameroon. Lastly, although nurses in charge of recruitment were well trained, they did not systematically record severe symptoms such as convulsion, stridor, chest pain, inability to drink or breast-feed, and outcomes of study participants. This limited our ability to assert the clinical case severity and outcome of our SARI cases. This situation also added a limitation to this study regarding the representativeness of children included.

Notwithstanding its limits, this is the first study in Cameroon to characterize 17 common respiratory viruses in pediatrics with SARI during a 2-year consecutive period. Using a multiplex rRT-PCR, we were able to identify a wide variety of viruses and their seasonal patterns. In our resource-limited setting, this process is particularly useful for selecting only the major contributors to SARI and thereby enhancing our existing surveillance systems. Additional studies evaluating asymptomatic Cameroonian children will

be important to understanding the relationship between viral carriage and disease. With this new method, we will also be able to evaluate the role of viral loads in respiratory infections in future research.

## Acknowledgements

We are grateful to all the nurses and other healthcare workers who collected specimens, data, and information and provided their support with clinical evaluations of patients during this study. 'This work was funded by the International Network of Pasteur Institutes (PTR 351) and the "Institut de Microbiologie et de Maladies Infectieuses (IMMI)" in France'.

## References

- 1 Nair H, Simões EAF, Rudan I *et al.* Global and regional burden of hospital admissions for severe acute lower respiratory infections in young children in 2010: a systematic analysis. *Lancet* 2013; 381:1380–1390.
- 2 Cilla G, Onate E, Perez-Yarza EG, Montes M, Vicente D, Perez-Trallero E. Viruses in community-acquired pneumonia in children aged less than 3 years old: high rate of viral coinfection. *J Med Virol* 2008; 80:1843–1849.
- 3 Nair H, Nokes DJ, Gessner BD *et al.* Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 2010; 375:1545–1555.
- 4 Lukšić I, Kearns PK, Scott F, Rudan I, Campbell H, Nair H. Viral etiology of hospitalized acute lower respiratory infections in children under 5 years of age – a systematic review and meta-analysis. *Croat Med J* 2013; 54:122–134.
- 5 Sung C, Chi H, Chiu N *et al.* Viral etiology of acute lower respiratory tract infections in hospitalized young children in Northern Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect* 2011; 44:184–190.
- 6 Ren L, Xiang Z, Guo L, Wang J. Viral infections of the lower respiratory tract. *Curr Infect Dis Rep* 2012; 14:284–291.
- 7 Sloots TP, Whitley DM, Lambert SB, Nissen MD. Emerging respiratory agents: new viruses for old diseases? *J Clin Virol* 2008; 42:233–243.
- 8 Allander T, Tammi MT, Eriksson M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, Andersson B. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc Natl Acad Sci* 2005; 102:12891–12896.
- 9 Buecher C, Mardy S, Wang W *et al.* Use of a multiplex PCR/RT-PCR approach to assess the viral causes of influenza-like illnesses in Cambodia during three consecutive dry seasons. *J Med Virol* 2010; 82:1762–1772.
- 10 Henrickson KJ. Advances in the laboratory diagnosis of viral respiratory disease. *Pediatr Infect Dis J* 2004; 23:S6–S10.
- 11 Njoum R, Mba SAS, Noah DN *et al.* Circulation of human influenza viruses and emergence of Oseltamivir-resistant A(H1N1) viruses in Cameroon, Central Africa. *BMC Infect Dis* 2010; 10:1–5.
- 12 Heraud J, Njoum R, Rousset D *et al.* Spatiotemporal circulation of influenza viruses in 5 African countries during 2008–2009: a collaborative study of the Institut Pasteur International Network. *J Infect Dis* 2012; 206:S5–S13.
- 13 Njoum R, Yekwa EL, Cappy P, Vabret A, Boisier P, Rousset D. Viral etiology of influenza-like illnesses in Cameroon, January–December 2009. *J Infect Dis* 2012; 206:S29–S35.



- 14 Ortiz JR, Sotomayor V, Uez OC *et al.* Strategy to enhance influenza surveillance worldwide. *Emerg Infect Dis* 2009; 15:1271–1278.
- 15 WHO. CDC protocol of realtime RTPCR for swine flu influenza A (H1N1). Geneva. 2009. Available at [http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/CDCrealtimeRTPCRprotocol\\_20090428pdf](http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/CDCrealtimeRTPCRprotocol_20090428pdf). (Accessed 7 January 2014).
- 16 Nascimento-Carvalho CM, Ribeiro CT, Cardoso MRA *et al.* The role of respiratory viral infections among children hospitalized for community-acquired pneumonia in a developing country. *Pediatr Infect Dis J* 2008; 27:939–941.
- 17 Suzuki A, Lupisan S, Furuse Y *et al.* Respiratory viruses from hospitalized children with severe pneumonia in the Philippines. *BMC Infect Dis* 2012; 12:267.
- 18 Rhedin S, Hamrin J, Naucler P *et al.* Respiratory viruses in hospitalized children with influenza-like illness during the H1N1 2009 Pandemic in Sweden. *PLoS ONE* 2012; 7:1–7.
- 19 Bonzel L, Tenenbaum T, Schrotten H, Schildgen O, Schweitzer-Krantz S, Adams O. Frequent detection of viral coinfection in children hospitalized with acute respiratory tract infection using a real-time polymerase chain reaction. *Pediatr Infect Dis J* 2008; 27:589–594.
- 20 Yoshida LM, Suzuki M, Yamamoto T *et al.* Viral pathogens associated with acute respiratory infections in central vietnamese children. *Pediatr Infect Dis J* 2009; 29:75–77.
- 21 Kwofie TB, Anane YA, Nkrumah B, Annan A, Nguah SB, Owusu M. Respiratory viruses in children hospitalized for acute lower respiratory tract infection in Ghana. *Virology* 2012; 9:1–8.
- 22 Khor C, Sam I, Hooi P, Quek K, Chan Y. Epidemiology and seasonality of respiratory viral infections in hospitalized children in Kuala Lumpur, Malaysia: a retrospective study of 27 years. *BMC Pediatr* 2012; 12:1–9.
- 23 Zhang C, Zhu N, Xie Z *et al.* Viral etiology and clinical profiles of children with severe acute respiratory infections in China. *PLoS ONE* 2013; 8:1–10.
- 24 Singleton RJ, Bulkow LR, Miernyk K *et al.* Viral respiratory infections in hospitalized and community control children in Alaska. *J Med Virol* 2010; 82:1282–1290.
- 25 Huguenin A, Moutte L, Renois F *et al.* Broad respiratory virus detection in infants hospitalized for bronchiolitis by use of a multiplex RT-PCR DNA microarray system. *J Med Virol* 2012; 84:979–985.
- 26 Ursic T, Jevsnik M, Zigon N *et al.* Human bocavirus and other respiratory viral infections in a 2-year cohort of hospitalized children. *J Med Virol* 2012; 84:99–108.
- 27 Sentilhes A, Choumlivong K, Celhay O *et al.* Respiratory virus infections in hospitalized children and adults in Lao PDR. *Influenza Other Respir Viruses* 2013; 7:1070–1078.
- 28 Pretorius MA, Madhi SA, Cohen C *et al.* Respiratory viral coinfections identified by a 10-plex real-time reverse-transcription polymerase chain reaction assay in patients hospitalized with severe acute respiratory illness—South Africa, 2009–2010. *J Infect Dis* 2012; 206:S159–S165.
- 29 O’Callaghan-Gordo C, Bassat Q, Morais L *et al.* Etiology and Epidemiology of Viral Pneumonia Among Hospitalized Children in Rural Mozambique. *Pediatr Infect Dis J* 2011; 30:39–44.
- 30 Hierholzer JC. Adenoviruses in the immunocompromised host. *Clin Microbiol Rev* 1992; 5:262–274.
- 31 Calvo C, Pozo F, García-García ML *et al.* Detection of new respiratory viruses in hospitalized infants with bronchiolitis: a three-year prospective study. *Acta Paediatr* 2010; 99:883–887.
- 32 Yin CC, Huah LW, Lin JTP, Goh A, Ling H, Moh CO. Lower respiratory tract infection in hospitalized children. *Respirology* 2003; 8:83–89.
- 33 Noyola DE, Rodriguez-Moreno G, Sanchez-Alvarado J, Martinez-Wagner R, Ochoa-Zavala JR. Viral etiology of lower respiratory tract infections in hospitalized children in Mexico. *Pediatr Infect Dis J* 2004; 23:118–123.
- 34 Mathisen M, Basnet S, Sharma A *et al.* RNA viruses in young nepalese children hospitalized with severe pneumonia. *Pediatr Infect Dis J* 2011; 30:1032–1036.
- 35 Jartti T, Hedman K, Jartti L, Ruuskanen O, Allander T, Söderlund-Venermo M. Human bocavirus—the first 5 years. *Rev Med Virol* 2012; 22:46–64.
- 36 Do AHL, Doorn HR, Nghiem MN *et al.* Viral etiologies of acute respiratory infections among hospitalized vietnamese children in Ho Chi Minh city, 2004–2008. *PLoS ONE* 2011; 6:1–9.
- 37 Jennings LC, Anderson TP, Werno AM, Beynon KA, Murdoch DR. Viral Etiology of Acute Respiratory Tract Infections in Children Presenting to Hospital. *Pediatr Infect Dis J* 2004; 23:1003–1007.
- 38 Broor S, Dawood FS, Pandey BG *et al.* Rates of respiratory virus-associated hospitalization in children aged <5 years in rural northern India. *J Infect* 2013; 13:1–22.
- 39 She RC, Polage CR, Caram LB *et al.* Performance of diagnostic tests to detect respiratory viruses in older adults. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010 Jul; 67:246–250.
- 40 Advani S, Sengupta A, Forman M, Valsamakis A, Milstone AM. Detecting respiratory viruses in asymptomatic children. *Pediatr Infect Dis J* 2012; 31:1221–1226.
- 41 Feikin DR, Njenga K, Bigogo G *et al.* Viral and bacterial causes of severe acute respiratory illness among children aged less than 5 years in a high malaria prevalence area of western Kenya, 2007–2010. *Pediatr Infect Dis J* 2013; 32:e14–e19.
- 42 Jartti T, Lehtinen P, Vuorinen T, Koskenvuo M, Ruuskanen O. Persistence of rhinovirus and enterovirus RNA after acute respiratory illness in children. *J Med Virol* 2004 Apr; 72:695–699.


#### 4. Article publié 2

RESEARCH NOTE

Open Access



# Phylogenetic analysis of human bocavirus detected in children with acute respiratory infection in Yaounde, Cameroon

Sebastien Kenmoe<sup>1,2,3</sup>, Marie-Astrid Vernet<sup>1</sup>, Mohamadou Njankouo-Ripa<sup>1</sup>, Véronique Beng Penlap<sup>2</sup>, Astrid Vabret<sup>3</sup> and Richard Njouom<sup>1\*</sup> 

## Abstract

**Objective:** Human Bocavirus (HBoV) was first identified in 2005 and has been shown to be a common cause of respiratory infections and gastroenteritis in children. In a recent study, we found that 10.7% of children with acute respiratory infections (ARI) were infected by HBoV. Genetic characterization of this virus remains unknown in Central Africa, particularly in Cameroon leading us to evaluate the molecular characteristics of HBoV strains in Cameroonian children with ARI.

**Results:** Phylogenetic analysis of partial HBoV VP1/2 sequences showed a low level of nucleotide variation and the circulation of HBoV genotype 1 (HBoV-1) only. Three clades were obtained, two clustering with each of the reference strains ST1 and ST2, and a third group consisting of only Cameroon strains. By comparing with the Swedish reference sequences, ST1 and ST2, Cameroon sequences showed nucleotide and amino acid similarities of respectively 97.36–100% and 98.35–100%. These results could help improve strategies for monitoring and control of respiratory infections in Cameroon.

**Keywords:** Human bocavirus, Children, Acute respiratory infection, Cameroon, Africa

## Introduction

During the past two decades, new molecular techniques have contributed to the discovery of many viruses. This was the case in September 2005 with the discovery of the Human Bocavirus (HBoV) by a Swedish research team [1]. HBoV was subsequently named HBoV-1. Since, three other species (HBoV-2, 3, and 4) have been described from stool samples in Pakistan, Australia, and Nigeria respectively [2–4]. Based on phylogenetic analysis of HBoV genomic sequences, it was assigned to the *Parvoviridae* family, *Parvovirinae* sub-family, and *Bocavirus* genus. Indeed, the sequences identified were closely related to two other bocaviruses: the Bovine Parvovirus and the canine Minute Virus. Although this classification was based on genetic characterization, microscopy

studies have observed viral particles having the characteristics of this family of viruses; small DNA viruses with unenveloped icosahedral capsid and a diameter ranging from 18 to 26 nm. The HBoV genome is a 5.2 kb linear negative sense single-stranded DNA. During the 8th ICTV report it was decided that the different species of the genus *Bocavirus* should show a similarity in the NS1 gene of at least 95%. Based on the analysis of a large number of VP1 gene sequences and calculations of the genetic distance of complete genomes of different species of HBoV, Kapoor and collaborators recently proposed a new classification mode for HBoV suggesting that HBoV strains with more than 8 and 10% difference respectively in protein and nucleotide sequences of the VP1 complete gene should be considered as different species. Those with more than respectively 1.5 and 5% difference should be considered as different genotypes [3]. This proposal is consistent with the current nomenclature of the four HBoV species. A decade

\*Correspondence: njouom@pasteur-yaounde.org

<sup>1</sup> Virology Unit, Centre Pasteur of Cameroon, Yaounde, BP 1274 Yaounde, Cameroon

Full list of author information is available at the end of the article

after the identification of HBoV-1 in Sweden, it has been detected at frequencies ranging from 2 to 19% [5] in several countries across Europe [6–9], Asia [10–13], America [14–17], Africa [18–21], Middle East [22–24], and Australia [4, 25], revealing an overall distribution of this virus. These studies indicate that HBoV-1 is primarily a respiratory pathogen. HBoVs are detected not only in the respiratory tract (HBoV-1 and 2), but also in the gastrointestinal tract (HBoV-1 to 4) where they are associated with gastroenteritis [5]. HBoV are highly conserved viruses and sequences obtained in various regions of the world by several groups highlight a high homology of genetic sequences [7, 9, 11, 18, 22].

In a recent study, we have found that 10.7% of children with acute respiratory infections (ARI) were infected by a HBoV [21]. However, most molecular epidemiology studies of HBoVs have been performed in developed countries [5]. Genetic characterization of this virus remains unknown in most African countries, particularly in Cameroon. This study is, to our knowledge, the first analysis of the genetic characteristics of HBoVs obtained from Cameroonian children with acute respiratory infections (ARI).

## Methods

### Study population and samples

The study population was hospitalized and outpatient children with ARI consulting at the pediatric service of 'Centre Hospitalier d'Essos' in Yaounde, Cameroon. Demographic and clinical characteristics of these children have been previously described [21]. For this study nasopharyngeal swab samples were used.

### Laboratory analysis

DNA was extracted using QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, Hiden, Germany, Cat No. 51306) from nasopharyngeal swab specimens following the manufacturer's instructions. A final elution volume of 200  $\mu$ L of DNA was stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  prior to testing by a commercially available duplex real time PCR for the detection of human Adenovirus and HBoV (Respiratory Multi Well System r-gene<sup>TM</sup>, BioMerieux, Lyon, France, Cat No. 1092480) following the manufacturer's instructions. HBoV positive samples were then selected and a fragment of the VP1/2 capsid gene was amplified by semi-nested PCR as described elsewhere [18]. Briefly, 10  $\mu$ L of the DNA was added to 50  $\mu$ L of PCR mixture containing of 24.5  $\mu$ L of water, 1.5  $\mu$ L of  $\text{MgCl}_2$  at 50 mM, 1  $\mu$ L dNTPs at 10 mM, 2.5  $\mu$ L of VP-A sense primer (5'-GCACTTCTGTATCAGATGCCCTT-3') at 10  $\mu$ M, 2.5  $\mu$ L of VP-B reverse primer (5'-CGTGGTATGTAGGCGGTAG-3') at 10  $\mu$ M, 5  $\mu$ L of 10 $\times$  PCR buffer, 2.5  $\mu$ L of the W1 solution at 1%, and 0.5  $\mu$ L of the Taq DNA Polymerase (Invitrogen, USA, Cat No. 10342053). To improve the sensitivity, a second

semi-nested reaction with 2  $\mu$ L of the first PCR product was performed with the pair of primer VB-B and VP-C (5'-CTTAGAACTGGTGAGAGCACTG-3') according to the previous protocol. The cycling parameters for the two PCR included an enzyme activation and initial denaturation at  $94^{\circ}\text{C}$  (3 min); 40 cycles of denaturation at  $94^{\circ}\text{C}$  (45 s), primer annealing at  $50^{\circ}\text{C}$  (30 s) and extension at  $72^{\circ}\text{C}$  (1 min 30 s); a final extension at  $72^{\circ}\text{C}$  (10 min), and a hold at  $4^{\circ}\text{C}$ . The amplified VP1/2 capsid of 980 bp product was observed after electrophoresis in a 1.5% agarose gel.

The VP1/2 capsid PCR products were purified and sequenced using Big Dye Terminator cycle sequencing (Applied Biosystems, Foster City, USA, Cat No. 4,337,454) and semi-nested PCR primers according manufacturer instructions. Electrophoresis and data collection were done on an Applied Biosystems AB3100 genetic analyzer. Sequences were first aligned and edited using Sequence Navigator1 software (Applied Biosystems, Foster City, CA). The consensus sequence was generated by removing low quality base peaks at the end of the chromatogram and correcting base pair mismatches.

### Phylogenetic analysis

Genotypes were determined by phylogenetic analysis comparing the consensus sequence of each sample to reference VP1/2 capsid sequences including the Swedish reference sequences ST1 and ST2, and reference sequences of HBoV-2 (NC\_012042), HBoV-3 (NC\_012564), HBoV-4 (NC\_012729), BPV (NC\_001540.1), and MVC (NC\_004442.1).

Phylogenetic analyses were performed using MEGA software version 6 [26]. Briefly, sequences in FASTA format were aligned using Clustal W algorithm. Genetic distances were measured with the Kimura-2 parameter model. A phylogenetic tree was constructed with the neighbor-joining algorithm and robustness of the tree was evaluated with 1000 bootstrap resamplings.

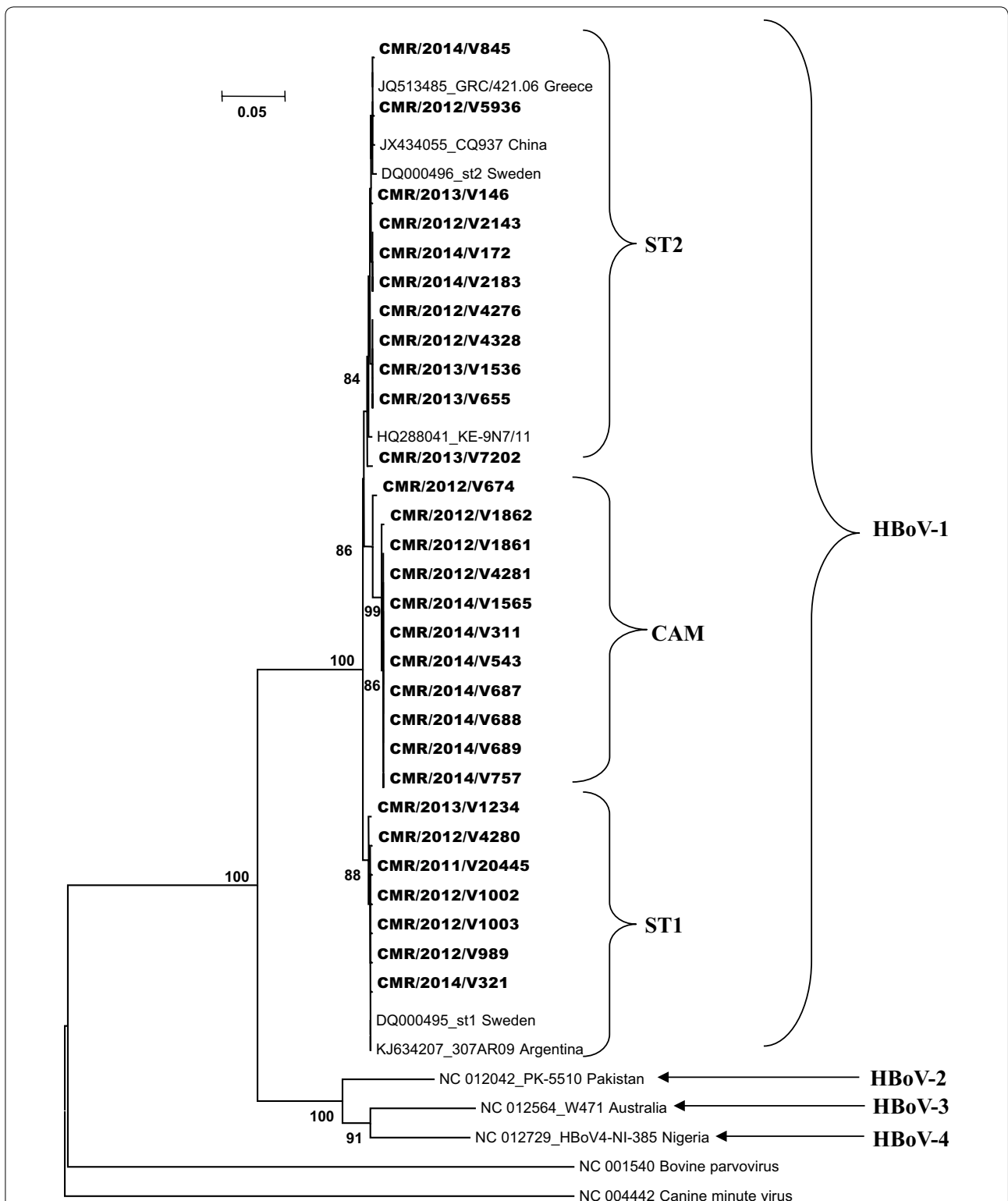
The MEGA software version 6 was used to generate predicted amino acid sequences from consensus nucleotide sequences by translation. The comparison of the sites and proportion of similarities at amino acid and nucleotide levels was made between consensus amino acid and nucleotide sequences of each Cameroonian HBoV sequences and ST1 and ST2 reference sequences.

All consensus nucleotide sequences obtained in this study were submitted to GenBank Database under accession numbers KX121135 to KX121163.

## Results

### Genotyping of HBoV isolates

Among the 80 HBoV positive samples, DNA in the VP1/2 capsid region could be amplified, sequenced and analysed



**Fig. 1** Neighbor-joining phylogenetic tree of the 29 human bocavirus strains from Cameroon, partial VP1/2 gene (839 bp). Sequences from this study are in *bold*. The number next to the node are bootstrap values. Only bootstrap values higher than 80% are presented. ST1 are sequences clustering with the reference sequence ST1. ST2 are sequences clustering with the reference sequence ST2. CAM are the Cameroon cluster group

phylogenetically in 29 samples (36.2%). The estimated phylogeny of these sequences and previously published VP1/2 capsid sequences including those of the four species of HBoV is shown in Fig. 1. All of the 29 sequences clustered with HBoV-1 reference sequences. Three clades were obtained, two clustering with each of the reference strains ST1 and ST2, and a third group consisting of only Cameroon strains (CAM).

By comparing with the Swedish reference sequences ST1 and ST2, Cameroon sequences showed nucleotide and amino acid similarities of respectively 97.36–100% and 98.35–100%.

### Nucleotide and amino acid polymorphisms

Based on the VP1/2 capsid gene of the Swedish reference strain (accession number NC\_007455), 28 of 717 nucleotides analyzed (position 1141–1857 of VP1/2 capsid gene) were found to be variable, with 21 (75%) transitions and 7 (25%) transversions. Ten nucleotide substitutions (G1243A, C1429T, G1470A, A1539G, C1542T, A1551G, T1619A, A1636C, T1800C, and A1821G) were specific to the Cameroonian clade: CAM (data not shown and available upon request). The description of the amino acid sequences deduced from HBoV-1 strains of this study was made with reference to the VP1/2 capsid domain of HBoV reference (accession number NC\_007455), which extended over a length of 239 amino acids (position 381–619). The HBoV strains analyzed in the study had the amino acid substitutions: G415S, N474S, F540Y, N546H, and S590T (data not shown and available upon request). Three of these amino-acid substitutions (G415S, F540Y, and N546H) were specific to the CAM clade.

### Discussion

This study reports for the first time molecular characteristics of HBoV in children suffering from acute respiratory infections in Cameroon. Only 29 (36.2%) tested samples were amplified by genotyping PCR on the VP1/2 capsid gene during this study. This low amplification rate can be explained by the high sensitivity of the detection technique compared to the genotyping technique, and also by the low viral load in unamplified samples (mean cycle threshold unamplified samples =  $35.6 \pm 1.8$  vs.  $28.1 \pm 6.3$  for the positive,  $p < 0.001$ ). Several studies have shown that HBoV-1 is a respiratory pathogen [5]. As expected, phylogenetic analysis of partial VP1/2 capsid gene sequences obtained in this study also revealed the presence of the HBoV-1 species. These viruses circulating among children with acute respiratory infections in Cameroon were divided into two genetic clades closely linked to ST1 and ST2 and a third clade made only of Cameroonian strains. The sequences revealed an extremely high homology with the original sequences (ST1 and ST2)

identified in Sweden in 2005. These results are consistent with findings of other authors from around the world [6, 7, 23]. However, unlike these results and others [6, 7, 15–17, 23], over 10 nucleotide substitutions leading to three amino acid mutations were specific to the CAM clade, suggesting that HBoV undergo higher selective pressures in Yaounde, Cameroon than in other regions.

Our study included limited number of patients from a single health care facility and is therefore not representative of our country. However, our sequences are also similar to those circulating in other countries, highlighting the low genetic variability of HBoV. In summary, our data indicates that HBoV-1 strains collected from 2011 to 2014 in Yaounde are divided in three groups. Two groups clustered with previously reported ST1 and ST2 genotypes, and the third group is an original Cameroonian genotype. The partial HBoV-1 VP1/2 gene sequences in Cameroon have relatively high genetic variations compared to others studies.

### Limitations

Our study included limited number of patients from a single health care facility and is therefore not representative of our country.

### Authors' contributions

RN, AV and VBP designed the study. SK, M-AV and MN-R carried out and interpreted experiments. SK conducted phylogenetic analyses and wrote the first draft of the paper. All authors read and approved the final manuscript.

### Author details

<sup>1</sup> Virology Unit, Centre Pasteur of Cameroon, Yaounde, BP 1274 Yaounde, Cameroon. <sup>2</sup> Biochemistry Department, Université de Yaounde 1, Yaounde, Cameroon. <sup>3</sup> Virology Service, Pôle de Biologie, CHU de Caen, Caen, France.

### Acknowledgements

We thank all laboratory and hospital staff involved data and respiratory samples collection used for this study and Dr. Matthieu Schoenhals for his assistance with the English language.

### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

### Availability of data and materials

All HBoV sequences analyzed in this study were published on Genbank with accession number KX121135 to KX121163.

### Ethics approval and consent to participate

Written informed consent was obtained from parents or guardians of all children enrolled in the study. The procedures of the original study (IMMI project) have been evaluated and approved by the National Research Ethics Committee and the Ministry of Health of Cameroon.

### Funding

This work was supported by the U.S. Department of Health and Human Services (DHHS) Grant Number 6 DESP060001-01-01 via the International Network of Pasteur Institutes and the 'Institut de Microbiologie et de Maladies Infectieuses' (IMMI) in France.

### Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Received: 12 April 2017 Accepted: 12 July 2017

Published online: 17 July 2017

## References

- Allander T, Tammi MT, Eriksson M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, Andersson B. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:12891–6.
- Kapoor A, Slikas E, Simmonds P, Chieochansin T, Naeem A, Shaikat S, et al. A newly identified bocavirus species in human stool. *J Infect Dis*. 2009;199:196–200.
- Kapoor A, Simmonds P, Slikas E, Li L, Bodhidatta L, Sethabutr O, et al. Human bocaviruses are highly diverse, dispersed, recombination prone, and prevalent in enteric infections. *J Infect Dis*. 2010;201:1633–43.
- Arthur JL, Higgins GD, Davidson GP, Givney RC, Ratcliff RM. A novel bocavirus associated with acute gastroenteritis in Australian children. *PLoS Pathog*. 2009;5:e1000391.
- Jartti T, Hedman K, Jartti L, Ruuskanen O, Allander T, Söderlund-Venermo M. Human bocavirus—the first 5 years. *Rev Med Virol*. 2012;22:46–64.
- Pogka V, Moutousi A, Kossyvakis A, Kalliaropoulos A, Sgouras DN, Giannaki M, et al. Genetic variability of human metapneumo- and bocaviruses in children with respiratory tract infections. *Influenza Other Respir Viruses*. 2014;8:107–15.
- Zappa A, Canuti M, Frati E, Pariani E, Perin S, Ruzza ML, et al. Co-circulation of genetically distinct human metapneumovirus and human bocavirus strains in young children with respiratory tract infections in Italy. *J Med Virol*. 2011;83:156–64.
- Guido M, Quattrocchi M, Campa A, Zizza A, Grima P, Romano A, et al. Human metapneumovirus and human bocavirus associated with respiratory infection in Apulian population. *Virology*. 2011;417:64–70.
- Dina J, Vabret A, Gouarin S, Petitjean J, Lecoq J, Brouard J, et al. Detection of human bocavirus in hospitalised children. *J Paediatr Child Health*. 2009;45:149–53.
- Lu Q-B, Wo Y, Wang H-Y, Huang D-D, Zhao J, Zhang X-A, et al. Epidemic and molecular evolution of human bocavirus in hospitalized children with acute respiratory tract infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015;34:75–81.
- Alam MM, Khurshid A, Shaikat S, Sharif S, Suleman RM, Angez M, et al. Human bocavirus in Pakistani children with gastroenteritis. *J Med Virol*. 2015;87:656–63.
- Tran DN, Nguyen TQN, Nguyen TA, Hayakawa S, Mizuguchi M, Ushijima H. Human bocavirus in children with acute respiratory infections in Vietnam. *J Med Virol*. 2014;86:988–94.
- Ahn JG, Choi SY, Kim DS, Kim KH. Human bocavirus isolated from children with acute respiratory tract infections in Korea, 2010–2011. *J Med Virol*. 2014;86:2011–8.
- Ghietto LM, Cámara A, Zhou Y, Pedranti M, Ferreyra S, Frey T, et al. High prevalence of human bocavirus 1 in infants with lower acute respiratory tract disease in Argentina, 2007–2009. *Braz J Infect Dis*. 2012;16:38–44.
- Longtin J, Bastien M, Gilca R, Leblanc E, de Serres G, Bergeron MG, et al. Human bocavirus infections in hospitalized children and adults. *Emerg Infect Dis*. 2008;14:217–21.
- Bastien N, Chui N, Robinson JL, Lee BE, Dust K, Hart L, et al. Detection of human bocavirus in Canadian children in a 1-year study. *J Clin Microbiol*. 2007;45:610–3.
- Kesebir D, Vazquez M, Weibel C, Shapiro ED, Ferguson D, Landry ML, et al. Human bocavirus infection in young children in the United States: molecular epidemiological profile and clinical characteristics of a newly emerging respiratory virus. *J Infect Dis*. 2006;194:1276–82.
- Misigo D, Mwaengo D, Mburu D. Molecular detection and phylogenetic analysis of Kenyan human bocavirus isolates. *J Infect Dev Ctries*. 2014;8:221–7.
- Smuts H, Workman L, Zar HJ. Role of human metapneumovirus, human coronavirus NL63 and human bocavirus in infants and young children with acute wheezing. *J Med Virol*. 2008;80:906–12.
- Smuts H, Hardie D. Human bocavirus in hospitalized children. *S Afr Emerg Infect Dis*. 2006;12:1457–8.
- Kenmoe S, Tchendjou P, Vernet M-A, Moyo-Tetang S, Mossus T, Njankouo-Ripa M, et al. Viral etiology of severe acute respiratory infections in hospitalized children in Cameroon, 2011–2013. *Influenza Other Respir Viruses*. 2016;10(5):386–93.
- Abdel-Moneim AS, Kamel MM, Al-Ghamdi AS, Al-Malky MR. Detection of bocavirus in children suffering from acute respiratory tract infections in Saudi Arabia. *PLoS ONE*. 2013;8:e55500.
- Nadji SA, Poos-Ashkan L, Khalilzadeh S, Baghaie N, Shiraghaei MJ, Hossain M, et al. Phylogenetic analysis of human bocavirus isolated from children with acute respiratory illnesses and gastroenteritis in Iran. *Scand J Infect Dis*. 2010;42:598–603.
- Hindiyeh MY, Keller N, Mandelboim M, Ram D, Rubinov J, Regev L, et al. High rate of human bocavirus and adenovirus coinfection in hospitalized Israeli children. *J Clin Microbiol*. 2008;46:334–7.
- Sloots TP, McErlean P, Speicher DJ, Arden KE, Nissen MD, Mackay IM. Evidence of human coronavirus HKU1 and human bocavirus in Australian children. *J Clin Virol*. 2006;35:99–102.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipiński A, Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*. 2013;30:2725–9.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)



## 5. Article soumis 1



# Tropical Medicine and Health

## Genetic diversity of Human Respiratory Syncytial Virus isolated among children in Southern Cameroon during three consecutive epidemic seasons, 2011-2013

--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>								
<b>Full Title:</b>	Genetic diversity of Human Respiratory Syncytial Virus isolated among children in Southern Cameroon during three consecutive epidemic seasons, 2011-2013							
<b>Article Type:</b>	Research							
<b>Funding Information:</b>	<table border="1"> <tr> <td>U.S. Department of Health and Human Services (6 DESP060001-01-01)</td> <td>Dr Richard Njouom</td> </tr> </table>	U.S. Department of Health and Human Services (6 DESP060001-01-01)	Dr Richard Njouom					
U.S. Department of Health and Human Services (6 DESP060001-01-01)	Dr Richard Njouom							
<b>Abstract:</b>	<p><b>Background:</b> Human Respiratory Syncytial Virus (HRSV) is the main viral cause of severe lower respiratory tract disease in infants and young children. The aim of this study was to describe for the first time the genetic variability of HRSV in Cameroonian patients living in Yaounde for three consecutive epidemic seasons.</p> <p><b>Methods:</b> HRSV positive nasopharyngeal samples detected in children less than 15 years in Yaounde were collected from September 2011 to December 2013. Semi-nested RT-PCR, sequencing, and phylogenetic analyses of the second variable region of the G gene were performed.</p> <p><b>Results:</b> A total of 57 HRSV positive samples were collected during the study period. Among these 46 (80.7%) could be amplified in the G gene. HRSV group A (HRSV-A) and group B (HRSV-B) co-circulated in this population at 17.4% and 82.6%, respectively. HRSV-A strains clustered in the NA-1 genotype while HRSV-B strains clustered in the BA-9 genotype. HRSV-A and HRSV-B co-circulated relatively at the same frequency in 2011 (2/6 vs 4/6, p=0,2) while HRSV-B predominated in 2012 (1/23 vs 22/23, p= 0.04) and 2013 (5/17 vs 12/17, p=0.1).</p> <p><b>Conclusions:</b> This study report for the first time on the genetic variability of HRSV G gene in Cameroon. Additional studies are required to clarify evolutionary pattern of respiratory viruses in sub-Saharan Africa in general.</p>							
<b>Corresponding Author:</b>	Richard Njouom, PhD Centre Pasteur of Cameroon Yaounde, CAMEROON							
<b>Corresponding Author Secondary Information:</b>								
<b>Corresponding Author's Institution:</b>	Centre Pasteur of Cameroon							
<b>Corresponding Author's Secondary Institution:</b>								
<b>First Author:</b>	Sebastien Kenmoe							
<b>First Author Secondary Information:</b>								
<b>Order of Authors:</b>	<table border="1"> <tr><td>Sebastien Kenmoe</td></tr> <tr><td>Marie-Astrid Vernet</td></tr> <tr><td>Fabien Mischczak</td></tr> <tr><td>Julia Dina</td></tr> <tr><td>Véronique Penlap Beng</td></tr> <tr><td>Astrid Vabret</td></tr> <tr><td>Richard Njouom, PhD</td></tr> </table>	Sebastien Kenmoe	Marie-Astrid Vernet	Fabien Mischczak	Julia Dina	Véronique Penlap Beng	Astrid Vabret	Richard Njouom, PhD
Sebastien Kenmoe								
Marie-Astrid Vernet								
Fabien Mischczak								
Julia Dina								
Véronique Penlap Beng								
Astrid Vabret								
Richard Njouom, PhD								
<b>Order of Authors Secondary Information:</b>								
<b>Opposed Reviewers:</b>								

1  
2 Genetic diversity of Human Respiratory Syncytial Virus isolated among children in Southern  
3 Cameroon during three consecutive epidemic seasons, 2011-2013.  
4  
5

6  
7 Sebastien Kenmoe<sup>1,2, 3, 4, 5</sup>, Marie-Astrid Vernet<sup>1</sup>, Fabien Miszczak<sup>2,3,4</sup>, Julia Dina<sup>2,3,4</sup>,  
8  
9 Véronique Penlap Beng<sup>5</sup>, Astrid Vabret<sup>2,3,4</sup>, Richard Njouom<sup>1\*</sup>  
10  
11

12  
13  
14 1: Virology Department, “Centre Pasteur du Cameroun”, P.O.Box 1274 Yaounde, Cameroon.

15  
16 E-Mails: ken\_sebas@yahoo.fr (SK); marie.vernet@pasteur-yaounde.org (MAV);  
17  
18 njouom@pasteur-yaounde.org (RN).  
19

20  
21 2: Normandie Université, 14032 Caen, France.  
22

23  
24 E-Mails: fabienmzz@yahoo.fr (FM); a-vabret@chu-caen.fr (AV); dina-j@chu-caen.fr (JD).  
25

26  
27 3: UNICAEN, UNIROUEN, GRAM, 14000, Caen, France  
28

29  
30 4: University Hospital of Caen, Department of Virology, 14000 Caen, France  
31

32  
33 5: Département de Biochimie, Université de Yaoundé 1, BP 812 Yaounde, Cameroun.  
34

35  
36 E-Mail: v.penlap@yahoo.fr (VPB).  
37  
38  
39  
40

41 \*Corresponding author: Richard Njouom, Associate Professor/HDR, Head Virology

42  
43 Department, Centre Pasteur of Cameroon, Yaounde, P.O.Box 1274 Yaounde, Cameroon.  
44

45  
46 Mail: njouom@pasteur-yaounde.org; Telephone: 00237 699654767; Fax: 00237 222231564  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## Abstract

**Background:** Human Respiratory Syncytial Virus (HRSV) is the main viral cause of severe lower respiratory tract disease in infants and young children. The aim of this study was to describe for the first time the genetic variability of HRSV in Cameroonian patients living in Yaounde for three consecutive epidemic seasons.

**Methods:** HRSV positive nasopharyngeal samples detected in children less than 15 years in Yaounde were collected from September 2011 to December 2013. Semi-nested RT-PCR, sequencing, and phylogenetic analyses of the second variable region of the G gene were performed.

**Results:** A total of 57 HRSV positive samples were collected during the study period. Among these 46 (80.7%) could be amplified in the G gene. HRSV group A (HRSV-A) and group B (HRSV-B) co-circulated in this population at 17.4% and 82.6%, respectively. HRSV-A strains clustered in the NA-1 genotype while HRSV-B strains clustered in the BA-9 genotype. HRSV-A and HRSV-B co-circulated relatively at the same frequency in 2011 (2/6 vs 4/6,  $p=0,2$ ) while HRSV-B predominated in 2012 (1/23 vs 22/23,  $p= 0.04$ ) and 2013 (5/17 vs 12/17,  $p=0.1$ ).

**Conclusions:** This study report for the first time on the genetic variability of HRSV G gene in Cameroon. Additional studies are required to clarify evolutionary pattern of respiratory viruses in sub-Saharan Africa in general.

**Keywords:** Cameroon, Genetic characterization, Human respiratory syncytial virus, Molecular epidemiology.

## Background

Human respiratory syncytial virus (HRSV) is the major viral cause of bronchiolitis and pneumonia in infants and young children worldwide. On the basis of a meta-analysis, Nair and his colleagues found an incidence of 33.8 million (95% CI, 19.3 to 46.2) cases of acute lower respiratory infections associated with HRSV each year in children under 5 years [1]. About 66-199 thousand deaths were recorded in the meta-analysis. A total of 91% of hospitalizations and nearly all deaths (99%) were registered in developing countries where access to health care is limited. According to the classification of the International Committee on Taxonomy of Viruses, HRSV belongs to the family *Paramyxoviridae* and a genus *Pneumovirus*. It is an enveloped virus with a genome consisting of negative sense RNA, single-stranded, non-segmented, and about 15,200 nucleotides. The envelope contains two main surface glycoproteins: the attachment protein (G) and the fusion protein (F), which are responsible for the attachment and viral entry into the host cell, respectively. The F protein is relatively conserved while the main differences between HRSV-A and HRSV-B are located on protein G. Protein G has a length varying from 282 to 321 amino acids (AA) according to the genotypes, and contains a cytoplasmic domain, a transmembrane domain, and an ectodomain. Cytoplasmic and transmembrane domains are conserved while the ectodomain has two hypervariable regions (HVR1 and HVR2), separated by a highly conserved central segment comprising the receptor binding site of 13 amino acids (AA 164-176) [2,3]. Due to its high variability, the HVR2 domain represents the main target for evolutionary and molecular epidemiology studies of HRSV [4–14]. Two major groups of HRSV (HRSV-A and HRSV-B) have been distinguished based on molecular and serological techniques [15]. Based on molecular techniques, these two groups can be subdivided into genotypes. The first HRSV genotypes GA-1 to 7 of HRSV-A group and GB-1 to 4 of HRSV-B group were reported by Peret and colleagues in 1998 and 2000 in the USA [16,17]. Thereafter, the genotypes of

1 HRSV-A group: SAA-1, NA-1 and 2, ON1, CB-A, and NA-3 and NA-4 have been described  
2 in South Africa, Japan, Canada, Korea, and China respectively [18–21]. Discovered in several  
3  
4 countries around the world, HRSV-B genotypes further include SAB-1 to 3, URU-1 and  
5  
6 URU-2, BA-1 to 14, SAB-4, CB-B, BA-C, CB-1, GB5, and THB [5,6,9,18,19,22–28]. Despite  
7  
8 huge efforts, no approved vaccine is available for prevention of HRSV infection [29].  
9  
10 Nevertheless, more than 60 vaccine development programs are under various stages and some  
11  
12 of them could be used in a near future. In the context of continuous genetic variability of  
13  
14 HRSV, monitoring genetic changes will help to detect emerging strains and a better  
15  
16 understanding of the need for annual changes of composition of a future HRSV vaccine. To  
17  
18 date, differentiation of HRSV strains into groups and genotypes has not been performed in  
19  
20 many African sub-Saharan countries [30,31]. An initial study in Cameroon showed that  
21  
22 HRSV circulated in the rainy season from October to December at 5.7% in outpatients with  
23  
24 influenza-like illness visiting influenza surveillance centers in 2009 [32]. Recently, we  
25  
26 showed that HRSV was the second most common respiratory virus (13.3%) after human  
27  
28 adenovirus in children hospitalized in Yaounde, Cameroon [33]. We examine here the genetic  
29  
30 variability of the G gene (HVR2) of HRSV strains detected for three consecutive epidemic  
31  
32 seasons (2011-2014) in Cameroonian children.  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42

## 43 **Materials and methods**

### 44 **HRSV samples**

45  
46  
47  
48 In this study, 46 HRSV positive nasopharyngeal swabs were obtained from a previous study  
49  
50 conducted from September 2011 to September 2013 in Yaounde, Cameroon [33]. Eleven  
51  
52 additional HRSV positive samples collected from October to December 2013 were included  
53  
54  
55  
56  
57  
58 in the study. Samples were submitted to the “Centre Pasteur du Cameroon” as part of  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 influenza surveillance in Cameroon and the IMMI (Institut de Microbiologie et de Maladies  
2 Infectieuses) project. Written informed consent was obtained from parents or guardians of all  
3 children enrolled in the study. The procedures of the original study were evaluated and  
4 approved by the National Ethics Committee and the Ministry of Public Health of Cameroon.  
5  
6 The clinical and demographic characteristics of the study population have already been  
7 described elsewhere [33].  
8  
9

### 10 11 12 13 14 15 16 17 **RNA extraction, HRSV G gene amplification, and sequencing**

18 RNA was extracted HRSV positive nasopharyngeal swabs as described elsewhere [33] and  
19 the HRSV G gene was amplified by using semi-nested RT-PCR with primers targeting the  
20 HVR2 region of the G gene [10,34]. The RT-PCR reaction was performed with the  
21 SuperScript® III One-Step RT-PCR System following the manufacturer's  
22 instructions. Briefly, 5 µL of extract were added to 45 µL of PCR reaction mixture containing  
23 ABG490 forward and F164 reverse primers. The primer ABG490 corresponds to the position  
24 497-519 of the G gene sequences of A2 reference sequence. The primer F164 is located at  
25 position 164-186 nucleotides of the F gene sequences of A2. A semi-nested amplification  
26 reaction was then performed with Taq DNA Polymerase (Invitrogen, USA) according to the  
27 manufacturer's instructions (Invitrogen). Briefly, 2.5 µL of the DNA of the RT-PCR was  
28 added to 45 µL of PCR reaction mixture containing forward primers [AG655 for HRSV-A  
29 and BG517 for HRSV-B], and F164 reverse primer. The primer AG655 is at position 655-674  
30 of the G gene of the A2 reference strain and BG517 at the position 517-538 of the reference  
31 strain CH18537 (M17213). Fragments amplified in the semi-nested PCR were bi-directionally  
32 sequenced by Sanger method. The primers used for sequencing were the same as those used  
33 for the semi-nested PCR.  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## Sequence alignment and phylogenetic tree construction

The phylogenetic analysis was performed on the HVR2 region of the HRSV genome. Sequences from this study, as well as the sequences of other reference studies around the world, have been aligned using the CLUSTAL W algorithm [35]. A phylogenetic tree was constructed with the maximum-likelihood method. The robustness of the tree was evaluated using 1,000 bootstrap resampling. Comparison of our isolates to reference strains A2 (M11486) and BA4128/99B (AY333364) was made to identify similarity proportions. The phylogenetic analysis was performed using MEGA software version 6 [36]. The nucleotide sequences of this study were submitted to Genbank and registered with the accession numbers KU928193 to KU928238.

## Results

### HRSV genotyping

A total of 57 HRSV-positive samples were included in this study. Among these 46 (80.7%) samples could be amplified and sequenced in the G gene including 6 in 2011, 23 in 2012 and 17 in 2013. The mean cycle threshold of amplified samples were significantly lower than unamplified ( $23.9 \pm 5.1$  Vs  $31.9 \pm 5.4$ ;  $p < 0.001$ ). HRSV group A (HRSV-A) and group B (HRSV-B) co-circulated in this population at 17.4% and 82.6%, respectively (Figure 1). Distribution of HRSV groups varied according to epidemic season. HRSV-A (33.3%; 2/6) and HRSV-B (66.7%, 4/6) co-circulated almost at the same frequency in 2011. In 2012 and 2013, HRSV-B predominated on HRSV-A strains. HRSV-B accounted for 95.7% (22/23) and 70.6% (12/17) of strains detected in 2012 and 2013, respectively. HRSV-A strains clustered in the NA-1 genotype while HRSV-B strains clustered in the BA-9 genotype (Figure 2 and 3). BA-9 genotype was further classified into 2 sub-branches that were labeled as subtypes BA-

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

9a and BA-9b. Temporal trends for BA-9 detections in Yaounde show that BA-9a and BA-9b were detected in the 2011/12 and 2012/13 epidemic seasons, respectively.

### **Analysis of nucleotide sequences**

The percentage of divergence between Cameroonian HRSV-A sequences and A2 reference strain ranged from 13.8 to 15% at the nucleotide level, and 24.7 to 28.8% at the amino acid sequence level. The percentage of difference between the HRSV-B strains from this study and that of the BAI (BA4128/99B) reference strain ranged from 3.5 to 5.4% at the genetic level and 5.4 to 10.3% at the protein level.

### **Analysis of deduced amino acid sequences**

The HVR2 of 8 NA-1 strains of this study were aligned with the NA-1 genotype from 11 countries and with the reference strain A2 (M11486) (Figure 4). Five NA-1 nucleotide sequences of this study had a premature stop codon (Q298Stop) which resulted in a sequence of 64 amino acids. The substitutions N237D, S269T, P274L, P286L, P289S, P292S, R297K, and Q298stop, previously reported as specific to NA-1 genotype [5,12,20,34,37] were also found in the NA-1 sequences of the current study. The HVR2 of 38 BA-9 strains of the present study were aligned with sequences of 11 other countries and the BA4128/99B reference sequence (Figure 5). Thirty six BA-9 nucleotide sequences of this study had a nucleotide mutation which led to the occurrence of a premature stop codon (Q313Stop), resulting in a sequence of 100 amino acids. Two remaining Cameroonian sequences [CMR/2012/V-4772 and CMR/2013/V-4982] have a length of 106 amino acids due to a mutation which has led to the replacement of the BA4128/99B stop codon by glutamine at position 316. As previously described, substitutions K218T and S247P were specific to all BA-9 genotypes [26]. BA-9 genotype specific mutations, T270I, V271A, and H287Y,



1 reported by previous studies were also recorded during this work [6,12,14,22,34]. I281T and  
2 P291L mutations previously attributed to BA-9 subgroup genotype were specific to BA-9a  
3 and BA-9b sub-group sequences, respectively [13]. The variation K233I, Q284R, and P291L  
4 and BA-9b sub-group sequences, respectively [13]. The variation K233I, Q284R, and P291L  
5 reported as specific to BA-13 genotype, was noted only in the Cameroonian sequences of the  
6 BA-9b genotype of this study [24]. Two sequences of the BA-9b genotype had four specific  
7 mutations: P231S, K233T, P238R, and S309P. It should be noted that the P231S change had  
8 been already identified in BA-10 HRSV genotype [5,37].  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18

## 19 **Discussion**

20  
21 The molecular characterization of the HVR2 C-terminal domain of HRSV G gene of HRSV  
22 sequences collected from Cameroonian individuals in Yaounde, Cameroon was performed.  
23  
24 This study was carried out for 3 epidemic seasons, from September 2011 to December 2013.  
25  
26 As reported in other studies, 19.2% (11/57) positive samples in generic real time RT-PCR  
27 have not been amplified by semi-nested RT-PCR for sequencing [7,8,11,38]. This result may  
28 be due to a low viral load in unamplified samples. All HRSV-B viruses had a BA genotype  
29 specific duplication of 60 nucleotides in the HVR2 domain. More than 15 years after the first  
30 detection of this HRSV-B genotype in Buenos Aires, Argentina, their wide dissemination  
31 affirms their great adaptation to humans. The first members of the BA genotype were initially  
32 defined by an identical reproduction of the 60 nucleotides duplicated [27]. The additional and  
33 continual genetic variability observed in these BA genotypes probably gives them a  
34 considerable fitness advantage. To date, almost 16 different BA genotypes have been reported  
35 worldwide [6,18,19,22,24,34,38,39]. This wide genetic divergence could be favored by the  
36 host immunity pressure. As observed in several other studies, a BA-9 genotype, described for  
37 the first time by Dapat et al. in 2010, is very diversified and has been classified into  
38 subgroups [12,13,24,38]. In the present work the comparison of Cameroonian BA-9  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 sequences with other reference sequences revealed that BA-9 was divided into two different  
2 clusters referred to as BA-9a and BA-9b. Similar to other studies, the divergence rate of  
3  
4 HRSV-A and HRSV-B sequences in the study was higher at the protein level than at the  
5  
6 nucleotide level [4,5,14,16,26,34,37,39].  
7

## 8 9 **Conclusion**

10 The current study provides data for the first time on HRSV genotypes circulating in Yaounde,  
11  
12 Cameroon. Genetic characterization of HRSV G glycoprotein, the main target of many  
13  
14 vaccines under development, indicated that two HRSV subtypes (NA-1 and BA-9) co-  
15  
16 circulated during the study. This study also points out importance of carrying out other studies  
17  
18 in limited-resource countries such as Cameroon where data remain scarce.  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25

## 26 **List of abbreviations**

- 27
- 28
- 29
- 30
- 31
- 32 - Human respiratory syncytial virus (HRSV)
- 33 - Amino acids (AA)
- 34 - Hypervariable regions (HVR)
- 35
- 36

## 37 38 **Declarations**

## 39 40 41 42 **Ethics approval and consent to participate**

43  
44  
45  
46  
47 Samples were submitted to the “Centre Pasteur du Cameroon” as part of influenza  
48  
49 surveillance in Cameroon and the IMMI (Institut de Microbiologie et de Maladies  
50  
51 Infectieuses) project. Written informed consent was obtained from parents or guardians of all  
52  
53 children enrolled in the study. The procedures of the original study were evaluated and  
54  
55 approved by the National Ethics Committee and the Ministry of Public Health of Cameroon.  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

### **Availability of data and material**

The nucleotide sequences of this study were submitted to Genbank and registered with the accession numbers KU928193 to KU928238.

### **Competing interests**

None

### **Funding**

This work was funded by the U.S. Department of Health and Human Services (DHHS) grant number 6 DESP060001-01-01 via the International Network of Pasteur Institutes and the ‘Institut de Microbiologie et de Maladies Infectieuses’ (IMMI) in France.

### **Author’s contributions**

N.J. designed the study; K.S. and V.M-A. carried out and interpreted experiments; K.S. and F.M. conducted phylogenetic analyses. K.S. wrote the first draft of the paper; All authors reviewed the manuscript critically and approved of the final manuscript as submitted.

### **Acknowledgements**

Not applicable

**Consent for publication**

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8
- 9
- 10
- 11
- 12
- 13
- 14
- 15
- 16
- 17
- 18
- 19
- 20
- 21
- 22
- 23
- 24
- 25
- 26
- 27
- 28
- 29
- 30
- 31
- 32
- 33
- 34
- 35
- 36
- 37
- 38
- 39
- 40
- 41
- 42
- 43
- 44
- 45
- 46
- 47
- 48
- 49
- 50
- 51
- 52
- 53
- 54
- 55
- 56
- 57
- 58
- 59
- 60
- 61
- 62
- 63
- 64
- 65

Not applicable

## References

1. Nair H, Nokes DJ, Gessner BD, Dherani M, Madhi SA, Singleton RJ, et al. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2010;375:1545–55.
2. Johnson PR, Spriggs MK, Olmsted RA, Collins PL. The G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses of subgroups A and B: extensive sequence divergence between antigenically related proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1987;84:5625–9.
3. Sullender WM, Mufson MA, Anderson LJ, Wertz GW. Genetic diversity of the attachment protein of subgroup B respiratory syncytial viruses. *J. Virol.* 1991;65:5425–34.
4. Aamir UB, Alam MM, Sadia H, Zaidi SSZ, Kazi BM. Molecular Characterization of Circulating Respiratory Syncytial Virus (RSV) Genotypes in Gilgit Baltistan Province of Pakistan during 2011-2012 Winter Season. *PLoS ONE* [Internet]. 2013 [cited 2015 Oct 30];8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3772930/>
5. Arnott A, Vong S, Mardy S, Chu S, Naughtin M, Sovann L, et al. A Study of the Genetic Variability of Human Respiratory Syncytial Virus (HRSV) in Cambodia Reveals the Existence of a New HRSV Group B Genotype<sup>∇</sup>. *J. Clin. Microbiol.* 2011;49:3504–13.
6. Dapat IC, Shobugawa Y, Sano Y, Saito R, Sasaki A, Suzuki Y, et al. New Genotypes within Respiratory Syncytial Virus Group B Genotype BA in Niigata, Japan. *J. Clin. Microbiol.* 2010;48:3423–7.
7. de-Paris F, Beck C, de Souza Nunes L, Machado ABMP, Paiva RM, da Silva Menezes D, et al. Evaluation of respiratory syncytial virus group A and B genotypes among nosocomial and community-acquired pediatric infections in southern Brazil. *Virol. J.* 2014;11:36.
8. Hirsh S, Hindiyeh M, Kolet L, Regev L, Sherbany H, Yaary K, et al. Epidemiological Changes of Respiratory Syncytial Virus (RSV) Infections in Israel. *PLoS ONE* [Internet]. 2014 [cited 2015 Oct 30];9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3940902/>
9. Khor C-S, Sam I-C, Hooi P-S, Chan Y-F. Displacement of predominant respiratory syncytial virus genotypes in Malaysia between 1989 and 2011. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* 2013;14:357–60.
10. Kushibuchi I, Kobayashi M, Kusaka T, Tsukagoshi H, Ryo A, Yoshida A, et al. Molecular evolution of attachment glycoprotein (G) gene in human respiratory syncytial virus detected in Japan 2008-2011. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* 2013;18:168–73.
11. Liu J, Mu Y, Dong W, Yao F, Wang L, Yan H, et al. Genetic variation of human respiratory syncytial virus among children with fever and respiratory symptoms in Shanghai, China, from 2009 to 2012. *Infect. Genet. Evol.* 2014;27:131–6.

- 1  
2  
3 12. Ohno A, Suzuki A, Lupisan S, Galang H, Sombrero L, Aniceto R, et al. Genetic  
4 characterization of human respiratory syncytial virus detected in hospitalized children in the  
5 Philippines from 2008 to 2012. *J. Clin. Virol.* 2013;57:59–65.  
6
- 7 13. Tabatabai J, Prifert C, Pfeil J, Grulich-Henn J, Schnitzler P. Novel Respiratory Syncytial  
8 Virus (RSV) Genotype ON1 Predominates in Germany during Winter Season 2012–13. *PLoS*  
9 *ONE* [Internet]. 2014 [cited 2015 Oct 30];9. Available from:  
10 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4188618/>  
11
- 12 14. Tran DN, Pham TMH, Ha MT, Tran TTL, Dang TKH, Yoshida L-M, et al. Molecular  
13 Epidemiology and Disease Severity of Human Respiratory Syncytial Virus in Vietnam. *PLoS*  
14 *ONE* [Internet]. 2013 [cited 2015 Oct 30];8. Available from:  
15 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3551923/>  
16  
17 15. Mufson MA, Orvell C, Rafnar B, Norrby E. Two distinct subtypes of human respiratory  
18 syncytial virus. *J. Gen. Virol.* 1985;66 ( Pt 10):2111–24.  
19
- 20 16. Peret TC, Hall CB, Schnabel KC, Golub JA, Anderson LJ. Circulation patterns of  
21 genetically distinct group A and B strains of human respiratory syncytial virus in a  
22 community. *J. Gen. Virol.* 1998;79 ( Pt 9):2221–9.  
23
- 24 17. Peret TCT, Hall CB, Hammond GW, Piedra PA, Storch GA, Sullender WM, et al.  
25 Circulation Patterns of Group A and B Human Respiratory Syncytial Virus Genotypes in 5  
26 Communities in North America. *J. Infect. Dis.* 2000;181:1891–6.  
27
- 28 18. Baek YH, Choi EH, Song M-S, Pascua PNQ, Kwon H, Park S-J, et al. Prevalence and  
29 genetic characterization of respiratory syncytial virus (RSV) in hospitalized children in Korea.  
30 *Arch. Virol.* 2012;157:1039–50.  
31
- 32 19. Cui G, Zhu R, Qian Y, Deng J, Zhao L, Sun Y, et al. Genetic Variation in Attachment  
33 Glycoprotein Genes of Human Respiratory Syncytial Virus Subgroups A and B in Children in  
34 Recent Five Consecutive Years. *PLoS ONE* [Internet]. 2013 [cited 2015 Oct 17];8. Available  
35 from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3775769/>  
36
- 37 20. Eshaghi A, Duvvuri VR, Lai R, Nadarajah JT, Li A, Patel SN, et al. Genetic Variability of  
38 Human Respiratory Syncytial Virus A Strains Circulating in Ontario: A Novel Genotype with  
39 a 72 Nucleotide G Gene Duplication. *PLoS ONE* [Internet]. 2012 [cited 2015 Oct 17];7.  
40 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3314658/>  
41  
42 21. Shobugawa Y, Saito R, Sano Y, Zaraket H, Suzuki Y, Kumaki A, et al. Emerging  
43 Genotypes of Human Respiratory Syncytial Virus Subgroup A among Patients in Japan. *J.*  
44 *Clin. Microbiol.* 2009;47:2475–82.  
45  
46 22. Auksornkitti V, Kamprasert N, Thongkomplew S, Suwannakarn K, Theamboonlers A,  
47 Samransamruajkij R, et al. Molecular characterization of human respiratory syncytial virus,  
48 2010-2011: identification of genotype ON1 and a new subgroup B genotype in Thailand.  
49 *Arch. Virol.* 2013;159:499–507.  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

- 1  
2  
3 23. Blanc A, Delfraro A, Frabasile S, Arbiza J. Genotypes of respiratory syncytial virus group  
4 B identified in Uruguay. *Arch. Virol.* 2004;150:603–9.  
5  
6 24. Gimferrer L, Andrés C, Campins M, Codina MG, Rodrigo JA, Melendo S, et al.  
7 Circulation of a novel human respiratory syncytial virus Group B genotype during the 2014-  
8 2015 season in Catalonia (Spain). *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin.*  
9 *Microbiol. Infect. Dis.* 2015;  
10  
11 25. Ren L, Xiao Q, Zhou L, Xia Q, Liu E. Molecular characterization of human respiratory  
12 syncytial virus subtype B: A novel genotype of subtype B circulating in China. *J. Med. Virol.*  
13 2015;87:1–9.  
14  
15 26. Trento A, Viegas M, Galiano M, Videla C, Carballal G, Mistchenko AS, et al. Natural  
16 History of Human Respiratory Syncytial Virus Inferred from Phylogenetic Analysis of the  
17 Attachment (G) Glycoprotein with a 60-Nucleotide Duplication. *J. Virol.* 2006;80:975–84.  
18  
19 27. Trento A, Galiano M, Videla C, Carballal G, García-Barreno B, Melero JA, et al. Major  
20 changes in the G protein of human respiratory syncytial virus isolates introduced by a  
21 duplication of 60 nucleotides. *J. Gen. Virol.* 2003;84:3115–20.  
22  
23 28. Ábrego LE, Delfraro A, Franco D, Castillo J, Castillo M, Moreno B, et al. Genetic  
24 Variability of Human Respiratory Syncytial Virus Group B in Panama Reveals a Novel  
25 Genotype BA14. *J. Med. Virol.* 2017;  
26  
27 29. PATH. RSV Vaccine and mAb Snapshot - PATH Vaccine Resource Library [Internet].  
28 2017 [cited 2017 Aug 15]. Available from:  
29 <http://www.path.org/vaccineresources/details.php?i=1562>  
30  
31 30. Agoti CN, Otieno JR, Ngama M, Mwihuri AG, Medley GF, Cane PA, et al. Successive  
32 Respiratory Syncytial Virus Epidemics in Local Populations Arise from Multiple Variant  
33 Introductions, Providing Insights into Virus Persistence. *J. Virol.* 2015;89:11630–42.  
34  
35 31. Fall A, Dia N, Cisse EHAK, Kiori DE, Sarr FD, Sy S, et al. Epidemiology and Molecular  
36 Characterization of Human Respiratory Syncytial Virus in Senegal after Four Consecutive  
37 Years of Surveillance, 2012-2015. *PloS One.* 2016;11:e0157163.  
38  
39 32. Njouom R, Yekwa EL, Cappy P, Vabret A, Boisier P, Rousset D. Viral Etiology of  
40 Influenza-Like Illnesses in Cameroon, January–December 2009. *J. Infect. Dis.* 2012;206:S29–  
41 35.  
42  
43 33. Kenmoe S, Tchendjou P, Vernet M-A, Moyo-Tetang S, Mossus T, Njankouo-Ripa M, et  
44 al. Viral etiology of Severe Acute Respiratory Infections in hospitalized children in  
45 Cameroon, 2011-2013. *Influenza Other Respir. Viruses.* 2016;n/a-n/a.  
46  
47 34. Forcic D, Ivancic-Jelecki J, Mlinaric-Galinovic G, Vojnovic G, Babic-Erceg A, Tabain I.  
48 A study of the genetic variability of human respiratory syncytial virus in Croatia, 2006–2008.  
49 *J. Med. Virol.* 2012;84:1985–92.  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

- 1  
2  
3 35. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of  
4 progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap  
5 penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 1994;22:4673–80.  
6  
7 36. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary  
8 Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 2013;30:2725–9.  
9  
10 37. Tuan TA, Thanh TT, Hai N thi T, Tinh LBB, Kim L thi N, Do LAH, et al.  
11 Characterization of hospital and community-acquired respiratory syncytial virus in children  
12 with severe lower respiratory tract infections in Ho Chi Minh City, Vietnam, 2010. *Influenza  
13 Other Respir. Viruses.* 2015;9:110–9.  
14  
15 38. Gimferrer L, Campins M, Codina MG, Martín M del C, Fuentes F, Esperalba J, et al.  
16 Molecular epidemiology and molecular characterization of respiratory syncytial viruses at a  
17 tertiary care university hospital in Catalonia (Spain) during the 2013–2014 season. *J. Clin.  
18 Virol.* 2015;66:27–32.  
19  
20 39. Choudhary ML, Anand SP, Wadhwa BS, Chadha MS. Genetic variability of human  
21 respiratory syncytial virus in Pune, Western India. *Infect. Genet. Evol.* 2013;20:369–77.  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65



## Figure legends

1  
2  
3  
4  
5 Figure 1: Phylogenetic trees of HRSV strains detected in Cameroon from 2011 to 2013. The  
6  
7 multiple sequence alignment was performed with Clustal W. The unrooted trees were  
8  
9 generated based on nucleotide sequences of the C-terminal HVR2 region of the G gene using  
10  
11 the maximum-likelihood method in MEGA version 6. The scale bars represent the frequency  
12  
13 of substitutions nucleotides and numbers at the nodes of the branches are the values  
14  
15 determined for the bootstrap resampling after 1000 iterations. Only bootstrap values >70% are  
16  
17 presented. The reference sequences from different continents, obtained from Genbank, are  
18  
19 identified from the left to the right with accession number, name of the strain, country, and  
20  
21 genotype. Current study strains are identified from left to right by CMR (Cameroon), the year  
22  
23 of detection and the laboratory number. The sequences of Cameroon are marked with (▲),  
24  
25 (●) and (■) for the 2011, 2012 and 2013, respectively. The groups/genotypes assigned to  
26  
27 branches are in the right after the bars.  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35

36 Figure 2: Phylogenetic trees of HRSV-A strains detected in Cameroon from 2011 to 2013.  
37  
38 The multiple sequence alignment was performed with Clustal W. The unrooted trees were  
39  
40 generated based on nucleotide sequences of the C-terminal HVR2 region of the G gene using  
41  
42 the maximum-likelihood method in MEGA version 6. The scale bars represent the frequency  
43  
44 of substitutions nucleotides and numbers at the nodes of the branches are the values  
45  
46 determined for the bootstrap resampling after 1000 iterations. Only bootstrap values >70% are  
47  
48 presented. The reference sequences from different continents, obtained from Genbank, are  
49  
50 identified from the left to the right with accession number, name of the strain, country, and  
51  
52 genotype. Current study strains are identified from left to right by CMR (Cameroon), the year  
53  
54 of detection and the laboratory number. The sequences of Cameroon are marked with (▲),  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

(●) and (■) for the 2011, 2012 and 2013, respectively. The groups/genotypes assigned to branches are in the right after the bars.

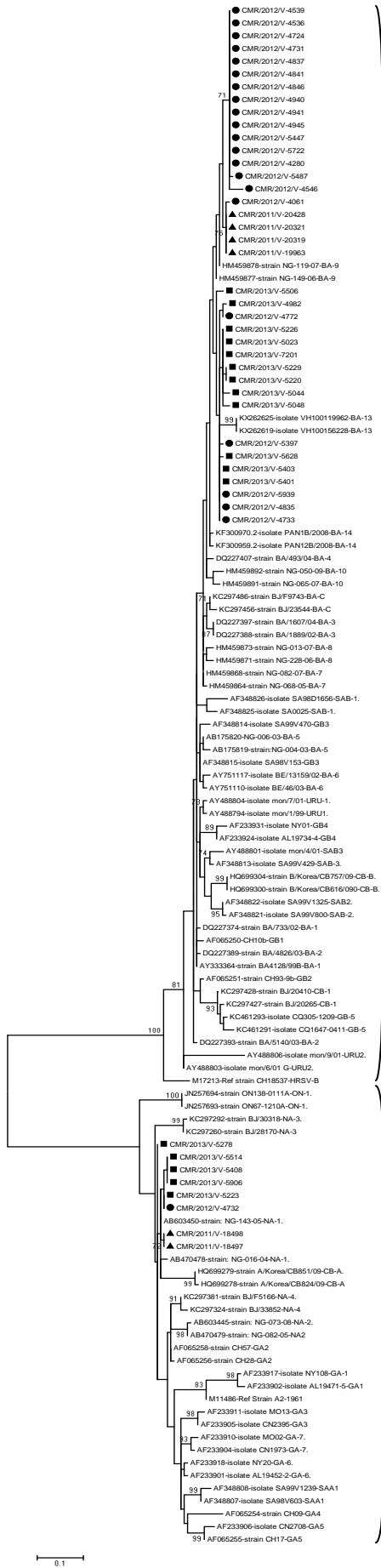
Figure 3: Phylogenetic trees of HRSV-B strains detected in Cameroon from 2011 to 2013. The multiple sequence alignment was performed with Clustal W. The unrooted trees were generated based on nucleotide sequences of the C-terminal HVR2 region of the G gene using the maximum-likelihood method in MEGA version 6. The scale bars represent the frequency of substitutions nucleotides and numbers at the nodes of the branches are the values determined for the bootstrap resampling after 1000 iterations. Only bootstrap values >70% are presented. The reference sequences from different continents, obtained from Genbank, are identified from the left to the right with accession number, name of the strain, country, and genotype. Current study strains are identified from left to right by CMR (Cameroon), the year of detection and the laboratory number. The sequences of Cameroon are marked with (▲), (●) and (■) for the 2011, 2012 and 2013, respectively. The groups/genotypes assigned to branches are in the right after the bars.

Figure 4: Alignment of deduced amino acid of the second hypervariable region of the G gene from the sequences of HRSV-A. The alignments are presented in reference to A2 prototype strain (M11486, position 234-300). Identical residues are represented by dots and stop codons by asterisks. The lack of amino acid is represented by dashes. The light gray shading delineates the borders Cameroonian sequences. The reference sequences are identified from the left to the right by their Genbank accession number, name of the strain, country, and genotype. Cameroonian sequences are named from the left to the right by CMR (Cameroon), the year of detection and the lab number.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

Figure 5: Alignment of deduced amino acid of the second hypervariable region of the G gene from the sequences of HRSV-B. The alignments are presented in reference to BA4128/99B prototype strain (AY333364, position 213-321). Identical residues are represented by dots and stop codons by asterisks. The lack of amino acid is represented by dashes. The two copies of duplicated region of 20 amino acids specific for BA genotype are represented by simple rectangles. Genotypes/subgroups are shown on the right. The light gray shading delineates the borders Cameroonian sequences. The reference sequences are identified from the left to the right by their Genbank accession number, name of the strain, country, and genotype. Cameroonian sequences are named from the left to the right by CMR (Cameroon), the year of detection and the lab number.

Figure 1



HRSV-B

HRSV-A

0.1

Figure 2

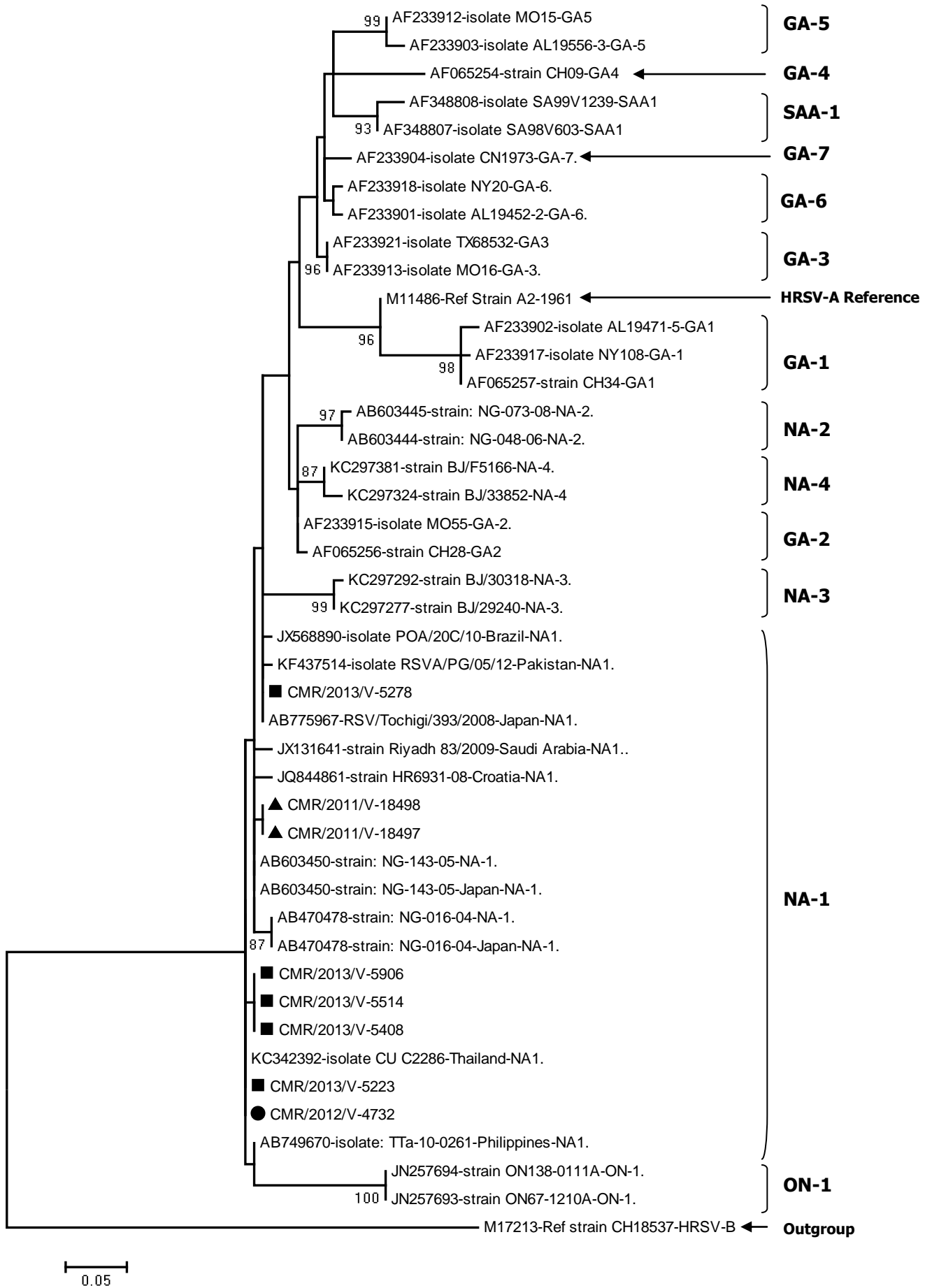


Figure 3

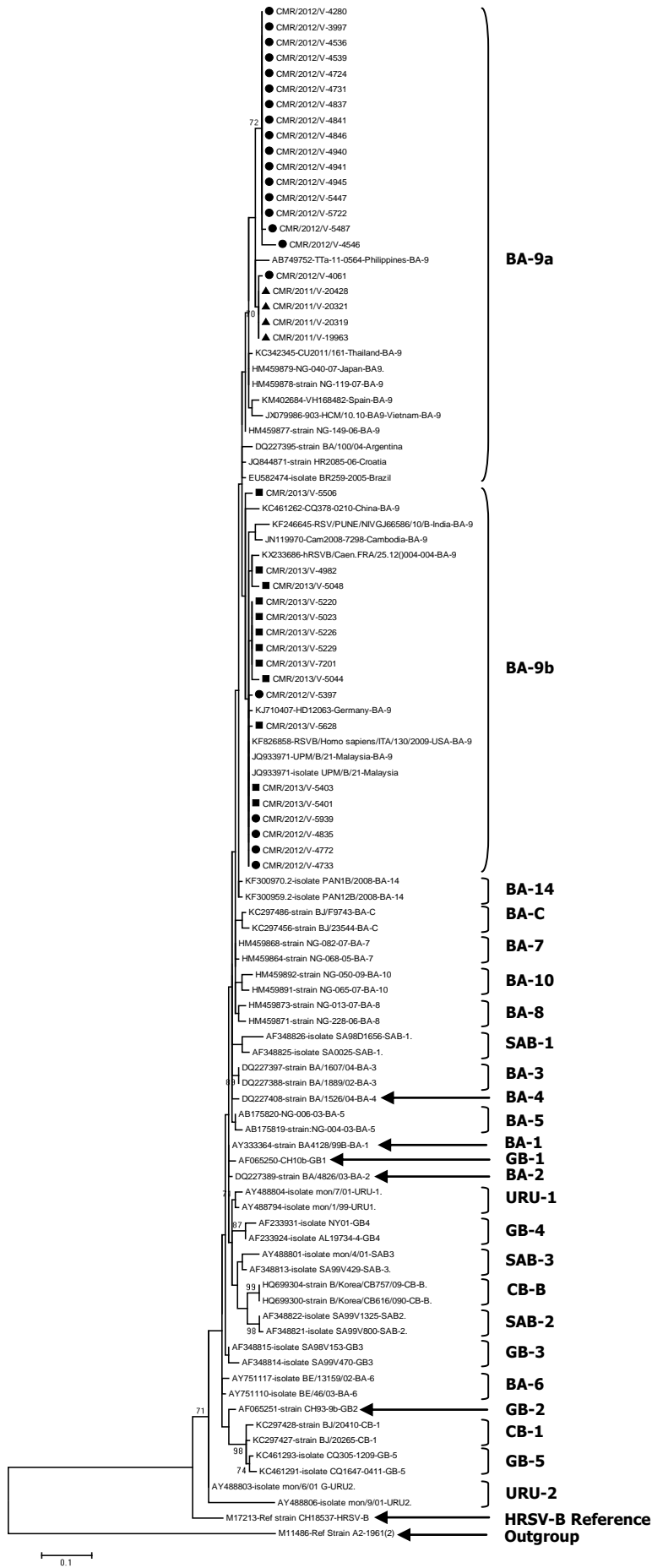


Figure 4

	240	250	260	270	280	290	
M11486-Ref Strain A2	P T I N T T K T N I I T T L L T S	N T T G N P E L T S	Q M E T F H S T S	S E G N P S P S Q V	S T T S E Y P S Q P S	S P P N T P R Q * L	
CMR/2011/V-18497		R	H	E	L	Y	S P S S T K * S
CMR/2011/V-18498		R	H	E	L	Y	S P S S T K * S
CMR/2012/V-4732	L	R	H	E	L	Y	S P S S T K * S
CMR/2013/V-5223	L	R	H	E	L	Y	S P S S T K * S
CMR/2013/V-5278	D	R	H	E	L	Y	S P S S T K * S
CMR/2013/V-5408		R	H	E	L	Y	S P S S T I L S
CMR/2013/V-5514		R	H	E	L	Y	S P S S T K L S
CMR/2013/V-5906		R	H	E	L	Y	S P S S T I L S
KC476772-isolate SA01-04291-South Africa-NA1.	T R P P		H	E	L	Y	S P S S T K * S
KJ658820-isolate SH11081503NA1-China-NA1		R	H	E	L	Y	S P S S T K * S
AB749670-isolate: TTa-10-0261-Philippines-NA1.		R	H	E	L	Y	S P S S T K * S
AB470478-strain: NG-016-04-Japan-NA-1.	D	R	H N	E	L	Y	S P S S T K * S
JF714706-strain Riyadh 91/2009-Saudi Arabia-NA1.	D	R	H	E	L	Y	S P S S T K * S
JQ844861-strain HR6931-08-Croatia-NA1.	D	R	H	E	L	Y	S P S S T K * S
KC342391-isolate CU C2277-Thailand-NA1.	D	R	Y H	E	L	Y	S P S S Y T K * S
KJ710381-strain HD12188-Germany-NA1.	D I	R	H	E	L	R Y	S P S S S K * S
JX131638-strain Riyadh 38/2008-Saudi Arabia-NA1.	D	R	H	E	L	T S Y	S P S S T K * S
JX568890-isolate POA/20C/10-Brazil-NA1.	D	R	H	E	L	Y	S P S S T K * S
KF246617-strain RSV/PUNE/NIV1062994/10/A-India-NA1.	D	P R	H	E	L	T K Y	S P S S T K * S
KF437514-isolate RSVA/PG/05/12-Pakistan-NA1.	D I	R	H	E	L	Y	S P S S T K * S

Figure 5

	220	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320
	K R D P K K L A K T L K K E T T I N P T K K P T P K T	T E R D T S T S Q S T V L D T T T S K H	T E R D T S T S Q S T V L D T T T S K H	T I Q Q Q S L H S T T P E N T P N S T Q T P T A S E P S T S N S T Q K L S Y A L							
AY33364-strain BA4128998-BA1											
CMR/2011/V-19963	T	P	P	P	I	I	T	Y			O
CMR/2011/V-20319	T	P	P	P	I	I	T	Y			O
CMR/2011/V-20321	T	P	P	P	I	I	T	Y			O
CMR/2011/V-20428	T	P	P	P	I	I	T	Y			O
CMR/2012/V-3997	T	P	P	P	A	A	T	Y			O
CMR/2012/V-4061	T	P	P	P	P	I	T	Y			O
CMR/2012/V-4280	T	P	P	P	A	A	T	Y			O
CMR/2012/V-4536	T	P	P	P	A	A	T	Y			O
CMR/2012/V-4539	T	P	P	P	A	A	T	Y			O
CMR/2012/V-4546	T	P	P	P	A	A	T	R Y			O
CMR/2012/V-4724	T	P	P	P	A	A	T	Y			O
CMR/2012/V-4731	T	P	P	P	A	A	T	Y			O
CMR/2012/V-4837	T P	P	P	P	A	A	T	Y			O
CMR/2012/V-4841	T	P	P	P	A	A	T	Y			O
CMR/2012/V-4846	T	P	P	P	A	A	T	Y			O
CMR/2012/V-4840	T	P	P	P	A	A	T	Y			O
CMR/2012/V-4941	T	P	P	P	A	A	T	Y			O
CMR/2012/V-4945	T	P	P	P	R	A	T	Y			O
CMR/2012/V-5447	I	T	P	P	A	A	T	Y			O
CMR/2012/V-5487	T	P	P	P	A	A	T	Y			O
CMR/2012/V-5722	T	P	P	P	A	A	T	Y			O
KC461262-isolate CC378-0210-China-BA-9	T	P	I	P	A	A	T		D		O
KM402694-isolate VH168482-Spain-BA-9	T	P	P	P	A	A	T	Y			O
HM459879-strain NG-040-07-Japan-BA9	T	P	P	P	I	A	T	Y			O
JX079886-isolate 903-HCM/10.10-BA9-Vietnam-BA-9	T	P	P	N	A	A	T	Y			O
KC342345-isolate CU2011/161-Thailand-BA-9	T	P	P	P	F	A	T	Y			O
AB749752-isolate: TTA-11-0564-Philippines-BA-9	T	P	K	P	G	P	T	F	Y		O
CMR/2012/V-4733	T	P	P	P	I	A	T	Y			O
CMR/2012/V-4772	T	P	P	P	I	A	T	Y			O
CMR/2012/V-4835	T P	P	P	P	I	A	T	Y			O
CMR/2012/V-5397	T	P	P	P	I	A	T	Y			O
CMR/2012/V-5939	T	P	P	P	I	A	T	Y			O
CMR/2013/V-4882	T	P	P	P	A	A	T	Y			O
CMR/2013/V-5023	T	P	P	P	I	A	T	Y			O
CMR/2013/V-5044	T	P	P	P	I	A	T	Y			O
CMR/2013/V-5048	T	P	P	P	I	A	T	Y			O
CMR/2013/V-5226	T P	P	T	P	I	A	T	Y			O
CMR/2013/V-5401	T	P	K	P	I	A	T	Y			O
CMR/2013/V-5403	T	P	K	P	I	A	T	Y			O
CMR/2013/V-5506	T	P	P	P	I	A	T	Y			O
CMR/2013/V-5628	T	S	P	P	I	A	Y	L			O
CMR/2013/V-7201	T P	P	P	P	I	A	T	Y			O
CMR/2013/V-5220	T P	P	S	T	R	P	T	Y			O
CMR/2013/V-5229	T P	P	S	T	R	P	T	Y			O
JN119970-isolate Cam2008-7298-Cambodia-BA-9	T	E	P	P	P	P	I	A	P		O
KF246645-strain RSV/PUNE/NIVGJ66586/10/B-India-BA-9	T	P	P	P	G	P	I	A	P		O
KF826858-strain RSV/B/Homo sapiens/TA/130/2009-USA-BA-9	T	P	P	P	P	I	A	Y			O
KJ710407-strain HD12063-Germany-BA-9	S	T	P	P	A	P	T	Y	I		O
JQ333971-isolate LPM/B/21-Malaysia-BA-9	T	P	P	P	A	P	T	Y			O

BA-9a

BA-9b



## 6. Article 1 en preparation

**Title:** Molecular characterization of human adenovirus associated with acute respiratory infections in Cameroon from 2011 to 2014.

### Summary

**Background:** Human adenoviruses (HAdVs) cause a wide range of diseases, including respiratory infections worldwide. Studies on the molecular epidemiology of HAdVs are limited in Cameroon.

**Objective:** To document the different serotypes HAdV circulating in Cameroon in children with acute respiratory infections.

**Methods:** Nasopharyngeal swabs were collected from 219 HAdV positive children under 15 years from 2011 to 2014. The HAdV was typed by amplification and sequencing of partial hexon gene and a real-time PCR.

**Results:** HAdV interspecies Co-infections were 22.2%. Six species of HAdV (Mastadenovirus A to F) were detected with B (78.5%) and C (34.8%) being the predominant strains. Phylogenetic analysis of HAdV-B3 virus (18) and B7 (5) shows a conserved and a significant temporal stability in relation to the reference sequence (99.1 to 100% of similarity).

**Conclusion:** These results support further evaluation of the burden of HAdV infection and the role of HAdV interspecies co-infections in Cameroon.

## Introduction

Human adenoviruses (HAdVs) are one of the common pathogens in acute respiratory infections worldwide. About 6-32% of respiratory infections are caused by this virus in children [1–5]. HAdV is also one of the most common causes of morbidity and mortality among children, particularly in developing countries. A recent study by McMorrow and colleagues shows that HAdV was detected in 6% of the 834 deaths in patients with severe respiratory infections recorded across eight African countries [6]. HAdVs are one of the most complex viruses analyzed structurally. This virus is consisting of unenveloped capsid with icosahedral symmetry and diameter between 70-90 nm. This box surrounds the genome that is complexes to 4 polypeptides (V, VII, X, and  $\mu$ ) and consisting of linear DNA, double-stranded, non-segmented, ranging in size from 26 kb to 48 according to the gender. HAdVs are members of the family *Adenoviridae* and gender Mastadenovirus. Traditionally these viruses were classified by neutralization reactions, hemagglutination and hydrolysis with restriction enzymes in 51 serotypes and multiple types. To date, they are classified into 7 groups named species Mastadenovirus A to G with a total of 54 serotypes officially recognized by the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). This classification is based on the partial (Hexon, penton base and fiber) or complete sequencing of viral genome [7,8]. New types of HAdV (HAdV-55 to 69) have recently been identified based on whole genome analysis. According to their tissue tropism, the various HAdV serotypes are responsible of a wide range of human diseases. HAdVs species B, C, and, E are involved in upper and lower acute respiratory tract infections. Effective vaccine against HAdV strains is available only for serotypes E (4) and B (7) [9]. To date, there is no antiviral treatment approved against HAdV infections. However, significant progress has been reported on cidofovir, a nucleotide analog that inhibits viral DNA polymerase [10]. The epidemiology, clinical presentation, pathogenesis, vaccination and treatment of HAdV infections depend on the viral serotype implicated. Thus, typing HAdV is therefore crucial for patient care and limiting the spread of infection.[11] Although HAdV has been studied in great detail for more than half century, data on circulating serotypes in Cameroon remain completely unknown. A first HAdV research work among Cameroonian hospitalized children conducted by our team showed that HAdV was the predominantly detected respiratory viruses (27.3%) [12]. In this study we perform molecular typing of HAdV strains detected in Cameroon between 2011 and 2014.

## Materials and methods

### Study Design

This cross-sectional study was performed between September 2011 and July 2014. The samples were collected from outpatient or inpatient children younger than 15 years at the pediatric service of the National Social Insurance hospital in Yaounde, Cameroon. Pediatric patients recruited met the case definition of WHO Influenza-Like illnesses (fever > 38 ° C accompanied by cough or sore throat with symptoms dating the previous 5 days of inclusion).

### Ethical approval

Ethical approval was obtained from the National Research Ethics Committee and the Ministry of Health of Cameroon for the main study (IMMI Project) associated with this work. This protocol was carried out in accordance with all the regulations establishing the protection of study participants. Informed written consent was acquired from the parents or guardians of all children involved in the study. A coding system was used for all participants to protect their confidential data. The caregivers of children were properly informed about the purpose of the study, the benefits and risks of study participation.

### Sampling, extraction of nucleic acids, detection, and typing of HAdV

Nasopharyngeal swabs were screened to detect respiratory viruses using 4 r-gene commercial duplex (AdV/HBoV r-gene<sup>TM</sup>, HCoV/HPIV r-gene<sup>TM</sup>, RSV/hMPV r-gene<sup>TM</sup>, Rhino & EV/Cc r-gene<sup>TM</sup>) as described elsewhere [13]. A total of 219 HAdV positive samples were subjected to further characterization by PCR carried out on hexon gene. To this end the test was carried out using primers published by Sriwanna et al. in 2013 [14]. Briefly, 5 µL of extracted DNA were added to a PCR mixture containing: 5 µL of 10X PCR buffer, 1.5 µL of MgCl<sub>2</sub> at 50 mM, 1 µL of dNTP at 10 mM, 2.5 µL of W1 solution at 1%, 0.5 µL of Taq DNA polymerase Invitrogen, 29.5 µL of distilled water, 2.5 µL of the forward primer ADV\_F2 (5'-TTY GCN ACC ATG CCC AAC AC-3'), and 2.5 µL of the reverse primer AdV\_R2 (GYT TCR AYG GCC ATG CGG TG) to a final volume of 50 µL. The thermal profile used consisted of initial denaturation at 94°C for 3 minutes; followed by 40 cycles of 94°C for 45 seconds, 50°C for 30 seconds and 72°C for one minute 30 seconds; and a final extension at 72°C for 10 minutes. The primers amplify a partial hexon gene of 956 bp. The molecular weight marker (1 kb DNA Ladder More, Invitrogen) and 5 µL of the amplified nucleotide fragments were migrated on 1.5% agarose gel prepared in the presence of the green gel as indicative. The gel was visualized under a UV transilluminator. Using the same PCR primers, the amplified hexon portions were sequenced bidirectionally by another laboratory (Beckman Coulter Genomics, UK). DNA extracts from negative samples (196 cases) after research by standard PCR amplification of the Hexon gene have been specified in HAdV-A, B, C, D, E, and F at the virology laboratory of Caen University Hospital, France. Samples analyzed were those with threshold cycle values obtained by the semi-quantitative r-gene technique lower than 34. This additional characterization was performed using real-time PCR techniques developed by Jerome Le Goff in Saint Louis Hospital and using primers described in 2004 by Leruez-Ville et al. and Watzinger et al. with minor modifications on probe sequence [15,16]. Amplifications were carried out using Hot Star Taq® DNA Polymerase kit from Qiagen. Five µL of DNA extracts were added to 20 µL of PCR mixture containing 11 µL of water, 2.5 µL of

10X buffer, 2  $\mu$ L of MgCl<sub>2</sub> at 25 mM, 1  $\mu$ l of dNTPs at 10  $\mu$ M, and 1  $\mu$ l of enzyme. The PCR program used was 50°C for 2 min, 95°C for 15 minutes, 40 cycles at 95°C for 15 seconds, and 60°C for 1 minute.

### Sequence analysis

Alignments were performed using the BLAST program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) for the research on Genbank of nucleotide sequences similar to the raw sequences of this study. Our sequences were cleaned and assembled using the program EDITSEQ of the software Seqman™ II Lasergene (DNA, Madison, WI, USA). Phylogenetic analyzes have been performed using the MEGA software version 6. The gene sequences obtained in this work were aligned with reference sequences of the 54 recognized serotypes of HAdV by the method of multiple alignments of Clustal W. The phylogenetic tree was generated from the alignment obtained by the Neighbor-Joining process. Evolutionary distances were calculated by the method of Kimura-2-parameter. The stability of the phylogenetic tree was assessed by a test with 1000 bootstrap repetitions. The Genbank accession numbers for all sequences used in this work are included in the phylogenetic tree (Figure 1). The nucleotide sequences of the hexon obtained in this work have been deposited in the Genbank database with accession numbers KX452120 to KX452142.

## Results

### Study Population

All sampling (219) were performed at the National Social Insurance hospital located in Yaoundé, Cameroon. All children included were under 15 years, with 65.3% having less than 2 years. The median age of these children was 19 months, IQR [10-36] months. The male/female and outpatient/inpatient participant ratios were 1.1 and 1.6 respectively.

Only 23 (10.5%) samples among the 219 tested positive in generic PCR were positive for the PCR amplification of a partial region of the hexon gene. All these 23 were positive species HAdV-B virus. Through phylogenetic analysis of the sequences obtained, 18 of these positives were grouped with serotype B3 while the remaining five were clustered in another group with the HAdV-B7 reference (Figure 1). HAdV was found in 114 of the 121 samples analyzed in Caen. Six species of HAdV were identified and HAdV-B (83 cases) was the predominant strain followed by 47 HAdV-C, 6 HAdV-F, 5 HAdV-E, 1 HAdV-A, and 1 HAdV-D.

### Temporal distribution of samples positive for HAdV.

The HAdV-B and C species were the most common and were found throughout the study period. HAdV-E and F have noticed sporadically between 2012 and 2014. The only cases HAdV-D and A appeared in February and June 2014 respectively. Of the 23 strains that have been sequenced and analyzed, the HAdV-B3 was the predominant serotype and was found continuously throughout the investigation. In contrast, 5 strains of HAdV-B7 have been found sporadically in 2011 and 2012.

### Distribution of mixed infections with HAdV

HAdV species of 135 positive samples were determined. The species most frequent was HAdV-B (106) followed by HAdV-C (47), HAdV-F (6), HAdV-E (5), HAdV-A (1), and HAdV-D (1). Mixed interspecies HAdV detections were obtained in 30 cases (29 double infections and one triple infection HAdV-B/C/D). It is noteworthy that 22 double infections were the couple HAdV-B/HAdV-C and all HAdV-A, HAdV-D, and HAdV-F infections occur in co-infection (Table I).

### Phylogenetic analysis

A similarity rate of 99.9 to 100% was obtained when comparing the 861 nucleotides and deduced amino acid of the Cameroonian hexon gene sequences and reference strains B3 (NC\_011203.1) and B7 (AC\_000018.1). In comparison with the B7 reference strain, B7 sequences of this study have only two variable residues in all sequences from Cameroon. Eight variable positions were observed with respect to the Cameroonian B3 sequences and B3 prototype strain. The phylogenetic tree was constructed with the sequences of 52 HAdV serotypes and Cameroonian strains. Phylogenetic analysis of the gene sequences of the hexon Cameroonian B7 strains showed they were grouped with reference B7. Cameroon's B3 strains have formed a monophyletic group with the B3 prototype sequence (Figure 1).

## Discussion

This study reports the different HAdV species involved in respiratory infections in Yaounde, Cameroon between September 2011 and July 2014. To the best of the information available to date, this is the first study that performed a molecular characterization of HAdV strains isolated from patients suffering from acute respiratory infections in Cameroon or the Central African sub region. Unlike previous studies [17,18], during this work 22.2% (30/135) of interspecies HAdV mixed infections were recorded. Nevertheless, this interspecies coinfection frequency remains similar to that (19%) recorded by Wang et al., In 2013 in Taiwan.[19] This high rate of coinfection could be attributed to the use of multiplex molecular techniques for detection of respiratory viruses. The HAdV are known for their recombination ability [5,20–24]. The high rate of HAdV interspecies coinfection in this investigation suggests a recombination potential for HAdV Cameroonian strains. Thus, further analysis of these strains will be our future work. Out of the 135 HAdV positive samples where the species was defined, 78.5% (106) were virus HAdV-B species and 34.8% (47) HAdV-C. In fact, they represent the most common species identified worldwide in the previous studies [5,14,17–20,25,26]. Unfortunately the data from the Cameroon neighboring countries are not available for comparison. Previous studies have shown that HAdV species A (31) and F (40 and 41) were commonly found in the gastrointestinal tract [22,27]. Similarly, viruses of the species D (8, 19 and 37) are found in ocular system [21,23,27,28]. Similar to other rare authors [25,29], we detected these species HAdV in respiratory samples, showing that they are not limited to these organs. Only 23 samples positives in generic quantitative PCR could be amplified by typing PCR on the hexon gene during this work. This low rate of amplification may mainly be due to the fact that the generic quantitative method is more sensitive than the PCR method of typing. Another reason which could be involved is the low viral load of false negative samples by amplification of the hexon gene (mean Ct false negative = 28.9 +/- 5.9 vs. 15.4 +/- 4, 5 for the positive,  $p < 0.001$ ). This work highlights the importance of different HAdV species far undocumented in Cameroon. In summary, this study reported species and serotypes HAdV detected in children with acute respiratory infections in Cameroon between September 2011 and July 2014. HAdV-B and C were the predominant species. These results will form the basis for the implementation of the work to determine the contribution of different HAdV species and the role of co-infections in acute respiratory infections in Cameroon. For example studies on the determination of the morbidity and mortality of HAdV infection in Cameroon.

## References

1. Kholly AAE, Mostafa NA, Ali AA, El-Sherbini SA, Ismail RI, Magdy RI, et al. Risk factors of prolonged hospital stay in children with viral severe acute respiratory infections. *J. Infect. Dev. Ctries.* 2014;8:1285–93.
2. Lekana-Douki SE, Nkoghe D, Drosten C, Ngoungou EB, Drexler JF, Leroy EM. Viral etiology and seasonality of influenza-like illness in Gabon, March 2010 to June 2011. *BMC Infect. Dis.* 2014;14:373.
3. Breiman RF, Cosmas L, Njenga MK, Williamson J, Mott JA, Katz MA, et al. Severe acute respiratory infection in children in a densely populated urban slum in Kenya, 2007–2011. *BMC Infect. Dis.* [Internet]. 2015 [cited 2015 Sep 4];15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4351931/>
4. Hindiyeh MY, Keller N, Mandelboim M, Ram D, Rubinov J, Regev L, et al. High rate of human bocavirus and adenovirus coinfection in hospitalized Israeli children. *J. Clin. Microbiol.* 2008;46:334–7.
5. Li Y, Zhou W, Zhao Y, Wang Y, Xie Z, Lou Y, et al. Molecular typing and epidemiology profiles of human adenovirus infection among paediatric patients with severe acute respiratory infection in China. *PLoS One.* 2015;10:e0123234.
6. McMorrow ML, Wemakoy EO, Tshilobo JK, Emukule GO, Mott JA, Njuguna H, et al. Severe Acute Respiratory Illness Deaths in Sub-Saharan Africa and the Role of Influenza: A Case Series From 8 Countries. *J. Infect. Dis.* 2015;212:853–60.
7. Harrach B, Benkő M, Both G, Brown M, Davison A, Echavarría M, et al. Family Adenoviridae. In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ, editors. *Virus Taxonomy. 9th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* N. Y. Elsevier. 2011;pp. 125–41.
8. Seto D, Chodosh J, Brister JR, Jones MS. Using the Whole-Genome Sequence To Characterize and Name Human Adenoviruses<sup>▽</sup>. *J. Virol.* 2011;85:5701–2.
9. Radin JM, Hawksworth AW, Blair PJ, Faix DJ, Raman R, Russell KL, et al. Dramatic Decline of Respiratory Illness Among US Military Recruits After the Renewed Use of Adenovirus Vaccines. *Clin. Infect. Dis.* 2014;59:962–8.
10. Wold WS, Toth K. New drug on the horizon for treating adenovirus. *Expert Opin. Pharmacother.* 2015;0:1–5.
11. Ghanaïem H, Averbuch D, Koplewitz BZ, Yatsiv I, Braun J, Dehtyar N, et al. An outbreak of adenovirus type 7 in a residential facility for severely disabled children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2011;30:948–52.
12. Kenmoe S, Tchendjou P, Vernet M-A, Moyo-Tetang S, Mossus T, Njankouo-Ripa M, et al. Viral etiology of Severe Acute Respiratory Infections in hospitalized children in Cameroon, 2011–2013. *Influenza Other Respir. Viruses.* 2016;n/a – n/a.

13. Kenmoe S, Tchendjou P, Moyo Tetang S, Mossus T, Njankouo Ripa M, Guillet M, et al. Evaluating the performance of a rapid antigen test for the detection of influenza virus in clinical specimens from children in Cameroon. *Influenza Other Respir. Viruses*. 2014;8:131–4.
14. Sriwana P, Chieochansin T, Vuthitanachot C, Vuthitanachot V, Theamboonlers A, Poovorawan Y. Molecular characterization of human adenovirus infection in Thailand, 2009–2012. *Viol. J*. 2013;10:193.
15. Leruez-Ville M, Minard V, Lacaille F, Buzyn A, Abachin E, Blanche S, et al. Real-Time Blood Plasma Polymerase Chain Reaction for Management of Disseminated Adenovirus Infection. *Clin. Infect. Dis*. 2004;38:45–52.
16. Watzinger F, Suda M, Preuner S, Baumgartinger R, Ebner K, Baskova L, et al. Real-Time Quantitative PCR Assays for Detection and Monitoring of Pathogenic Human Viruses in Immunosuppressed Pediatric Patients. *J. Clin. Microbiol*. 2004;42:5189–98.
17. Demian PN, Horton KC, Kajon A, Siam R, Hasanin AMN, Elgohary Sheta A, et al. Molecular identification of adenoviruses associated with respiratory infection in Egypt from 2003 to 2010. *BMC Infect. Dis*. 2014;14:50.
18. Qurei L, Seto D, Salah Z, Azzeh M. A Molecular Epidemiology Survey of Respiratory Adenoviruses Circulating in Children Residing in Southern Palestine. *PLoS ONE* [Internet]. 2012 [cited 2015 Sep 4];7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3411832/>
19. Wang S-L, Chi C-Y, Kuo P-H, Tsai H-P, Wang S-M, Liu C-C, et al. High-Incidence of Human Adenoviral Co-Infections in Taiwan. *PLoS ONE* [Internet]. 2013 [cited 2015 Sep 4];8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3779158/>
20. Chen M, Zhu Z, Huang F, Liu D, Zhang T, Ying D, et al. Adenoviruses associated with acute respiratory diseases reported in Beijing from 2011 to 2013. *PloS One*. 2015;10:e0121375.
21. Ishiko H, Aoki K. Spread of Epidemic Keratoconjunctivitis Due to a Novel Serotype of Human Adenovirus in Japan. *J. Clin. Microbiol*. 2009;47:2678–9.
22. Jones MS, Harrach B, Ganac RD, Gozum MMA, dela Cruz WP, Riedel B, et al. New Adenovirus Species Found in a Patient Presenting with Gastroenteritis. *J. Virol*. 2007;81:5978–84.
23. Walsh MP, Chintakuntlawar A, Robinson CM, Madisch I, Harrach B, Hudson NR, et al. Evidence of Molecular Evolution Driven by Recombination Events Influencing Tropism in a Novel Human Adenovirus that Causes Epidemic Keratoconjunctivitis. *PLoS ONE* [Internet]. 2009 [cited 2015 Sep 5];4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2685984/>
24. Walsh MP, Seto J, Jones MS, Chodosh J, Xu W, Seto D. Computational Analysis Identifies Human Adenovirus Type 55 as a Re-Emergent Acute Respiratory Disease Pathogen. *J. Clin. Microbiol*. 2010;48:991–3.
25. Abbas KZ, Lombos E, Duvvuri VR, Olsha R, Higgins RR, Gubbay JB. Temporal changes in respiratory adenovirus serotypes circulating in the greater Toronto area, Ontario, during December 2008 to April 2010. *Viol. J*. 2013;10:15.

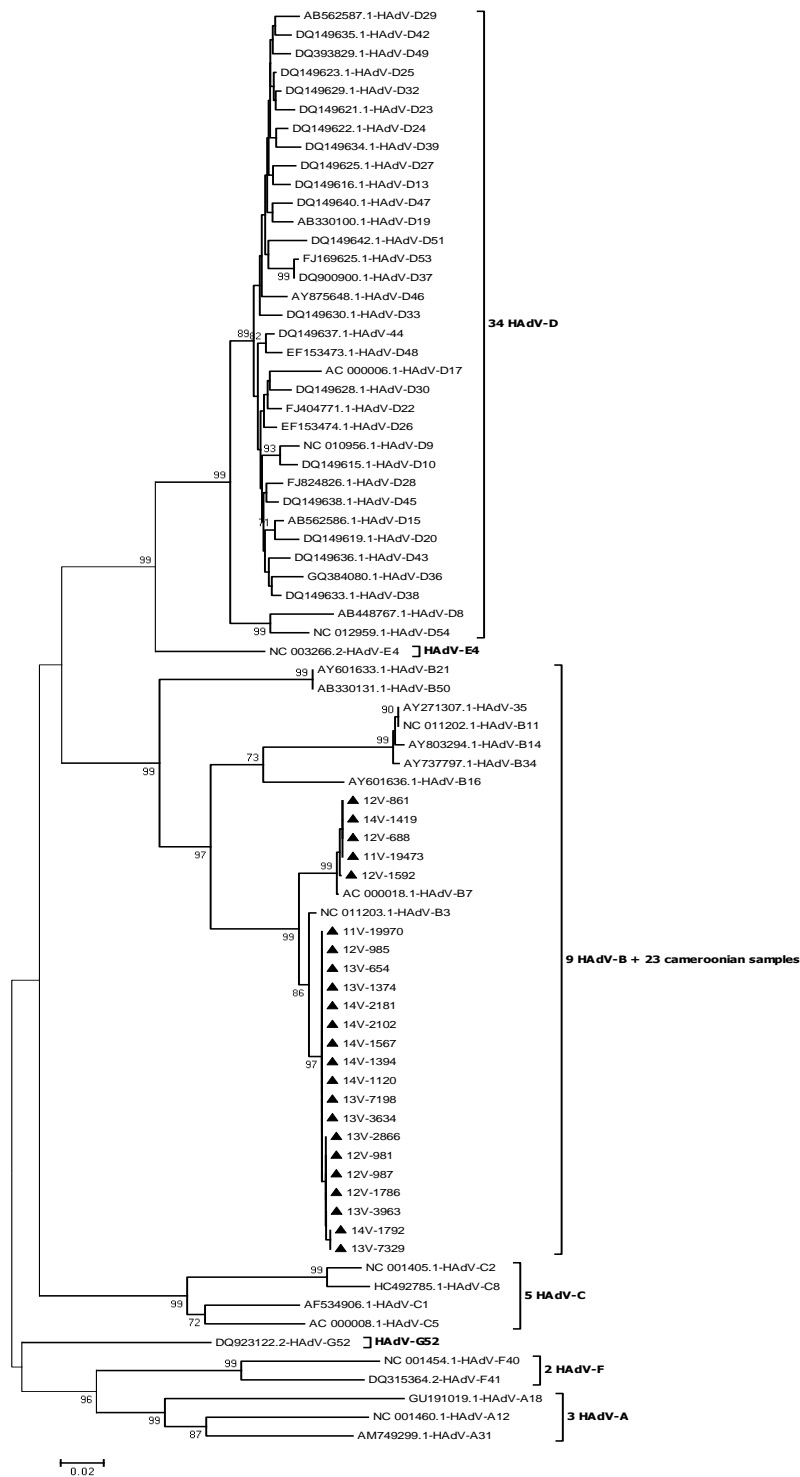


26. Ampuero JS, Ocaña V, Gómez J, Gamero ME, Garcia J, Halsey ES, et al. Adenovirus Respiratory Tract Infections in Peru. PLoS ONE [Internet]. 2012 [cited 2015 Sep 4];7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3466214/>
27. Lynch JP, Fishbein M, Echavarría M. Adenovirus. Semin. Respir. Crit. Care Med. 2011;32:494–511.
28. Robinson CM, Singh G, Henquell C, Walsh MP, Peigue-Lafeuille H, Seto D, et al. Computational analysis and identification of an emergent human adenovirus pathogen implicated in a respiratory fatality. Virology. 2011;409:141–7.
29. Mandelboim M, Dror P, Azar R, Bromberg M, Mendelson E. Adenovirus infections in hospitalized patients in Israel: epidemiology and molecular characterization. J. Clin. Microbiol. 2011;49:597–601.

**Table I:** Interspecies distribution of Human Adenovirus coinfection.

	HAdV-A	HAdV-B	HAdV-C	HAdV-D	HAdV-E	HAdV-F	Total = 136
<b>HAdV-A</b>	0	1	0	0	0	0	1 (0,7)
<b>HAdV-B</b>	-	82	22	0	0	1	107 (78,7)
<b>HAdV-C</b>	-	-	23	0	0	1	47 (34,6)
<b>HAdV-D</b>	-	-	-	0	0	0	1 (0,7)
<b>HAdV-E</b>	-	-	-	-	1	4	5 (3,7)
<b>HAdV-F</b>	-	-	-	-	-	0	6 (4,4)
<b>Mono</b>	0	82	23	0	1	0	105 (77,2)
<b>Double</b>	1	24	23	0	4	6	29 (21,3)
<b>Triple</b>	0	1	1	1	0	0	1 (0,7)

Data are number (%= number/136).



**Figure 1:** Phylogenetic analysis of partial sequences of the hexon gene (560 nucleotides) of adenovirus type 3 and type 7 collected in Cameroon from 2011 to 2014.

The nucleotide sequences were aligned using the Clustal W method. The tree topology was built according to the Neighbor-Joining method and Kimura-2-parameter model using the MEGA software 6. The accuracy of the tree was assessed by 1000 bootstrap replicates. Only Bootstrap values > 70% are presented. Cameroonian sequences are indicated by black triangles and the other sequences are the prototypes of 52 HAAdV formally recognized by the ICTV. Cameroonian samples are identified in the following format: The first two numbers represent the year (eg 11 represents 2011) followed by laboratory number (V688). Genbank accession numbers of all sequences used are shown in the tree. The scale bar represents the number of nucleotide substitutions per site between close relatives.