



HAL
open science

Entérovirus D68 : analyse épidémiologique & génomique

Maxime Duval

► **To cite this version:**

Maxime Duval. Entérovirus D68 : analyse épidémiologique & génomique. Virologie. Université Clermont Auvergne, 2022. Français. NNT : 2022UCFAC020 . tel-03919639

HAL Id: tel-03919639

<https://theses.hal.science/tel-03919639>

Submitted on 3 Jan 2023

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.

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES
DE LA VIE, SANTÉ, AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT

Thèse

Présentée à l'Université Clermont Auvergne
Pour l'obtention du grade de DOCTEUR

(Décret du 5 juillet 1984)

Spécialité : **Virologie**
30 juin 2022

Maxime DUVAL

Entérovirus D68 : Analyse épidémiologique & génomique

Co-directeurs de thèse : Dr Jean-Luc BAILLY & Dr Audrey MIRAND

Rapporteurs : Pr Laurent ANDRÉOLETTI, Université de Reims Champagne Ardenne
Dr Sylvie PILLET, Université Claude Bernard Lyon

Membres du jury : Pr Olivier LESENS, Université Clermont Auvergne (Président du jury)
Dr Audrey MIRAND, Université Clermont Auvergne
Dr Jean-Luc BAILLY, Université Clermont Auvergne
Dr Laurence JOSSET, Université Claude Bernard Lyon

Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement, UMR CNRS 6023
Université Clermont Auvergne, 28 Place Henri Dunant, 63000 Clermont-Ferrand

Remerciements

En premier lieu, je tiens à exprimer toute ma gratitude à Sylvie Pillet et Laurent Andréoletti pour avoir accepté d'examiner et de juger ce manuscrit de thèse. Mes remerciements vont également à Laurence Josset et Olivier Lessens pour leur participation au jury ainsi qu'à Guillaume Dalmasso, Frédéric Carvalho et David Boutolleau, pour leur apport scientifique lors de mes comités de suivi de thèse.

Bien que cette thèse soit le fruit d'un travail assez personnel, elle aurait difficilement vu le jour sans l'implication des membres de l'équipe EPIE et notamment de mes deux directeurs de thèse. Jean-Luc, je tiens à te remercier pour cette opportunité que tu as choisi de m'offrir ainsi que pour la confiance que tu m'as accordé au cours de ces dernières années. Audrey, je te suis particulièrement reconnaissant pour le soutien que tu m'as offert, notamment ces derniers mois. Je ne vais pas m'étaler sur l'apport indéniable de connaissances que vous m'avez tous deux apportés.

Au final, je n'aurais pas beaucoup travaillé à la paillasse au cours de cette thèse. Pourtant Isa et Gwendo, j'ai toujours pu compter sur votre aide lorsque j'en avais besoin. Au-delà du travail, votre porte a toujours été ouverte pour parler de tout et de rien, activité bien plus importante pour le moral que ce qu'on pourrait imaginer. Pour tout ça, vous avez toute ma gratitude. Dans le même esprit, je tiens à remercier les thésards et jeunes docteurs avec lesquelles j'ai partagé mon bureau, Maxime, Stéphanie, Léa, Igor et Mahya, pour tous les bons moments partagés au cours de ma thèse. J'exprime également toute ma reconnaissance aux autres membres de l'équipe, avec lesquels j'ai peu travaillé mais qui m'ont toujours apporté leur aide lorsque qu'elle m'était nécessaire. Je n'oublie pas Thomas et Aizat, avec lesquels je me suis bien marré. Je vous souhaite à tous le meilleur pour la suite.

J'ai toujours trouvé que les paroles valaient mieux que l'écrit, néanmoins, je n'aurais pas pu rédiger ces remerciements sans exprimer la plus profonde gratitude aux personnes qui ont été les plus proches de moi au cours de ces dernières années. Sans eux, j'aurais écrit ce chapitre de ma vie avec une encre sacrément terne. Max, Marina, Alex, vous faites partie de ma famille. Enfin Laura, je pense que tu sais déjà tout ce que je pourrais écrire ici. On a veillé l'un sur l'autre pendant toute cette thèse et plus encore. Tout ça, c'est aussi ta réussite.

Résumé

L'entérovirus D68 (EV-D68), isolé pour la première fois en 1962, a été ensuite peu détecté pendant plusieurs décennies. Depuis 2014, des épidémies sont rapportées tous les deux ans en Europe et aux USA. L'analyse moléculaire des souches qui circulent à l'échelle mondiale montre qu'elles se répartissent en quatre clades A à D ; le clade B a été à l'origine de la majorité des épidémies récentes. Ce virus est responsable d'infections respiratoires sévères rapportées chez l'enfant principalement, en particulier en cas de maladie respiratoire sous-jacente. Des complications neurologiques proches de celles associées aux poliovirus ou à l'EV-A71, sont rattachées à une entité neurologique propre à l'EV-D68, la myélite flasque aiguë, caractérisée par des séquelles fréquentes. L'objectif de la thèse était d'analyser les données épidémiologiques concernant les infections à EV-D68 recueillies sans sélection des patients, entre 2014 et 2018 au CHU de Clermont-Ferrand et de comparer les souches détectées chez les enfants et les adultes à celles qui circulent à l'échelle mondiale. Les souches identifiées chez les patients appartiennent aux sous-clades B3 et D1. Nous montrons que l'augmentation du nombre d'adultes infectés au cours de la période coïncide avec l'émergence du sous-clade D1. Pour franchir le cap de l'épidémiologie moléculaire basée sur l'étude des séquences VP1 et passer à l'épidémiologie génomique, nous avons développé une technique d'amplification du génome complet applicable aux échantillons cliniques. Elle a été combinée au séquençage NGS. L'analyse des variations moléculaires a été réalisée de façon exhaustive pour tous les sous-clades. Plusieurs substitutions nucléotidiques dans les régions non codantes et d'acides aminés dans les sites antigéniques ont été mises en évidence pour chacun des groupes phylogénétiques. Nous avons aussi analysé l'histoire évolutive du virus et exploré la diffusion géographique. Ces travaux ont permis d'intégrer dans la même étude des données d'épidémiologie clinique et d'épidémiologie génomique. Notre analyse comparative suggère que plusieurs mutations dans tout le génome sont nécessaires pour faire émerger un clade ou sous-clade épidémique pérenne. Des mutations dans les protéines non structurales combinées à des variations antigéniques peuvent conduire à un avantage sélectif plus décisif que chaque mutation isolée.

Mots-clés : Entérovirus D, infections respiratoires, enfants, adultes, épidémiologie clinique, épidémiologie génomique, séquençage NGS, émergence virale

Abstract

Enterovirus D68 (EV-D68), first isolated in 1962, was subsequently poorly detected for several decades. Since 2014, outbreaks have been reported every two years in Europe and the USA. Molecular analysis of the circulating strains shows that they fall into four clades A to D; clade B was involved in most of the recent outbreaks. This virus is associated with severe respiratory infections reported mainly in children and in patients with underlying respiratory disease. Neurological complications similar to those associated with polioviruses or EV-A71 are designated as a neurological entity specific to EV-D68, acute flaccid myelitis, characterised by frequent sequelae. The aim of the thesis was to analyse unbiased epidemiological data concerning EV-D68 infections between 2014 and 2018 at the Clermont-Ferrand University Hospital and to compare the strains detected in children and adults to those circulating worldwide. The strains identified in patients belong to subclades B3 and D1. We showed that the increase in the number of infected adults over the period coincides with the emergence of the D1 subclade. To move from molecular epidemiology based on VP1 sequences to genomic epidemiology, we developed a whole genome amplification technique applicable to clinical samples. This was combined with NGS sequencing. Comprehensive molecular variation analysis was performed for all subclades. Several nucleotide substitutions in non-coding regions and amino acid substitutions in antigenic sites were identified for each phylogenetic group. We also analysed the evolutionary history of the virus and explored the geographical spread. This work allowed the combined analysis of clinical and genomic epidemiological data. Our comparative analysis suggests that several mutations throughout the genome are required to give rise to a perennial epidemic clade or subclade. Mutations in non-structural proteins combined with antigenic variations may lead to a more decisive selective advantage than each isolated mutation.

Key words: enterovirus D, respiratory infections, children, adults, clinical epidemiology, genomic epidemiology, new generation sequencing, viral emergence

Liste des abréviations

ACBD3	Acyl-CoA-binding domain-containing protein 3	GBF1	Guanine nucleotide exchange factor 1
ACSL3	acyl-coA synthetase long-chain family member 3	GTP	Guanosine triphosphate
ADN	Acide désoxyribonucléique	GTR	Generalised Time-Reversible
AG	Appareil de Golgi	hnRNPA1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1
APNES	Asia-Pacific Network for Enterovirus Surveillance	HSP90	Heat shock protein 90
Arf1	Adénosine diphosphate ribosylation factor 1	HUR	Human antigen R
ARN	Acide ribonucléique	IC	Intervalle de confiance
BLAST	Basic local alignment search tool	ICAM-5	Intercellular adhesion molecule 5
CCS	Séquence circulaire consensus	IRES	Internal ribosome entry site
CCTα	CTP-phosphocholine-cytidylyl transferase alpha	IRF7	Interferon regulatory factor 7
CDC	Centers for Disease Control and Prevention	IRM	Imagerie par résonance magnétique
CME	Clathrin-mediated endocytosis	ITAFs	IRES trans-acting factors
CNR	Centre National de Référence	LCS	Liquide cébrospinal
COPI/II	Coat protein complex I / II	MAAII	Maackia amurensis lectin II
cre	Cis-acting replication element	MAVS	Mitochondrial antiviral signalling proteins
CREB	Cyclic AMP-responsive element-binding protein	MDA5	Melanoma Differentiation-Associated protein 5
CSTE	Conseil d'État et des épidémiologistes territoriaux	MFA	Myélite flasque aiguë
CVB3	Coxsackievirus B3	NESS	National Enterovirus Surveillance System
DAF	Decay accelerating factor	NGS	Séquençage nouvelle génération
eIFs	Facteurs eucaryotes d'initiation de la traduction	Nup	Nucléopore
ENPEN	European Non-Poliovirus Enterovirus Network	NVSN	New Vaccine Surveillance Network
EV	Entérovirus	Oct-1	Octamer binding transcription factor 1
FAS	Fatty acid synthase	OMS	Organisation Mondiale de la Santé
FBP1	Fructose-1,6-bisphosphate 1	OR	Organelle de répliation virale
G3BP1	Ras GTPase-activated protein-binding protein 1	ORF	Open reading frame
		OSBP	Oxysterol-binding protein

PABP	Poly(A)-binding protein	Unr	Upstream of N-ras
PC	Phosphatidylcholine	VPg	Virion protein genome linked
PCBP2	Poly(rC)-binding protein 2		
PFA	Paralysie flasque aiguë		
pH	Potentiel hydrogène		
PI4KB	Phosphatidylinositol 4-kinase- β		
PI4P	Phosphatidylinositol-4-phosphate		
PLA2G16	Phospholipase A2 groupe XVI		
PTBP1	Polypyrimidine tract binding protein 1		
RE	Réticulum endoplasmique		
RIG-1	Retinoic acid-inductible gene-1		
RLR	RIG-1 like receptors		
RSE	Réseau de Surveillance des infections à Entérovirus		
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction		
sGaGs	Glycoaminoglycanes sulfatés		
SMRT	Single-molecule real-time sequencing		
SNA	Sambucus nigra agglutinin		
SNAP29/47	Synaptosomal-associated protein 29/47		
SQSTM1	Sequestosome 1		
SRp20	Serine/Arginine-Rich Splicing Factor		
SVFhi	Sérum de veau foetal décomplémenté		
TAK1	Transforming growth factor β activated kinase 1		
TBP	TATA-binding protein		
TEER	Résistance électrique transépithéliale		
TIA1	T cell intracellular antigen 1		
TLR	Toll-like receptors		
TRAF3	Tumor necrosis factor receptor-associated factor 3		
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β		

Figures & Tableaux

Figure 1 : Génome de l'entérovirus D68	2
Figure 2 : Capside virale icosaédrique de l'entérovirus D68.....	2
Figure 3 : Sites antigéniques probables de l'entérovirus D68.....	2
Figure 4 : Aspects généraux du cycle viral d'un entérovirus.....	4
Figure 5 : Intermédiaires structuraux de la capsid de l'entérovirus D68.....	5
Figure 6 : Mécanisme de libération du génome d'un entérovirus hors de l'endosome.....	5
Figure 7 : Schéma de l'initiation de la traduction du génome d'un entérovirus	6
Figure 8 : Remaniement de la voie autophagique pendant l'infection par un picornavirus	11
Figure 9 : Mécanismes d'échappement immunitaire mis en place par l'entérovirus D68	12
Figure 10 : Morphologie des organelles de réplication des entérovirus	12
Figure 11 : Régulation de l'apoptose par la protéine 2B des picornavirus	13
Figure 12 : Phylogénie de l'EV-D68	13
Figure 13 : Évolution du nombre de myélites flasques aiguës (MFA) rapportées aux États-Unis depuis 2014.....	20
Figure 14 : Infection des neurones moteurs de la corne antérieure de la moelle épinière d'une souris par l'entérovirus D68.....	26
Figure 15 : Mécanisme général hypothétique de la neuroinvasion par l'EV-D68.....	27
Figure 16 : Systèmes de surveillance spécifiques et/ou déclaration de cas d'infections à entérovirus D68 (EV-D68) en Europe en 2016.....	29
Figure 17 : Principe général de la technologie de séquençage SMRT (Single-molecule real-time)	49
Figure 18 : Études rapportant une association entre les patients adultes et les EV-D68 appartenant au clade D1	51
Figure 19 : Principe général des stratégies utilisées pour le séquençage des génomes complets d'EV-D68	54
Figure 20 : Principe de l'amplification aléatoire	57
Figure 21 : Positions polymorphes dans les régions 5' et 3' non traduites du génome de l'EV-D68.....	61
Figure 22 : Phylogénie globale de l'EV-D68 et variations moléculaires des protéines virales.....	61
Figure 23 : Phylogénie détaillée du clade C et variations moléculaires des protéines virales.....	62
Figure 24 : Phylogénie détaillée du clade B1 et variations moléculaires des protéines virales.....	62
Figure 25 : Phylogénie détaillée du clade B2 et variations moléculaires des protéines virales.....	63
Figure 26 : Phylogénie détaillée du clade B3 et variations moléculaires des protéines virales.....	63
Figure 27 : Phylogénie détaillée du clade A et variations moléculaires des protéines virales.....	64
Figure 28 : Phylogénie détaillée du clade D et variations moléculaires des protéines virales	64
Figure 29 : Génomes complets d'EV-D68 séquencés et souches isolées appartenant au clade B3	72

Figure 30 : Génomes complets d'EV-D68 séquencés et souches isolées appartenant aux clades D1 et B2	72
Figure 31 : Sensibilité de la barrière épithéliale formée par les cellules Calu-3 à l'infection par l'EV-D68	73
Figure 32 : Morphologie générale de la barrière épithéliale formée par les cellules Calu-3.....	73
Figure 33 : Effets de la supplémentation en sérum de veau fœtal décomplémenté (SVFhi) et de l'acide rétinoïque sur la résistance électrique transépithéliale (TEER) de barrières épithéliales polarisées (cellules Calu-3 différenciées)	73
Figure 34 : Effet d'un traitement par la neuraminidase sur les cellules A549 infectées ou non par l'EV-D68.....	74
Figure 35 : Effet du traitement préalable des cellules A549 par la neuraminidase sur l'infection à EV-D68	74
Figure 36 : Effet du traitement préalable des cellules Calu-3 par la neuraminidase sur l'infection à EV-D68	75
Figure 37 : Sensibilité des cellules Calu-3 à l'infection par l'EV-D68 CF270004.....	75
Tableau 1 : Cas rapportés d'atteintes paralytiques associées à une infection à EV-D68	20
Tableau 2 : Cas rapportés publiés d'infections à EV-D68 aux États-Unis.....	30
Tableau 3 : Cas rapportés publiés d'infections à EV-D68 en Europe	30
Tableau 4 : Cas rapportés publiés d'infections à EV-D68 en Asie.....	30
Tableau 5 : Cas rapportés publiés d'infections à EV-D68 hors des États-Unis, de l'Europe et de l'Asie.....	30
Tableau 6 : Stratégies de séquençage du génome de l'EV-D68 employées dans la littérature.....	53
Tableau 7 : Charge virale (Ct) des souches CF125132 et CF270004 à 24 et 48h post-inoculation de la barrière épithéliale bronchique (Calu-3).....	76

Table des matières

Introduction générale	1
Revue bibliographique	2
I. Caractéristiques et cycle viral de l'EV-D68	2
A. Génome viral et capsid.....	2
B. Attachement du virion aux récepteurs cellulaires	3
C. Libération du génome viral dans la cellule.....	5
D. Traduction du génome viral	6
E. Maturation co-translationnelle de la polyprotéine virale	7
F. Réorganisation de l'environnement intracellulaire	7
G. Réplication du génome viral.....	8
H. Formation des usines de réplication virale	9
I. Mécanismes d'échappement immunitaire	11
J. Assemblage de la capsid virale.....	12
K. Effets cytopathiques et libération des particules virales	13
II. Classification	13
III. Pouvoir pathogène de l'EV-D68	15
A. Atteintes respiratoires.....	15
B. Atteintes neurologiques.....	17
B.1. Définition et caractéristiques de la myélite flasque aiguë	17
B.2. Lien étiologique entre la MFA et l'EV-D68.....	20
IV. Diagnostic des infections à EV-D68	27
V. Approches thérapeutiques	28
VI. Surveillance des infections à EV-D68	29
VII. Épidémiologie clinique et moléculaire des infections à EV-D68	30
A. Émergence de l'EV-D68	31

A.1.	Émergence de l'EV-D68 aux États-Unis et en Europe.....	31
A.2.	Émergence et circulation de l'EV-D68 en Asie.....	33
A.3.	Émergence de l'EV-D68 dans le reste du monde	36
B.	Études séro-épidémiologiques.....	37
C.	Circulation de l'EV-D68 à partir de 2014.....	38
C.1.	Focus sur l'épidémie de 2014	38
C.2.	2015 - 2016 : le clade B3 est majoritaire	40
C.3.	2017-2018 : co-circulation des clades B3 et D1.....	42
	Problématique et objectifs de la thèse	44
	Travaux personnels	45
I.	Article publié dans le journal « Viruses »	45
II.	Commentaires de l'article	46
A.	Caractéristiques épidémiologiques des infections à EV-D68.....	46
B.	Actualisation des données épidémiologiques post 2018.....	46
C.	Méthodes de séquençage employées.....	47
C.1.	Séquençage « Sanger » du génome d'isolats viraux.....	48
C.2.	Séquençage « SMRT » à partir des échantillons cliniques.....	49
C.3.	Commentaires sur les méthodes proposées	51
D.	Épidémiologie moléculaire : association adultes/clade D1	51
III.	Autres travaux personnels	52
A.	Stratégies de séquençage du génome de l'EV-D68 utilisées dans la littérature ..	52
A.1.	Recherche des génomes et des métadonnées associées.....	52
A.2.	Recherche bibliographique	53
A.3.	Les différentes méthodes de séquençage décrites	53
A.4.	Séquençage avec enrichissement spécifique du génome	54
A.5.	Séquençage par une analyse méta-transcriptomique.....	56
A.6.	Séquençage avec enrichissement non spécifique du virome.....	57
A.7.	Commentaires.....	58

B.	Analyse complémentaire des génomes complets.....	60
B.1.	Méthodes d'analyses des données génomiques.....	60
B.2.	Analyse générale des clades	61
B.3.	Différenciation du clade C.....	62
B.4.	Différenciation du clade B.....	62
B.5.	Différenciation du clade A	64
B.6.	Différenciation du clade D	64
B.7.	Commentaires.....	65
C.	Exploration du pouvoir pathogène des isolats dans des modèles cellulaires <i>in vitro</i>	70
C.1.	Matériels et méthodes.....	70
C.2.	Résultats.....	72
C.3.	Commentaires.....	76
	Conclusions et Perspectives	78
I.	Dynamique épidémique et surveillance de la circulation du virus	78
II.	Épidémiologie génomique	81
III.	Le pouvoir pathogène de l'EV-D68	84
IV.	Conclusion	87
	Références bibliographiques	88
	Références Web	106
	Annexe	107
I.	Préparation de la librairie de séquençage par la technique SMRT.....	107

Introduction générale

La dynamique de circulation des entérovirus demeure encore très mystérieuse aux yeux de la communauté scientifique et l'entérovirus D68 (EV-D68) ne fait pas exception à cet égard. Découvert en 1962 aux États-Unis, sa circulation est restée silencieuse pendant plus de 50 ans avant de déclencher une épidémie mondiale d'infections respiratoires sévères à majorité pédiatrique en 2014. Associé depuis lors à une recrudescence d'atteintes paralytiques, il est considéré comme l'un des successeurs du poliovirus et son tropisme respiratoire, lui offrant un énorme potentiel épidémique, fait de lui un virus dont la surveillance est essentielle à la sécurité sanitaire mondiale. Bien que le nombre d'atteintes cliniques graves lui étant imputées reste relativement faible comparé à des virus comme l'EV-A71, la grippe ou plus récemment le SARS-CoV-2, qui monopolise logiquement une énorme partie de la recherche scientifique, l'EV-D68 constitue un risque pour la santé humaine et la compréhension des facteurs de sa diffusion dans la population est essentielle. D'autant qu'à l'instar de beaucoup d'autres virus, nous ne disposons d'aucun vaccin ni de traitement spécifique pour lutter contre les infections dont il est à l'origine.

Les travaux de cette thèse s'inscrivent dans cette logique de compréhension générale de la circulation de l'EV-D68. En exploitant les données épidémiologiques et cliniques recueillies grâce à une surveillance du virus réalisée entre 2014 et 2018 au CHU de Clermont-Ferrand, nous avons tenté de mettre en lumière les potentielles relations entre l'aspect clinique et la génétique du virus. En résulte un article scientifique publié dans la revue *Viruses* qui, contrairement à la très large majorité des études épidémiologiques, intègre aussi bien la clinique des patients que l'analyse moléculaire des virus détectés. Encore peu utilisé dans la recherche sur les entérovirus, qui se limite principalement à l'étude des protéines formant la capsid virale et renfermant les sites antigéniques, l'analyse du génome complet de l'EV-D68 forme le cœur de mes travaux et permet d'entrevoir et de décrire l'intégralité de l'évolution génomique du virus. Cette thèse rassemble et complète les données épidémiologiques, cliniques et moléculaires concernant l'EV-D68 et établit un bilan de la diversité des séquences et de leur classification phylogénétique. Tout ceci pour servir la vocation première de ces travaux, tenter de clarifier les causes de la réémergence et de la circulation du virus en apportant une hypothèse générale sur la distribution des clades au cours des différentes épidémies déclenchés par le virus.

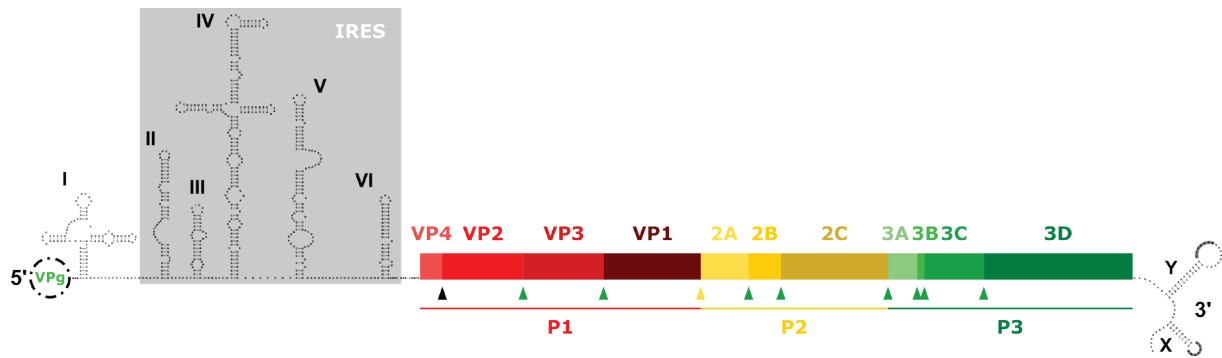


Figure 1 : Génome de l'entérovirus D68. Le génome viral est un ARN de polarité positive constitué d'un cadre de lecture ouvert unique encadré par les régions 5' et 3' non traduites. Les domaines en structure tige-boucle de la région 5' sont numérotés de I à VI. Les domaines II à VI forment une structure appelée IRES (internal ribosome entry site). La région 5' est liée de façon covalente à la protéine VPg (3B) et la région 3' se termine par une queue polyadénylée. Les trois précurseurs protéiques P1, P2 et P3 (colorés en rouge, jaune et vert) sont issus de la maturation de la polyprotéine, tout comme les différentes protéines qu'ils renferment. Les triangles indiquent des sites de clivage par les protéases 3C (triangle vert) ou 2A (triangle jaune). Le triangle noir indique un clivage par maturation autocatalytique.

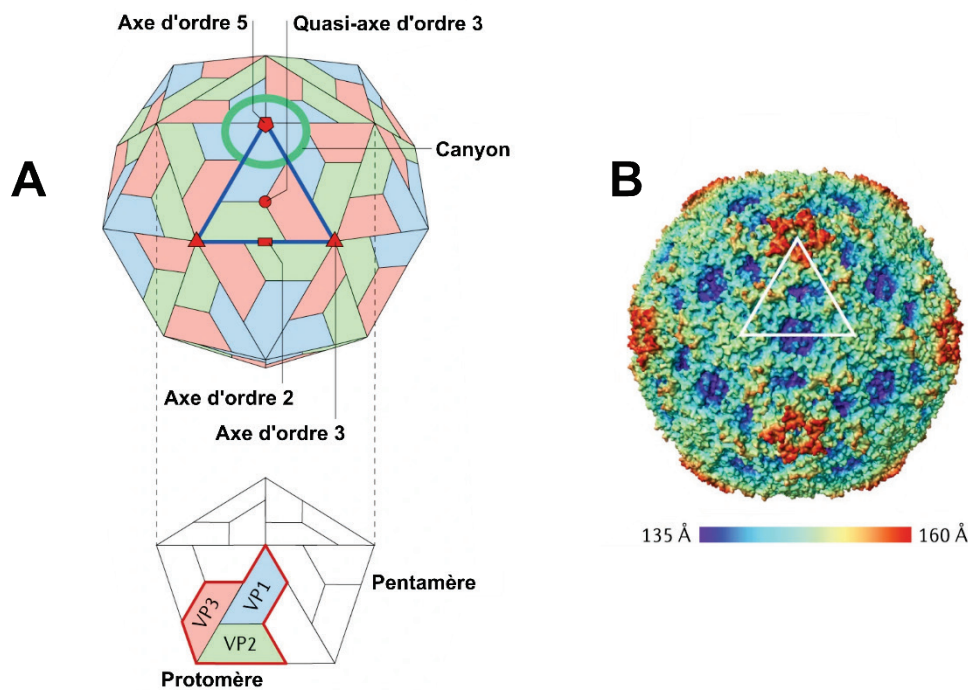


Figure 2 : Capside virale icosaédrique de l'entérovirus D68. (A) Représentation schématique de la capside des entérovirus montrant une unité asymétrique triangulaire délimitée en bleu. Les différents axes de symétrie sont indiqués par des formes géométriques rouges et le canyon est indiqué par un cercle vert. Cinq protomères, constitués des protéines VP1 à VP3, forment un pentamère. Soixante copies de ce pentamère forment la capside virale. La protéine VP4 est interne. (B) Capside colorée par un gradient de couleurs selon la distance qui sépare le centre du virion de la surface ; l'échelle indique les distances en angström (Å). Une unité asymétrique est délimitée par un triangle blanc. (Adaptée de Baggen et al. 2018).

Revue bibliographique

I. Caractéristiques et cycle viral de l'EV-D68

A. Génome viral et capsid

L'EV-D68 est un picornavirus (petit virus à ARN) qui appartient à l'espèce taxonomique D du genre *Enterovirus* (EV), laquelle comprend quatre autres types dont trois ont été rapportés chez l'Homme et le chimpanzé (EV-D70, EV-D94, EV-D111) et un (EV-D120) chez le gorille. Le genre EV comprend six autres espèces taxonomiques retrouvées chez l'Homme, les entérovirus A à C, et les rhinovirus A à C (<https://www.picornaviridae.com>, au 13.07.2021). Comme tous les picornavirus, le génome de l'EV-D68 se présente sous la forme d'un ARN monocaténaire de polarité positive. L'ARN, d'environ 7,4kb, se compose de deux extrémités 5' et 3' non traduites englobant un cadre de lecture ouvert ou ORF (open reading frame) unique, traduit en une polyprotéine d'environ 2200 acides aminés. Le second ORF ou uORF (upstream) récemment identifié en amont de l'ORF historique dans le génome des entérovirus A, B et C est absent chez l'EV-D68 ainsi que les rhinovirus (Lulla et al., 2019). La maturation de la polyprotéine virale par les protéases virales génère sept protéines non-structurales 2A-2C, 3A-3D et quatre protéines structurales VP1 (1D), VP2 (1B), VP3 (1C) et VP4 (1A) (Figure 1). L'assemblage de 60 protomères constitués de ces quatre protéines VP en 12 pentamères constitue la capsid icosaédrique d'environ 30nm de diamètre de l'EV-D68 (Figure 2).

Les propriétés physico-chimiques de la capsid offrent à l'EV-D68 des caractéristiques singulières qui le démarquent des autres entérovirus tout en le rapprochant des rhinovirus qui eux aussi, présentent un tropisme respiratoire. Une sensibilité au pH acide (Blomqvist et al., 2002; Oberste et al., 2004; Royston et al., 2018) explique notamment l'absence de tropisme digestif chez l'EV-D68, ce qui fait échos à l'absence de l'uORF dont la traduction, chez les entérovirus A, B et C, génère une protéine virale qui conférerait un avantage répliatif dans les cellules épithéliales du tractus digestif (Lulla et al., 2019).

Les sites antigéniques ou épitopes présents en surface de la capsid de l'EV-D68 ne sont pas clairement identifiés. Toutefois, les boucles BC et DE de la protéine VP1 (Figure 3A), ont été proposées comme des sites antigéniques potentiels par Liu et al (2015b). Plus récemment, Mishra et al (2019) ont montré que des échantillons de sérum et de liquide cébrospinal (LCS) de patients atteints de myélite flasque aiguë (MFA), déclenchent une

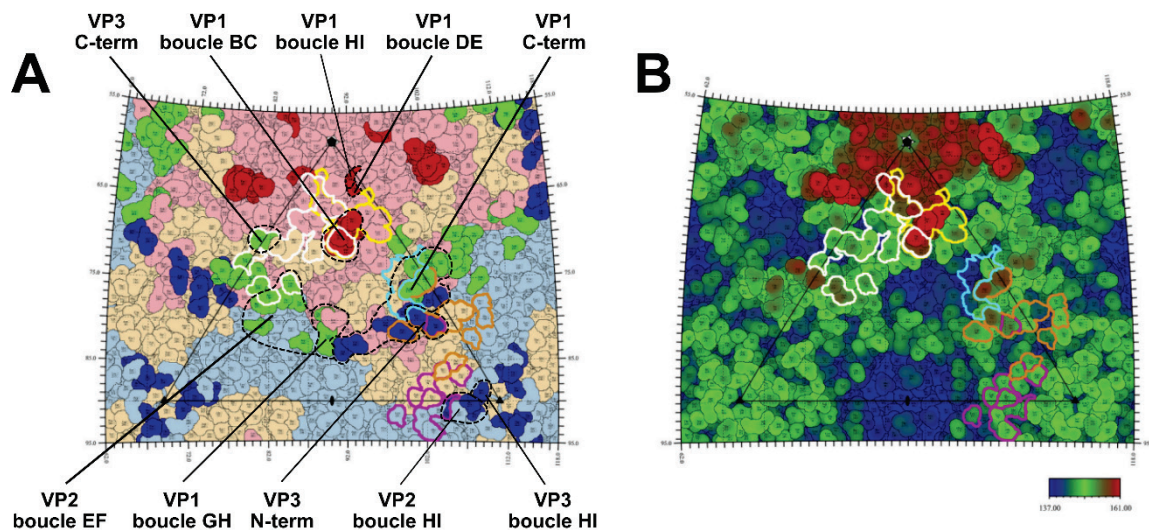


Figure 3 : Sites antigéniques probables de l'entérovirus D68. Une unité asymétrique de la capside virale est délimitée par un triangle noir. Les acides aminés interagissant avec des anticorps monoclonaux sont délimités par des traits continus de couleurs différentes : jaune (anticorps 11G1), blanc (EV68-228), orange (EV68-159) et magenta (15C5). **(A)** Représentation de la surface de la capside. Les acides aminés appartenant aux protéines VP1, VP2 et VP3 sont respectivement colorés en rose, bleu clair et beige. Les acides aminés appartenant aux sites antigéniques 1, 2 et 3, prédits par l'étude de Fang et al (2021), sont respectivement colorés en rouge, vert et bleu. Les régions correspondantes aux structures secondaires indiquées sur la figure sont délimitées par des pointillés noirs. **(B)** Représentation de la capside colorée suivant la distance qui sépare le centre du virion de la surface, selon l'échelle colorée en angström (Å). **(Adaptée de Fang et al. 2021).**

immuno-réaction contre des peptides couvrant une partie de la boucle AB de VP1, région conservée au sein des entérovirus, et une partie de la région C-terminale de cette même protéine. Contrairement à la boucle AB, la région C-terminale est exposée en surface de la capsid et pourrait être un troisième site antigénique. Une étude bio-informatique récente (Fang et al., 2021) a conforté l'hypothèse proposant ces trois structures de VP1 (boucles BC et DE, et région C-terminale) comme sites antigéniques du virus. L'étude suggère aussi des épitopes conformationnels dans plusieurs autres structures : différentes positions dans les boucles HI et GH de VP1 ; les boucles EF, BC et HI de VP2, les régions N-terminale et C-terminale ainsi que la boucle HI de VP3 (Figure 3B, 3C). Ces prédictions sont confortées par les sites de fixation de quatre anticorps monoclonaux (11G1, EV68-228, EV68-159 et 15C5) qui se superposent partiellement ou totalement avec les trois sites antigéniques prédits. Une seule position dans la boucle DE de VP1 a toutefois été prédite comme faisant partie d'un des sites antigéniques du virus. L'analyse prédictive a pu être biaisée par le fait que la modélisation de cette boucle soit difficile à cause de sa variabilité, mais a contrario, la boucle DE de VP1 n'est pas connue comme une cible d'anticorps neutralisant l'EV-D68. De plus, bien que les boucles BC et C-terminales de VP1 ainsi que EF de VP2 sont des épitopes connus chez les entérovirus, ce n'est pas le cas de la boucle DE de VP1 qui pourrait tout de même être un site antigénique spécifique à l'EV-D68. Le vérifier demandera de plus amples recherches (Fang et al., 2021).

B. Attachement du virion aux récepteurs cellulaires

Les caractéristiques de la capsid permettent à l'EV-D68 de se fixer aux acides sialiques présents à la surface des cellules épithéliales respiratoires. Les seuls récepteurs cellulaires solidement identifiés sont ces monosaccharides liés en $\alpha 2,3$ ou $\alpha 2,6$ aux oligosaccharides. Le virus possède une plus forte affinité pour les acides sialiques liés aux sucres en $\alpha 2,6$, très présents dans les voies respiratoires supérieures. Après la contamination respiratoire, les voies supérieures pourraient être un site primaire de multiplication virale (Baggen et al., 2016; Imamura et al., 2014; Liu et al., 2015a). Cette voie d'infection est liée à la température optimale de multiplication du virus qui est de 33°C, propriété partagée avec les rhinovirus, alors que les autres entérovirus se multiplient plus efficacement à 37°C (Oberste et al., 2004; Royston et al., 2018).

Baggen et al (2016) ont toutefois montré que la dépendance aux acides sialiques n'était pas une propriété partagée par toutes les souches d'EV-D68, en décrivant la capacité

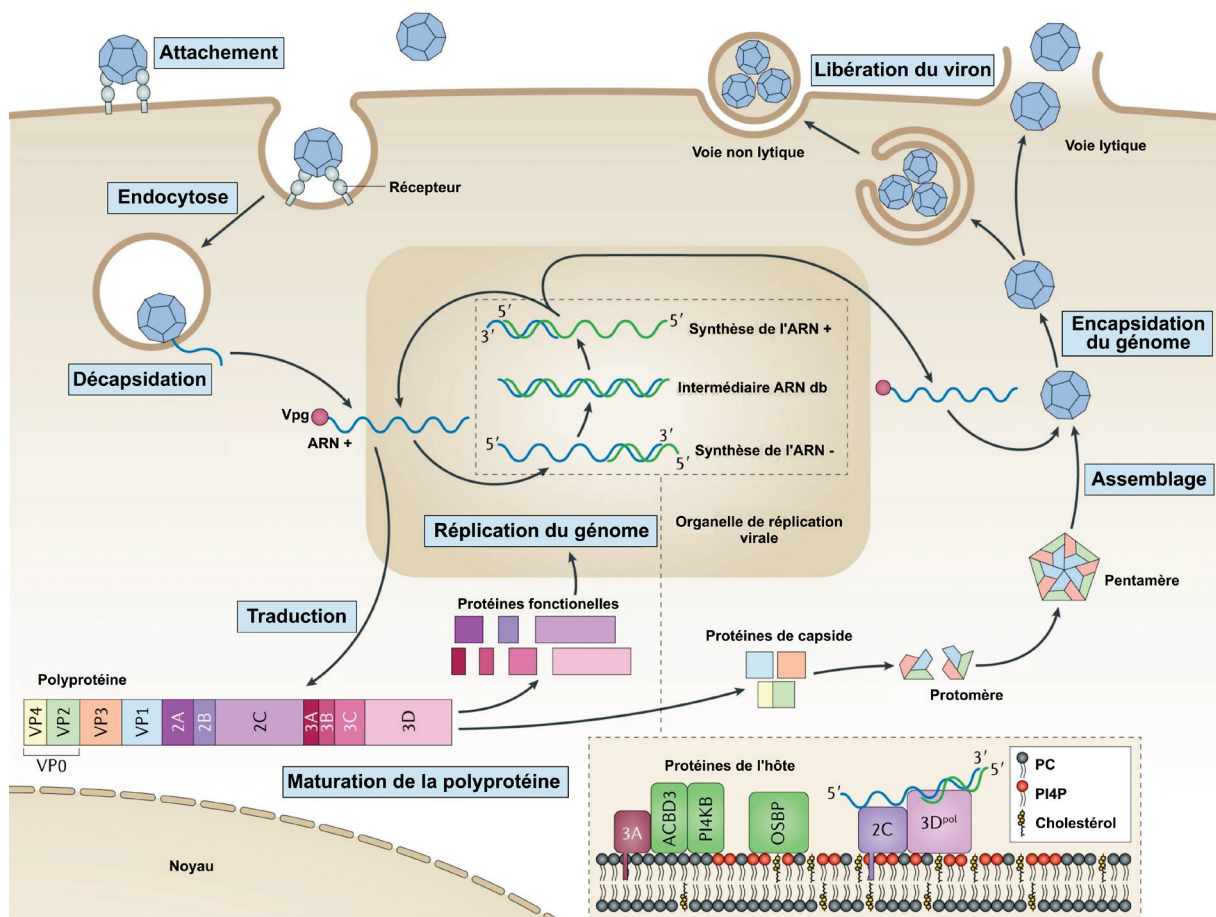


Figure 4 : Aspects généraux du cycle viral d'un entérovirus. L'infection de la cellule hôte est initiée par l'attachement de la particule virale à un ou des récepteurs à la surface cellulaire. Le virion entre dans la cellule par endocytose avant que son génome soit libéré dans le cytoplasme, où la totalité du cycle viral est réalisé. Le génome viral est traduit en une polyprotéine qui subit une maturation protéolytique réalisée par les protéases virales (2A et 3C). La réplication du génome viral par les protéines virales fonctionnelles débute par la synthèse de l'antigénome (ARN de polarité négative), ce qui génère un intermédiaire ARN double brin. L'antigénome sert ensuite de matrice pour la transcription de nombreux brins d'ARN positifs. Tout ce processus a lieu au cœur des organelles de réplication dont les membranes servent de point d'ancrage au complexes réplicatifs. Dans le même temps, les protéines de capsid sont assemblées pour former la capsid virale avant que le génome nouvellement synthétisé ne soit encapsidé. Les nouvelles particules virales infectieuses sont ensuite libérées par voie lytique ou non lytique. PI4P, phosphatidylinositol-4-phosphate ; PC, phosphatidylcholine ; OSBP, oxysterol-binding protein ; ACBD3, Acyl-CoA Binding Domain Containing 3. (Adaptée de Baggen et al. 2018).

de certaines souches récentes, à infecter des cellules dépourvues d'acide sialique. La voie d'entrée alternative et les facteurs sont inconnus. D'autres sucres, les glycosaminoglycanes sulfatés (sGAGs), composés d'une répétition de disaccharides, ont été identifiés comme étant des récepteurs potentiels du virus. Toutefois, la capacité d'attachement aux sGAGs pourrait être une adaptation à la culture virale sur une lignée cellulaire. En effet, la mutation E271K dans la protéine VP1, au cœur de la région putative d'attachement aux sGAGs, apparaît essentielle à la fixation (Baggen et al., 2019) mais n'est que très peu présente dans les séquences VP1 d'entérovirus D68 disponibles sur GenBank.

Enfin, la protéine DAF ou « Decay Accelerating Factor », également très présente à la surface des cellules épithéliales respiratoires, a elle aussi été décrite comme un récepteur de la souche prototype Fermon (Blomqvist et al., 2002). Toutefois, les cellules Vero (épithélium rénal de singe vert) qui expriment la protéine DAF, ne sont pas permissives à l'EV-D68. L'interaction avec la protéine DAF ne suffit donc pas à amorcer l'internalisation de la particule virale (J. Sun et al., 2019). Aucune autre étude n'a approfondi ces deux hypothèses et le mécanisme de l'entrée du virus dans les cellules respiratoires doit encore être précisé. On peut donc considérer les acides sialiques comme les facteurs principaux mais non exclusifs de la voie d'entrée du virus permettant d'initier le cycle infectieux (Figure 4).

La liaison des acides sialiques à la capsid de l'EV-D68 s'opère au niveau d'une dépression de la surface, zone appelée canyon, encerclant chaque axe de symétrie d'ordre 5, axe situé au centre d'un regroupement de cinq copies de la protéine VP1 (Figure 2). La capsid de l'EV-D68 se rapproche de celle des rhinovirus car le canyon est moins profond et plus étroit que celui des autres entérovirus, ce qui exclue qu'un récepteur de type immunoglobuline puisse s'y fixer. La liaison des acides sialiques au canyon provoque des changements de conformation de la boucle GH de la protéine VP1, située à la base du canyon. Ces modifications provoquent l'effondrement de la poche hydrophobe localisée sous le canyon et l'expulsion du « pocket factor », une petite molécule lipidique qui, en remplissant cette poche hydrophobe, permet la stabilisation de la capsid virale (Liu et al., 2015a).

La glycoprotéine ICAM-5 (« intercellular adhesion molecule 5 ») est également rapportée comme récepteur fonctionnel du virus. L'attachement de l'EV-D68 à ce récepteur pourrait déclencher le mécanisme d'entrée comme avec les acides sialiques (Wei et al., 2016). Toutefois, le rôle de cette protéine dans l'infection virale *in vivo* doit être confirmé puisque

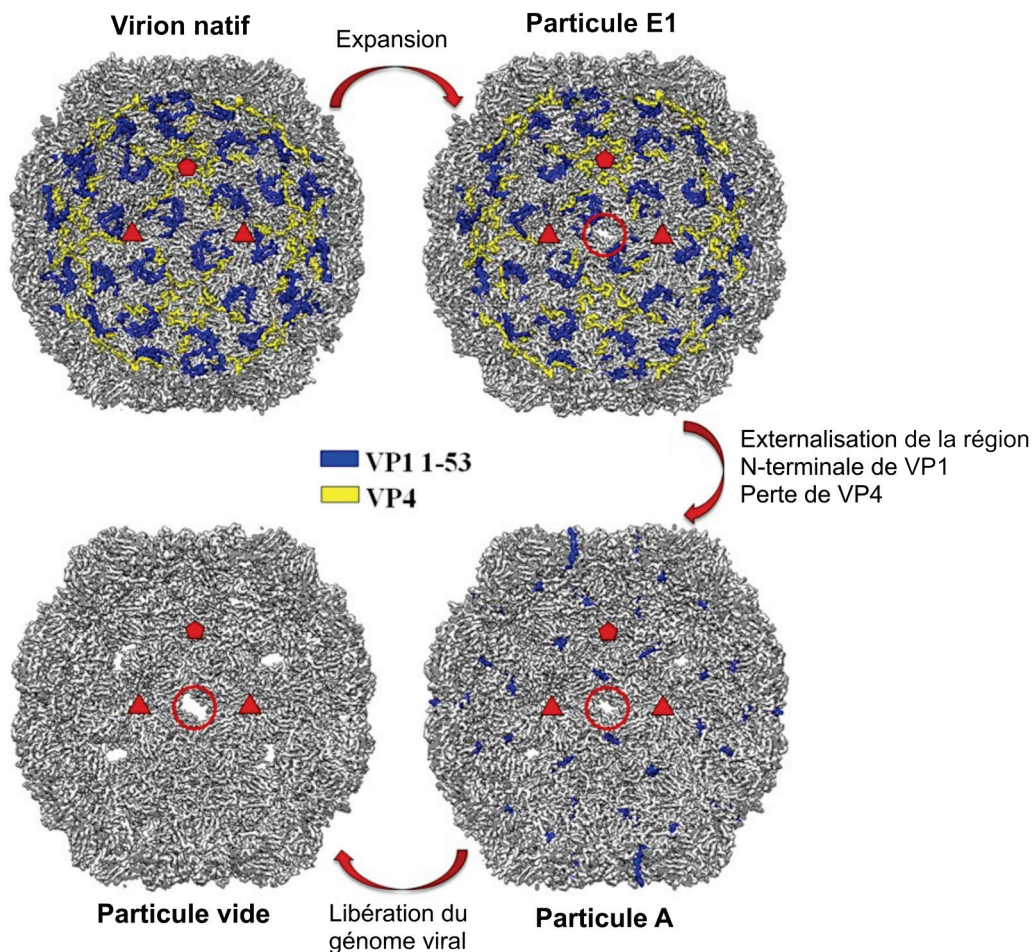


Figure 5 : Intermédiaires structuraux de la capsid de l'entérovirus D68. L'acidification de l'endosome entraîne une série de modifications structurales permettant in fine la libération du génome viral dans le cytosol de la cellule hôte. Les limites d'une unité structurale asymétrique de la capsid virale sont indiquées par deux triangles et un pentagone rouge. Le cercle rouge indique la présence d'un pore au niveau de l'axe de symétrie d'ordre 2. E1 : Expanded 1. **(Adaptée de Liu et al. 2018).**

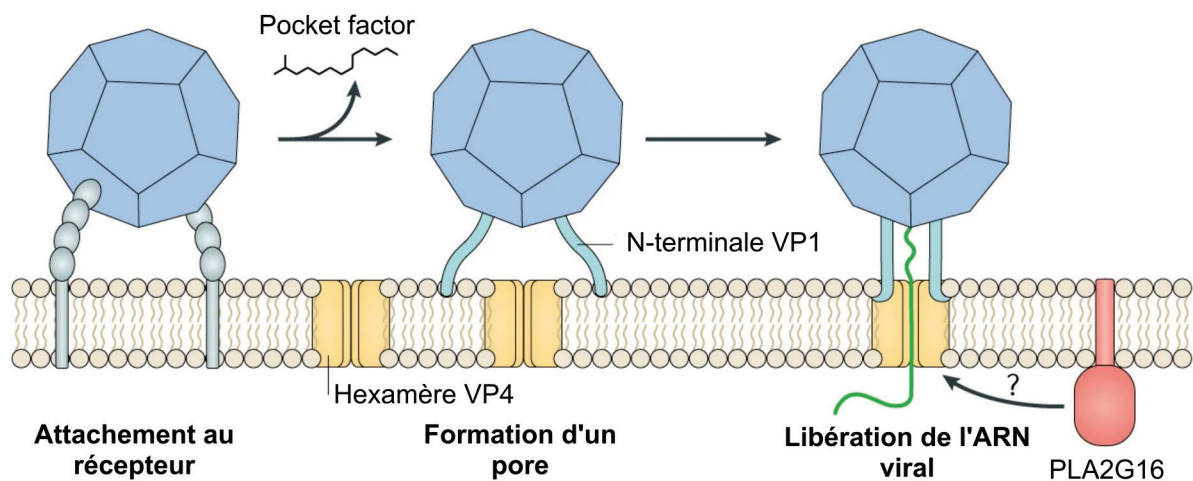


Figure 6 : Mécanisme de libération du génome d'un entérovirus hors de l'endosome. La déstabilisation de la capsid virale débute après son attachement au récepteur cellulaire après l'éjection du "pocket factor" (molécule lipidique stabilisant la capsid). Les changements de conformation illustrés dans la Figure 5, provoquent l'extériorisation de la région N-terminale de VP1 et permet l'ancrage du virion à la membrane endosomale. Des hexamères de la protéine myristoylée VP4 forment des pores par lesquels transite le génome viral jusqu'au cytosol. La protéine cellulaire PLA2G165 (phospholipase A2 groupe XVI) est également impliquée dans cette translocation dont le mécanisme moléculaire est inconnu. **(Adaptée de Baggen et al. 2018).**

qu'elle semble être exclusivement exprimée dans le cerveau (télencéphale), tissu dans lequel l'EV-D68 ne se multiplie pas en modèle murin (Alison M. Hixon et al., 2017; S. Sun et al., 2019; Zhang et al., 2018).

C. Libération du génome viral dans la cellule

L'attachement au récepteur cellulaire déclenche les cascades de signalisation intracellulaires nécessaires à l'endocytose de la particule virale. L'acidification de l'endosome provoque ensuite la libération du génome de l'EV-D68 dans le cytosol (Liu et al., 2018) en déclenchant des changements de conformation massifs de la capsid (Figure 5). Une première expansion de la particule virale est induite par l'acidification endosomale et facilitée par la déstabilisation de la capsid consécutive à l'expulsion du « pocket factor ». Ces réarrangements génèrent la formation de pores dans la capsid qui forme un intermédiaire structural appelé particule E1 ou « expanded 1 ». Suivront la perte de VP4, une protéine myristoylée interne au contact de l'ARN viral et l'externalisation de la région N-terminale de VP1, elle aussi interne dans la particule native. Ces changements génèrent un nouvel intermédiaire structural, la particule A à partir de laquelle l'ARN viral est libéré dans le cytosol (Liu et al., 2018).

Le mécanisme exact de la libération du génome viral nécessite également la formation de pores dans la membrane lipidique de l'endosome ; le mécanisme proposé pour les EV est schématisé dans la Figure 6. Chez les rhinovirus humains, la particule A est ancrée à la membrane plasmique endosomale via la région N-terminale de VP1. La protéine VP4 myristoylée forme des pores nécessaires au passage du génome viral dans le cytosol (Baggen et al., 2018). La phospholipase PLA2G16 (A2 Groupe XVI) participe aussi à la translocation de l'ARN viral mais le mécanisme exact est inconnu. Une première hypothèse est qu'elle pourrait interagir avec l'ARN viral ou des protéines virales pour faciliter la translocation et/ou la formation, l'expansion et le maintien des pores. Elle pourrait aussi modifier des lipides formant la membrane, ce qui affecterait sa fluidité et/ou faciliterait l'insertion des composants de pores (Baggen et al., 2018; Staring et al., 2017). Toutefois, dans le cas de l'EV-D68, PLA2G16 ne serait plus requise en cas d'utilisation des sGAGs comme récepteur cellulaire (Baggen et al., 2019).

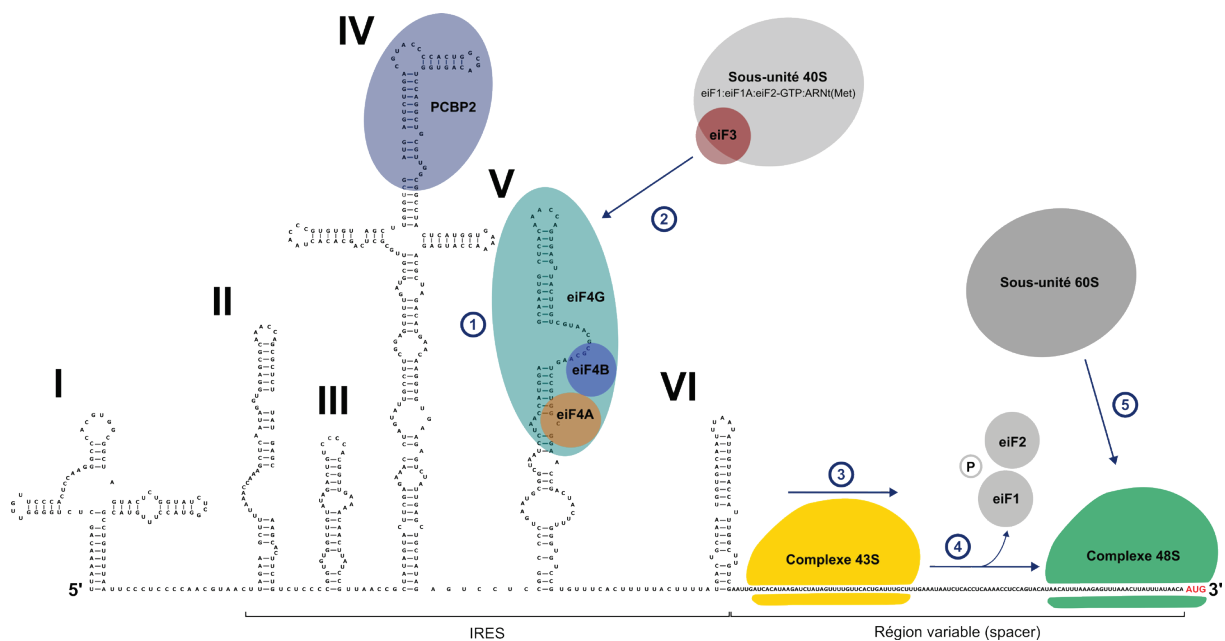


Figure 7 : Schéma de l'initiation de la traduction du génome d'un entérovirus. L'ensemble du processus est réalisé en cinq phases principales. **1.** Le facteur eucaryotique d'initiation de la traduction (eIF) 4G se fixe au domaine V de l'IRES, puis forme un complexe avec eIF4A et eIF4B. **2.** La protéine eIF3 est recrutée : elle se lie à la sous-unité ribosomique 40S associée aux protéines eIF1, eIF1A, eIF2-GTP et à un ARN de transfert (ARNt) méthionine. Ceci génère la formation du complexe 43S de pré-initiation de la traduction. **3.** Grâce à l'activité hélicase de eIF4A, ce complexe scanne la séquence jusqu'à l'hybridation de l'ARNt au codon d'initiation AUG. **4.** Le complexe d'initiation de la traduction 48S se forme par la libération des protéines eIF1 et eIF2 ainsi que d'un phosphate et l'interaction de la poly(rC)-binding protein 2 (PCBP2), fixée au domaine IV de l'IRES. **5.** La sous-unité ribosomique 60S est recrutée, ce qui permet la formation d'un ribosome 80S mature et le déclenchement de la traduction virale.

D. Traduction du génome viral

La traduction du génome viral n'a pas été spécifiquement décrite pour l'EV-D68, mais elle se déroule selon un mécanisme conservé parmi les picornavirus et qui a été bien décrit pour les poliovirus, membres de l'espèce C du genre *Enterovirus*. La traduction est initiée dès la libération du génome viral dans le cytosol et le site d'initiation interne de la traduction ou IRES (Internal ribosome entry site) localisé dans la région non traduite en 5' de l'ARN joue un rôle majeur. Cette importance fonctionnelle explique le degré de similitude élevé de l'IRES entre les entérovirus. Cet élément du génome viral est constitué de cinq des six domaines en structure tige-boucle, numérotés II à VI (Figure 7). L'initiation de la traduction implique la formation de plusieurs complexes ribonucléo-protéiques dans lesquels sont associés deux types de facteurs cellulaires : les facteurs eucaryotes d'initiation de la traduction (eIFs) et des facteurs transactivateurs « IRES trans-acting factors » (ITAFs).

Formation du complexe de pré-initiation. La protéine eIF4G se fixe au domaine V de l'IRES puis forme un premier complexe qui comprend eIF4A et eIF4B. La formation du complexe 43S de pré-initiation de la traduction est ensuite guidée par la protéine eIF3 qui interagit avec eIF4G et la sous-unité ribosomique 40S associée aux facteurs eIF1, eIF1A et à un complexe ternaire (eIF2, GTP et ARN de transfert initiateur méthionine). L'activité hélicase de eIF4A permet au complexe 43S de scanner la séquence nucléotidique jusqu'au codon d'initiation AUG. Les facteurs eIF1 et eIF2 sont libérés du complexe protéique et l'hydrolyse du GTP par eIF2, favorisée par eIF5, libère un phosphate.

Formation du complexe d'initiation. Cette séquence d'évènements conduit à la formation du complexe d'initiation de la traduction 48S. Celle-ci nécessite la protéine PCBP2 (poly(rC)-binding protein 2), un facteur transactivateur se fixant au domaine IV de l'IRES. La sous-unité ribosomique 60S est recrutée grâce aux protéines eIF5B et eIF1A, ce qui permet la formation d'un ribosome 80S mature et le déclenchement de la traduction de l'ARN viral.

D'autres ITAFs, tels que, entre autres, PTBP1 (Polypyrimidine tract binding protein 1, également appelé PTB), SRp20 (Serine/Arginine-Rich Splicing Factor ; également appelé SRSF3), Unr (upstream of N-ras) ou encore hnRNPA1 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1), participent également à l'initiation de la traduction en améliorant l'activité de l'IRES, notamment via la stabilisation de son association avec les sous-unités

ribosomiques, sans en être des facteurs indispensables (Lee et al., 2017; Lozano and Martínez-Salas, 2015; Sweeney et al., 2014).

E. Maturation co-translationnelle de la polyprotéine virale

La conservation, entre les espèces d'EV, des sites catalytiques des protéases virales 2A^{pro} et 3C^{pro} suggère une spécificité de séquence et ainsi des sites de clivage conservés (Laitinen et al., 2016). Ainsi, il est admis que le processus de maturation de la polyprotéine virale est conservé chez les entérovirus. Les protéases virales 2A^{pro} et 3C^{pro} déclenchent la maturation de la polyprotéine pendant la traduction de l'ARN viral. La protéase 2A permet de libérer le précurseur P1, à la jonction P1-P2, tandis que la protéase 3C sépare les précurseurs P2 et P3, contenant respectivement les protéines 2A-2C et 3A-3D. Les autres clivages sont réalisés par la protéase 3C^{pro} et la protéine 3CD^{pro}, et génèrent une série d'intermédiaires protéiques et l'ensemble des protéines virales fonctionnelles. La séparation de VP4 et VP2 est issue de l'auto-clivage du précurseur VP0 lors de la formation de la capsid virale (Huang et al., 2015) (Figures 1 & 4). La particularité de l'EV-D68 se situe toutefois dans la région C-terminale de la protéine VP3, légèrement plus longue que chez les autres EV du fait de la présence d'une petite hélice α (Liu et al., 2015b).

F. Réorganisation de l'environnement intracellulaire

Bien que peu décrit pour l'EV-D68, le rôle des protéases virales dans le cycle infectieux des entérovirus s'étend classiquement au-delà de la maturation de la polyprotéine car elles ont beaucoup d'autres cibles à l'intérieur de la cellule. Bien que décrites pour certains EVs, celles-ci peuvent être considérées comme des cibles potentielles à étudier pour l'ensemble des EVs dont l'EV-D68. Les clivages de facteurs intracellulaires produisent un environnement cellulaire favorable à la réplication du génome viral et à la multiplication du virus.

Inhibition de la traduction des ARNm cellulaires. Pour les poliovirus et l'EV-A71, l'action des protéases virales permet d'amplifier la traduction de l'ARN viral en inhibant la traduction des ARNm cellulaires. La protéase 2A^{pro} opère le clivage de la protéine eIF4G dont la région N-terminale contient les domaines de liaison à eIF4E et de reconnaissance de la coiffe des ARNm cellulaires. Cette altération bloque l'initiation de la traduction coiffe-dépendante sans inhiber la traduction via l'IRES, qui nécessite seulement la région C-terminale de eIF4G. Cette même protéase clive également différentes nucléoporines (Nup62, Nup98, Nup153) ce

qui provoque un blocage de l'exportation des ARNm et une relocalisation cytoplasmique de protéines nucléaires dont de nombreux facteurs de transactivation positive (SRp20, hnRNPA1) de la traduction virale (Filipe et al., 2021; Lee et al., 2017).

Inhibition de la transcription des ARNm cellulaires. Le clivage des nucléoporines est également associé à l'altération de la régulation de la transcription des ARNm de la cellule hôte. La protéine 3CD est transloquée dans le noyau de la cellule hôte et clive de nombreux facteurs de transcription : TBP (TATA-binding protein), CREB (Cyclic AMP-responsive element-binding protein), Oct-1 (Octamer binding transcription factor 1) ou encore p53.

Les facteurs transactivateurs négatifs de la traduction virale sont également la cible des protéases virales, ce qui empêche leur compétition avec les régulateurs positifs pour se lier à la région variable (spacer region) qui sépare l'IRES de l'ORF (Figure 7). Ces clivages peuvent également permettre à d'autres facteurs transactivateurs positifs, de promouvoir la traduction virale. Un des exemples décrits est celui de la protéase virale 2A de l'EV-A71, qui clive FBP1 (fructose-1,6-bisphosphate 1) dont la partie N-terminale est ensuite capable de promouvoir la traduction virale de façon coordonnée avec la protéine FBP1 native (Filipe et al., 2021; Lee et al., 2017).

G. Réplication du génome viral

Chez les entérovirus, la réplication du génome viral débute par la circularisation de l'ARN de polarité positive (ARN⁺), qui est nécessaire à la synthèse de l'antigénome de polarité négative (ARN⁻). Cette circularisation est due à la protéine cellulaire PABP (Poly(A)-binding protein). Fixée à la queue poly-adiénylée de l'ARN viral, elle établit un pont avec le complexe des protéines virales et cellulaires 3CD, PCBP2 et 3AB, attaché au domaine I (structure dite en feuille trèfle de la région 5' non traduite). La protéine VPg (virion protein genome linked ou 3B) ou son précurseur 3BC, à l'origine lié de façon covalente à l'extrémité 5' de l'ARN viral, se détache puis subit une poly-uridylylation (VPgpUpU) par la polymérase virale 3D^{pol}. Cette étape de poly-uridylylation requiert une matrice poly-adiénylée : l'élément cre (cis-acting replication element). Celui-ci forme une structure tige boucle localisée dans la région traduite de la protéine virale 2C^{ATPase} et hautement conservée chez les entérovirus D. VpgpUpU est complexée avec la polymérase 3D^{pol} ou son précurseur 3CD puis le complexe est transféré à

l'extrémité 3' non traduite de l'ARN+ (Baggen et al., 2018; Filipe et al., 2021; Pascal et al., 2020; Paul and Wimmer, 2015).

La structure poly-uridylylée s'hybride à la queue poly-adénylée de l'ARN+, ce qui permet d'initier la synthèse de l'antigénome par le complexe de réplication. Le brin d'ARN négatif sert de matrice à la transcription des ARN+ par un mécanisme proche de celui de la synthèse de l'antigénome. L'ARN double-brin doit cependant être déstabilisé pour reformer le domaine I de la région 5' non traduite, permettant ainsi l'interaction avec les protéines nécessaires à l'initiation de la transcription. Cette déstabilisation est facilitée par la fonction hélicase des protéines 2C^{ATPase} et/ou 2BC. La protéine cellulaire hnRNPc permet de stabiliser la structure circulaire en se liant à la fois aux régions 5' et 3' non traduites de l'ARN négatif. Les protéines 3AB et 3CD fixées au domaine I de l'ARN+ procèdent au déroulement de l'ARN double brin. Les ARN+ sont ensuite traduits ou encapsidés pour produire de nouvelles particules virales. La protéine 3AB permet également la stabilisation du complexe de réplication constitué de la polymérase 3D^{pol}, la protéine VPg et la matrice ARN. La formation des structures secondaires de l'ARN viral est médiée par l'activité chaperonne de la protéine 2C^{ATPase} (Baggen et al., 2018; Filipe et al., 2021; Pascal et al., 2020; Paul and Wimmer, 2015).

La traduction des ARN+, majoritaire lors des premiers stades de l'infection, laisse place à la réplication de l'ARN viral lorsque la concentration en protéase 3C^{pro} atteint un niveau suffisant. En effet, cette protéase clive la protéine PCBP2, inhibant l'initiation de la traduction virale sans impacter l'initiation de la réplication. Le clivage d'autres facteurs transactivateurs tels que la protéine PTBP1 participe à cette inhibition (Elrick et al., 2021).

H. Formation des usines de réplication virale

L'ARN viral est répliqué au sein de structures tubulaires ou vésiculaires néoformées appelées organelles de réplication (OR) ou usines virales. Les structures tubulaires présentent une membrane simple (single-membrane tubules) et les structures vésiculaires, une double membrane (double-membrane vesicles). Les OR sont générées par la réorganisation des membranes de l'appareil de Golgi (AG) et du réticulum endoplasmique (RE). Elles concentrent tous les éléments nécessaires à la réplication. Le complexe de réplication y est ancré grâce à la protéine 3AB qui présente, comme la protéine 3A, une propriété de fixation aux membranes. Les mécanismes qui sont à l'origine des OR ont principalement été décrits pour

les poliovirus et CVB3. Ils font entrer en jeu des protéines virales et des facteurs cellulaires, notamment ceux du métabolisme lipidique de la cellule hôte. La participation de divers facteurs a toutefois été décrite pour d'autres EVs dont l'EV-D68 et est détaillée dans la revue bibliographique de Li et al (2020).

Les membranes des OR sont enrichies en phosphatidylcholine (PC), en PI4P (phosphatidylinositol-4-phosphate) ainsi qu'en cholestérol ce qui permet la régulation de l'activité du complexe de réplication (Figure 4). Pendant l'infection à poliovirus, l'accumulation de PC, qui nécessite la protéine 2A indépendamment de son activité protéasique, résulte du recrutement de la protéine FAS (fatty acid synthase) qui permet la biosynthèse d'acides gras au niveau de la membrane de l'usine virale. L'importation d'acides gras depuis le milieu extracellulaire est aussi permise par la protéine ACSL3 (acyl-coA synthetase long-chain family member 3). ACSL3 induit également une régulation positive de la synthèse des phospholipides. L'enzyme CCT α (CTP-phosphocholine-cytidylyl transferase alpha) est attachée à la membrane des OR, ce qui permet de synthétiser la PC. Au cours de l'infection, le pool nucléaire de cette enzyme est transloqué dans le cytoplasme (Li et al., 2020).

L'enrichissement en phosphatidylinositol-4-phosphate (PI4P) est réalisé par la kinase PI4KB (phosphatidylinositol 4-kinase- β). Pendant une infection à EV, EV-D68 compris, elle est recrutée par la protéine virale 3A grâce à la protéine ACBD3 (acyl-CoA-binding domain-containing protein 3) (Li et al., 2020; Lyoo et al., 2019). Les protéines 3A des poliovirus et CVB3 peuvent également faciliter ce recrutement via leur interaction avec le complexe formé par GBF1 (guanine nucleotide exchange factor 1) et Arf1 (ADP ribosylation factor 1), lui-même recruté par 3CD ou 3A dans les cas respectifs des poliovirus ou CVB3. Enfin chez les poliovirus et rhinovirus humains, les protéines 2BC et 2B, respectivement, sont impliquées dans le recrutement de PI4KB. Il est notable que l'intervention des facteurs cellulaires, à l'exception d'ACBD3, semble varier en fonction de l'entérovirus étudié, d'autant que PI4KB est fonctionnellement indépendante (Li et al., 2020).

Plusieurs voies sont mobilisées pour accumuler le cholestérol dans la membrane des OR. Dans le contexte d'une infection à poliovirus ou CVB3, le précurseur 2BC active la protéine CME (clathrin-mediated endocytosis) qui permet de ramener dans le cytoplasme du cholestérol issu de la membrane plasmique ou du milieu extracellulaire. Une fois dans le cytoplasme, il est transporté par des endosomes de recyclage liés à la protéine rab11. Celle-ci

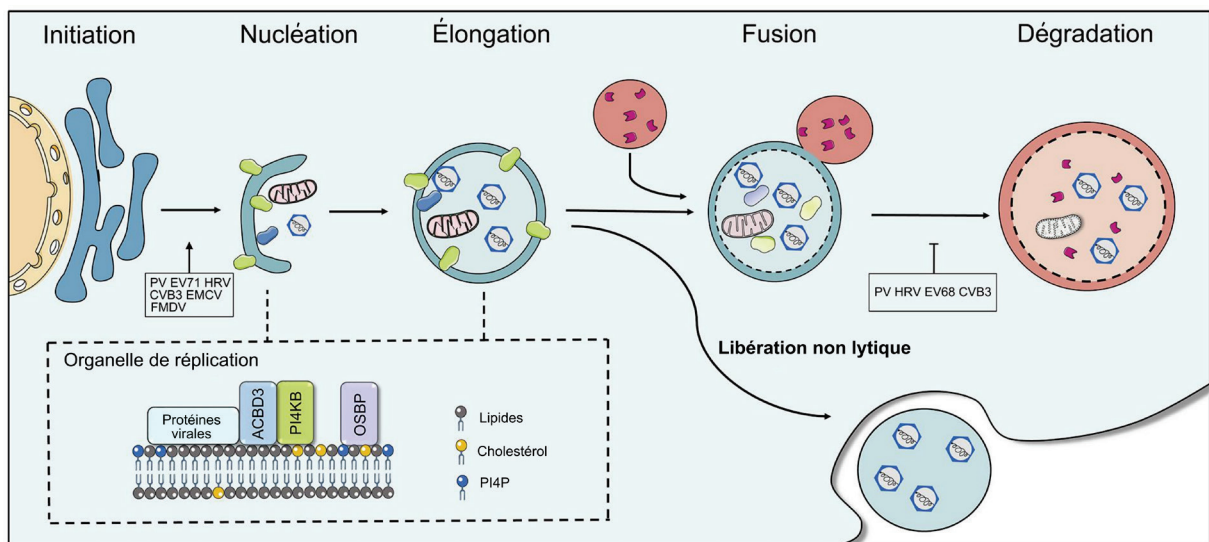


Figure 8 : Remaniement de la voie autophagique pendant l'infection par un picornavirus. Dans le déroulement standard, la fusion de l'amphisome et d'un lysosome permet la dégradation du contenu de l'amphisome. Cette étape est inhibée pendant le cycle infectieux de plusieurs picornavirus dont le poliovirus (PV), les rhinovirus humains (HRV), le coxsackie virus B3, ou aussi l'EV-D68. Les amphisomes ou vésicules à double membrane, peuvent alors fusionner avec la membrane plasmique cellulaire, permettant ainsi la libération d'une vésicule mono-membranaire contenant les virions. **(Adaptée de J. Sun et al. 2019).**

est attachée par PI4KB ce qui permet la fixation des endosomes aux OR et leur exploitation. De plus, les molécules PI4P intégrées dans la membrane des OR participent à l'ancrage de la protéine OSBP (oxysterol-binding protein) qui permet la captation et le transport de cholestérol depuis la membrane du RE. La formation des OR fait également entrer en jeu les vésicules COPI et COPII (Coat protein complex I / II), facteurs importants du trafic protéique et lipidique entre le RE et l'AG. La protéine 2C^{ATPase} participerait à la formation des OR en modifiant la courbure de la membrane du RE (Li et al., 2020; Strating and van Kuppeveld, 2017).

L'autophagie est un processus voué au recyclage des organites endommagés ou à l'élimination de micro-organismes. Ce processus est court-circuité lors de l'infection par l'EV-D68 et de nombreux virus à ARN, ce qui a pour conséquence d'amplifier la réplication du génome viral (Figure 8). L'autophagie repose sur les autophagosomes, vésicules à double membrane, qui captent l'élément à dégrader grâce à des protéines cargo, marqueurs de l'activité autophagique. L'autophagosome fusionne ensuite avec un endosome. L'amphisome ainsi produit fusionne à son tour avec un lysosome générant un autolysosome dans lequel l'élément est dégradé. Lors de la phase tardive de l'infection par l'EV-D68, la protéine cargo SQSTM1 (sequestosome 1) est clivée, probablement par la protéase 2A, ce qui inhibe l'activité autophagique. La protéase 3C clive la protéine SNAP29 (Synaptosomal-associated protein 29) nécessaire à la fusion de l'amphisome et du lysosome, ce qui bloque le processus autophagique au stade autophagosome ou amphisome. Avant son clivage, SNAP29 promeut toutefois la réplication de l'EV-D68, comme la protéine SNAP47 qui serait impliquée dans l'acidification de l'autophagosome en facilitant sa fusion avec un endosome. En plus d'inhiber l'autophagie, la réplication du génome de l'EV-D68 pourrait avoir lieu directement dans les autophagosomes ou leurs membranes pourraient être détournées vers la formation des OR, amplifiant ainsi la réplication (Corona et al., 2018; Li et al., 2020; Mohamud et al., 2018).

I. Mécanismes d'échappement immunitaire

Le rôle des OR n'est pas limité à la réplication du génome viral. La formation de ces structures participe à un mécanisme d'échappement à la réponse immunitaire innée intracellulaire. En enfermant les ARN bicaténaires viraux, les OR empêchent qu'ils soient reconnus par les récepteurs intra-cellulaires type RLR (RIG-1 like receptors) : RIG-1 (Retinoic acid-inducible gene-1) et MDA5 (Melanoma Differentiation-Associated protein 5). L'échappement

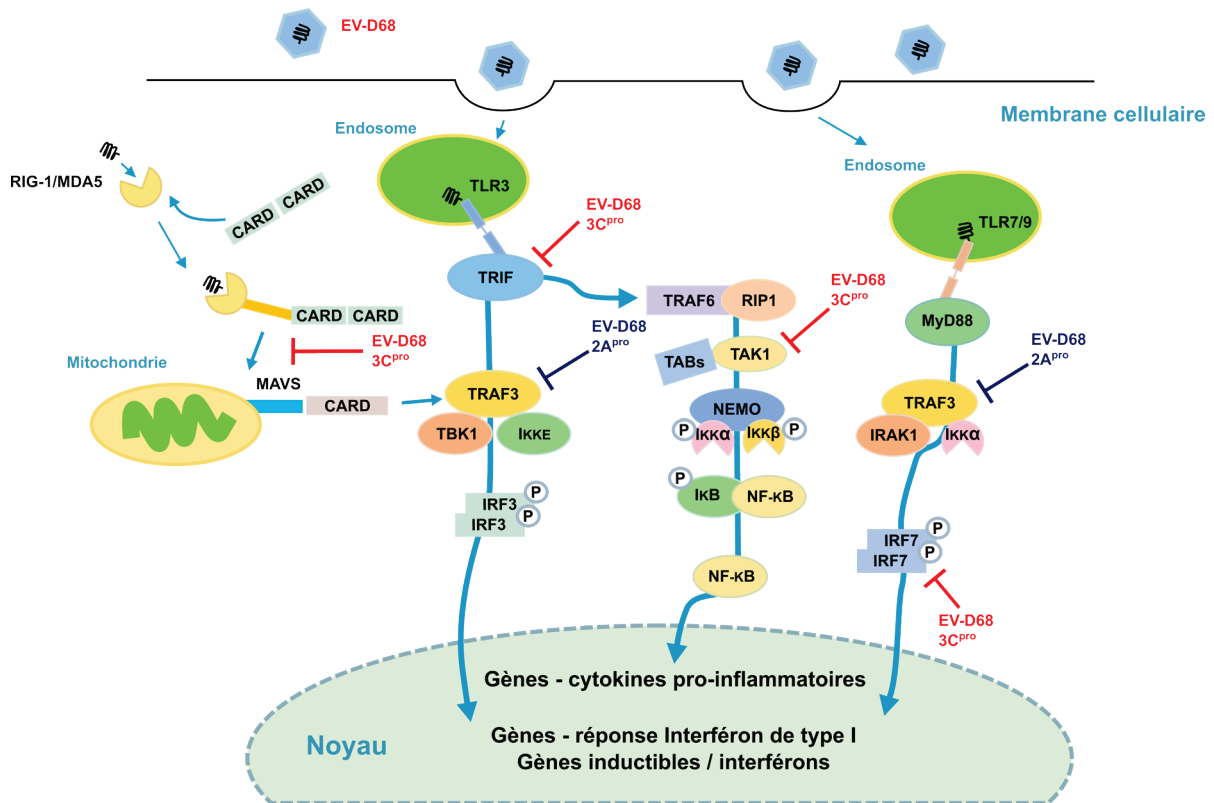


Figure 9 : Mécanismes d'échappement immunitaire mis en place par l'entérovirus D68. L'activité des protéases virales 2A et 3C sur des facteurs cellulaires conduit à l'inhibition de la réponse interféron de type I et de la production de cytokines pro-inflammatoires. La protéase virale 3C clive les protéines TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β), TAK1 (Transforming growth factor β activated kinase 1) et IRF7 (Interferon regulatory factor 7), inhibant ainsi les voies de signalisation des récepteurs TLR (Toll-like receptors) 3, 7 et 9. La protéase virale 2A peut cliver la protéine TRAF3 (Tumor necrosis factor receptor-associated factor 3), inhibant ainsi les mêmes voies de signalisations mais également celle des récepteurs RLR (RIG-1 like receptors). Cette dernière est également inhibée par la protéase 3C qui, en se fixant au récepteur MDA5, empêche son interaction avec les protéines MAVS (mitochondrial antiviral signalling proteins). (Adaptée de J. Sun et al. 2019).

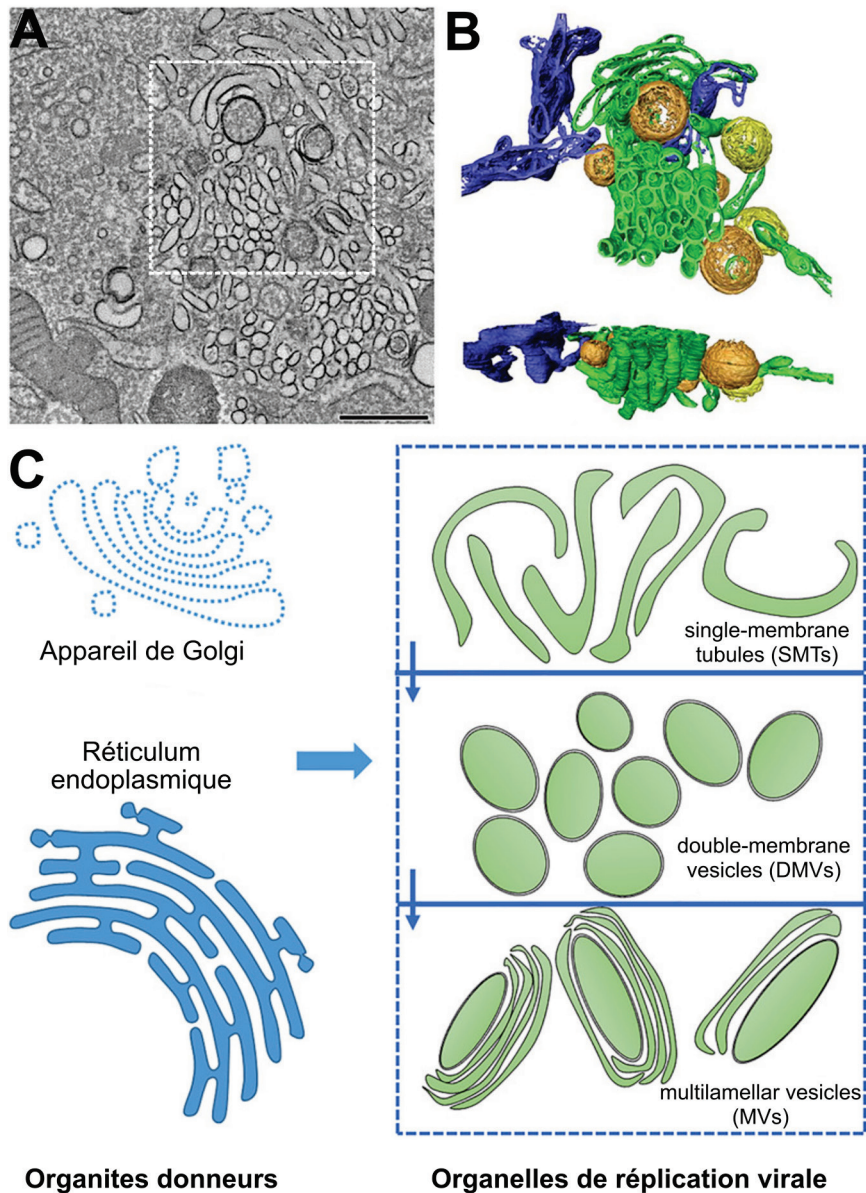


Figure 10 : Morphologie des organelles de réplication des entérovirus. **(A)** Coupe de tomographie électronique en série d'une cellule infectée par le coxsackievirus B3 (5h post-infection). La barre d'échelle représente 500 nm. **(B)** Modélisation 3D de la zone encadrée dans le panneau A vue du dessus (en haut) et de côté (en bas) montrant en vert des tubules à membrane simple (DMV) et des vésicules à double membrane (DMV) ouvertes (orange) et fermées (jaune) ; le réticulum endoplasmique en indiqué en bleu. **(C)** Représentation schématique de la morphologie des organelles de réplication virale. Ceux-ci sont générés à partir du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi. Tôt dans l'infection, les organelles de réplication se présentent sous la forme de tubules mono-membranaire avant de se transformer en vésicules à double membrane puis en vésicules multi-lamellaires (MVs) lorsque l'infection progresse. **(Adaptée de Li et al. 2020).**

immunitaire de l'EV-D68 passe également par l'activité protéolytique des deux protéases virales qui inhibent la réponse interféron de type I (Figure 9). La protéase 2A^{pro} clive la protéine TRAF3 (Tumor necrosis factor receptor-associated factor 3) impliquée dans les voies de signalisation des récepteurs TLR (Toll-like receptors) 3, 7 et 9 et des récepteurs RLR (Kang et al., 2020). Ces deux voies sont également inhibées par l'activité de la protéase 3C^{pro} qui clive IRF7 (Interferon regulatory factor 7), impliqué dans la voie TLR7/9 (Xiang et al., 2016a), ainsi que TAK1 (Transforming growth factor β activated kinase 1) (Rui et al., 2017) et TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β) (Xiang et al., 2014). L'inactivation de TAK1 et TRIF inhibe ainsi la production de cytokines et la voie de signalisation conduisant à la production des interférons de type 1. La protéase 3C^{pro} a la propriété de se lier au récepteur MDA5, ce qui empêche son interaction avec les protéines MAVS (mitochondrial antiviral signalling proteins), nécessaire à l'activation de la réponse interféron de type I (Rui et al., 2017).

Les granules de stress se forment tôt dans l'infection par l'EV-D68, en réponse à la phosphorylation de la sous-unité α du facteur eIF2 par la protéine kinase R. Induite par l'infection virale, cette phosphorylation est considérée comme une réponse à un stress cellulaire qui stoppe la synthèse protéique. Les granules de stress sont constitués des protéines TIA1 (T cell intracellular antigen 1), HUR (human antigen R) et G3BP1 (Ras GTPase-activated protein-binding protein 1) qui se lient à l'ARN viral par l'intermédiaire de la région 3' non traduite, ce qui inhibe la réplication virale. En clivant G3BP1 lors de la phase tardive de l'infection, la protéase 3C^{pro} de l'EV-D68 empêche la formation des granules de stress et l'expression de gènes d'interféron β (Cheng et al., 2020). La protéase 2A^{pro} de l'EV-D68, via un mécanisme inconnu, jouerait un rôle encore plus important dans l'inhibition de la réponse interféron de type I (J. Sun et al., 2019; Visser et al., 2019).

J. Assemblage de la capside virale

La structure tridimensionnelle des OR évolue constamment pendant l'infection virale (Figure 10). Les structures tubulaires mono-membranaires semblent vouées à la réplication de l'ARN viral. Après la phase exponentielle de réplication, elles sont modifiées pour former des vésicules à double membrane et celles-ci à leur tour sont restructurées en vésicules multilamellaires (multilamellar vesicles), lors de la phase tardive de l'infection. Le rôle des vésicules à double-membrane pourrait être d'abriter la phase d'assemblage des virions en cours de

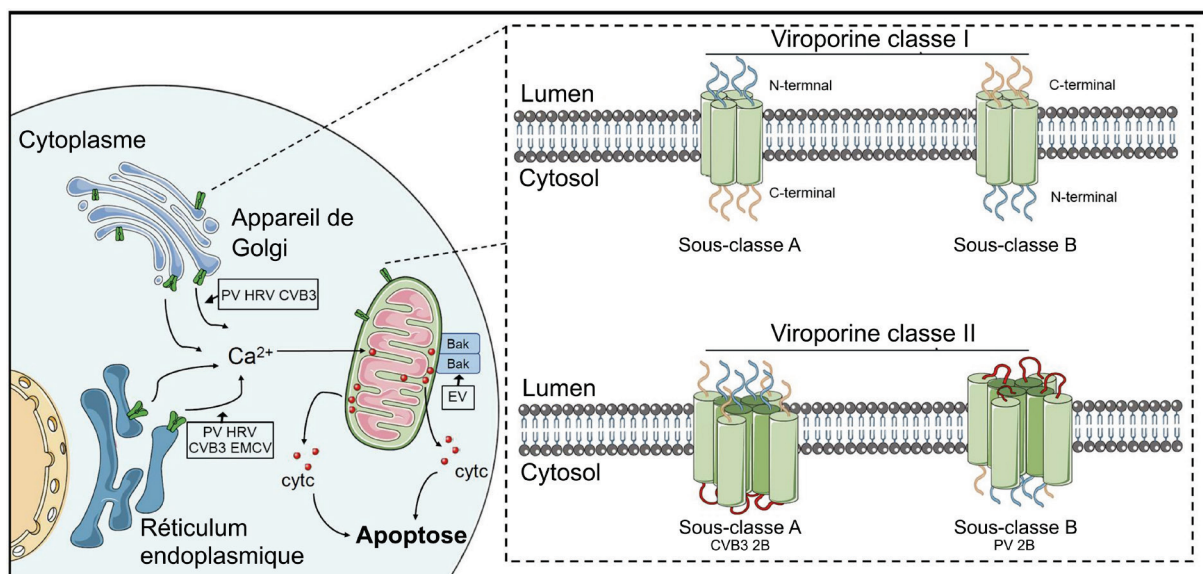


Figure 11 : Régulation de l'apoptose par la protéine 2B des picornavirus. La protéine 2B des poliovirus (PV), rhinovirus humains (HRV) et coxsackie virus B3 (CVB3) est une viroporine. Elle s'assemble sous la forme de tétramères et forme des pores dans la membrane de l'appareil de Golgi et du réticulum endoplasmique, ce qui induit la libération de Ca^{2+} dans le cytosol. Les mitochondries captent le Ca^{2+} cytosolique, ce qui conduit à la libération de cytochrome c et au déclenchement de l'apoptose. Il y a deux classes majeures de viroporine selon le nombre de domaines transmembranaires ; la viroporine 2B des entérovirus en contient deux et appartient à la classe classe II. Les viroporines du CVB3 et du PV appartiennent respectivement aux sous-classes A et B, définies d'après l'orientation du complexe dans la membrane. (Adaptée de J. Sun et al. 2019).

formation (Li et al., 2020). Cette phase survient à l'issue de la maturation du précurseur P1 par la protéase 3CD^{pro} associée à la protéine HSP90 (heat shock protein 90). Le trimer formé par les protéines VP0, VP1 et VP3 génère une unité pentamérique par auto-assemblage. Douze pentamères, stabilisés par la partie myristoylée de VP0 et/ou la glutathione, se condensent autour d'un brin d'ARN⁺ pour former un provirion. Lors de l'encapsidation, l'interaction de VP0 avec l'ARN viral induit son clivage en deux protéines VP4 et VP2. Ce dernier événement forme la particule virale mature infectieuse (Baggen et al., 2018; Elrick et al., 2021).

K. Effets cytopathiques et libération des particules virales

La multiplication d'un entérovirus dépend des interactions qui se produisent entre les protéines virales et un grand nombre de facteurs cellulaires, et de leurs conséquences sur l'équilibre cellulaire. Parmi les altérations structurales de la cellule hôte pendant l'infection virale, le remodelage complet du cytosquelette d'actine la conduit rapidement à entrer en apoptose. La viroporine 2B du poliovirus participe à l'induction de l'apoptose en altérant l'homéostasie intracellulaire du Ca²⁺ (Figure 11). La formation de pores dans les membranes du RE et de l'AG permet le rejet de Ca²⁺ dans le cytosol. Celui-ci est capté par les mitochondries, ce qui induit la libération de cytochrome c et l'entrée dans le processus apoptotique. Par ailleurs, les protéases virales clivent des caspases et différents facteurs pro-apoptotiques, ce qui stoppe l'apoptose (J. Sun et al., 2019). La cellule entre alors en nécrose, processus lytique qui permet la libération des particules virales néo-formées. Une voie non lytique de libération par une exocytose des autophagosomes/OR (Figure 8), décrite pour plusieurs picornavirus, pourrait également permettre de libérer les particules d'EV-D68 (Li et al., 2020; J. Sun et al., 2019).

II. Classification

Historiquement, les premiers travaux cherchant à décrire la diversité phylogénétique des souches d'EV-D68 ont classé les séquences VP1 en trois lignées (Figure 12). La diversité de ce virus a ensuite été classée en 3 clades : A (lignée 3), B (lignée 2) et C (lignée 1). Le clade B serait le plus récent et aurait dérivé du clade C (Tokarz et al., 2012). Les trois clades se différencient par plusieurs délétions de nucléotides et 4 à 6% de divergence en acides aminés dans la protéine VP1 (Du et al., 2015; Tokarz et al., 2012). Après la réémergence épidémique

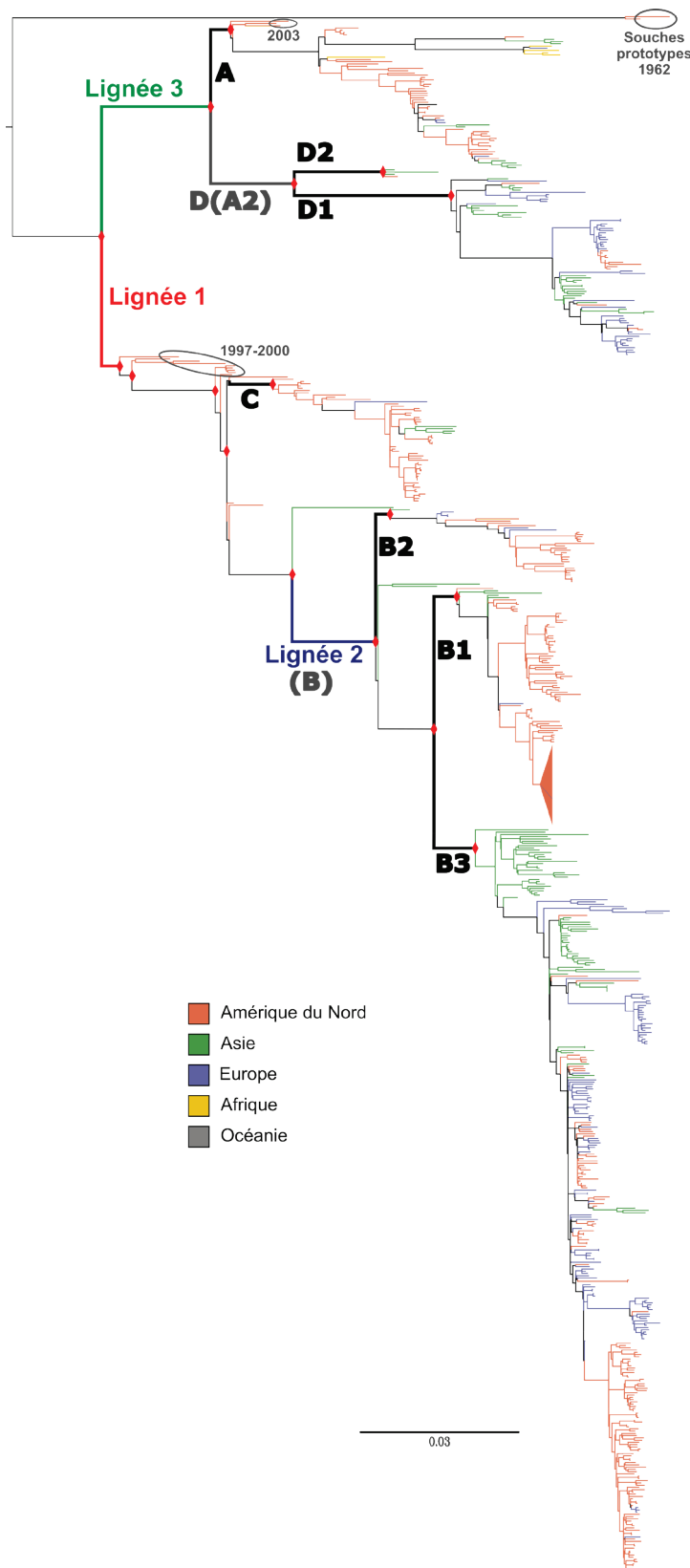


Figure 12 : Phylogénie de l'EV-D68.

Les séquences de l'EV-D68 sont réparties en quatre clades A, B, C et D (anciennement sous-clade A2). Les clades B et D sont respectivement subdivisés en sous-clades B1, B2, B3 et D1, D2. Initialement, trois lignées avaient été décrites. La lignée 1 contenait les séquences du clade C actuel, la lignée 2, celles du clade B et la lignée 3, celles du clade A avant que celui-ci ne soit divisé en sous-clades A1 et A2 et que ce dernier soit reclassé en clade D. Trente-cinq ans séparent les séquences des souches prototypes (1962) des séquences les plus anciennes de la lignée 1 (1997). L'arbre phylogénétique a été obtenu avec un jeu de données regroupant 896 séquences couvrant *a minima* le cadre de lecture ouvert complet du génome de l'EV-D68. La méthode utilisée est le maximum de vraisemblance avec le modèle d'évolution moléculaire GTR (Generalised Time-Reversible). Les losanges rouges indiquent une fiabilité des nœuds de 100% (probabilité postérieure = 1) estimée avec le test statistique aBayes.

de l'EV-D68 en 2014, la circulation intense des souches a amené une diversification supplémentaire et la classification phylogénétique a été affinée par la description du sous-clade B1 (Greninger et al., 2015) et du clade D représenté par des séquences appartenant initialement au clade A (Du et al., 2015).

En 2016, Tan et al (2016) décrivent le sous-clade B2 et proposent également la division du clade A en deux sous-clades A1 et A2. Ces deux sous-clades correspondent respectivement aux clades A et D décrits auparavant, ce qui provoque encore une grande confusion dans l'assignation des séquences entre les publications. Le sous-clade B3 décrit ensuite, présente une divergence nucléotidique moyenne dans l'ensemble de l'ORF de 4 et 5,2% respectivement par rapport aux sous-clades B1 et B2 (Gong et al., 2016). La divergence est encore plus élevée par rapport aux autres clades : 10,2% (A), 9,6% (D) et 7,7% (C). Yip et al (2017) proposent la division du clade D en deux sous-clades D1 et D2 sur la base d'une divergence des séquences nucléotidiques de VP1 comprise entre 4,4 et 5,9%. Ils confirment que les clades D et A2 forment un unique groupe phylogénétique et que la dénomination D devrait être utilisée de manière consensuelle. Plus récemment, Shen et al (2019) ont décrit le sous-clade D3 qui, par rapport au sous-clade D1, présente une divergence nucléotidique pour l'ensemble du génome de 3 à 3,5% (1,1 à 1,8% en acides aminés pour la polyprotéine). Toutefois, cette dénomination n'a depuis pas été ré-utilisée, les séquences phylogénétiquement proches plus récentes étant toutes décrites comme appartenant au clade D1.

Les deux évènements de recombinaison génétique rapportés de l'EV-D68 sont décrits dans la séquence codant la protéine VP2. Le premier est décrit chez une souche du sous-clade B2 (US/KY/14-18951 ; numéro d'accèsion KM851229) ayant recombiné avec une souche du sous-clade B1 (Tan et al., 2016). Le second est décrit chez les souches virales du sous-clade D2 BCH89A (numéro d'accèsion KF726085) et BJ24 (numéro d'accèsion KU242683), ayant recombiné avec une souche du clade A (Yip et al., 2017).

III. Pouvoir pathogène de l'EV-D68

A. Atteintes respiratoires

L'EV-D68 a été associé, dès sa découverte en 1962, à des atteintes respiratoires, le distinguant ainsi des autres entérovirus. L'entérovirus D68 est responsable d'un large panel de pathologies respiratoires allant d'une simple rhinite à des formes plus sévères telles que des pneumonies ou détresses respiratoires aiguës. Les données cliniques collectées au cours des dernières épidémies, notamment celle de 2014, ont permis de préciser le spectre des manifestations cliniques associées à ce virus.

Des symptômes grippaux classiques (fatigue, myalgie, céphalées) sont fréquemment rapportés (Fall et al., 2019b; Holm-Hansen et al., 2016; Itagaki et al., 2018; Meijer et al., 2012, 2014). Lors de l'épidémie américaine de 2014, les symptômes respiratoires les plus fréquents étaient une dyspnée (n=513/614, 83,6%), une toux (n=500/614, 81,4%) et une sibilance (n=427/614, 69,5%). Ces symptômes étaient accompagnés de fièvre dans 47,9% (n=294/614) des cas (Midgley et al., 2015). Le virus est fréquemment associé à des atteintes respiratoires basses caractérisées par une sibilance, une dyspnée et plus rarement une hypoxie (Biggs et al., 2021; Calvo et al., 2016; Cottrell et al., 2018; Fall et al., 2019b, 2019a; Funakoshi et al., 2019; Gilrane et al., 2020; Gong et al., 2016; Holm-Hansen et al., 2016; Hy et al., 2016; Imamura et al., 2011; Itagaki et al., 2018; A. I. C. Martin et al., 2017; Meijer et al., 2012; Messacar et al., 2017; Metoki et al., 2018; Rahamat-Langendoen et al., 2011; Reiche et al., 2015; Shen et al., 2019; Thongpan et al., 2016; Vazquez-Perez et al., 2016). Ces symptômes étaient plus fréquents chez les patients infectés par un EV-D68 que par un autre entérovirus en 2016 en Espagne (Montes et al., 2019). La sibilance semble être aussi plus fréquente au cours des infections à EV-D68 que dans celles associées aux autres types d'entérovirus et rhinovirus (Caylan et al., 2018; Tang et al., 2021).

En France, lors de l'épidémie de 2014, le diagnostic final retenu était l'asthme ou l'exacerbation d'asthme dans 48% des cas ou une bronchiolite dans 21% (Schuffenecker et al., 2016), tableaux retrouvés dans de nombreuses autres études (Calvo et al., 2016; Cottrell et al., 2018; González-Sanz et al., 2019; Holm-Hansen et al., 2016; Itagaki et al., 2018; Kramer et al., 2018; Levy et al., 2015; Pellegrinelli et al., 2019b; Piralla et al., 2018; Srinivasan et al., 2018; Todd et al., 2013). Une détresse respiratoire aiguë est également rapportée (Bal et al., 2019;

González-Sanz et al., 2019; Holm-Hansen et al., 2016; Kramer et al., 2018). D'autres atteintes respiratoires basses telles que les bronchites et les cas plus sévères de pneumonie sont aussi fréquemment associées à une infection par l'EV-D68 (Biggs et al., 2021; Böttcher et al., 2016; Hy et al., 2016; Kaida et al., 2017, 2011; Lau et al., 2016; Meijer et al., 2014, 2012; Midgley et al., 2020; Piralla et al., 2018; Rahamat-Langendoen et al., 2011; Shen et al., 2019; Tang et al., 2021; Thongpan et al., 2016; Vazquez-Perez et al., 2016; Xiao et al., 2015) et de façon plus fréquente qu'avec d'autres entérovirus (Baertl et al., 2021; González-Sanz et al., 2019). La majorité des études ont porté sur la population pédiatrique et les caractéristiques cliniques des infections respiratoires à EV-D68 chez l'adulte sont moins bien décrites même si des formes graves telles que l'exacerbation de bronchopneumopathie chronique obstructive, une pneumonie et une détresse respiratoire aiguë ont été observées (Kramer et al., 2018; Lau et al., 2016; Ly et al., 2014; Pellegrinelli et al., 2019a; Shen et al., 2019; Xiang et al., 2012).

La proportion de patients présentant un ou plusieurs facteurs de comorbidité varie entre 20 et 80% selon les études (Bal et al., 2019; Biggs et al., 2021; Funakoshi et al., 2019; Gilrane et al., 2020; Holm-Hansen et al., 2016; Itagaki et al., 2018; Knoester et al., 2017; Korematsu et al., 2018; Kramer et al., 2018; Lau et al., 2016; A. I. C. Martin et al., 2017; Messacar et al., 2017; Montes et al., 2019; Pellegrinelli et al., 2019b; Piralla et al., 2018; Poelman et al., 2015; Rahamat-Langendoen et al., 2011; Reiche et al., 2015; Schuffenecker et al., 2016; Srinivasan et al., 2018; Vazquez-Perez et al., 2016; Huanyu Wang et al., 2019; Xiao et al., 2015). Ces co-morbidités peuvent influencer la sévérité des atteintes respiratoires associées à l'EV-D68, en particulier lorsqu'il existe une pathologie respiratoire sous-jacente telle que des antécédents d'asthme ou une hyperréactivité bronchique (Midgley et al., 2015). Comme pour les autres infections à entérovirus, l'immunodépression, la prématurité ou l'âge constituent également des facteurs de risque d'infection sévère (Lau et al., 2016; Lauinger et al., 2012; Midgley et al., 2015; Poelman et al., 2015). Dans une étude européenne réalisée dans 14 pays, 31% (131/389) des patients présentaient une pathologie sous-jacente dont 72 (19%) une pathologie respiratoire, 26 (7%) une immunodépression et 33 (8%) une pathologie autre que respiratoire (Poelman et al., 2015). Ces infections sévères se traduisent par des taux d'admission en soins intensifs allant de 6,8% (Schuffenecker et al., 2016) à 66% selon les études (pour revue, Holm-Hansen et al., 2016), ces différences pouvant être liées à un biais de recrutement ou de recherche de l'EV-D68 plus systématique dans les formes sévères dans

certaines études. L'épidémie américaine en 2014 s'est ainsi caractérisée par un taux important d'infections sévères avec près de 2 patients sur 3 admis en soins intensifs, 28% ayant dû bénéficier d'une assistance ventilatoire (Midgley et al., 2015).

Les infections à EV-D68 les plus graves peuvent conduire en de rares occasions au décès du patient. Vingt-quatre décès (dont 14 au cours de l'épidémie américaine en 2014) ayant été rapportés entre 1962 et 2014 (Holm-Hansen et al., 2016).

B. Atteintes neurologiques

Les complications neurologiques associées à l'entérovirus D68 se présentent surtout sous la forme de myélite flasque aiguë et ont été presque exclusivement rapportées au cours des épidémies d'infections respiratoires à ce virus.

B.1. Définition et caractéristiques de la myélite flasque aiguë

Avant l'alerte du 26 septembre 2014 lancée par le CDC (Center for Disease Control and Prevention) américain, l'EV-D68 n'était pas considéré comme un pathogène important. Aux États-Unis, deux cas de paralysie avait été associés au virus, l'un chez un adulte en 2005 avec détection de l'EV-D68 dans le liquide cébrospinal (Khetsuriani et al., 2006), l'autre chez un enfant en 2008 (Kreuter et al., 2011). Avant 2014, plusieurs études rétrospectives réalisées aux États-Unis entre 2005 et 2013 ont cependant permis de recenser 47 cas de myélites flasques aiguës (MFA) dont 6 (13%) étaient associées à la détection d'un EV-D68 dans un prélèvement respiratoire (Cortese et al., 2020; Greninger et al., 2015; J. A. Martin et al., 2017; Roux et al., 2014; Uprety et al., 2019; Van Haren et al., 2015). Au cours de la même période, l'EV-D68 n'a été rétrospectivement associé qu'à quatre autres cas pédiatriques de paralysies flasques aiguës au Japon (n=3) (Itagaki et al., 2018; Kaida et al., 2017) et en Australie (n=1) (Levy et al., 2015). En 2014 aux États-Unis, une recrudescence d'atteintes neurologiques sévères de type myélite flasque aiguë a été observée parallèlement à l'épidémie d'infections respiratoires associées à l'entérovirus D68, rappelant le neurotropisme potentiel de tous les entérovirus.

Une définition de la MFA a été établie en 2015 puis révisée à trois reprises en 2017, 2019 et 2021 par le Conseil d'État et des épidémiologistes territoriaux (CSTE) américain. Un cas est défini par la survenue brutale d'une faiblesse musculaire associée à une perte de tonus musculaire et des réflexes ET à l'observation à l'IRM de la moelle épinière de lésions

majoritairement localisées au niveau de la substance grise et couvrant au moins un segment vertébral, à l'exclusion d'autres étiologies. Une MFA peut également être rapportée post-mortem après confirmation à l'IRM ou via une autopsie mettant en évidence une inflammation de la corne antérieure de la moelle épinière touchant au moins un segment vertébral (www.cdc.gov/acute-flaccid-myelitis/hcp/case-definitions.html, au 06/08/2021). La limite d'âge (21 ans) ou la pléiocytose du LCS n'entrent plus en considération. Les modifications successives de définition des cas peuvent biaiser le suivi épidémiologique des cas de MFA et la comparaison entre les différentes études.

La MFA est caractérisée par la survenue brutale d'une paralysie flasque et asymétrique des membres associée à une perte des réflexes et une absence de déficit sensoriel. La paralysie survient 7 jours (1 – 16 jours) après un épisode infectieux caractérisé par de la fièvre, des symptômes respiratoires et/ou digestifs et des myalgies. Une évolution en deux phases est très souvent rapportée avec une amélioration du syndrome infectieux avant le retour de la fièvre, puis un syndrome méningé suivi des déficits neurologiques progressant en quelques heures. Les muscles proximaux des membres supérieurs sont les plus souvent atteints bien qu'une tétraparésie soit fréquemment observée. Une atteinte des paires crâniennes est observée chez 25 à 50 % des patients et se traduit par une diplopie, une dysphagie ou une paralysie faciale. Les cas les plus sévères peuvent conduire à un arrêt respiratoire dû à la faiblesse des muscles respiratoires, nécessitant une ventilation mécanique, ou à de graves complications neurologiques, tels que des changements de température corporelle et l'instabilité de la pression artérielle, pouvant engager le pronostic vital du patient (www.cdc.gov/acute-flaccid-myelitis, au 06.08.2021).

En 2018 aux États-Unis, le nombre record de 238 cas de MFA a été rapporté. L'âge médian des patients était de 5,3 ans (IQR 3,3-8,2, de 0,5 à 81,8). Une phase prodromique débutant en moyenne 6 jours (IQR 3-9) avant l'apparition des symptômes de paralysie a été rapportée chez 97% (n=230/238) des patients. La large majorité (83%, n=191/230) des prodromes était d'ordre respiratoire. L'apparition de fièvre, en moyenne 3 jours (IQR 2-6) avant le début des symptômes de la MFA, a été rapportée chez 80% (n=184/230) des patients (Kidd, 2020). Ces deux caractéristiques cliniques ont d'ailleurs été plus fréquemment rapportées pour les cas de MFA que pour les autres types d'atteintes paralytiques (Lopez, 2019) et retrouvées dans les cas de MFA rapportés en 2014 et 2016 aux États-Unis (McLaren

et al., 2020; Messacar et al., 2016c) et au Japon en 2015 (Chong et al., 2018). En 2018 aux États-Unis, les symptômes prodromiques les plus tardifs, apparaissant en moyenne entre 1,5 et 2 jours en amont de la MFA, étaient les douleurs au cou ou au dos, les maux de tête et les symptômes gastro-intestinaux, rapportés respectivement chez 48% (n=110/230), 38% (n=87/230) et 23% (n=53/230) des patients. Les symptômes les plus fréquemment associés à la MFA étaient la difficulté à marcher (52%, n=124/238), les douleurs au cou ou au dos (47%, n=111/238), la fièvre (35%, n=83/238), les douleurs au niveau des membres affectés (34%, n=82/238) ainsi que les maux de tête (28%, n=66/238). La MFA affectait plus fréquemment les membres supérieurs (64%, n=153/238) que les membres inférieurs (36%, n=85/238) (Kidd, 2020). Une atteinte des paires crâniennes a été rapportée chez 21% (n=51/238) des patients. 54% (n=129/238) des patients ont été admis en unité de soins intensifs et 23% (n=55/238) ont requis une intubation et une ventilation mécanique (Kidd, 2020). Dans l'ensemble, les données cliniques associées aux cas de MFA de 2014 aux États-Unis, sont proches de celles de 2018 (Kidd, 2020; Messacar et al., 2016c). Les cas de MFA rapportés au Canada en 2014 et 2018 sont également similaires bien que la fréquence des atteintes des membres supérieurs ou inférieures n'était pas différente (78%, n=45/58 versus 74%, n=43/58) (Yea et al., 2020). Dans le monde, les complications respiratoires dues à la MFA ont conduit au décès de 3 adultes immunodéprimés et de 2 enfants (Kane et al., 2019; Knoester et al., 2019; Messacar et al., 2016c). La MFA semble toucher une large majorité de patients sans facteur de comorbidité mais également des patients asthmatiques ou présentant des allergies (Bove et al., 2019; Chong et al., 2018; Messacar et al., 2016c; Yea et al., 2017).

Peu d'études se sont intéressées aux séquelles de la myélite flasque aiguë. D'après les données disponibles, un déficit moteur, lié à des atrophies musculaires, persiste un an après la phase aiguë de la MFA chez 75 à 93 % des patients (Aubart et al., 2020; J. A. Martin et al., 2017; Yea et al., 2017). Dans d'autres études, le taux de récupération complète de la mobilité peut être plus élevé avec 41% (n=11/27) des cas (Kane et al., 2019). Ces disparités pourraient être expliquées par une différence de prise en charge et de rééducation des patients, liée aux connaissances des médecins et à l'environnement familial (Bove et al., 2019; Murphy et al., 2021). Ces séquelles semblent persister au moins jusqu'à 4 ans après la phase aiguë et certains patients nécessitent une assistance respiratoire sur plusieurs années (P. F. Chong et al., 2021; Downey et al., 2020; Kirolos et al., 2019). Ces déficits moteurs sont également accompagnés

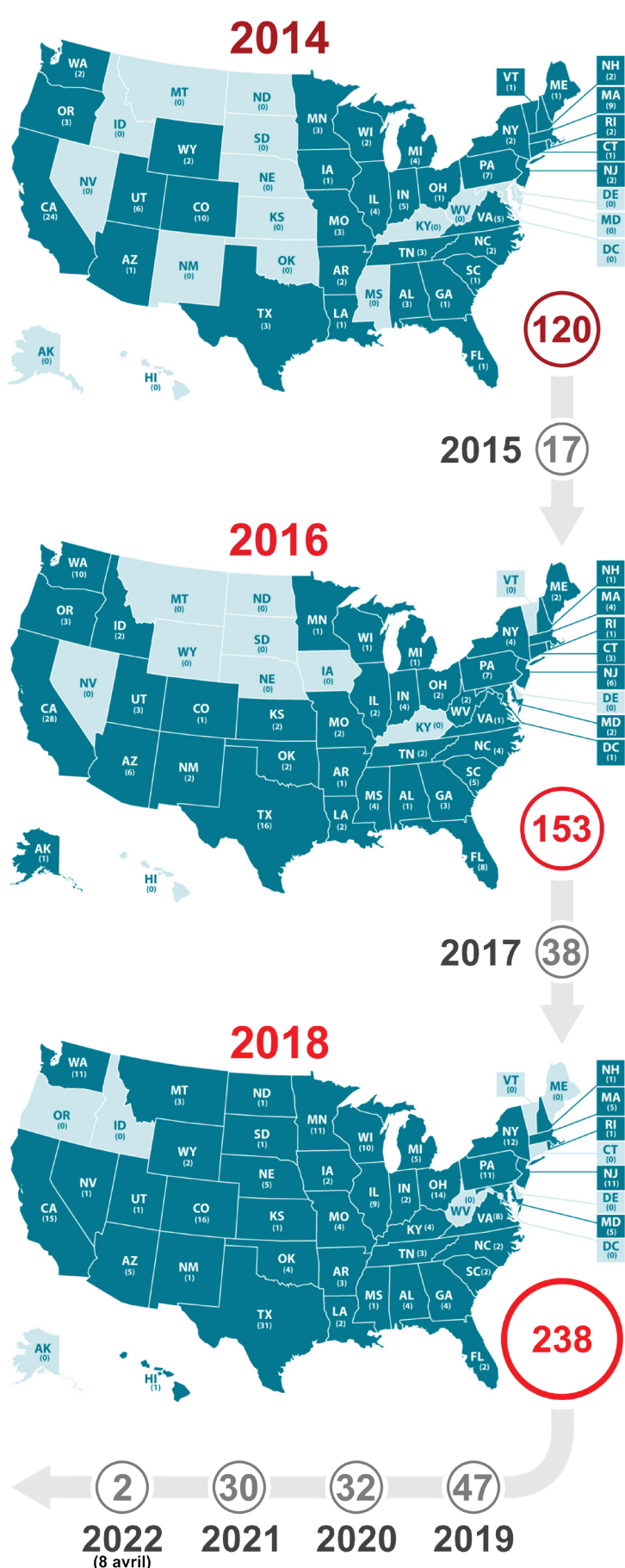


Figure 13 : Évolution du nombre de myélites flasques aiguës (MFA) rapportées aux États-Unis depuis 2014. Les états dans lesquels ont été rapportés des cas de MFA, sont colorés en foncé; le nombre de cas est indiqué entre parenthèses. Au total, 677 cas de MFA ont été confirmés aux États-Unis depuis 2014. Les données ainsi que les cartes ont été obtenues sur le site web du Center for Disease Control and Prevention, consulté le 08/04/2022 (<https://www.cdc.gov/acute-flaccid-myelitis/cases-in-us.html>).

de fatigue, de douleurs ou encore de difficultés respiratoires ou d'incontinence (Bove et al., 2019).

Un groupe d'entraide comptant à l'heure actuelle plus de 800 membres (au 20.08.2021) a été créé en 2015 sur Facebook (Parents of Children with Polio-Like Syndrome/Acute Flaccid Myelitis) et a permis la mise en place de l'étude de Bove et al (2019). Une association a également vu le jour avec pour objectif la diffusion des connaissances sur la MFA et le soutien, notamment financier via un système de donations, des patients et de leurs proches ([Acute Flaccid Myelitis Association \(afmanow.org\)](http://afmanow.org), au 23.08.2021).

B.2. Lien étiologique entre la MFA et l'EV-D68

2.1. Cas rapportés de MFA et association avec l'EV-D68

En 2014, 120 cas avaient été rapportés contre 153 et 238 en 2016 et 2018, respectivement, majoritairement entre août et novembre ([Figure 13](#)). À l'inverse, au cours des années impaires caractérisées par une faible circulation de l'EV-D68, le nombre de cas de MFA est plus faible avec 22, 38 et 47 cas confirmés en 2015, 2017 et 2019, respectivement (www.cdc.gov/acute-flaccid-myelitis/cases-in-us.html, au 23.08.21). L'entérovirus D68 était le pathogène le plus fréquemment identifié chez les patients atteints de MFA en 2014 ($n \geq 13$) (Sejvar et al., 2016), en 2016 ($n=24$) et en 2018 ($n=37$) (Kidd et al., 2021; McLaren et al., 2020) et n'a pas été détecté en 2015 et 2017 (McLaren et al., 2020). Cette association spatio-temporelle a clairement été mise en évidence par Park et al (2021) qui ont caractérisé la dynamique de circulation de l'entérovirus D68 aux États-Unis et l'ont associée aux pics de MFA. De manière similaire, 58 cas pédiatriques de MFA ont été confirmés au Canada en 2014 ($n=25$) et 2018 ($n=33$) et le pathogène le plus identifié ($n=16$) était l'entérovirus D68 (Yea et al., 2020).

D'autres cas de MFA associés à l'EV-D68 ont été décrits dans de nombreux pays et sur tous les continents avec un nombre de cas plus importants au cours des périodes de plus forte détection de l'entérovirus D68 dans les échantillons respiratoires ([Tableau 1](#) ; [Figure 13](#)):

En Europe, les cas de MFA associés au virus ont principalement été rapportés en 2016 et chez des enfants (89,7%, $n=26/29$) et sont répartis en France ($n=5$), Ecosse ($n=5$), Espagne ($n=3$), Suède ($n=3$), Norvège ($n=3$), Pays-Bas ($n=2$), Allemagne ($n=2$), Italie ($n=2$), Autriche ($n=1$), Angleterre ($n=1$), Pays de Galles ($n=1$) et Irlande ($n=1$) (Knoester et al., 2019). En 2014,

Tableau 1 : Cas rapportés d'atteintes paralytiques associées à une infection à EV-D68

	Localisation	Période	Total de cas (n)	Cas associés à l'EV-D68 (n)	Population pédiatrique (n)	Clade (n)
Khetsuriani et al. 2006	États-Unis (NESS)	2005	NP (PFA)	1	0 (<20 ans)	NP
Kreuter et al. 2011	États-Unis (New-Hampshire)	2008	1 (PFA)	1 (100%)	1 (100%, 5 ans)	NP
Uprety et al. 2019	États-Unis (Pennsylvanie)	2009	2	1 (50%)	1 (50%)	NP
Itagaki et al. 2017	Japon	2010 (septembre)	1 (PFA)	1 (100%)	1 (100%, 4 ans)	NP
Levy et al. 2015	Australie	2010 (avril et juillet)	2 (PFA)	2 (100%)	2 (100%)	A (2)
Greninger et al. 2015	États-Unis (Californie)	2011 (décembre)	1	1 (100%)	1 (100%)	B1 (1)
Uprety et al. 2019	États-Unis (Pennsylvanie)	2012	1	1 (100%)	1 (100%)	NP
Roux et al. 2014						
Van Haren et al. 2015	États-Unis (Californie)	2012 (juin-novembre)	10	2 (20%, novembre)	2 (100% ≤14 ans)	B1 (1)
Greninger et al. 2015						
Greninger et al. 2015	États-Unis (Colorado)	2013 (février-novembre)	3	1 (33%, novembre)	1 (33%, ~6 mois)	B1 (1)
Martin et al. 2017						
Kaida et al. 2017	Japon	2013 (septembre)	1 (PFA)	1 (100%)	1 (100%, 9 mois)	A (1)
Sejvar et al. 2016						
Greninger et al. 2015	États-Unis	2014 (août-décembre)	120	≥13 (10,8%)	NP (max. 21 ans)	B1 (8)
Yea et al. 2020	Canada	2014	25	16/58 (27,6%)*	16 (100% <18 ans)	NP
Lang et al. 2014	France	2014 (septembre)	1 (PFA)	1 (100%)	1 (100%, 4 ans)	B2 (1)
Varghese et al. 2015	France	2014	1 (PFA)	1 (100%)	1 (100%, 1 an)	NP
Pfeiffer et al. 2015	Norvège	2014 (septembre-novembre)	2	2 (100%)	2 (100%, 5-6 ans)	B2 (1)
Stacpoole et al. 2017	Royaume-Uni	2014	1	1 (100%)	0 (0%, 45 ans)	NP
Chong et al. 2018	Japon	2015 (août-décembre)	57 1 (MFAP) 2 (PFA)	8/57 (14%) 1/1 (100%, MFAP) 2/2 (100%, PFA)	7 (87,5% <11 ans) 1 (100%, 1 ans) 1 (50%, 2 ans)	NP

seuls 5 cas associés à l'EV-D68 avaient été rapportés en Norvège (n=2 enfants) (Pfeiffer et al., 2015), en France (n=2 enfants) (Lang et al., 2014; Varghese et al., 2015) et au Royaume-Uni (n=1 adulte) (Stacpoole et al., 2017). En 2018, 3 MFA associées à l'EV-D68 ont été confirmées en Europe. Toutefois, la même année, le virus aura également été associé à 9 cas de PFA chez une majorité de patients pédiatriques (88.9%, n=8/9) au Royaume-Uni (Force, 2019) ainsi qu'à 2 PFA en Espagne (González-Sanz et al., 2019) et à 4 cas de MFA probables à majorité pédiatriques (75%, n=3/4) en France ([Rapport d'activité CNREV 2018](#)). En Europe comme aux États-Unis, les atteintes neurologiques associées à l'EV-D68 sont moins fréquentes les années impaires en période de faible circulation du virus. L'épidémie d'infections à entérovirus D68 rapportée par le Pays de Galles en 2015 a été associée à 2 cas pédiatriques de MFA (Cottrell et al., 2018) et 2 cas pédiatriques de PFA ont été rapportés en Espagne en 2015 et 2017 (González-Sanz et al., 2019).

Au Japon, 8 cas majoritairement pédiatriques (87.5%, n=7/8) de MFA confirmées et 1 cas pédiatrique probable associés à l'EV-D68 ont été rapportés en 2015. Au total, 58 MFA auront été confirmées lors de l'épidémie d'infections respiratoires à entérovirus D68 et le virus aura une nouvelle fois été le pathogène le plus identifié. Il aura également été associé à deux cas de PFA la même année (Chong et al., 2018). L'EV-D68 aura également été associé, au cours des épidémies d'infections respiratoires de 2013 et 2018 dont il est à l'origine, respectivement à un cas pédiatrique de PFA (Kaida et al., 2017) et 4 cas pédiatriques de MFA (Okumura et al., 2020). A Taiwan, 13 MFA associées à l'EV-D68 auront été confirmées en 2016 (n=1 patient pédiatrique) et 2017 (n=12) (Hu and Chang, 2020). En Chine, l'épidémie de 2018 a été accompagnée par 17 cas pédiatriques confirmés de MFA dont 9 (52.9%) associés à l'EV-D68 (Gong et al., 2020). La même année, le virus aura également été associé à des infections pédiatriques provoquant 1 autre cas de MFA (Wang et al., 2020) et 2 cas de PFA (Zhang et al., 2021). Un cas pédiatrique de MFA associé à l'EV-D68 a également été rapporté en 2016 (Chen et al., 2018).

En Amérique du Sud en 2016, 8 cas de MFA associées à l'EV-D68 chez des patients pédiatriques ont été rapportés en Argentine (Carballo et al., 2019; Ruggieri et al., 2017). La même année en Afrique de l'Ouest, l'EV-D68 aura été associé à 16 cas pédiatriques de PFA sur un total de 567 cas rapportés dans 7 pays dont la Guinée (n=391), le Niger (n=85), le Sénégal

Cottrell et al. 2018	Pays de Galles	2015	2	2 (100%)	2 (100%)	NP
González-Sanz et al. 2019	Espagne	2015 (décembre)	1 (PFA)	1 (100%)	1 (100%)	B2 (1)
Mclaren et al. 2020						
Kidd et al. 2020	États-Unis	2016	153	24 (15,7%)	Majoritaire	B3 (7)
Ng et al. 2016						
Knoester et al. 2018	France	2016	5	29/29 (100%)*	26/29 (89,7%)*	B3 (1)
	Ecosse		5			NP
	Espagne		3			B3 (2)
	Suède		3			NP
	Norvège		3			NP
	Pays-Bas		2			B3 (1)
	Allemagne		2			NP
	Italie		2			B3 (2)
	Autriche		1			NP
	Angleterre		1			NP
	Pays de Galles		1			NP
	Irlande	1	NP			
Ruggieri et al. 2017	Argentine	2016 (avril-mai)	11	4 (36,4%)	4 (100%)	NP
Carballo et al. 2019	Argentine	2016	6	4 (66,7%)	4 (100%)	B3 (2)
Roberts et al. 2020a	Australie	2016	62 (PFA)	1 (1,6%)	1 (100%)	NP
Fall et al. 2020	Sénégal	2016 (juin-septembre)	59 (PFA)	4 (6,8%)	4 (100% <15 ans)	B3 (4)
	Guinée		391 (PFA)	11 (2,8%)	11 (100% <15 ans)	B3 (5)
	Niger		85 (PFA)	1 (1,2%)	1 (100% <15 ans)	B3 (1)
Chen et al. 2018	Taiwan	2016	1	1 (100%)	1 (100%, 5 ans)	B3 (1)
Hu et Chang 2020	Taiwan	2017	12	1 (100%)	NP	NP
González-Sanz et al. 2019	Espagne	2017 (octobre)	1 (PFA)	1 (100%)	1 (100%)	B3 (1)
Chan et al. 2021	Hong-Kong	2017 (juillet)	1 (PFA)	1 (100%)	1 (100%)	NP
Hatayama et al. 2019	Japon	2017	1	1 (100%)	1 (100%, 2 ans)	NP
Okumura et al. 2020	Japon	2018	11	4 (36,4%)	4 (100%)	NP
Gong et al. 2020	Chine	2018	17	9 (52,9%)	9 (100%)	B3 (9)
Wang et al. 2020	Chine	2018	1	1 (100%)	1 (100%, 6 ans)	NP
Zhang et al. 2021	Chine	2018	2 (PFA)	1 (50%)	1 (100%)	NP
Roberts et al. 2020b	Australie	2018	57 (PFA)	3 (5,3%)	3 (100%)	NP

(n=59), la Mauritanie (n=20), la Gambie (n=6), la Guinée-Bissau (n=5) et le Cape Verde (n=1) (Fall et al., 2020).

Quelques cas sporadiques de MFA ou PFA ont été associés à l'entérovirus D68 sans être liés à une épidémie d'infections respiratoires. Des cas pédiatriques de PFA ont ainsi été rapportés en Australie en 2016 (n=1) et 2018 (n=3) (Roberts et al., 2020a, 2020b) ainsi qu'à Hong-Kong en 2017 (n=1) (Chan et al., 2021) et un cas pédiatrique de MFA a été rapporté en 2017 (n=1) au Japon (Hatayama et al., 2019). Enfin, les derniers cas de MFA associées à l'EV-D68 rapportés concernent deux patients pédiatriques en 2019 au Danemark et en France. La même année, un cas pédiatrique de PFA également associé au virus a été rapporté en Allemagne (Midgley et al., 2020). Aux États-Unis, il n'y a pas eu de recrudescence de cas de MFA de l'ordre de 2014 et 2016 depuis 2018 (Figure 13) et un seul cas plus récent (2019) a été associé à l'EV-D68 (Kidd et al., 2021). Toutefois, de nouveaux cas de MFA ont été confirmés en 2019 (n=47), 2020 (n=32) et 2021 (n=30). Au 08/04/2022, seul deux cas de MFA ont été confirmés pour l'année 2022 (www.cdc.gov/acute-flaccid-myelitis/cases-in-us.html). L'enrayement de la circulation des virus respiratoires du fait de la pandémie de SARS-CoV-2 pourrait permettre d'expliquer cette tendance (Park et al., 2021).

Au total, l'EV-D68 a été détecté chez 169 patients présentant une MFA et est le pathogène le plus fréquemment identifié pour cette pathologie. Le virus est également associé à 49 cas de paralysies flasques aiguës. Les clades les plus retrouvés sont les clades B1 et B3, toutefois, des EV-D68 appartenant aux clades B2 et A ont été détectés chez six patients atteints de MFA ou de PFA (González-Sanz et al., 2019; Kaida et al., 2017; Lang et al., 2014; Levy et al., 2015; Pfeiffer et al., 2015). Malgré les efforts visant à établir le lien entre MFA et EV-D68, le nombre de cas de myélite flasque aiguë associé à l'entérovirus D68 est très probablement sous-estimé notamment au vu des recrudescences de cas en 2014, 2016 et 2018 rapportées aux États-Unis et ce, pour plusieurs raisons:

- La définition clinique de la MFA manque de spécificité et peut s'apparenter à d'autres paralysies flasques telles que la myélite transverse ou le syndrome de Guillain-Barré (Christy and Messacar, 2019; Helfferich et al., 2019; Murphy et al., 2021; Murphy and Pardo, 2020; Rodríguez-Morales et al., 2019; Williams et al., 2016). L'étiologie "entérovirus D68" peut donc ne pas être évoquée.

Mclaren et al. 2020							
Kidd et al. 2020	États-Unis	2018	238	37 (14,3%)	37 (100%)	B3 (30)	
Kidd et al. 2021							
Yea et al. 2020	Canada	2018	33	16/58 (27,6%)*	16 (100% <18 ans)	NP	
González-Sanz et al. 2019	Espagne	2018	2 (PFA)	2 (100%)	2 (100%)	B3 (2)	
UK AFP Task Force 2019	Royaume-Uni	2018 (juillet-décembre)	9 31 (PFA)	2/9 (22,2%) 7/31 (22,6%, PFA)	8/9 (88,9% ≤19 ans)	NP	
Pellegrinelli et al. 2021	Italie	2018 (octobre)	2	1 (50%)	1 (100% <15 ans)	B3 (1)	
CNR EV 2018	France	2018	4 (MFAP)	4 (100%)	3 (75%)	NP	
Midgley et al. 2020	France	2019	1	1 (100%)	1 (100%)	NP	
	Danemark	2019	1	1 (100%)	1 (100%)	NP	
	Allemagne	2019	1 (PFA)	1 (100%)	1 (100%)	NP	
Kidd et al. 2021	États-Unis	2019	47	1 (2,1%)	1 (100%)	NP	
Total	-	-	797 (MFA) 707 (MFAP/PFA)	169/797 (21,2%, MFA) 49/707 (6,9%, MFAP, PFA)	-	B3 (69) B1 (11) B2 (3) A (3)	

*Chiffres totaux de l'étude ; NP, non précisé dans l'étude ; PFA, paralysie flasque aigüe ; MFAP, myélite flasque aigüe probable ; MFA, myélite flasque aigüe (les cas pour lesquels le type d'atteinte n'est pas cité correspondent à des cas de MFA)

- Mise en défaut du diagnostic virologique : la détection du virus chez les patients atteints peut être considérablement impactée par le panel des échantillons réalisés chez les patients présentant une MFA et la précocité de réalisation de ceux-ci après le début des symptômes. Pour la très large majorité des infections décrites ci-dessus, l'EV-D68 a été détecté dans un prélèvement respiratoire (Lopez, 2019). Or, les recommandations pour la surveillance de l'éradication de la poliomyélite plébiscitent le diagnostic virologique via des échantillons de selles dans lesquelles l'entérovirus D68 n'est que très rarement détecté (Fall et al., 2020; Roberts et al., 2020a, 2020b). De façon similaire, l'entérovirus D68 n'est que très rarement détecté dans le LCS, pourtant prélevé de manière systématique en cas d'atteinte neurologique. Qui plus est, le timing de l'échantillonnage est d'une importance cruciale. Effectué trop tardivement après le début des symptômes, la détection du virus est compromise (Messacar et al., 2016c; Sejvar et al., 2016). Une recherche plus systématique des entérovirus dans ces tableaux cliniques pourrait permettre d'évaluer la fréquence d'association avec l'EV-D68 mais également avec d'autres EV, comme l'entérovirus A71, qui pourrait être le second agent causal de la MFA (Aubart et al., 2020; Bove et al., 2019; Helfferich et al., 2019; Kidd, 2020; Lopez, 2019; McLaren et al., 2020; Yea et al., 2020)

2.2. Spécificités cliniques de la MFA associée à l'EV-D68

Bien que plusieurs entérovirus, et notamment l'entérovirus A71 et les poliovirus puissent provoquer une myélite flasque aiguë, plusieurs études montrent que la pathologie diffère selon son étiologie. La littérature disponible décrit des cohortes de patients plus âgés lorsque la MFA est associée à l'EV-D68 (médiane : 7,1 ans) comparé à l'EV-A71 (médiane : 1,8 ans) mais également une phase prodromique respiratoire plus fréquente et plus longue (médiane : 6 vs 1 jours). Les patients présentant une MFA associée à l'EV-D68 sont plus fréquemment admis en unité de soins intensifs, y sont plus longtemps maintenus et nécessitent plus souvent une intubation et ventilation mécanique que les patients infectés par l'EV-A71 (Kidd, 2020; Messacar et al., 2020; Yea et al., 2020). La MFA provoquée par l'EV-D68 semble donc plus sévère ce qui pourrait expliquer les séquelles plus lourdes qui lui sont associées (Chong et al., 2018; P. F. Chong et al., 2021; Knoester et al., 2019; Messacar et al., 2020; Yea et al., 2020).

2.3. Confirmation du lien étiologique entre EV-D68 et MFA

Longtemps controversé, le lien étiologique entre l'entérovirus D68 et la MFA, a été établi en utilisant les critères de Bradford Hill (Dyda et al., 2018; Messacar et al., 2018) et confirmé *via* diverses études *in vitro* et *in vivo* (Hixon et al., 2019b; Messacar et al., 2018). Mishra et al (2019) ont montré la présence d'anticorps dirigés contre l'entérovirus D68 dans les prélèvements de LCS et de sérum de 43% (n=6/14) et 73% (n=8/11) des patients testés présentant une MFA mais dans aucun prélèvement de patients présentant d'autres pathologies neurologiques. Le neurotropisme du virus a aussi été clairement établi *in vitro*. L'entérovirus D68 est notamment capable d'infecter et de se multiplier dans les cellules neuronales SK-N-SH (Ayudhya et al., 2020) et SH-SY5Y (Brown et al., 2018), différenciées ou non via l'utilisation d'acide rétinoïque, deux lignées cellulaires dérivées d'un unique neuroblastome humain. Le neurotropisme de l'EV-D68 s'étend également aux neurones corticaux (incluant différents types de neurones), neurones moteurs et astrocytes humains dérivés de cellules souches pluripotentes induites (Hixon et al., 2019a; Rosenfeld et al., 2019).

Le neurotropisme des différentes souches virales testées dans ces études n'est pas équivalent ce qui pose la question de l'acquisition récente du neurotropisme par l'EV-D68. Ainsi, la souche prototype Fermon (ATCC VR-1197, numéro d'accèsion KT725431) et la souche N0051U5 de 2012 (KT347280), appartenant au clade A, sont incapables d'infecter les cellules SH-SY5Y (Brown et al., 2018). Dans une étude plus récente, Ayudhya et al (2020) ont montré que la souche Fermon et des souches appartenant aux clades A, B1, B2 et B3 ou D1 isolées entre 2009 et 2016 pouvaient infecter et se multiplier dans les cellules SK-N-SH mais que seules certaines souches des clades B1 (MO/14-18947, KM851225), B2 (IL/14-18952, KM851230) et D1 (KY/14-18953, KM851231) isolées en 2014 pouvaient infecter les cellules SH-SY5Y. Cette divergence n'est pas présente dans les modèles *in vitro* mimant plus fidèlement les caractéristiques neuronales *in vivo*. À l'exception de la souche de clade B2 (IL/14-18952), toutes les souches testées par Rosenfeld et al (2019), incluant les souches prototypes Fermon et Rhyne ainsi que les souches de clade B1 MO/14-18947 et MO/14-18949, la souche de clade D1 KY/14-18953 et la souche de clade B2 IL/14-18956, peuvent infecter et se multiplier dans les neurones corticaux et astrocytes dérivés de cellules souches pluripotentes induites. De manière similaire, toutes les souches virales testées par Hixon et al (2019a) incluant IL/14-18952, MO/14-18947, Fermon (numéro d'accèsion KU844179), Rhyne

(numéro d'accèsion KU844178), CA/14-4231 (numéro d'accèsion KU844181, 2014, clade B2) et N0051U5, peuvent infecter et se multiplier dans les neurones moteurs dérivés de cellules souches pluripotentes induites.

Ces divergences de tropisme pourraient être dues à la dépendance ou non des souches d'EV-D68 aux acides sialiques lors de l'attachement aux cellules. En effet, Baggen et al (2016) ont montré *in vitro* que le clivage des acides sialiques présents à la surface des cellules grâce à la neuraminidase ou le knock-out de gènes nécessaires à leur production, avant l'infection, inhibaient considérablement l'infection par certaines souches d'EV-D68 dont la souche prototype Fermon, mais n'avait pas ou peu d'effet sur l'infection par d'autres souches, indépendamment de l'année d'isolement ou du clade. Or, l'analyse transcriptomique menée par Brown et al (2018) sur les cellules SH-SY5Y n'a pas mise en évidence la transcription des gènes codants les enzymes sialyltransférases ST3GAL4 et ST6GAL1, essentielles à la production des acides sialiques liées en α 2,3 et α 2,6. Les acides sialiques seraient donc absents de la surface des cellules SH-SY5Y ce qui permettrait d'expliquer l'incapacité de la souche Fermon à infecter ces cellules (Baggen et al., 2016; Hixon et al., 2019a). Qui plus est, Hixon et al (2019a) indiquent que le clivage des acides sialiques présents à la surface des neurones moteurs dérivés de cellules souches pluripotentes induites inhibe totalement l'infection par les souches d'EV-D68 les plus anciennes, Fermon, Rhyne et N0051U5 mais n'a aucun effet pour les autres.

In vivo, les résultats sont similaires à ceux obtenus avec les cellules SH-SY5Y. Hixon et al (2017a) ont montré que plusieurs souches virales d'EV-D68 incluant les clades B1 MO/14-18947 et CA/14-4232 (numéro d'accèsion KU844180, 2014), B2 IL/14-18952 et D1 KY/14-18953, pouvaient provoquer, *via* différentes voies d'inoculation, une paralysie flasque chez des souriceaux nouveau-nés Webster Suisse (SW), ce qui n'était pas le cas de la souche CA/14-4231 ou des souches prototypes Fermon (numéro d'accèsion AY426531) et Rhyne, comme observé par Schieble et al (1967). Plusieurs études ont confirmé ces résultats en observant la survenue de paralysies flasques après inoculation de souches d'EV-D68 dont MO/14-18947, MO/14-18949 et Beijing-R0132 (numéro d'accèsion KP240936, 2014, clade B2) chez différents types de modèles murins mais pas après inoculation des souches Fermon et N0051U5 (Brown et al., 2018; Hixon et al., 2019a; Morrey et al., 2018; S. Sun et al., 2019; Zhang et al., 2018). Ces études *in vivo* ont permis de confirmer le lien étiologique entre la MFA

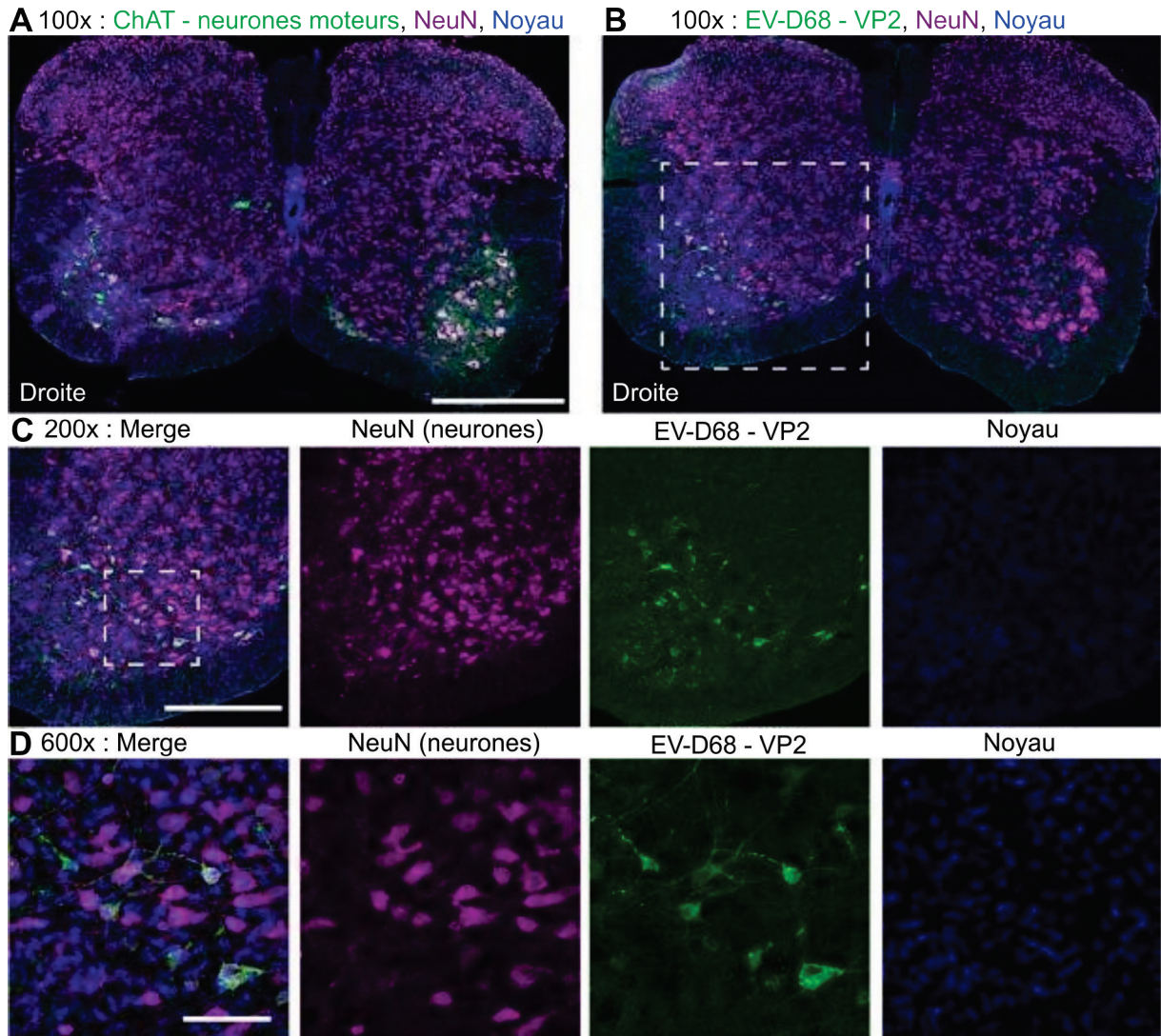


Figure 14 : Infection des neurones moteurs de la corne antérieure de la moelle épinière d'une souris par l'entérovirus D68. Observations réalisées en microscopie confocale. La souris a reçu une injection intracérébrale de la souche MO/14-18947 (clade B1). **A.** Coupe de moelle épinière cervicale observée au grossissement 100x, 4 jours post-infection. La perte de neurones moteurs (verts, marqués avec la choline acétyltransférase ou ChAT) est visible au niveau de la corne antérieure droite, correspondant au côté paralysé. Au contraire, la corne antérieure gauche, correspondant au côté non affecté, est intacte. **B.** Coupe consécutive à celle utilisée pour le panneau A observée au grossissement 100x, révélant la présence de la protéine de capsid VP2 de l'EV-D68 dans les neurones moteurs restants au niveau de la corne antérieure droite de la moelle épinière. La zone délimitée en pointillés correspond à l'image à 200x du panneau C et la nouvelle zone qui y est délimitée correspond à l'image à 600x du panneau D. Pour toutes les images, les neurones sont marqués en magenta avec le marqueur général de neurones NeuN et les noyaux sont marqués en bleu avec le marqueur Hoechst 33342. Les barres d'échelle des grossissements 100x, 200x et 600x correspondent respectivement à 400 μ m, 200 μ m et 50 μ m. (Adaptée de Hixon et al. 2017a).

et l'entérovirus D68 *via* la vérification des postulats de Koch, pour la souche virale MO/14-18947 sur les souris SW. En effet, le virus a pu être détecté chez une souris atteinte de paralysie puis être isolé à partir d'un prélèvement de moelle épinière en culture de cellules RD (Rhabdomyosarcoma) avant d'être de nouveau inoculé chez plusieurs souris saines et de provoquer une nouvelle paralysie pour 38% (n=9/24) d'entre elles (Alison M. Hixon et al., 2017). De plus, un antisérum d'entérovirus D68, prélevé chez une souris paralysée, permet d'éviter une atteinte paralytique chez une souris saine (Hixon et al., 2017a; S. Sun et al., 2019; Zhang et al., 2018). La dépendance aux acides sialiques, plus fréquente parmi les souches anciennes, pourrait donc empêcher la neurovirulence *in vivo* et expliquer l'explosion récente des cas de MFA liés à l'EV-D68.

La neurovirulence semble due au passage de l'entérovirus D68 par la voie axonale rétrograde pour infecter les neurones moteurs de la moelle épinière. En effet, la voie d'inoculation provoquant le plus fréquemment une paralysie flasque chez les souris SW est la voie intramusculaire (Hixon et al., 2017a). Une multiplication virale a d'ailleurs été détectée dans les muscles et la moelle épinière de souris paralysées, la paralysie touchant en premier lieu le muscle inoculé (Hixon et al., 2017a). L'utilisation de la voie axonale rétrograde a été confirmée *in vivo*, via un système de traceur fluorescent et *in vitro*, via les neurones moteurs humains dérivés de cellules souches pluripotentes induites cultivés dans des chambres microfluidiques permettant la séparation des extrémités axonales et des corps neuronaux (Hixon et al., 2019a). Les résultats d'imagerie obtenus *in vivo* (Figure 14) confirment la destruction des neurones moteurs localisés dans la corne antérieure de la moelle épinière, zone où l'EV-D68 a été détecté en immunofluorescence (Hixon et al., 2017a; Hixon et al., 2019a; Morrey et al., 2018). Le neurotropisme du virus semble strictement limité aux neurones moteurs puisqu'il ne se multiplie pas dans le cerveau. Seule une inoculation par voie intracrânienne peut permettre une infection cérébrale avec toutefois une très faible multiplication virale détectée (Hixon et al., 2017a; S. Sun et al., 2019; Zhang et al., 2018). Cette absence de multiplication cérébrale pourrait expliquer que les patients atteints de MFA ne présentent pas d'encéphalite associée. Enfin, la détection de l'ARN viral et de protéines capsidiales de l'entérovirus D68 au niveau des neurones moteurs localisés dans la corne antérieure de la moelle épinière d'un patient décédé des suites d'une MFA, permet de définitivement acter le lien étiologique entre le virus et l'atteinte neurologique (Vogt et al., 2021). Toutes ces informations nous permettent

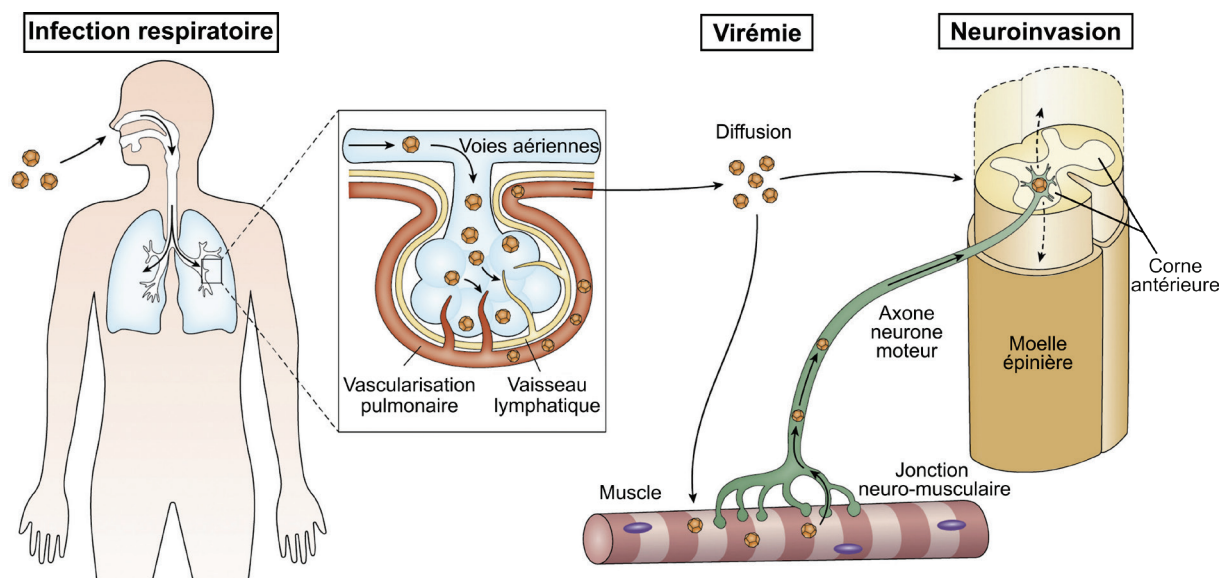


Figure 15 : Mécanisme général hypothétique de la neuroinvasion par l'EV-D68. Après une transmission interhumaine respiratoire, l'entérovirus D68 infecte les voies respiratoires. Une translocation dans le système sanguin lui permettrait ensuite d'établir une virémie. Il pourrait également, au lieu d'un passage direct dans le système sanguin, devoir dans un premier temps passer, comme le poliovirus, par le système lymphatique. Après sa diffusion dans l'organisme, l'EV-D68 pourrait entrer dans le système nerveux central en traversant la barrière hémato-encéphalique. Il est en revanche admis qu'il peut se multiplier dans un tissu musculaire avant de passer la jonction neuro-musculaire pour ensuite utiliser la voie axonale rétrograde jusqu'aux neurones moteurs localisés dans la corne antérieure de la moelle épinière. L'EV-D68 peut ensuite se multiplier et envahir la substance grise en lysant les neurones moteurs infectés. (Adaptée de Elrick et al. 2021).

de dresser la probable stratégie de neuroinvasion suivie par l'entérovirus D68. Après une infection respiratoire ainsi qu'une diffusion dans le corps via une phase virémique, il atteindrait les muscles des membres supérieurs et/ou inférieurs. Après une phase de multiplication dans ces tissus musculaires, le virus, via la voie axonale rétrograde, infecterait les neurones moteurs de la corne antérieure de la moelle épinière, provoquant ainsi une MFA. L'hypothèse d'une neuroinvasion via un passage à travers la barrière hémato-encéphalique n'a pas été testée (Figure 15).

IV. Diagnostic des infections à EV-D68

Comme pour les autres entérovirus, le diagnostic des infections à entérovirus D68 repose sur la détection du génome dans les échantillons cliniques. En cas d'atteinte respiratoire isolée, un prélèvement respiratoire (écouvillon naso-pharyngé avec milieu de transport, aspiration naso-pharyngée, lavage broncho-alvéolaire) réalisé le plus précocement possible est suffisant. Cette recherche peut être réalisée avec des trousse commerciales ou maison, spécifiques des entérovirus ou, le plus souvent, permettant la détection génomique sans distinction des entérovirus et des rhinovirus (Duval et al., 2021). En cas d'atteinte neurologique, si le liquide cébrospinal constitue le prélèvement de choix pour le diagnostic de certitude d'une atteinte neuro-méningée à entérovirus, leur génome est très rarement détecté dans les atteintes neurologiques sévères associées à l'entérovirus D68 (tout comme l'entérovirus A71) (Messacar et al., 2020). Le diagnostic différentiel d'une atteinte sévère, surtout en cas de signe évocateur de myélite, doit inclure, dès l'admission du patient, un échantillon respiratoire (même en l'absence de prodromes respiratoires), un échantillon de selles et un écouvillonnage de gorge. Lors de l'investigation des MFA rapportées aux États-Unis depuis 2012, le taux de détection de l'EV-D68 dans les échantillons respiratoires était plus élevé que dans les selles ou le LCS mais diminuait en fonction du délai entre le début des signes cliniques et la réalisation du prélèvement (Messacar et al., 2016c; Sejvar et al., 2016).

Les trousse permettant le diagnostic des infections à entérovirus ciblent la région 5' non codante. La parenté génétique entre les entérovirus et les rhinovirus, élevée dans cette région, explique qu'il y est impossible de les différencier. Les trousse désignées comme "spécifique" des entérovirus peuvent détecter certains rhinovirus, d'autant plus lors de l'analyse d'échantillons respiratoires. Seul le séquençage des gènes de capsid permet de faire la distinction et de déterminer le type d'entérovirus ou de rhinovirus. Le génotypage cible le

plus souvent les protéines de capsid VP4-VP2 et la technique est disponible dans les laboratoires du Centre National de référence des entérovirus et parechovirus. La recherche spécifique de l'entérovirus D68 peut aussi se faire à l'aide d'une RT-PCR en temps réel (Poelman et al., 2015) pour le diagnostic ou le génotypage, surtout en cas d'épidémie pour identifier rapidement l'agent étiologique. Le diagnostic spécifique d'une infection à entérovirus D68 n'est donc pas réalisé en pratique courante dans les laboratoires de virologie médicale. Le CNR des entérovirus recommande cependant de (faire) réaliser le génotypage ou la recherche spécifique en cas d'atteinte respiratoire ou neurologique sévère.

V. Approches thérapeutiques

À l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement spécifique d'une infection à entérovirus D68. Seul un traitement symptomatique est appliqué. Plusieurs antiviraux candidats ciblant la capsid virale, les protéases virales 2A et 3C, la protéine 2C, la polymérase 3D ou l'IRES ont été testés. Le seul composé ayant démontré une efficacité en modèle murin *in vivo* est la guanidine, inhibiteur de la protéine 2C. Toutefois, les doses injectées étaient trop élevées pour un test chez l'Homme (Elrick et al., 2021; Hu et al., 2020; Hurst et al., 2019). Seule la fluoxetine, un autre inhibiteur de la protéine 2C, a été testée chez des patients atteints de MFA, sans montrer d'effet bénéfique (Messacar et al., 2019b).

De manière similaire, il n'existe aucun traitement standardisé de la myélite flasque aiguë. Toutefois, l'utilisation d'immunoglobulines intraveineuses commerciales est courante car elles contiennent des quantités élevées d'anticorps neutralisants anti EV-D68 (Elrick et al., 2021; Murphy et al., 2021; Y. Zhang et al., 2015). Leur efficacité chez l'Homme n'est pour autant pas clairement établie. Seule une administration très précoce après le début de l'infection a permis une protection contre la paralysie en modèle murin *in vivo* (Hixon et al., 2017b). Des résultats similaires ayant été obtenus avec l'administration d'anticorps monoclonaux anti EV-D68 (Vogt et al., 2020), ceux-ci pourraient constituer une alternative intéressante (Elrick et al., 2021). L'administration de corticoïdes ou de plasma a également été pratiquée chez certains patients sans que leur apport bénéfique ne soit clairement établi (Elrick et al., 2021; Murphy et al., 2021). L'utilisation de la dexaméthasone en modèle murin *in vivo* très tôt après l'infection a même entraîné une aggravation des symptômes (Hixon et al., 2017b). Enfin, le transfert nerveux chirurgical serait une solution prometteuse pour

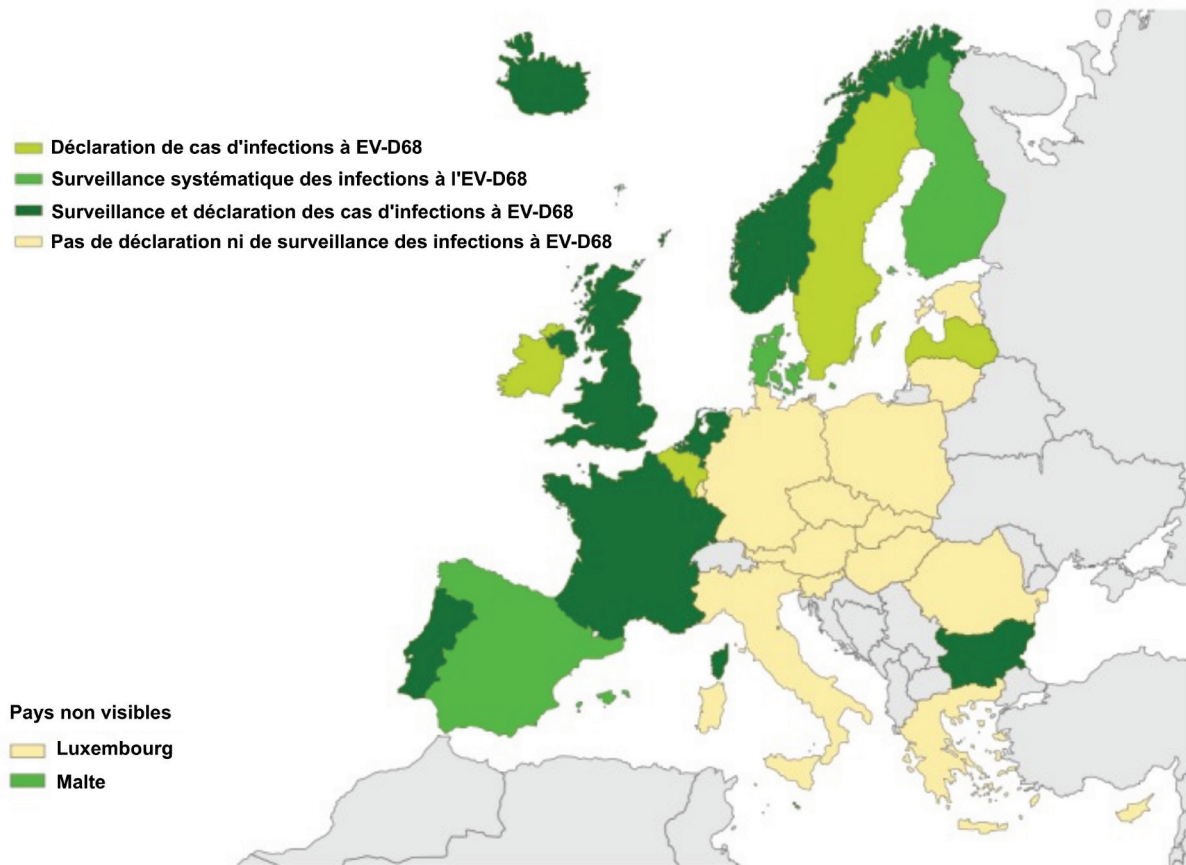


Figure 16 : Systèmes de surveillance spécifiques et/ou déclaration de cas d'infections à entérovirus D68 (EV-D68) en Europe en 2016. n=29 pays. (Adaptée de Harvala et al. 2017).

améliorer la récupération de la motricité des patients (Bove et al., 2019; P. F. Chong et al., 2021; Downey et al., 2020; Nath and Somasundaram, 2019).

VI. Surveillance des infections à EV-D68

L'EV-D68, par son tropisme respiratoire, présente un profil de circulation épidémique et la survenue de complications neurologiques justifie une surveillance ciblée. Malgré cela, la surveillance spécifique du virus à l'échelle mondiale reste parcellaire et très hétérogène. Le génotypage systématique des échantillons respiratoires positifs pour la recherche d'entérovirus et/ou rhinovirus n'est pas réalisé. Aucune directive officielle de l'OMS ou du CDC européen, non mandaté par la commission européenne, n'inclue la surveillance des infections à entérovirus non poliomyélitiques (Fischer et al., 2021).

La surveillance des infections à entérovirus D68 n'a aucun caractère obligatoire. Aux États-Unis, le réseau national de surveillance des entérovirus (NESS), mis en place dans les années 60, se base sur une notification volontaire des cas d'infections à entérovirus. Le New Vaccine Surveillance Network (NVSN), quant à lui, conduit depuis 2015 la surveillance des cas d'infections respiratoires aiguës, dont l'entérovirus D68 est l'un des agents causals. Toutefois, seul un nombre limité d'états américains participent à ce réseau de surveillance (<https://www.cdc.gov/surveillance/nvsn/index.html>, au 06.09.2021). En découlent des difficultés à évaluer le réel impact épidémique de l'entérovirus D68 aux États-Unis. Au niveau européen, en 2016, seul 37,9% (n=11/29) des pays européens procédaient à une surveillance spécifique ou déclaraient sporadiquement des cas d'infections à entérovirus D68 (Figure 16) (Harvala et al., 2017). Le système de surveillance, basé sur les échantillons respiratoires ou uniquement sur les cas de PFA, variait selon les pays, tout comme le nombre d'échantillons testés et typés (Harvala et al., 2017). En France, la surveillance est assurée via le Réseau de Surveillance des infections à Entérovirus (RSE), constitué d'une quarantaine de laboratoires volontaires. Actif depuis 2000 et sous l'égide de Santé Publique France et coordonné par les deux laboratoires de Lyon et Clermont-Ferrand qui forment le Centre National de Référence des Entérovirus et Paréchovirus et qui rapportent annuellement les données cliniques et virologiques des infections à entérovirus (<https://cnr.chu-clermontferrand.fr>). Comme aux États-Unis, cette surveillance porte principalement sur les infections neuroméningées et néonatales à entérovirus. Dans le cadre de cette surveillance hospitalière, il n'est pas recommandé de transmettre ou de réaliser le génotypage de tous les échantillons

respiratoires positifs à entérovirus/rhinovirus mais de se focaliser sur les atteintes sévères, respiratoires ou neurologiques. En cas d'alerte épidémique cependant, les laboratoires du réseau de surveillance peuvent être incités à transmettre leurs échantillons respiratoires pour la recherche spécifique de l'entérovirus D68. Cette stratégie ne permet malheureusement pas de faire une veille efficace des infections associées. En Europe, les méthodologies de diagnostic (recherche non systématique des infections à EV/Rhinovirus) et de surveillance varient ce qui rend difficile le suivi de la circulation de l'entérovirus D68.

En Asie, seuls le Japon et Taïwan possèdent un système national de surveillance des infections à entérovirus depuis la fin du XX^{ème} siècle, rapportant publiquement de façon mensuelle les données épidémiologiques, ce qui explique leur apport conséquent de données relatives à l'EV-D68 (Chiu et al., 2020).

VII. Épidémiologie clinique et moléculaire des infections à EV-D68

L'EV-D68 éveille l'intérêt du monde médical et scientifique lors de l'épidémie d'infections respiratoires rapportée aux États-Unis, au Canada et en Europe en 2014 (Holm-Hansen et al., 2016). Pour autant, les premières souches du virus nommées Fermon, Franklin, Robinson et Rhyne, ont été isolées en 1962, soit 50 ans plus tôt, à Berkeley, en Californie (États-Unis) à partir de prélèvements oro-pharyngés de quatre enfants présentant une infection respiratoire sévère, une pneumonie ou une bronchiolite. Les quatre souches virales présentant des propriétés antigéniques identiques, Fermon a été définie comme souche prototype du virus (Schieble et al., 1967). Avant 2014, l'EV-D68 n'a été que très rarement rapporté. Redécouvert en 1963 (nommé Corn), il est même décrit sous le type rhinovirus 87 (Kapikian et al., 1971) ; reclassé comme EV-D68 en 2002 (Blomqvist et al., 2002; Ishiko et al., 2002). Le système de surveillance des infections à entérovirus du CDC américain n'a identifié que 26 cas d'infection (environ 75% pédiatriques) majoritairement associées à des virus de clade C entre 1970 et 2005 aux États-Unis, ce qui représente alors 0,1% des infections à entérovirus (Khetsuriani et al., 2006). Le premier de ces cas date de 1987 et la majorité d'entre eux (n=11, 42,3%) ont été rapportés en 2003 grâce à une étude présentant une amélioration significative de la détection des virus respiratoires dans les prélèvements cliniques de patients asthmatiques. En 2016, Holm-Hansen et al (2016) faisaient état de 699 cas d'infections datant de la période pré-2014 identifiés dans le monde pour la plupart rétrospectivement. À l'heure actuelle, plus de 300 autres cas datant de la même période ont été identifiés (Tableaux 2-5).

Tableau 2 : Cas rapportés publiés d'infections à EV-D68 aux États-Unis.

	Localisation	Période	Cas (n)	Population pédiatrique (n)	Clade (n)
Schieble et al. 1967	Californie	1962	4	4 (100%)	Prototype
Kapikian et al. 1971	Californie	1963	1	NP	NP
Khetsuriani et al. 2006	États-Unis	1987-2005	26	~75% (<20 ans)	C (NP) A (NP) NA
Wang et al. 2010	Californie	2007	7	NP	NP
Kreuter et al. 2011	New Hampshire	2008	1	1 (100%)	NP
Tokarz et al. 2011	New-York	2009	20	NP	A (12) C (1)
Greninger et al. 2015	Californie	2009	1	NP	C (1)
CDC 2010	Georgie	Septembre 2009 – avril 2010	6	0 (0% <20 ans)	NP
Uprety et al. 2019	Pennsylvanie	2009	35	35 (100%)	A (4) C (2) B1 (1)
		2010	3	3 (100%)	NP
CDC 2010	Arizona	2010 (août-septembre)	5	5 (100%)	NP
Jacobson et al. 2012	Nouveau-Mexique	2010	5	5 (100% ≤18 ans)	NP
Greninger et al. 2015	Californie	2010	1	NP	A (1)
		2011 (avril et décembre)	2	2 (100%)	B1 (2)
		2011	1	1 (100%)	NP
Uprety et al. 2019	Pennsylvanie	2012	12	12 (100%)	B1 (3) A (1)
Tan et al. 2016	Tennessee	2012 (novembre)	1	1 (100%)	A (1)
Greninger et al. 2015	Californie	2012 (novembre)	2	2 (100%)	B1 (1)
Roux et al. 2014	Colorado	2013 (novembre)	1	1 (100%)	B1 (1)
Van Haren et al. 2015					
Martin et al. 2017	États-Unis	2014 (juin-décembre)	1395	Majoritaire	B1 (265 ; 93,6%) B2 (17 ; 6%) D1 (1 ; 0,4%)
Abedi et al. 2018		2015	9	NP	NP
		2016	138	NP	B3 (47) B1 (1)
Messacar et al. 2017	Colorado	2016 (juillet-octobre)	46	46 (100%)	B3 (NP)
Huanyu Wang et al. 2019	Ohio	2016 (juin-octobre)	14	14 (100%)	B3 (NP)
Srinivasan et al. 2018	Missouri	2016 (août-novembre)	23	23 (100%)	B3 (NP)
Uprety et al. 2019	Pennsylvanie	2016	30	30 (100%)	B3 (NP)
G. Wang et al. 2017 Gilrane et al. 2020	New-York	2016 (septembre-octobre)	160	145 (90,6% <21 ans)	B3 (22)
		2017 (juillet-octobre)	8	5 (62,5%)	D1 (1)
Kujawski et al. 2019 Shah et al. 2021	États-Unis (NVSN)	2017	3	3 (100% <18 ans)	B3 (42)

		2018	382	382 (100% <18 ans)	
Gilrane et al. 2020	New-York	2018 (juillet- octobre)	89	77 (86,5%)	B3 (37) D1 (11)
HuanYu Wang et al. 2019	Ohio	2018 (juin-octobre)	401	401 (100%)	B3 (401)
Uprety et al. 2019	Pennsylvanie	2018	≥1	NP	B3 (NP)
Messacar et al. 2019a	Colorado	2018 (pic épidémique septembre)	23	23 (100%)	B3 (NP)
Pakala et al. 2019 (Inclus dans le NVSN)	Missouri	2018 (août- septembre)	17	NP	B3 (17)
Shah et al. 2021	États-Unis (NVSN)	2019	6	6 (100% <18 ans)	NP
		2020	30	30 (100% <18 ans)	NP
Fall et al. 2022	Maryland	2021 (septembre- octobre)	17	15 (88%)	B3 (12)
Total minimum estimé (épidémies majeures)	États-Unis	2016	≥273	-	B3 (47 ; 97,9%) B1 (1 ; 2,1%)
		2018	≥896	-	B3 (455 ; 97,6%) D1 (11 ; 2,4%)

NP, non précisé dans l'étude ; NA, non assigné à un clade

Tableau 3 : Cas rapportés publiés d'infections à EV-D68 en Europe.

	Localisation	Période	Cas (n)	Population pédiatrique (n)	Clade (n)
Meijer et al. 2012	Pays-Bas	1996	1	29/69 (42% ≤19 ans)*	Lignée 1 - pré clade C (6)
		1997	1		
		1998	1		
		1999	1		
Smura et al. 2007	France	1999	1	1 (100%)	
Meijer et al. 2012	Pays-Bas	2000	1	29/69 (42% ≤19 ans)*	Lignée 3 - pré clade A (4)
		2001	2		
		2003	2		C (4)
		2004	6		Lignée 3 - pré clade A (2)
Tokarz et al. 2012	Finlande	2004-2005	NP	NP	A (NP)
Meijer et al. 2012	Pays-Bas	2006	8	29/69 (42% ≤19 ans)*	C (6)
		2007	5		A (2)
		2008	11		A (4)
					C (1)
Piralla et al. 2014	Italie	2008	12	NP	C (6) A (5)
Petitjean-Lecherbonnier et al. 2011	France	2008 (octobre-novembre)	19	NP	NP
Renois et al. 2013		2009 (septembre-octobre)	10	10 (100%)	C (NP)
Lauinger et al. 2012	Angleterre	2009 (novembre-décembre)	9	NP	B2 (6) A (1)
Meijer et al. 2012	Pays-Bas	2009	6	29/69 (42% ≤19 ans)*	B2 (4) C (1) A (1)
Rahamat-Langendoen et al. 2011		2009	4	4 (100%)	B2 (4)
Meijer et al. 2012		2010	24	29/69 (42% ≤19 ans)*	A (23)
Rahamat-Langendoen et al. 2011		2010	24	5/17 (29,4% ; 7 NP)	A (16) B2 (6)
Lauinger et al. 2012 A.I.C Martin et al. 2017	Royaume-Uni	2010 (septembre-décembre)	8	NP	B2 (3) A (2)
Launes et al. 2015	Espagne	2010	3	3 (100%)	NP
Piralla et al. 2014	Italie	2010	4	7/9 (77,8%)*	A (4)
Kramer et al. 2018	France	2010 (septembre-novembre)	7	6 (85,7%)	A (4) B2 (2)
		2011 (octobre)	1	1 (100%)	A (1)
A.I.C Martin et al. 2017	Royaume-Uni	2011	1	NP	NA

		2011 (septembre)	1		A (1)
Meijer et al. 2014	Pays-Bas	2012 (octobre-décembre)	9	16/27 (59,3%)*	A (4) B2 (3) B1 (1) D1 (1)
Kramer et al. 2018	France	2012 (août-novembre)	55	49 (89,1%)	B2 (16) B1 (9) A (9) D1 (1)
Piralla et al. 2014	Italie	2012	5	7/9 (77,8%)*	B2 (3) B1 (1) A (1)
A.I.C Martin et al. 2017	Angleterre	2012	7	NP	B2 (6) A (1)
Calvo et al. 2016	Espagne	Octobre 2012 – Février 2013	12	12 (100%)	B2 (8) D1 (3) B1 (1)
Molet et al. 2016	France	2013 (septembre-novembre)	2	0 (0%)	NP
Meijer et al. 2014	Pays-Bas	2013 (pic octobre-novembre)	5	16/27 (59,3%)*	B2 (2) B1 (1) D1 (1)
Baertl et al. 2021		2013	16	16 (100%)	B2 (15) B1 (1)
Böttcher et al. 2016	Allemagne	2013 (pic septembre-décembre)	17	31/39 (79,5%)*	B2 (13) B1 (1) D1 (1)
A.I.C Martin et al. 2017	Angleterre	2013 (novembre-décembre)	6	NP	D1 (3) NA (2)
Böttcher et al. 2016		2014 (pic septembre-novembre)	22	31/39 (79,5%)*	B2 (11) D1 (6) B1 (4)
Baertl et al. 2021	Allemagne	2014	8	8 (100%)	B2 (4) B1 (3) D1 (1)
Reiche et al. 2015		2014 (septembre-octobre)	25	14 (56%)	D1 (11)
Meijer et al. 2014	Pays-Bas	2014 (pic juillet-septembre)	12	16/27 (59,3%)*	B2 (8) D1 (2) B1 (1) A (1)
Poelman et al. 2015 (Inclus Meijer et al. 2014)	Pays-Bas	2014 (juillet-décembre)	56	NP	B2 (28) A (7) D1 (5) B1 (1)
A.I.C Martin et al. 2017	Angleterre	2014 (pic septembre-décembre)	65	NP	B1 (26) B2 (22) D1 (5) NA (1)
Poelman et al. 2015 Pfeiffer et al. 2015	Norvège	2014 (juillet-décembre)	49	NP	B2 (13) B1 (1) B3 (1)
Poelman et al. 2015	Slovénie	2014 (juillet-décembre)	48	NP	B2 (27) B1 (15)
	Ecosse		22		NP
	Finlande		17		B2 (2)

					A (1)
	Italie		13		B1 (8) D1 (1)
	Pays de Galles		9		D1 (2) A (2)
	Irlande		4		B2 (1) B1 (1)
	Autriche		1		NP
	Luxembourg		1		NP
Poelman et al. 2015 Dyrdak et al. 2016	Suède	2014	8	NP	B1 (6) A (1)
Poelman et al. 2015 Midlgey et al. 2020	Danemark	2014	>8	NP	B2 (5) D1 (1) B1 (1)
Poelman et al. 2015 González-Sanz et al. 2019	Espagne	2014	10	NP	D1 (4) B2 (2) B1 (2) A (1)
Wollants et al. 2019	Belgique	2014	2	NP	A (1)
CNR EV 2018	France	2014 (juillet-décembre)	205	180 (87,8%)	B2 (98) B1 (31) D1 (10) A (4) B3 (1)
A.I.C Martin et al. 2017	Angleterre	2015 (janvier-février)	4	NP	B2 (4)
Knoester et al. 2017 Karelehto et al. 2019	Pays-Bas	2015	≥1	NP	NP
Andrés et al. 2019 González-Sanz et al. 2019 Montes et al. 2019	Espagne	2015	9	NP	B2 (2)
Baertl et al. 2021	Allemagne	2015 (mars-octobre)	≥5	NP	B3 (2) A (2) B1 (1)
CNR EV 2015 Midlgey et al. 2020	France	2015	3	NP	NP
Cottrell et al. 2018	Pays de Galles	Décembre 2015 - janvier 2016	56	152/220 (69,1%)*	NP
Demirkan et al. 2017	Turquie	2014-2016	1	NP	NP
CNR EV 2018	France	2016 (mai-novembre)	206	187 (90,8%)	B3 (59) D1 (1)
Knoester et al. 2017 Karelehto et al. 2019 Midlgey et al. 2020	Pays-Bas	2016	>100	NP	B3 (1)
Midlgey et al. 2020 Baertl et al. 2021	Allemagne	2016 (juin-octobre)	>100	NP	B3 (40) B2 (1)
Dyrdak et al. 2016 Midlgey et al. 2020	Suède	2016 (août-septembre)	74	60 (81,1%)	B3 (45)
Piralla et al. 2018 Pellegrinelli et al. 2019b	Italie	2016 (avril-octobre)	52	52 (100%)	B3 (21)
Knoester et al. 2019	Norvège	2016 (mars-octobre)	146	NP	NP
Andrés et al. 2019	Espagne	2016	>150	Majoritaire	B3 (132) B2 (4)

González-Sanz et al. 2019					D1 (1)
Montes et al. 2019					
Knoester et al. 2019	Slovénie	2016 (mars-octobre)	24	NP	NP
Barnabas et al. 2017 Midgley et al. 2020	Danemark	2016 (août-septembre)	9	8 (88,9%)	B3 (4)
Wollants et al. 2019	Belgique	2016	8	NP	B3 (8)
Knoester et al. 2019	Islande	2016 (mars-octobre)	8	NP	NP
	Autriche		5		
	Ecosse		5		
	Angleterre		1		
	Irlande		1		
Cottrell et al. 2018	Pays de Galles	Juillet 2016 - janvier 2017	48	152/220 (69,1%)*	NP
		2017 (octobre)	2		
Midgley et al. 2020	Allemagne	2017	≥1	NP	NP
Karelehto et al. 2019 Midgley et al. 2020	Pays-Bas	2017	≥1	NP	NP
Wollants et al. 2019	Belgique	2017	2	NP	D1 (2)
CNR EV 2017 Publication thèse	France	2017 (août)	1	0 (0%)	D1 (1)
González-Sanz et al. 2019	Espagne	2017 (octobre-décembre)	8	28/51 (54,9%)*	D1 (7) B3 (1)
		2018	43		D1 (28) B3 (15)
CNR EV 2018	France	2018 (juin-décembre)	85	47 (55,3%)	B3 (42) D1 (43)
Cottrell et al. 2018	Pays de Galles	2018 (juin-novembre)	114	152/220 (69,1%)*	NP
Howson-Wells et al. 2022	Angleterre	2018 (septembre-décembre)	83	35 (42,2%)	B3 (50) D1 (33)
Wollants et al. 2019	Belgique	2018	80	10/22 (45,5%), 58 NP)	D1 (13) B3 (9)
Pellegrinelli et al. 2019a	Italie	2018 (septembre-novembre)	21	11 (52,4%)	D1 (16) B3 (4)
Hodcroft et al. 2020 Midgley et al. 2020	Allemagne	2018 (août-novembre)	≥1	NP	NP
	Pays-Bas		≥10	5 (50%)	D1 (6) B3 (4)
	Suisse		≥6	0 (0%)	D1 (4) B3 (2)
	Suède		≥4	4 (100%)	B3 (4)
	Allemagne		36		
Midgley et al. 2020	Danemark	2019 (août-décembre)	21	78/112 (69,6%)*	B3 (47) D1 (8)
	Pays-Bas		19		
	Suède		11		
Midgley et al. 2020 CNR EV	France		25		
CNR EV	France	2020 (janvier-mars)	26	18 (69,2%)	NP
Benschop et al. 2021	Belgique	2021 (jusqu'à mi-octobre)	14	129/139 (92,8%)*	NP
	Espagne		10		
	Irlande		1		
	Italie		1		
	Pays-Bas		2		
	Suède		2		

	Angleterre		7		
	Pays de Galles		82		
	France		20		
Total minimum estimé (épidémies majeures)	Europe	Été 2014 – début 2015	573	-	B2 (205 ; 55,9%) B1 (98 ; 26,7%) D1 (46 ; 12,5%) A (17 ; 4,6%) B3 (1 ; 0,3%)
		2016	>930	-	B3 (311 ; 97,8%) B2 (5 ; 1,6%) D1 (2 ; 0,6%)
		2018	>404	-	D1 (115 ; 50%) B3 (115 ; 50%)

*Chiffres totaux de l'étude ; NP, non précisé dans l'étude ; NA, non assigné à un clade

Tableau 4 : Cas rapportés publiés d'infections à EV-D68 en Asie.

	Localisation	Période	Cas (n)	Population pédiatrique (n)	Clade (n)
Ikeda et al. 2012	Japon	2005 (septembre-octobre)	10	10 (100%)	C (10)
		2006 (septembre)	1	1 (100%)	A (1)
Kaida et al. 2011	Japon	2006	2	2 (100%)	NP
Xiang et al. 2012	Chine	2006 (août-décembre)	11	0 (0% <15 ans)	NP
Ikeda et al. 2012	Japon	2007 (août-octobre)	2	2 (100%)	A (1) C (1)
Kaida et al. 2011	Japon	2007	8	8 (100%)	NP
Hu et al. 2019	Taiwan	2007	9	9 (100%)	A (9)
Huang et al. 2017 Wei et al. 2018	Taiwan	2007	17	19/29 (65,5%, 38 NP)*	A (10) B (4) B2 (1) D2 (1) D (1)
		2008	3		B2 (2) B (1)
Xiang et al. 2012	Chine	2008	2	0 (0% <15 ans)	C (1) D2 (1)
Furuse et al. 2015	Philippines	2008	≥8	NP	B entre B1/B2 (7) D2 (1)
Imamura et al. 2011	Philippines	Octobre 2008 – février 2009	21	21 (100%)	NP
Huang et al. 2017 Wei et al. 2018	Taiwan	2009	4	19/29 (65,5%, 38 NP)*	NA (2) A (1) D2 (1)
Ikeda et al. 2012	Japon	2009 (septembre)	2	2 (100%)	A (1) D2 (1)
Kaida et al. 2011	Japon	2009	4	4 (100%)	NP
Linsuwason et al. 2012	Thaïlande	2009 (juin-septembre)	5	5 (100%)	B (4) A (1)
Ly et al. 2014	Cambodge	2009 (août-octobre)	7	0 (0%)	D2 (1) D (6)
B'krong et al. 2018	Vietnam	2009-2010	8	8 (100%)	NP
Ikeda et al. 2012	Japon	2010 (août-octobre)	40	40 (100%)	C (27) B2 (7) A (5)
Kaida et al. 2011	Japon	2010 (juin-décembre)	14	14 (100%)	C (14)
Itagaki et al. 2018	Japon	2010	31	31 (100%)	C (19) B2 (6) A (5)
Hasegawa et al. 2011	Japon	2010	26	26 (100%)	NP
Korematsu et al. 2018 (inclus les autres études japonaises)	Japon	2010 (juin-décembre)	>100	100% <20 ans	NP
Huang et al. 2017 Wei et al. 2018	Taiwan	2010	18	19/29 (65,5%, 38 NP)*	A (16) D (1) D2 (1)
Linsuwanon et al. 2012	Thaïlande	2010	10	10 (100%)	B (10)

Lu et al. 2014	Chine	2010	3	2 (66,7%)	D2 (1) D1 (1)
Lau et al. 2016	Hong-Kong	2010 (juin-août)	4	4 (100%)	A (2) B1 (2)
Linster et al. 2020	Singapour	2010	3	0 (0%)	B2 (1) A (1) D1 (1)
		2011	2	0 (0%)	D1 (2)
Linsuwanon et al. 2012	Thaïlande	2011 (juin-septembre)	10	10 (100%)	A (6) B (4)
Ly et al. 2014	Cambodge	2011 (août)	1	1 (100%)	B1 (1)
Furuse et al. 2015	Philippines	2011	≥7	NP	B entre B1/B2 (5) A (2)
Lau et al. 2016	Hong-Kong	2011 (août-décembre)	6	6 (100%)	D1 (3) B1 (3)
Huang et al. 2017 Wei et al. 2018	Taiwan	2011	11	19/29 (65,5%, 38 NP)*	B1 (7) D1 (2) D (1) A (1)
Zhang et al. 2016	Chine	2011 (novembre-décembre)	3	3 (100%)	B1 (2) D1 (1)
Lu et al. 2014	Chine	2011	5	4 (80%)	B1 (4) D1 (1)
		2012	1	1 (100%)	D1 (1)
Xiao et al. 2015	Chine	2012 (janvier)	3	3 (100%)	D1 (2)
Zhang et al. 2016	Chine	2012 (janvier)	1	0 (0%)	D1 (1)
Lau et al. 2016	Hong-Kong	2012 (mars-septembre)	8	5 (62,5%)	D1 (4) B1 (4)
Yip et al. 2017	Hong-Kong	2012 (mai-juillet)	2	2 (100%)	B1 (2)
Huang et al. 2017 Wei et al. 2018	Taiwan	2012	2	19/29 (65,5%, 38 NP)*	B1 (2)
Ng et al. 2015	Malaisie	2012 (juin-décembre)	8	0 (0%)	D1 (7) A (1)
Xiao et al. 2015	Chine	2013	3	3 (100%)	D1 (2) B3 (1)
Zhang et al. 2016	Chine	2013 (août-octobre)	3	3 (100%)	D1 (2) B1 (1)
Lau et al. 2016	Hong-Kong	2013 (juin-octobre)	6	1 (16,7%)	D1 (6)
Yip et al. 2017	Hong-Kong	2013 (mai)	1	0 (0%)	D1 (1)
Huang et al. 2017 Wei et al. 2018	Taiwan	2013	4	19/29 (65,5%, 38 NP)*	A (3) NA (1)
Korematsu et al. 2018 (inclus les autres études japonaises)	Japon	2013 (juillet-décembre)	>100	100% <20 ans	NP
Itagaki et al. 2018	Japon	2013	2	2 (100%)	A (NP)
Kaida et al. 2017	Japon	2013 (septembre-octobre)	4	4 (100%)	A (3)
Ng et al. 2015	Malaisie	2013 (décembre)	1	0 (0%)	B (1)
Thongpan et al. 2016	Thaïlande	2013 (septembre)	2	2 (100%)	B3 (2)
Furuse et al. 2015	Philippines	2013	14	14 (100%)	B3 (9) D1 (5)
Kaida et al. 2017	Japon	2014	1	1 (100%)	A (1)
Zhang et al. 2016	Chine	2014 (septembre-novembre)	5	5 (100%)	B3 (5)

Tang et al. 2021	Chine	2014 (juin-septembre)	5	5 (100%)	B3 (5)
Zhang et al. 2015	Chine	2014 (juillet)	1	1 (100%)	B3 (1)
Xiao et al. 2015	Chine	2014 (septembre-octobre)	13	13 (100%)	B3 (3)
Ng et al. 2015	Malaisie	2014 (janvier)	3	0 (0%)	B (2) D1 (1)
Thongpan et al. 2016	Thaïlande	2014 (novembre-décembre)	3	3 (100%)	B3 (3)
Lau et al. 2016	Hong-Kong	2014 (juin-août)	6	6 (100%)	B3 (5) B1 (1)
Hy et al. 2016	Hong-Kong	2014	24	24 (100%)	B3 (24)
Yip et al. 2017	Hong-Kong	2014	7	7 (100%)	B3 (7)
Huang et al. 2017 Wei et al. 2018	Taiwan	2014	8	19/29 (65,5%, 38 NP)*	B3 (8)
Gong et al. 2016	Taiwan	2014 (juillet-septembre)	11	7 (63,6%)	B3 (11)
Furuse et al. 2015	Philippines	2014 (janvier-février)	6	6 (100%)	B3 (6)
Ny et al. 2018	Vietnam	2009-2015	21	21 (100%)	B3 (7 ; 2013-2014) B (1 ; 2009) D2 (1 ; 2010)
Itagaki et al. 2018	Japon	2015	46	46 (100%)	B3 (40)
Kaida et al. 2017	Japon	2015 (juillet-octobre)	13	13 (100%)	B3 (13)
Funakoshi et al. 2019	Japon	2015	40	40 (100%)	B3 (4)
Metoki et al. 2018	Japon	2015 (septembre-octobre)	16	16 (100%)	B3 (9) B1 (1)
Korematsu et al. 2018 Hatayama et al. 2019 (inclus les autres études japonaises)	Japon	2015 (juillet-octobre)	258	100% <20 ans	NP
Wei et al. 2018	Taiwan	2015	16	NP	B3 (16)
Setianingsih et al. 2019	Indonésie	2015 (juillet)	1	0 (0%)	NP
Wang et al. 2019	Hong-Kong	2015 (octobre-décembre)	15	15 (100%)	B3 (15)
Chen et al. 2016	Chine	2015 (novembre-décembre)	4	4 (100%)	B3 (4)
Furuse et al. 2019	Philippines	2014-2016	42	42 (100%)	A (4 ; 2015) B3 (3 ; 2014-2015) D1 (2 ; 2016)
Shen et al. 2019	Chine	2016 (juillet-octobre)	40	19 (47,5%)	B3 (26) D1 (14)
Tang et al. 2021	Chine	2016	6	6 (100%)	B3 (6)
Wei et al. 2018	Taiwan	2016	12	NP	B3 (11) D1 (1)
Mawuntu et al. 2018	Indonésie	Août 2015 – février 2017	1	0 (0%)	NP
Bhardwaj et al. 2019	Inde	2017 (septembre)	1	1 (100%)	B3 (1)
Shen et al. 2019	Chine	2017	2	1 (50%)	B3 (1) D1 (1)
Tang et al. 2021	Chine	2017 (septembre)	4	4 (100%)	B3 (4)
Liu et al. 2021	Chine	2017	2	NP	B3 (1) D1 (1)

Hatayama et al. 2019	Japon	2017	1	1 (100%)	NP
Okamoto et al. 2021	Philippines	2017	≥1	NP	D1 (1)
Chan et al. 2021	Hong-Kong	2017 (juillet)	1	1 (100%)	NP
Hu et Chang 2020	Taiwan	2017	27	NP	NP
		2018	1		
Ikuse et al. 2021	Japon	2018	22	22 (100%)	B3 (11)
Okumura et al. 2020	Japon	2018	4	4 (100%)	NP
Tang et al. 2021	Chine	2018 (juin-juillet)	2	2 (100%)	B3 (2)
Liu et al. 2021	Chine	2018	7	NP	B3 (7)
Sanjay et al. 2021	Inde	2016-2018	3	3 (100%)	B3 (3)
Okamoto et al. 2021	Philippines	2018	19	NP	D1 (14)
Liu et al. 2021	Chine	2019	3	NP	D1 (3)
Chong et al. 2021	Malaisie	2020	1	0 (0%)	A (1)

*Chiffres totaux de l'étude ; NP, non précisé dans l'étude ; NA, non assigné à un clade

Tableau 5 : Cas rapportés publiés d'infections à EV-D68 hors des Etats-Unis, de l'Europe et de l'Asie.

	Localisation	Période	Cas (n)	Population pédiatrique (n)	Clade (n)
Tokarz et al. 2012	Afrique du Sud	2000	6	6 (100%)	NA (6)
		2001	2	2 (100%)	A (1) NA (1)
	Gambie	2008 (juin)	5	5 (100%)	A (5)
Levy et al. 2015	Australie	2008	1	48/55 (87,3%)*	NP
Opanda et al. 2016	Kenya	2008	5	5 (100%)	A (4) B (1)
		2009	1	1 (100%)	A (1)
Carney et al. 2015	Brésil	2009 (octobre)	2	2 (100%)	NP
Hellferscee et al. 2017b	Afrique du Sud	2009	1	1 (100%)	A (1)
		2010	2	2 (100%)	B (1) B2 (1)
Opanda et al. 2014	Kenya	2010	5	5 (100%)	A (5)
Phan et al. 2022	Kenya	2010	4	4 (100%)	A (4)
Todd et al. 2013	Nouvelle-Zélande	2010 (mars-août)	15	11 (73,3%)	A (1)
Tokarz et al. 2012	Sénégal	2010 (février-mars)	3	3 (100%)	A (3)
Levy et al. 2015	Australie	2010 (février-octobre)	6	48/55 (87,3%)*	A (3) B2 (1)
		2011 (juin-décembre)	26		B2 (8) A (3)
Hellferscee et al. 2017b	Afrique du Sud	2011	7	7 (100%)	B2 (7)
Opanda et al. 2016	Kenya	2011	2	2 (100%)	A (1) C (1)
Levy et al. 2015	Australie	2012 (août-décembre)	3	48/55 (87,3%)*	B2 (2)
		2013 (pic septembre-octobre)	21		B2 (6) B1 (1)
Biggs et al. 2021	Panama	2013	17	17 (100%)	B1 (15) D1 (1)
Hellferscee et al. 2017a	Afrique du Sud	2013-2014	7	Majoritaire	B2 (5) A (2)
Fall et al. 2019a	Sénégal	2014 (octobre-décembre)	14	14 (100%)	A (14)
Holm-Hansen et al. 2016	Canada	2014	699	Majoritaire	B1 (31) B2(2)
Eshaghi et al. 2017					
Vazquez-Perez et al. 2016	Mexique	2014 (septembre-octobre)	24	24 (100%)	B1 (15)
Gamiño-Arroyo et al. 2018	Mexique	2014	3	3 (100%)	B1 (1)
Nathaniel et al. 2017	Bermudes	2014 (octobre)	2	2 (100%)	B1 (2)
	Dominique	2014 (novembre-décembre)	2	2 (100%)	B1 (2)

Torres et al. 2015	Chili	2014 (septembre-octobre)	2	2 (100%)	B1 (2)
Weil et al. 2017	Israël	2014 (septembre-novembre)	7	7 (100%)	B1 (5) B2 (2)
Kubi et al. 2019	Ghana	2014 (juillet)	1	1 (100%)	NP
		2015 (septembre-octobre)	3	3 (100%)	NP
Levy et al. 2015	Australie	2015 (janvier)	1	48/55 (87,3%)*	NP
Roberts et al. 2020a	Australie	2016	1	1 (100%)	NP
El Badry et al. 2016	Haïti	2016	1	1 (100%)	B1 (1)
Fall et al. 2019b	Sénégal	2016 (juin-août)	44	NP	B3 (38)
Fall et al. 2020	Guinée	2016 (juin-septembre)	11	11 (100%)	B3 (5)
	Niger	2016 (août)	1	1 (100%)	B3 (1)
Ruggieri et al. 2017	Argentine	2016 (avril-mai)	4	4 (100%)	NP
Carballo et al. 2019	Argentine	2016	4	4 (100%)	B3 (2)
Roberts et al. 2020b	Australie	2018	3	3 (100%)	NP
Raboni et al. 2020	Brésil	2018 (avril-décembre)	36	NP	B3 (1)
Rodríguez-Morales et al. 2019	Pérou	2018	NP	NP	NP
Mozhgani et al. 2021	Iran	2018	34	34 (100%)	A (4) B3 (3)
Erster et al. 2022	Israël	2021 (mai-octobre)	33	33 (100%)	B3 (23)

*Chiffres totaux de l'étude ; NP, non précisé dans l'étude ; NA, non assigné à un clade

La plupart de ces études rapportent des cas d'infections respiratoires datant des années 2008 à 2013, période marquant la réémergence progressive de l'EV-D68 rétrospectivement observée dans de nombreux pays à travers le monde.

A. Émergence de l'EV-D68

A.1. Émergence de l'EV-D68 aux États-Unis et en Europe

Aux États-Unis ([Tableau 2](#)), après quelques cas sporadiques d'infections (n=8) rapportés en 2007 et 2008 (Kreuter et al., 2011; Wang et al., 2010), la première épidémie d'infections respiratoires à EV-D68, causée majoritairement par des souches appartenant aux clades A et C, est décrite en 2009. Le virus est alors détecté à New-York (n=20 ; Tokarz et al., 2011), en Géorgie chez des patients adultes (CDC, 2011), en Californie (n=1 ; Greninger et al., 2015) mais surtout en Pennsylvanie (n=35 patients pédiatriques) où une prévalence élevée (19%) de l'EV-D68 dans les échantillons positifs à rhinovirus/entérovirus est rapportée (Uprety et al., 2019). En 2010, quelques clusters d'infections respiratoires sont rapportés en Géorgie (patients adultes), en Californie (n=1 clade A ; Greninger et al., 2015), en Arizona (n=5 patients pédiatriques ; CDC, 2011) et au Nouveau-Mexique (n=5 patients pédiatriques) où une augmentation des hospitalisations d'enfants présentant des symptômes respiratoires est observée (Jacobson et al., 2012). En Pennsylvanie en 2010 et 2011, la prévalence du virus reste inférieure à 4% (n=4 enfants) avant de franchir le seuil des 10% en 2012 (n=12 enfants) avec une prédominance du clade B1 (Uprety et al., 2019). Entre 2011 et 2012, l'EV-D68 est également rapporté chez des enfants en Californie (n=4 clade B1 ; Greninger et al., 2015) ainsi que dans le Tennessee (n=1 clade A ; Tan et al., 2016). Après 2012, la circulation de l'EV-D68 semble suivre un modèle biennal en Pennsylvanie puisque des prévalences élevées (>10%) sont rapportées en 2014, 2016 et 2018 (population pédiatrique ; Uprety et al., 2019), années associées à de larges épidémies d'infections respiratoires dans l'ensemble des États-Unis.

En Europe ([Tableau 3](#)), les premiers cas d'infection sont rapportés sporadiquement entre 1996 et 2004 aux Pays-Bas (n=15 ; Meijer et al., 2012), en 1999 en France (1 enfant ; Smura et al., 2007)) et en 2004-2005 en Finlande (clade A ; Tokarz et al., 2012). Aux Pays-Bas, la circulation du virus s'intensifie entre 2006 et 2009 où il est détecté sporadiquement chaque année pour un total de 30 cas d'infections. La majorité des souches virales appartiennent alors au clade C, déjà identifié en 2004, ainsi qu'au clade A puis au clade B2 en 2009 (Meijer et al.,

2012; Rahamat-Langendoen et al., 2011). En 2010, une première épidémie est rapportée avec 48 cas d'infections respiratoires majoritairement associés à des virus de clade A bien que le clade B2 soit toujours détecté (Meijer et al., 2012; Rahamat-Langendoen et al., 2011). A l'inverse de la plupart des études, ces cas néerlandais sont en majorité (n=52/86, 60%) rapportés chez des patients adultes de plus de 20 ans (Meijer et al., 2012; Rahamat-Langendoen et al., 2011). Ceci suggère que la population adulte aurait joué un rôle dans la réémergence du virus. Par ailleurs, les adultes représentent une part non négligeable (n=11/27, 41%) des infections rapportées entre 2011 et 2014. Cette période montre, comme aux États-Unis, une circulation biennale du virus puisqu'après 2010, 78% (n=21/27) des infections sont rapportées en 2012 (n=9/27, 33%) et 2014 (n=12/27, 44%) (Meijer et al., 2014). Entre 2011 et 2013, les virus de clade A (n=5/14, 36%) et B2 (n=5/14, 36%) co-circulent avant de laisser place à une majorité de clade B2 (n=8/12, 67%) en 2014. Les clades B1 (n=3/26, 12%) et D1 (n=4/26, 15%) circulent également durant la même période (Meijer et al., 2014).

Dans le reste de l'Europe (Tableau 3), l'EV-D68 est identifié sporadiquement en 2009 (n=9), 2010 (n=8) et 2011 (n=1) au Royaume-Uni suivant la même distribution phylogénétique (clades B2 et A) qu'aux Pays-Bas chez des patients de 7 à 45 ans (Lauinger et al., 2012; A. I. C. Martin et al., 2017). En Angleterre, le virus aura également été rapporté en 2012 (n=6/7 clades B2, 86%) et six autres cas, notamment associés à des virus de clade D1, seront rapportés entre novembre et décembre 2013 (A. I. C. Martin et al., 2017). Trois cas d'infections pédiatriques sont rapportés en 2010 en Espagne (Launes et al., 2015) et seront suivis entre octobre 2012 et février 2013 par 12 cas pédiatriques sporadiques associés aux clades B2 (n=8/12, 67%), D1 (n=3/12, 25%) et B1 (n=1/12, 8%) (Calvo et al., 2016). En France, une petite épidémie de 19 cas d'infections respiratoires est rapportée en 2008 au CHU de Caen ce qui fait de l'EV-D68 le plus identifié des entérovirus (30%) au cours de cette année (Petitjean-Lecherbonnier et al., 2011). Un cluster de 10 cas d'infections respiratoires pédiatriques, associés à des souches de clade C, est ensuite rapporté en 2009 au CHU de Reims (Renois et al., 2013). La circulation biennale de l'EV-D68 se confirme ensuite à Lyon, où 98% (n=169/172) des infections respiratoires rapportées entre 2010 et 2016 concernent les années paires. Ainsi, après l'identification d'un petit cluster de 7 cas d'infection à majorité pédiatrique (n=6/7, 86%) en 2010, associées à des virus de clade A et B2, et une seule infection pédiatrique associée à un virus de clade A en 2011, une épidémie de 55 cas d'infections à majorité pédiatrique (n=49,

89%) est rapportée en 2012. Elle est alors majoritairement associée à des virus de clade B2 (n=16/35, 46%) mais aussi de clade B1 (n=9/35, 26%) et A (n=9/35, 26%). La première souche de clade D1 française est également identifiée. Détecté une fois en 2015, le virus causera deux nouvelles épidémies à majorité pédiatrique à Lyon (n=93/107, 87%) en 2014 (n=42) et 2016 (n=65) majoritairement associés à des virus de clade B2 et B3 respectivement. En 2014, les clades B1 et D1 circulent faiblement et deux souches virales de clade A et B3 sont également détectées (Kramer et al., 2018). L'EV-D68 a également été identifié chez deux patients adultes en 2013 en Île de France (Molet et al., 2016). Enfin, en Italie, l'EV-D68 est identifié en 2008, année au cours de laquelle un cluster de 12 infections respiratoires, associées à des virus de clade C et A, est rapporté. S'en suivra l'identification de deux clusters d'infections à majorité pédiatriques (n=7/9, 78%) en 2010 (n=4, clade A) et 2012 (n=5) où le clade B2 (n=3/5, 60%) devient majoritaire tout en co-circulant avec les clades B1 et A (Piralla et al., 2014). En Allemagne, la circulation de l'EV-D68 est rapportée en 2013 et 2014, années au cours desquelles 33 et 55 cas d'infections pédiatriques (n=69/88, 78%) et d'adultes (19/88, 22%) sont rapportées. Le clade B2 est majoritairement identifié durant cette période (n=43/71, 60,6%) même si la circulation des clades D1 et B1 semble augmenter en 2014 (Baertl et al., 2021; Böttcher et al., 2016; Reiche et al., 2015). Un cas sera rapporté en Turquie entre 2014 et 2016 (Demirkan et al., 2017).

A.2. Émergence et circulation de l'EV-D68 en Asie

En Asie ([Tableau 4](#)), le premier cluster de 10 cas est rapporté en 2005 au Japon chez des enfants ; il est associé à des virus de clade C. La circulation du virus sera ensuite détectée exclusivement chez des patients pédiatriques en 2006 (n=3 ; clade A), 2007 (n=10 ; clades A et C), et 2009 (n=6 ; clades A et D2) (Ikeda et al., 2012; Kaida et al., 2011). En 2010, une première épidémie d'infections respiratoires pédiatriques est rapportée au cours de laquelle au moins 111 cas sont identifiés et majoritairement associés à des souches de clade C (n=60/83, 72%), les clades B2 (n=13/83, 16%) et A (n=10/83, 12%) sont également présents (Hasegawa et al., 2011; Ikeda et al., 2012; Itagaki et al., 2018; Kaida et al., 2011; Korematsu et al., 2018). Contrairement aux États-Unis et à l'Europe, le virus n'est pas détecté en 2012 et un seul cas est rapporté en 2014. Toutefois, en 2013, un pic épidémique similaire à celui de 2010 est associé au clade A. Une nouvelle épidémie de 258 cas d'infections respiratoires pédiatriques, corrélée à une hausse inédite des hospitalisations pour exacerbation d'asthme, sera ensuite

rapportée en 2015 et associée à des virus de clade B3 (Funakoshi et al., 2019; Hatayama et al., 2019; Itagaki et al., 2018; Kaida et al., 2017; Korematsu et al., 2018; Metoki et al., 2018). Le virus ne sera détecté par la suite qu'une fois chez un enfant en 2017 (Hatayama et al., 2019), puis le clade B3 sera responsable du dernier cluster d'infections respiratoires pédiatriques (n=22) rapporté au Japon en 2018 (Ikuse et al., 2021). La même année, seront rapportés 4 cas d'atteintes neurologiques pédiatriques associés à ce même clade (Okumura et al., 2020).

En Chine ([Tableau 4](#)), les premières infections à EV-D68 sont rapportées en 2006 chez 11 adultes (Xiang et al., 2012). Le virus ne sera ensuite que peu détecté entre 2008 et 2013 : 24 cas d'infections respiratoires à majorité pédiatrique (Lu et al., 2014; Xiang et al., 2012; Xiao et al., 2015; T. Zhang et al., 2016). Au cours de cette période, les clades D1 et B1 sont majoritairement identifiés. Ils seront remplacés par le clade B3 en 2014, année au cours de laquelle une augmentation du nombre de cas est visible puisque 24 infections respiratoires pédiatriques sont rapportées (Lu et al., 2014; Tang et al., 2021; Xiao et al., 2015; T. Zhang et al., 2015, 2016). À l'inverse du Japon, le clade B3 circule faiblement en 2015 : seulement 4 cas d'infections pédiatriques rapportés (Chen et al., 2016). Il devient prédominant à Pékin en 2016 : clades B3 (n=32/46 ; 70%) *versus* D1/D3 (n=14/46 ; 30%). Une grande proportion d'adultes est rapportée (n=21/46, 45.7%) parmi les 46 cas d'infections respiratoires (Shen et al., 2019; Tang et al., 2021). Le virus est ensuite moins détecté à Pékin : entre 2017 et 2019, 20 cas d'infections associées à des virus de clades B3 (n=15/20 ; 75%) et D1/D3 (n=5/20 ; 25%) (Liu et al., 2021; Shen et al., 2019; Tang et al., 2021). La circulation de l'EV-D68 semble similaire à Hong-Kong où le virus est détecté dans 27 cas d'infections respiratoires sporadiques de patients pédiatriques et adultes entre 2010 et 2013. Le clade A circule en 2010 comme le clade B1 qui co-circulera ensuite avec le clade D1 avant que celui-ci ne devienne le seul rapporté en 2013 (Lau et al., 2016; Yip et al., 2017). En 2014, 37 cas d'infections sont rapportés chez des enfants et sont associés au clade B3 (Hy et al., 2016; Lau et al., 2016; Yip et al., 2017). Ce même clade est également identifié dans 15 cas d'infections pédiatriques en 2015 (Haichao Wang et al., 2019). L'examen des séquences déposées dans Genbank (au 13.09.2021) indique que le clade B3 a ensuite co-circulé avec le clade D1 entre 2016 et 2017.

À Taïwan ([Tableau 4](#)) où l'EV-D68 est recherché chez les enfants et les adultes présentant des atteintes respiratoires, la circulation semble différente de celle observée au Japon et en Chine. Le virus est pour la première fois détecté en 2007 et les infections,

majoritairement pédiatriques, sont associées aux clades A (n=19/26 ; 73%), B (n=5/26 ; 19%) et D (n=2/26 ; 8%) (Hu et al., 2019; Y.-P. Huang et al., 2017; Wei et al., 2018). Les mêmes clades circulent faiblement en 2008 et 2009 (7 cas). Deux pics d'infections sont rapportés ensuite. L'un en 2010 marqué par la co-circulation des clades A (n=16/18 ; 89%) et D (n=2/18 ; 11%), l'autre en 2011 caractérisé par trois clades : B1 (n=7/11 ; 64%), D (n=3/11 ; 27%) et A (n=1/11 ; 9%). En 2012 et 2013, le nombre de cas est à nouveau très faible : respectivement 2 et 4 cas associés aux clades B1 et A. Une recrudescence est rapportée entre 2014 et 2017 : respectivement 19, 16, 12 et 27 cas, majoritairement associés à des virus B3 (n=46/47 ; 98%). Un seul cas d'infection est rapporté en 2018 (Gong et al., 2016; Hu and Chang, 2020; Y.-P. Huang et al., 2017; Wei et al., 2018). La circulation du virus ne semble pas suivre un mode biennal à Taïwan, mais le nombre de cas reste trop faible pour pouvoir dresser une conclusion définitive.

L'émergence de l'EV-D68 a été observée dans plusieurs autres pays asiatiques ([Tableau 4](#)) comme les Philippines, où un premier cluster de 21 infections pédiatriques est rapporté entre octobre 2008 et février 2009 (Imamura et al., 2011). D'autres cas associés à des virus des clades B, D et A sont identifiées en 2008 et 2011, avant un pic entre 2013 et début 2014 de 20 cas associés aux clades B3 (n=15/20, 75%) et D1 (n=5/20, 25%) (Furuse et al., 2015). Quarante-deux nouvelles infections pédiatriques sont également rapportées entre 2014 et 2016 (Furuse et al., 2019b). Elles seront suivies d'au moins 20 cas d'infections associés à des virus de clade D1, rapportés en 2017 (n=1) et 2018 (n=19 ; Okamoto et al., 2021). Dans la péninsule indochinoise, le virus est rapporté pour la première fois en 2009. Au Vietnam où selon une étude phylogénétique (Ny et al., 2018), le virus aurait été importé en 2008, il est rapporté sporadiquement entre 2009 et 2015 : 29 cas pédiatriques associés aux clades D2 puis B3 (B'Krong et al., 2018; Ny et al., 2018). Cinq cas pédiatriques liés aux clades B1 (n=4/5, 80%) et A (n=1/5, 20%) sont également rapportés en 2009 en Thaïlande. L'incidence des cas pédiatriques reliés à une atteinte respiratoire aiguë y augmente en 2010 et 2011 (Linsuwanon et al., 2012). Ils sont associés à des virus de clades B (n=14/20 ; 70%) et A (n=6/20, 30%). Cinq autres cas pédiatriques (clade B3) sont ensuite rapportés en 2013 (n=2) et 2014 (n=3) (Thongpan et al., 2016). Enfin, 5 cas d'infections chez des patients adultes liés à des virus D1 (n=3/5, 60%), A et B2, sont rapportés à Singapour en 2010 (n=3) et 2011 (n=2) (Linster et al., 2020). En Malaisie, l'EV-D68 est détecté en 2012 (n=8), 2013 (n=1) et 2014 (n=3) ; les cas sont

associés aux clades D1 (n=8/12 ; 67%), B (n=3/12 ; 25%) et A (n=1/12 ; 8%) (Ng et al., 2015). Au Cambodge, sept infections liées au clade D chez des patients adultes et 1 infection pédiatrique associée au clade B1 sont rapportées en 2009 et 2011 (Ly et al., 2014). D'autres pays asiatiques ont détecté le virus tardivement. En Inde, des EV-D68 de clade B3 ont été détecté chez 4 patients pédiatriques entre 2016 et 2018 (Bhardwaj et al., 2019; Sanjay et al., 2021). Deux infections ont également été rapportées chez des patients adultes au cours de la période 2015-2017 en Indonésie (Mawuntu et al., 2018; Setianingsih et al., 2019).

A.3. Émergence de l'EV-D68 dans le reste du monde

Au Canada, il est possible, à partir des séquences d'EV-D68 déposées dans GenBank (au 13.09.2021), d'établir que l'EV-D68 y circule depuis la fin des années 1990 et qu'une majorité de virus de clade A ont été détectés sporadiquement entre 2005 et 2012. L'émergence de l'EV-D68 en Amérique du Sud, en Océanie et en Afrique (Tableau 5) est peu documentée. Toutefois, les premiers cas d'infection rapportés datent pour la plupart toujours de la période 2008-2013. L'EV-D68 est détecté pour la première fois sur le continent Sud-américain en 2009 au Brésil où deux infections sont rapportées (Carney et al., 2015). Un cluster de 17 infections pédiatriques, majoritairement associées à des virus de clade B1, sera ensuite rapporté au Panama en 2013 (Biggs et al., 2021). En Océanie, le virus est détecté pour la première fois en 2008 (n=1) en Australie. Six cas sporadiques associés à des virus de clade A et B2 sont rapportés en 2010 avant une augmentation nette du nombre d'infections associées aux mêmes clades en 2011 avec 26 cas identifiés. Le virus circule ensuite faiblement en 2012 où 3 infections à EV-D68 clade B2 sont rapportées avant de causer un nouveau pic de 21 infections en 2013, majoritairement associées à des virus de clade B2 mais aussi de clade B1. Par la suite, l'EV-D68 sera identifié une fois en 2015. La plupart de ces cas australiens concernent des patients pédiatriques (n=48/55 ; 87%) (Levy et al., 2015). Quatre cas d'atteintes neurologiques associées à l'EV-D68 ont également été rapportés en 2016 (n=1 ; Roberts et al., 2020a) et 2018 (n=3 ; Roberts et al., 2020b). L'EV-D68 est associé en Nouvelle-Zélande à 15 cas d'infection à majorité pédiatrique (n=11/15 ; 73%) en 2010 (Todd et al., 2013).

Sur le continent Africain (Tableau 5), la circulation de l'EV-D68 a été détectée dès 2000 et 2001 en Afrique du Sud (Tokarz et al., 2012). Des virus majoritairement associés au clade B2 sont ensuite associés à 10 cas d'infections en majorité pédiatriques, rapportés en 2009

(n=1), 2010 (n=2) et 2011 (n=7) (Hellferscee et al., 2017b). Sept cas en majorité pédiatriques seront identifiés en 2013 et 2014 et associés aux clades B2 (n=5/7 ; 71%) et A (n=2/7 ; 29%) (Hellferscee et al., 2017a). L'EV-D68 clade A est rapporté en 2008 chez des enfants en Gambie (n=5 ; Tokarz et al., 2012) et au Kenya (n=5 dont 1 clade B) où 12 autres cas pédiatriques pour la plupart associés au même clade seront identifiés en 2009 (n=1/12 ; 8%), 2010 (n=9/12 ; 75%) et 2011 (n=2/12 dont 1 clade C ; 17%) (Opanda et al., 2016; Phan et al., 2022). Au Sénégal, l'EV-D68 clade A est rapporté à partir de 2010 (Tokarz et al., 2012). Par la suite, deux clusters seront rapportés simultanément aux épidémies américaines et européennes. En 2014, 14 infections pédiatriques sont associées au clade A (Fall et al., 2019a) et en 2016, 44 infections associées au clade B3 sont rapportées chez des enfants et des adultes (Fall et al., 2019b). La même année, des cas d'atteintes neurologiques pédiatriques (clade B3) sont également décrits en Guinée (n=11) et au Niger (n=1) (Fall et al., 2020). Enfin, 4 cas d'infection pédiatrique sont rapportés au Ghana en 2014 (n=1) et 2015 (n=3) (Kubi et al., 2019).

B. Études séro-épidémiologiques

Diverses études de séroprévalence des anticorps anti-EV-D68 ont été réalisées pour déterminer le taux des anticorps neutralisants à l'aide de sérums collectés à différentes périodes, dans des populations de plusieurs pays.

Dans une étude conduite à Pékin, la séroprévalence a été comparée à l'aide de sérums prélevés en 2004, 2007, 2009 et 2011 (Xiang et al., 2017). La séroprévalence et le titre en anticorps neutralisants (titre géométrique moyen) ont été évalués contre une souche du clade D2. Dans les sérums de 2004, le titre neutralisant moyen (21, IC 95%, pour les 16-59 ans) est faible pour toutes les classes d'âge étudiées avant d'augmenter entre 2007 et 2011 dans la population adulte. La séroprévalence reste quant à elle à 100% entre 2004 et 2009. Bien que ces résultats semblent indiquer une circulation de l'EV-D68 déjà en place avant 2004, ils pourraient être en faveur d'une intensification de sa circulation après cette période, expliquant ainsi les premières déclarations de cas de 2006 en Chine (cf ci-dessus).

Aux Pays-Bas, la séroprévalence en anticorps anti-EV-D68 et le titre neutralisant moyen ont été évalués avec une souche de clade B3 collectée en France et la souche prototype Fermon (Karelehto et al., 2019). Les résultats pour les sérums de 2006-2007 montrent des valeurs élevées avec une séroprévalence moyenne approchant les 90% (pour Fermon et la

souche B3). Les titres en anticorps neutralisants (titre géométrique moyen) sont également élevés aussi bien contre la souche Fermon (123,7; IC 95%) que contre la souche de clade B3 (199,7; IC 95%). Ceci suggère, comme en Chine, une circulation endémique déjà en place depuis plusieurs années dans la population.

De façon similaire, une étude de séroprévalence conduite au Royaume-Uni avec des souches de clades A et B3, montre que la prévalence et le titre neutralisant moyen sont élevés en 2006 dans la population adulte. Cette étude montre également une augmentation de la séroprévalence entre 2006 et 2016 chez les patients de moins de 40 ans (10-20% d'augmentation selon les tranches d'âge). Ceci pourrait indiquer un accroissement de la circulation de l'EV-D68 (Kamau et al., 2019).

Enfin, l'étude finlandaise de Smura et al (2010) porte sur une population de femmes enceintes et montre que 100% d'entre elles étaient séropositives en 1983 avec un titre neutralisant moyen (contre la souche Fermon) élevé dans leur sérum (178,8). Cette dernière étude montre également une donnée importante quant à la réémergence du virus. Le titre en anticorps neutralisants la souche prototype Fermon diminue en 1993 (88,1) puis 2002 (44,5), ce qui pourrait indiquer un ralentissement de sa circulation au profit de groupes phylogénétiques plus récents affichant un polymorphisme antigénique. Cette observation est confirmée dans l'étude de Karelehto et al (2019) avec des sérums collectés entre 2006 (123,7 ; IC 95%) et 2016 (89,3 ; IC 95%). Les études séro-épidémiologiques sont encore très parcellaires (il existe d'autres études). Les données pour les pays européens suggèrent cependant que l'apparition de nouveaux groupes phylogénétiques pourrait être un des moteurs de la réémergence de l'EV-D68.

C. Circulation de l'EV-D68 à partir de 2014

C.1. Focus sur l'épidémie de 2014

Les travaux présentés ci-dessus montrent que la grande majorité des données épidémiocliniques qui permettent de retracer l'histoire épidémiologique de l'EV-D68 couvrent une période très récente. L'année 2014 y tient une place particulière dans la mesure où elle marque une rupture dans la circulation du virus très précisément au début du mois d'août, quand l'hôpital pour enfants de Kansas City, dans le Missouri, rapporte une recrudescence inédite d'hospitalisations liées à des infections respiratoires sévères à EV-D68. Peu de temps

après, deux hôpitaux dans l'Illinois et le Colorado décrivent des cas similaires (Midgley et al., 2015, 2014). De nombreux autres cas d'infections respiratoires seront rapportées à travers les États-Unis entre août et décembre 2014 (Tableau 2), totalisant 1395 cas pour la plupart associés à des virus B1 (Abedi et al., 2018; Greninger et al., 2015; Holm-Hansen et al., 2016). Bien que ce total soit supérieur à tous les cas antérieurs, tout laisse à penser qu'il est encore sous-estimé. En effet, il est établi sur les cas cliniques pédiatriques sévères et sur la réalisation du diagnostic moléculaire qui est pratiqué uniquement dans un petit nombre de laboratoires de référence. Une grande proportion de patients présentant des atteintes respiratoires au cours de l'épidémie n'a pas été testée pour l'EV-D68 comme le montre une étude dans les hôpitaux d'Illinois et du Missouri (Midgley et al., 2014). L'hôpital pour enfants du Colorado à Aurora, rapporte une augmentation de 36% des consultations aux urgences (soit 1185 patients) ainsi qu'une augmentation du nombre d'hospitalisations (+387 patients, +80%) et d'admissions en soins intensifs (+96 patients, +79%). Pour autant, la recherche de l'EV-D68 dans les échantillons respiratoires cliniques aura été effectuée pour 101 patients seulement (Messacar et al., 2016b). Même constat à New-York où seulement 34,8% des échantillons respiratoires positifs pour les rhinovirus/entérovirus ont été testés pour l'EV-D68 (Gilrane et al., 2020). Selon le CDC américain, l'épidémie d'infections respiratoires à EV-D68 aurait touché plusieurs millions de personnes à travers les États-Unis (Messacar et al., 2016a). L'hôpital pour enfants du Colorado sera à l'origine de l'alerte de santé publique lancée par le CDC (26 septembre 2014) après avoir notifié quelques jours auparavant un cluster de 9 patients pédiatriques qui présentaient une atteinte neurologique caractérisée par une faiblesse des membres et une atteinte des paires crâniennes (Pastula et al., 2014).

Cette alerte participera au renforcement de la surveillance de l'EV-D68 dans le monde et à la description de nombreux cas d'infections respiratoires supplémentaires. Les États-Unis n'étant pas le seul pays à rapporter une épidémie en 2014. Le Canada (Tableau 4), voisin, est le second pays le plus touché, avec 699 cas d'infections respiratoires en majorité pédiatriques. Comme aux États-Unis, le virus B1 (n=31/33, 94%) est le plus fréquent (Eshaghi et al., 2017; Holm-Hansen et al., 2016; Martin et al., 2016).

Alors qu'il est minoritaire en Amérique du Nord, le virus B2 est le clade le plus fréquent (n=98/144, 68%) parmi les 205 cas d'infections respiratoires rapportées en France (Tableau 3) par le réseau de surveillance des entérovirus (RSE) et le CNR des entérovirus et paréchovirus,

entre juillet et décembre 2014 (Schuffenecker et al., 2016) ([Rapport d'activité CNREV 2018](#)). Le clade B1 vient en second (n=31/144, 22%), suivent par ordre décroissant les clades D1, A et B3. Ailleurs en Europe, 16 pays rapportent des cas pédiatriques d'infections respiratoires entre juillet et décembre 2014 ([Tableau 3](#)). Les virus B2 sont retrouvés dans la majorité des cas, les clades B1 et D1 sont minoritaires et le clade A est rapporté dans quelques cas (Poelman et al., 2015). L'épidémie européenne de 2014 s'élève au minimum à 573 cas d'infections à EV-D68, soit un total de 2667 cas rapportés aux États-Unis, au Canada et en Europe.

Dans le reste du monde ([Tableau 5](#)), outre les pays déjà décrits en amont, seuls quelques pays rapportent des cas d'infections à EV-D68 en 2014. Le virus de clade B1 est associé à des infections pédiatriques dans les pays suivants : Mexique (n=27 cas ; Gamiño-Arroyo et al., 2018; Vazquez-Perez et al., 2016), Chili (n=2 ; Torres et al., 2015), Bermudes (n=2), Dominique (n=2) (Nathaniel et al., 2017) et Israël (n=7 ; Weil et al., 2017). Dans ce dernier pays, 2 infections à virus B2 sont aussi décrites. Le nombre de cas rapportés est tributaire de la surveillance propre à chaque pays et aussi des difficultés de diagnostic de l'EV-D68 qui existent alors. En conséquence, on peut penser que l'épidémie d'infections respiratoires en 2014 est sous-estimée dans tous les pays, comme aux États-Unis.

C.2. 2015 - 2016 : le clade B3 est majoritaire

Hormis des clusters d'infections au Japon, à Taïwan et à Hong-Kong associés à des EV-D68 de clade B3 ([Tableau 4](#)), peu de cas ont été rapportés dans le monde en 2015. Seuls 9 cas d'infections rapportés aux États-Unis (Abedi et al., 2018) et quelques cas sporadiques rapportés aux Pays-Bas (Karelehto et al., 2019; Knoester et al., 2017), en Espagne (n=9 ; Andrés et al., 2019; González-Sanz et al., 2019; Montes et al., 2019), en Allemagne (Baertl et al., 2021) et en France (n=3 ; [Rapport d'activité CNREV 2015](#); Midgley et al., 2020) s'ajoutent au faible nombre de cas d'infection chinois, indonésiens, australiens, ghanéens et anglais décrits en amont ([Tableaux 3-5](#)). Fait unique en Europe pour l'année 2015, une épidémie de 56 cas d'infections respiratoires rapportées entre décembre 2015 et janvier 2016 au Pays de Galles (Cottrell et al., 2018). Cette épidémie sera suivie par une seconde (48 cas d'infections respiratoires) entre juillet 2016 et janvier 2017 (Cottrell et al., 2018).

Entre mai et novembre 2016, le RSE français rapporte 206 cas d'infections dont 187 (91%) chez des enfants. Le virus B3 représente alors 98% (n=59/60) des sous-génotypes

(Kramer et al., 2018 ; [Rapport d'activité CNREV 2018](#)). Dans la même période, des épidémies sont également rapportées dans plusieurs autres pays européens, avec notamment plus de 150 cas majoritairement pédiatriques en Espagne (Andrés et al., 2019; González-Sanz et al., 2019; Montes et al., 2019) et 146 cas en Norvège (Knoester et al., 2019). Les Pays-Bas (Karelehto et al., 2019; Knoester et al., 2017; Midgley et al., 2020) et l'Allemagne (Baertl et al., 2021; Midgley et al., 2020) rapportent tous deux plus d'une centaine de cas. Enfin, deux clusters, 74 cas majoritairement pédiatriques (n=60, 81%) en Suède (Dyrdak et al., 2016; Midgley et al., 2020) et 52 cas pédiatriques en Italie (Pellegrinelli et al., 2019b; Piralla et al., 2018), sont également rapportés. Les EV-D68 de clade B3 sont très largement majoritaires dans ces clusters épidémiques (n=239/245, 98%). Des clusters plus petits et des cas sporadiques une nouvelle fois associés à des virus de clade B3 sont également rapportés à la même période dans 9 autres pays européens. Globalement en 2016, l'épidémie d'infections à EV-D68 semble avoir affecté environ un millier de patients en Europe ([Tableau 3](#)). Quelques cas sporadiques ont également été rapportés dans le reste du monde ([Tableau 4-5](#)).

La même année, l'épidémie aux États-Unis ([Tableau 2](#)) est peu documentée et son ampleur entre les états semble tout aussi disparate qu'entre les pays européens, et comme en Europe, les infections sont associées à des virus B3. Initialement, 138 cas respiratoires ont été rapportés par le NESS (Abedi et al., 2018). Toutefois, l'analyse des différentes études publiées indique un minimum de 273 cas rapportés dans cinq états. Parmi eux, 160 (58,6%) sont rapportés à New-York entre septembre et octobre 2016, la majorité (n=145/160 ; 91%) concernant des patients de moins de 20 ans. Bien que l'ampleur de l'épidémie new-yorkaise soit supérieure à celle de 2014, le nombre d'infections est sous-estimé car seulement 62,3% des échantillons positifs pour les rhinovirus/entérovirus ont été testés pour l'EV-D68 (Gilrane et al., 2020; G. Wang et al., 2017). Des infections pédiatriques sont également rapportées en Pennsylvanie, état voisin au sud de New-York, (n=30 ; Uprety et al., 2019). Dans l'Ohio, à l'ouest de la Pennsylvanie, le nombre d'infections est beaucoup plus faible qu'en 2014 : seulement 14 cas pédiatriques sporadiques entre juin et octobre contre 213 cas deux ans auparavant (Huanyu Wang et al., 2019). Dans le Colorado, 46 cas pédiatriques sont rapportés entre juillet et octobre (Messacar et al., 2019a, 2017). Vingt-trois cas pédiatriques sont rapportés dans le Missouri entre août et décembre (Srinivasan et al., 2018). Les variations entre états ont été analysées par Park et al (2021) qui montrent que les épidémies suivent des

gradients de latitude et longitude, ce qui pourrait être dû à des variations climatiques, de l'immunité collective et de taux de natalité. Ainsi lorsqu'une épidémie a lieu, elle crée une immunité collective qui est peu à peu réduite par les naissances (renouvellement de la population) ce qui permet l'éclatement d'une nouvelle épidémie, si les conditions climatiques y sont favorables. Ces résultats sont en accord avec ceux d'études antérieures plus globales de la circulation des entérovirus qui suggèrent l'implication de facteurs environnementaux et climatiques ainsi que des variations antigéniques (Pons-Salort et al., 2018; Pons-Salort and Grassly, 2018).

C.3. 2017-2018 : co-circulation des clades B3 et D1

Comme en 2015, la circulation de l'EV-D68 semble étouffée car très peu de cas d'infection ont été rapportés dans le monde en 2017. Hors de l'Europe et des États-Unis, la Chine (Liu et al., 2021; Shen et al., 2019; Tang et al., 2021) et Taïwan (Hu and Chang, 2020), rapportent respectivement 8 (clade B3, n=6 ; clade D1, n=2) et 27 cas. Un cas d'atteinte neurologique pédiatrique est également rapporté au Japon (Hatayama et al., 2019). Les Philippines (Okamoto et al., 2021), l'Inde (Sanjay et al., 2021) et Hong-Kong (Chan et al., 2021) rapportent également 3 cas d'infections (clades B3 et D1) ([Tableau 4](#)). Aux États-Unis ([Tableau 3](#)), seulement 8 cas (1 clade D1) sont rapportés dont la majorité (n=5/8, 62,5%) à New-York (Gilrane et al., 2020) et le reste par le NVSN, focalisé sur les patients pédiatriques (Kujawski et al., 2019). En Europe ([Tableau 2](#)), le virus est rapporté dans quelques pays : Allemagne (Midgley et al., 2020), Pays-Bas (Karelehto et al., 2019; Midgley et al., 2020), Pays de Galles (n=2 ; Cottrell et al., 2018), Belgique (n=2, clade D1 ; Wollants et al., 2019), Espagne (González-Sanz et al., 2019) et France (n=1 ; [Rapport d'activité CNREV 2017](#)).

Une nouvelle recrudescence des cas rapportés aux États-Unis et en Europe en 2018 vient conforter l'hypothèse d'un mode biennal de circulation épidémique de l'EV-D68 dans les deux régions. Aux États-Unis ([Tableau 2](#)), le « New Vaccine Surveillance Network » rapporte 382 cas dans 7 états (Kujawski et al., 2019; Shah et al., 2021). Une autre étude rapporte 401 infections pédiatriques dans l'Ohio (Huanyu Wang et al., 2019). Cette épidémie causée par le clade B3 est la plus importante dans cet état. A New-York, 89 cas dont 77 (87%) pédiatriques sont aussi liés à des virus B3 (n=37/48 ; 77%) et D1 (n=11/48 ; 23%), l'épidémie semble donc plus restreinte que celle de 2016 (Gilrane et al., 2020). Encore une fois, la proximité géographique entre 2 états voisins ne semble pas déterminante dans le déclenchement des

épidémies à EV-D68. Vingt-trois cas pédiatriques sont rapportés dans le Colorado (Messacar et al., 2019a) et 17 cas d'infections associées au clade B3 sont rapportés dans le Missouri (Pakala et al., 2019). Enfin, une épidémie d'infections pédiatriques associées à des virus de clade B3 est rapportée en Pennsylvanie (Uprety et al., 2019). Le nombre total de cas en 2018 (minimum 896) est donc trois fois plus élevé qu'en 2016. L'ampleur de l'épidémie, qui paraît élevée tant le nombre d'états touchés est faible, est bien évidemment soumise aux mêmes biais que les épidémies de 2014 et 2016 ce qui induit une sous-estimation du nombre de cas.

En France (Tableau 3), l'épidémie d'infections à EV-D68 est objectivée chez 85 cas rapportés entre juin et décembre. Ces infections, associées à la co-circulation de virus B3 (n=42/85 ; 49%) et D1 (43/85 ; 51%), sont rapportées chez un nombre inédit de patients adultes (n=38/85 ; 45%) (Bal et al., 2019 ; Rapport d'activité CNREV 2018). Dans le même temps, le Pays de Galles rapporte 114 cas entre juin et novembre 2018 (Cottrell et al., 2018). En Angleterre, 83 cas d'infections sont rapportés entre septembre et décembre dont 58% (n=48/83) chez des patients adultes. Les clades B3 (n=50/83 ; 60%) et D1 (n=33/83 ; 40%) co-circulent (Howson-Wells et al., 2022). Une épidémie de grande ampleur (plus de 80 cas à Louvain et Bruges) est également rapportée en Belgique. Les 22 cas pour lesquels des informations précises sont disponibles montrent une grande proportion de patients adultes (n=12/22 ; 54%) et une co-circulation des clades B3 (n=9/22 ; 41%) et D1 (n=13/22 ; 59%) (Wollants et al., 2019). En Italie, 21 cas rapportés entre septembre et novembre sont également associés aux clades D1 (n=16/20 ; 80%) et B3 (n=4/20 ; 20%) ; les patients adultes représentent 48% (n=10/21) des cas (Pellegrinelli et al., 2019a). Sur la période 2017-2018, l'Espagne rapporte 51 cas également associés à une grande proportion de patients adultes (45.1%) et à des virus D1 (n=35/51 ; 69%) et B3 (n=16/51 ; 31%) (González-Sanz et al., 2019). Enfin, plus de 21 cas d'infections associées aux mêmes clades D1 et B3, sont rapportés en Allemagne, aux Pays-Bas, en Suisse et en Suède (Hodcroft et al., 2020; Midgley et al., 2020).

La Chine (n=9, clade B3 ; Liu et al., 2021; Tang et al., 2021), Taïwan (n=1 ; Hu and Chang, 2020), le Japon (n=26, clade B3 ; Ikuse et al., 2021; Okumura et al., 2020), les Philippines (n=19, clade D1 ; Okamoto et al., 2021), l'Australie (n=3 ; Roberts et al., 2020b), l'Iran (n=34, clades B3 et A ; Mozhgani et al., 2021), le Brésil (n=36, clade B3 ; Raboni et al., 2020) et le Pérou (Rodríguez-Morales et al., 2019) rapportent d'autres cas d'infection majoritairement pédiatriques (Tableaux 4-5).

Problématique et objectifs de la thèse

Les travaux réalisés au cours de cette thèse portent sur l'analyse des données épidémiologiques concernant les infections à EV-D68 recueillies entre 2014 et 2018 au CHU de Clermont-Ferrand. Les données cliniques et virologiques nous ont permis d'étudier les conséquences de l'évolution moléculaire du virus sur sa circulation et son pouvoir infectieux. L'objectif principal était d'étudier les facteurs virologiques pouvant être associés à l'émergence de l'EV-D68.

La surveillance épidémiologique des infections à EV-D68 est, dans la littérature, sujette à des biais méthodologiques importants liés à la sélection de patients et au typage moléculaire dans les prélèvements cliniques. Il existe également une cassure nette entre les études cliniques, focalisées sur les patients et les études décrivant l'évolution moléculaire du virus ce qui complique considérablement la compréhension de la dynamique évolutive et de circulation de l'EV-D68. Le **premier objectif** de cette thèse était donc de décrire et d'analyser l'épidémiologie clinique et moléculaire des infections à EV-D68 au CHU de Clermont-Ferrand au cours de la période de surveillance pour étudier les variations phylogénétiques entre les différentes épidémies provoquées par le virus et les possibles relations entre clade et caractéristiques cliniques.

Les travaux ont été poursuivis par l'analyse du génome complet des souches virales obtenues au cours de la surveillance clinique. Les études d'épidémiologie moléculaire des entérovirus sont encore majoritairement focalisées sur l'analyse de la séquence codant la protéine de la capsid VP1. Malgré son intérêt, le séquençage de la totalité du génome viral est encore peu employé en routine. Il permet de mettre en évidence l'évolution moléculaire complète du virus et les disparités génétiques entre les différents groupes phylogénétiques. Le **second objectif** de la thèse était de développer une stratégie de séquençage haut débit en vue d'obtenir un maximum de génomes complet d'EV-D68.

Les séquences obtenues ont permis la réalisation du **troisième objectif** de ces travaux : l'étude de l'évolution moléculaire de l'EV-D68, des potentiels facteurs génétiques liés aux caractéristiques cliniques des patients ainsi qu'à sa circulation. Pour ce faire, la comparaison des différents clades notamment des sous clades B3 et D1, circulant en 2018, a été réalisée.

Enfin, la comparaison de ces deux clades a été poursuivie dans le cadre du **dernier objectif** de cette thèse : l'exploration du tropisme respiratoire de l'EV-D68 notamment via l'utilisation d'un nouveau modèle de culture *in vitro*.



Travaux personnels

L'article ci-dessous décrit les principaux résultats obtenus au cours de ma thèse. Il est suivi de commentaires visant à éclaircir la méthodologie de séquençage utilisée et à actualiser les données épidémiologiques retraçant la circulation du virus après 2018. Ces commentaires sont suivis de la présentation de résultats issus de travaux supplémentaires permettant d'approfondir les résultats de la publication.

I. Article publié dans le journal « Viruses »

Article

Retrospective Study of the Upsurge of Enterovirus D68 Clade D1 among Adults (2014–2018)

Maxime Duval ¹, Audrey Mirand ^{1,2}, Olivier Lesens ³, Jacques-Olivier Bay ⁴, Denis Caillaud ⁵, Denis Gallot ⁶, Alexandre Lautrette ⁷, Sylvie Montcouquiol ⁸, Jeannot Schmidt ⁹ , Carole Egron ¹⁰, Gwendoline Jugie ¹, Maxime Bisseux ^{1,2}, Christine Archimbaud ^{1,2}, Céline Lambert ¹¹ , Cécile Henquell ^{1,2} and Jean-Luc Bailly ^{1,*}

- ¹ Université Clermont Auvergne, LMGE CNRS 6023, UFR de Médecine et des professions paramédicales, 63001 Clermont-Ferrand, France; maxime.duval@uca.fr (M.D.); amirand@chu-clermontferrand.fr (A.M.); gwendoline.jugie@uca.fr (G.J.); mbisseux@chu-clermontferrand.fr (M.B.); carchimbaud@chu-clermontferrand.fr (C.A.); chenquell@chu-clermontferrand.fr (C.H.)
 - ² CHU Clermont-Ferrand, Centre National de Référence Des Entérovirus et Parechovirus, Laboratoire de Virologie, 63003 Clermont-Ferrand, France
 - ³ CHU Clermont-Ferrand, Service Des Maladies Infectieuses et Tropicales, 63003 Clermont-Ferrand, France; olesens@chu-clermontferrand.fr
 - ⁴ CHU Clermont-Ferrand, Service de Thérapie Cellulaire et Hématologie Clinique, 63003 Clermont-Ferrand, France; jobay@chu-clermontferrand.fr
 - ⁵ CHU Clermont-Ferrand, Service de Pneumologie, 63003 Clermont-Ferrand, France; dcaillaud@chu-clermontferrand.fr
 - ⁶ CHU Clermont-Ferrand, Service de Gynécologie-Obstétrique, 63003 Clermont-Ferrand, France; dgallot@chu-clermontferrand.fr
 - ⁷ Service de Réanimation, Centre Jean Perrin, 63003 Clermont-Ferrand, France; alautrette@chu-clermontferrand.fr
 - ⁸ CHU Clermont-Ferrand, Centre de Référence et de Compétence Mucoviscidose, 63003 Clermont-Ferrand, France; smontcouquiol@chu-clermontferrand.fr
 - ⁹ CHU Clermont-Ferrand, Service Des Urgences, 63003 Clermont-Ferrand, France; jschmidt@chu-clermontferrand.fr
 - ¹⁰ CHU Clermont-Ferrand, Service de Pédiatrie Générale, 63003 Clermont-Ferrand, France; cegron@chu-clermontferrand.fr
 - ¹¹ CHU Clermont-Ferrand, Service Biométrie et Médico-Economie—Direction de la Recherche Clinique et Innovation, 63003 Clermont-Ferrand, France; clambert@chu-clermontferrand.fr
- * Correspondence: j-luc.bailly@uca.fr



Citation: Duval, M.; Mirand, A.; Lesens, O.; Bay, J.-O.; Caillaud, D.; Gallot, D.; Lautrette, A.; Montcouquiol, S.; Schmidt, J.; Egron, C.; et al. Retrospective Study of the Upsurge of Enterovirus D68 Clade D1 among Adults (2014–2018). *Viruses* **2021**, *13*, 1607. <https://doi.org/10.3390/v13081607>

Academic Editor: Petri Susi

Received: 6 July 2021

Accepted: 8 August 2021

Published: 13 August 2021

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



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Enterovirus D68 (EV-D68) has emerged as an agent of epidemic respiratory illness and acute flaccid myelitis in the paediatric population but data are lacking in adult patients. We performed a 4.5-year single-centre retrospective study of all patients who tested positive for EV-D68 and analysed full-length EV-D68 genomes of the predominant clades B3 and D1. Between 1 June 2014, and 31 December 2018, 73 of the 11,365 patients investigated for respiratory pathogens tested positive for EV-D68, of whom 20 (27%) were adults (median age 53.7 years [IQR 34.0–65.7]) and 53 (73%) were children (median age 1.9 years [IQR 0.2–4.0]). The proportion of adults increased from 12% in 2014 to 48% in 2018 ($p = 0.01$). All adults had an underlying comorbidity factor, including chronic lung disease in 12 (60%), diabetes mellitus in six (30%), and chronic heart disease in five (25%). Clade D1 infected a higher proportion of adults than clades B3 and B2 ($p = 0.001$). Clade D1 was more divergent than clade B3: 5 of 19 amino acid changes in the capsid proteins were located in putative antigenic sites. Adult patients with underlying conditions are more likely to present with severe complications associated with EV-D68, notably the emergent clade D1.

Keywords: enterovirus D68; respiratory conditions; adult patients; paediatric patients; next-generation sequencing; molecular epidemiology

1. Introduction

Enterovirus D68 (EV-D68) is a re-emerging, pathogenic picornavirus that causes severe lower respiratory diseases in the paediatric population. It is associated with acute flaccid

myelitis (AFM), a recently defined neurological illness [1]. The ability of EV-D68 to replicate within the upper and lower respiratory tracts is a key factor in the swift transmission of disease in the community, which results in large outbreaks [2–4]. EV-D68 illnesses have also been reported in healthy adults and those with underlying medical conditions, but the frequency of EV-D68 among different age groups has not been fully investigated. As for other enterovirus types, circulating strains of EV-D68 are genetically diverse and have been divided into four clades designated A–D [5,6]. The distribution of clades has been recorded over time and across countries but their frequency and the genetic and molecular variations among age groups remain elusive. To contribute to filling these knowledge gaps, we report the clinical characteristics of unselected patients with laboratory-confirmed EV-D68 respiratory disease. We also describe the changes that occurred at the genomes and proteins of EV-D68 clades reported in patient groups.

2. Materials and Methods

2.1. Patient Population, Study Design and Molecular Testing of Clinical Specimens

All patients with laboratory-confirmed EV-D68-associated disease and admitted to the University Hospital of Clermont-Ferrand from 1 June 2014 to 31 December 2018 were reviewed for the study. The respiratory specimens (nasopharyngeal swabs, nasopharyngeal aspirates, and broncho-alveolar lavages) were tested prospectively for enterovirus (EV) and rhinovirus (RV) with commercial RT-PCR assays, either RV/EV R-gene[®] kit or FilmArray[®] Respiratory Panel (bioMérieux, Marcy l’Etoile, France), as part of the routine screening for respiratory viral infections. When positive, the specimens were typed by sequencing the VP4/VP2 coding region or tested with an EV-D68 VP1 RT-PCR [7,8]. The complete or partial VP1 sequences of EV-D68-positive specimens were determined by in-house gene amplification and Sanger sequencing to assign a phylogenetic clade to the virus detected in each specimen. The VP1 sequences determined in this study were deposited under the accession numbers MT795858–MT795868. Data on patient characteristics, clinical manifestations, and co-morbidity factors were collected retrospectively from medical charts, and they were recorded in an anonymized form for each patient and analysed.

2.2. Construction of Metagenomic Libraries

Nucleic acids were extracted either from virus isolates at passage four ($n = 8$) or directly from clinical specimens ($n = 27$) with the NucliSENS[®] easyMAG[®] system (bioMérieux, Marcy l’Etoile, France). Virus isolation was performed in A549 cells (human Caucasian lung carcinoma) and the inoculated cultures were grown in a humidified 33 °C incubator with 5% CO₂. Reverse transcription into DNA was performed with Superscript III[®] (Invitrogen) and random or in-house primers for RNA extracted from virus isolates or clinical specimens, respectively. Two methods of amplification were used. The amplification of randomly synthesised cDNA was performed with overlapping in-house oligonucleotide primers and Phusion Flash[®] master mix (ThermoFisher). PCR products were purified with NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) before Sanger sequencing. The sequence of the amplicons obtained from virus isolates were determined with the Big Dye Terminator v.1.1 kit (Applied Biosystems) using the 3500 Dx Genetic Analyser[®] system (Applied Biosystems). The amplification of specifically synthesised cDNA was performed with in-house primers (Table S1) and the Platinum SuperFi enzyme (Invitrogen) to obtain 22/27 (2016, $n = 4/4$; 2018, $n = 18/23$) near full-length or whole genome amplicons. The amplicons were sequenced at the GENTYANE platform (INRAE, Clermont-Auvergne University, Clermont-Ferrand, France) by single molecule real-time sequencing with the Sequel I sequencer (Pacific Biosciences). The 3′ untranslated region was determined with an in-house amplification of the cDNA ends method.

2.3. Sequence Datasets, Phylogenetic and in Silico Analyses

The 30 EV-D68 genomes determined in this study were grouped with those available in the GenBank database (as of 1 February 2020, $n = 764$ sequences). The open reading

frame (ORF) sequences were used for the analyses (see below). A second dataset included 1433 whole VP1 gene sequences comprising 70 sequences from our patients, of which 32 were reported earlier [8–10]. Of the 38 VP1 sequences determined in this study, nine were obtained from the complete VP1 genes and 29 were derived from the whole genomes (Table S2). The open reading frame (ORF) and VP1 nucleotide sequence datasets were subjected to phylogenetic analyses with the Nextstrain pipeline [11]. BEAST2 software was used for assessing divergence times of clades under explicit evolutionary models and computing the posterior probability distribution with a set of phylogenetic trees to assess node support [12]. The untranslated regions (UTRs) were analysed with datasets including 660 (5'UTR) and 628 (3'UTR) sequences. Phylogenetic analyses were performed with PhyML v3.0 using the maximum likelihood method and the Generalised Time-Reversible evolutionary model, and the statistical test aLRT SH-like [13]. The amino acid (ORF) and nucleotide (UTRs) sequences were compared to identify polymorphic and clade-specific positions within the B3 and D clades. The frequency of amino acid residues and nucleotides per site was determined using all EV-D68 clades and the relevant sites were plotted with Weblogo 3 [14]. Amino acid changes were mapped to 3D structures reported previously for the capsid proteins (Fermon strain, PDB code 4WM8) and the 3D polymerase (virus strain JPOC10-378, PDB code 5XE0) [15,16].

2.4. Statistical Analysis

Statistical analysis was performed with Stata software (v. 15; StataCorp, College Station, TX, USA). All tests were two-sided, with a Type I error set at 0.05. Categorical variables were expressed as frequencies and associated percentages, and the age as median and interquartile range. Comparisons between independent groups (children/adults) were made with the chi-square test or Fisher's exact test for categorical variables and with the Mann–Whitney test for age.

3. Results

3.1. Clinical Characteristics of Patients

Routine diagnostic screening for RV/EV respiratory diseases was performed in 11365 respiratory samples from patients seen in the University Hospital of Clermont-Ferrand between 1 June 2014, and 31 December 2018. Of the 2101 respiratory specimens positive for RV/EV, 1836 (87%) were typed (Table 1). EV-D68 was detected in the specimens of 73 patients (median age 4 years [IQR 0.4–32.8]) of whom 61 (84%) were hospitalized. The 73 patients comprised 53 (73%) children (≤ 16 years; median age 19 years [IQR 0.2–4.0]; range 0.04–9.6) and 20 (27%) adults (>16 years; median age 53.7 years [IQR 34.0–65.7]; range 23.9–78.0). The number of laboratory-confirmed EV-D68 cases was stable in 2014, 2016, and 2018. In contrast, patient age varied with the proportion of adults increasing significantly from 12% (3/26) in 2014 to 22% (5/23) in 2016 and 48% (11/23) in 2018 ($p = 0.01$). The yearly proportions of respiratory specimens tested and subjected to enterovirus molecular typing in children and adults were stable in all three years.

Table 1. Yearly screening for rhinovirus/enterovirus (RV/EV) in respiratory samples from patients presenting to the University Hospital, Clermont-Ferrand, France.

Data ¹	Age Group ²	2014 ³	2015	2016	2017	2018	Total
Total samples tested	Adults	397 (55%)	1043 (58%)	2201 (70%)	1678 (59%)	1809 (63%)	7128 (63%)
	Children	324 (45%)	752 (42%)	948 (30%)	1153 (41%)	1060 (27%)	4237 (27%)
Positive detection of RV/EV	Adults	55 (14%)	103 (10%)	208 (9%)	134 (8%)	209 (12%)	709 (10%)
	Children	138 (43%)	225 (30%)	332 (35%)	335 (29%)	362 (34%)	1392 (33%)
Enterovirus typing	Adults	46 (84%)	91 (88%)	188 (90%)	121 (90%)	191 (91%)	637 (90%)
	Children	127 (92%)	183 (81%)	289 (87%)	276 (82%)	324 (90%)	1199 (86%)
EV-D68 typing	Adults	3 (12%)	0	5 (22%)	1 (100%)	11 (48%)	20 (27%)
	Children	23 (88%)	0	18 (78%)	0	12 (52%)	53 (73%)
	Median age	4 (0.7–6.9)		3.1 (0.2–7.6)		7.8 (0.5–54)	4 (0.4–32.8)
	Total	26	0	23	1	23	73

¹ Data are *n* (%) or median (IQR). ² Adults, patients aged >16 years; children, patients aged 0–16 years. ³ In 2014, the data were recorded from June 1st.

Children were more likely to be hospitalised than adults (91% vs. 65%, $p = 0.01$; Table 2) and less likely to be admitted to an intensive care unit (ICU) (13% vs. 38%, $p = 0.046$). In our population, 71/73 (97%) patients had respiratory signs. Upper respiratory tract infections were the most frequent signs in both children (62%) and adults (45%). Twenty-seven (51%) children had clinical signs of asthma as against one (5%) adult. Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) exacerbation was observed in five (25%) adults. Two clinical presentations were more frequent among adults with lung disease being reported in eight (40%) adults as against three (6%) children ($p = 0.001$) and neurological signs in seven (35%) adults compared to five (9%) children ($p = 0.01$). In adults, neurological signs were dominated by altered mental status ($n = 5$); sudden muscle weakness and cerebellitis were each observed in one adult. Of the 11 patients admitted to an ICU, nine (82%) had acute respiratory distress syndrome. There was one fatality reported in an infant presenting with congenital stridor and a co-infection with rhinovirus C.

Table 2. Demographic and clinical characteristics of patients presenting to the University Hospital, Clermont-Ferrand with enterovirus D68-associated diseases between 1 June 2014, and 31 December 2018.

Characteristics ¹	All Patients	Children	Adults	<i>p</i> Value
Total number of patients	73	53 (73%)	20 (27%)	
Age (years)	4.0 [0.4–32.8]	1.9 [0.2–4.0]	53.7 [34.0–65.7]	<0.001
Sex (male)	41 (56%)	33 (62%)	8 (40%)	0.09
Hospital admission	61 (84%)	48 (91%)	13 (65%)	0.01
ICU admission	11/61 (18%)	6/48 (13%)	5/13 (38%)	0.046
Fever	36 (49%)	25 (47%)	11 (55%)	0.55
Respiratory signs	71 (97%)	51 (96%)	20 (100%)	1.00
Upper respiratory tract infection	42 (58%)	33 (62%)	9 (45%)	0.18
Asthma	28 (38%)	27 (51%)	1 (5%)	<0.001
Bronchitis/Bronchiolitis	10 (14%)	10 (19%)	0 (0%)	0.053
Lung disease	11 (15%)	3 (6%)	8 (40%)	0.001
COPD exacerbation	5 (7%)	0 (0%)	5 (25%)	0.001
Acute respiratory distress	34 (47%)	28 (53%)	6 (30%)	0.08
Ear-Nose-Throat signs	2 (3%)	2 (4%)	0 (0%)	1.00
Neurological signs	12 (16%)	5 (9%)	7 (35%)	0.01
Digestive signs	9 (12%)	5 (9%)	4 (20%)	0.25
Cardiac signs	3 (4%)	2 (4%)	1 (5%)	1.00
Multiorgan failure	1 (1%)	0 (0%)	1 (5%)	0.27
All underlying conditions	49 (67%)	29 (55%)	20 (100%)	<0.001
History of asthma/wheezing	18 (25%)	17 (32%)	1 (5%)	0.02
Chronic lung disease	15 (21%)	3 (6%)	12 (60%)	<0.001
Chronic heart disease	7 (10%)	2 (4%)	5 (25%)	0.01
Chronic kidney disease	1 (1%)	0 (0%)	1 (5%)	0.27
Chronic liver disease	1 (1%)	0 (0%)	1 (5%)	0.27

Table 2. Cont.

Characteristics ¹	All Patients	Children	Adults	<i>p</i> Value
Diabetes mellitus	7 (10%)	1 (2%)	6 (30%)	0.001
Immunocompromising conditions	4 (5%)	2 (4%)	2 (10%)	0.30
Neurological disorders	1 (1%)	0 (0%)	1 (5%)	0.27
Current tobacco use	9 (12%)	0 (0%)	9 (45%)	-
Current alcohol overuse	4 (5%)	0 (0%)	4 (20%)	-
Obesity	3 (4%)	0 (0%)	3 (15%)	0.02
Pregnancy	4/32 (12%)	0/20 (0%)	4/12 (33%)	-
Other underlying conditions ²	6 (8%)	6 (11%)	0 (0%)	0.18
EV-D68 clade A	1 (1%)	1 (2%)	0 (0%)	-
EV-D68 clade B1	3 (4%)	3 (6%)	0 (0%)	-
EV-D68 clade B2	18 (25%)	17 (32%)	1 (5%)	-
EV-D68 clade B3	33 (45%)	24 (45%)	9 (45%)	-
EV-D68 clade D1	16 (22%)	6 (11%)	10 (50%)	0.001 ⁴
Clade not determined ³	2 (3%)	2 (4%)	0 (0%)	-

¹ Data are *n* (%) or median [IQR]. Data collected retrospectively from medical charts of patients. ² Congenital stridor (*n* = 2), premature (*n* = 2) one of which was associated with bronchopulmonary dysplasia, Gordon syndrome (*n* = 1), and stenosis of two pulmonary veins (*n* = 1).

³ Enterovirus D68 was genotyped with an enterovirus D68-specific RT-PCR, but the amplicons were not sequenced. ⁴ The statistical analysis compared the proportion of adults infected by the clades B2, B3, and D1; the data for the other two clades were not included. Abbreviations: ICU = intensive care unit. COPD = chronic obstructive pulmonary disease.

67% (49/73) of patients had one or more comorbidity or risk factors for respiratory infections. In adults, the most frequent were chronic lung disease (12/20, 60%) and smoking (9/20, 45%). The other comorbidities in adults were diabetes mellitus (6/20, 30%) and chronic heart disease (5/20, 25%). Of the 13 adult patients admitted to hospital, 10 (77%) had chronic lung disease and four of them were admitted to an ICU. Five (25%) patients aged 33 to 70 years old required management in an ICU with a median (IQR) duration stay of 15 days (6–29). The four adult female patients who were pregnant did not require hospitalisation. No complication was reported at delivery and the new-borns were healthy. Asthma or wheezing or both were uncommon in adults (1/20, 5%) but were the most frequent underlying conditions in children (17/53, 32%; *p* = 0.02).

Three children were co-infected with rhinovirus (*n* = 2) or coronavirus (*n* = 1). A microbiological screening including blood and expectoration cultures and urinary antigens (*Legionella* and *Pneumococcus*) was performed in 35 patients. *Pneumococcus* infection was detected in two hospitalised children and one hospitalised adult with COPD exacerbation, and colonisation with *Pseudomonas* and fungi was observed in two adult outpatients with cystic fibrosis.

3.2. Enterovirus Molecular Typing Data

Enterovirus molecular typing was performed prospectively by sequencing the VP4-VP2 genes in five (7%) specimens and the VP1 gene in 66 (90%) specimens (Table 2). The specimens of two other paediatric patients tested positive with an EV-D68-specific RT-PCR but the amplicons were not sequenced. The nucleotide sequences were used to assign a phylogenetic clade to the EV-D68 present in each specimen. In 2014, 18/26 (69%) patients were infected with clade B2, of whom all, but one, were children (Figure 1). The other eight patients were infected with clades D1 (*n* = 4; 2 adults), B1 (*n* = 3), and A (*n* = 1). Of the 23 patients recorded in 2016, 16 (70%) were infected with clade B3, of whom four (25%) were adults. One of the three non-clade B3 patients was an adult infected with clade D1; the other two were children infected with an EV-D68 whose clade was not determined. In 2018, B3 was the most frequent clade, affecting 13/23 (57%) patients, of whom five (39%) were adults. In the other 10 (43%) patients, of whom six (60%) were adults, EV-D68 was assigned to clade D1. Overall, clade D1 affected a higher proportion of adult patients (63%, *n* = 10/16) than clades B2 (6%, *n* = 1/18) and B3 (27%, *n* = 9/33) (*p* = 0.001). The proportion of patients who had an acute respiratory distress syndrome was higher in those infected with clade B2 (15/18, 83%) than those infected with clades B3 (10/33, 30%) or D1 (6/16, 38%)

($p = 0.001$). The five patients with COPD exacerbation had clade D1 infection ($p < 0.001$). Neurological signs were recorded in 12/73 (16%) patients, with a higher proportion in adults ($p < 0.01$). Altered mental status was reported in 5/20 (25%) adults: three were infected with clade B3, one with clade B2, and one with clade D1. Of the two adult patients infected with clade B3, one had signs of acute flaccid myelitis and the other of cerebellitis. Headaches were reported in two adults with clade D1 infection. Among the neurological signs reported in five children, irritability ($n = 2$) and hypotonia ($n = 2$) were associated with clades B3 and D1, respectively, and acute flaccid myelitis with clade B2 [10].

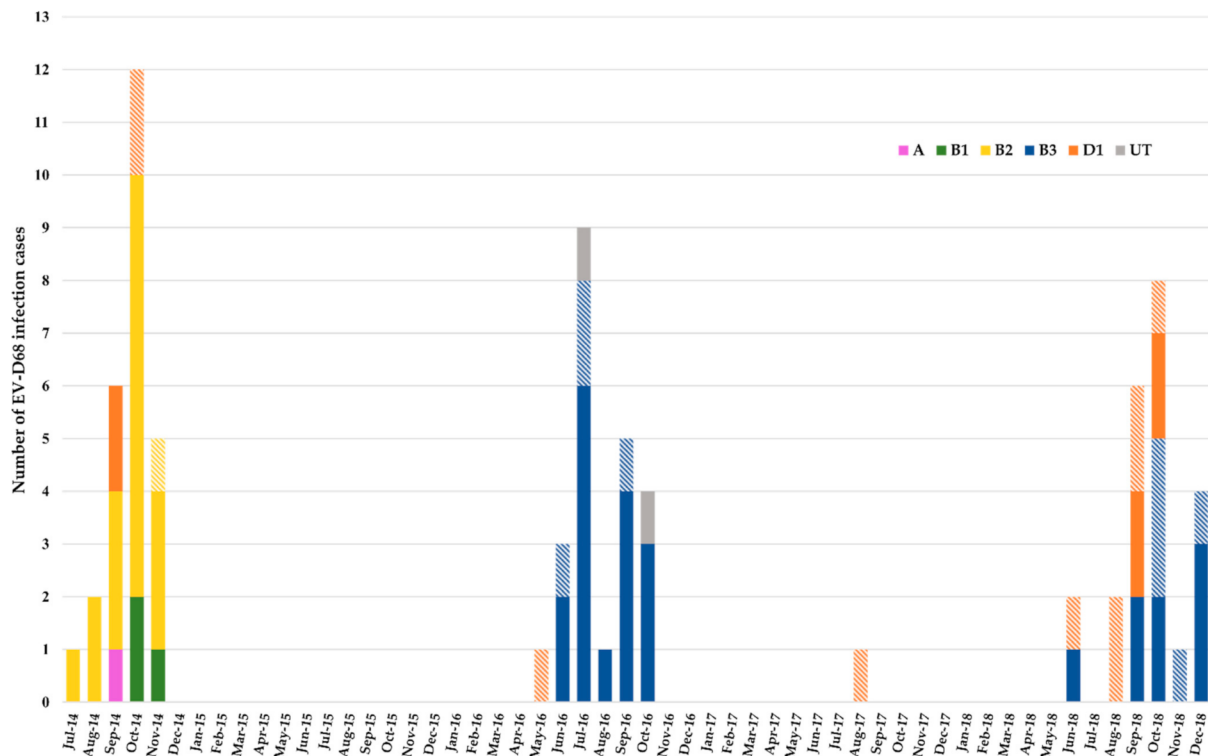


Figure 1. Monthly distribution of EV-D68 infections, Clermont-Ferrand, 2014–2018. Histogram colours match the EV-D68 clade related to the infection case as indicated on the graph. Hatched colours match EV-D68 in adult patients. Solid colours match EV-D68 in paediatric patients. UT: untyped.

3.3. Analysis of Clade D1 Complete Genomes

The leftover respiratory specimens were available for 46/73 patients and were used to determine the complete EV-D68 genomes (Table S2). The sequencing yield was better with the NGS approach directly from clinical specimens after amplification of the viral genome in one RT-PCR than with the Sanger method after cell culture (81% vs. 42%). The Ct values of the diagnostic RT-PCR available in 13 specimens that tested positive for EV-D68, ranged between 21.02 and 32.58. The mean sequencing coverage was 463 and 1767 full sequence reads, respectively, for the whole genome and near full-length amplicons. A phylogenetic tree was reconstructed for clade D (formerly designated A2) using eight genomes from this study and 28 genomes reported earlier in France and other countries (Figure 2A). The viral genomes in our patients were scattered within the D1 clade. Phylogenetic analysis of the larger VP1 sequence dataset confirmed this distribution pattern (Figure S1B). The close phylogenetic relationships of viruses in our and other French patients to those reported in neighbouring and distant countries were consistent with multiple introductions of EV-D68 during the same year and over years or with co-circulation of distinct lineages over time. The spread of the 2014 and 2018 EV-D68 lineages began shortly before our patients were infected. Sequence comparisons showed clade D-specific amino acid changes at 32 positions located throughout the open reading frame (Figure 2B). Six amino acid

changes (including two insertions of two amino acid residues in the VP1 protein) were reported earlier [5,17]. 19/32 (59%) amino acid changes were detected in the capsid proteins, of which five were placed in putative immunoreactive epitopes, i.e., the VP1 BC and DE loops and the VP1 C-terminus [15,18]. In the D1 viruses detected in French patients, VP1 position 86 had different residues over time (an isoleucine in the 2014 lineage and a valine in the 2018 lineage). The sequential amino acid changes were confirmed by analysis of the VP1 dataset (Figure S1B). VP1 phylogeny showed two distinct clusters among the D1 sequences reported in Europe in 2018 both of which arose from amino acid changes at four positions, I1V, I5M, I86V, and I231V. The overall clade D1 differed from the other clades by 13 (42%) other amino acid changes, located in the non-structural proteins (Figure 2B). The 5'UTR of clade D1 differed by 27 nucleotide positions from that of the other clades of which six were in the secondary-structure domains II ($n = 3$), III, IV, and VI (Figure S2). Clade D1 was not different from the other clades in the 3'UTR (data not shown).

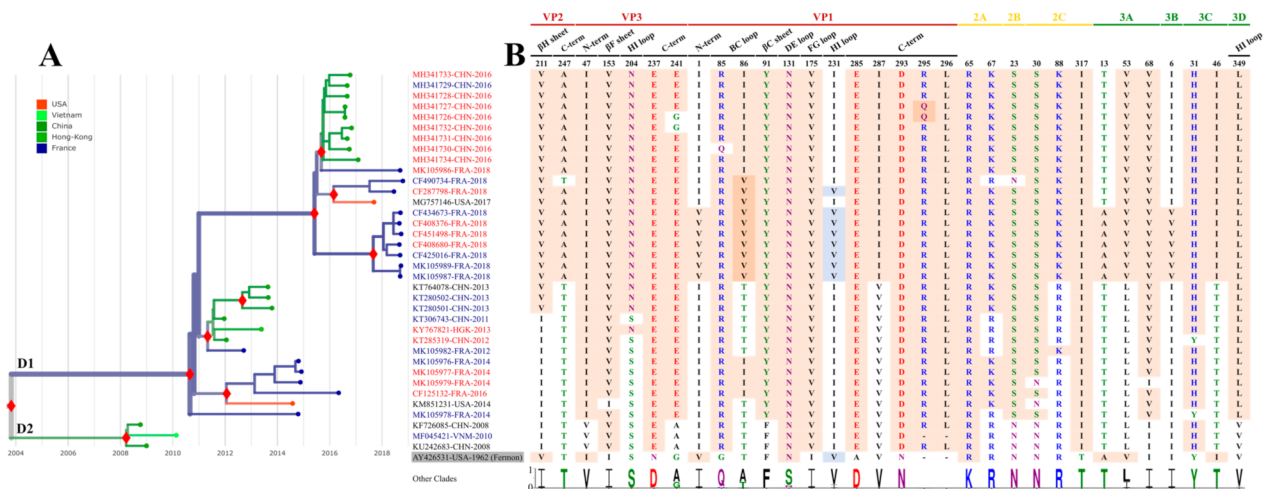


Figure 2. Phylogeny of EV-D68 clade D and molecular variation of viral proteins. **(A)** The phylogenetic tree was obtained with the Nextstrain pipeline using a global dataset of 734 EV-D68 whole genomes available in Genbank (as of 1 February 2020) and 30 new sequences obtained in this study. The solid red diamonds indicate statistical support of main nodes (posterior probability ≥ 0.98). The colours of sequence names match with age groups of related patients: red and blue colours match with adults (>16 years) and children (≤ 16 years), respectively. Sequence names in black had no corresponding information on related patient age. The branches are coloured according to the geographic origin. **(B)** Identification of protein positions having amino acid residues specific to clade D. The amino acid positions from other EV-D68 clades are expressed in percentages on the graph with Weblogo 3 [14]. Amino acids with pink background indicate specific positions. Amino acids with blue background match unpecific positions. Amino acids are coloured according to their chemistry.

3.4. Analysis of Clade B3 Complete Genomes

The phylogeny of clade B3 assessed with complete genomes indicated that viral sequences reported among French patients in 2018 were distributed in two main clusters, a pattern that suggests virus co-circulation or independent virus introductions (Figure 3A). The overall B3 viruses had distinctive amino acid changes at 15 positions throughout the ORF (Figure 3B), four of which (VP4/18, VP2/151, VP3/241, and 3Cpro/55) were identified earlier [19]. The amino acid changes at six positions (VP2/74, VP3/163, VP1/206, 2C/102, 2C/277, and 3Cpro/50) arose in 2015–2016, and clearly differentiate clade B3 from all the other clades. The two 2018 phylogenetic clusters arose with amino acid changes at eight positions, D237E (VP3), S131N (VP1), T142S (2Apro), R264K, G273S, and A277T (2C ATPase), S59N (3A) and K166R (3Dpol). The first two changes (VP3/D237E and VP1/S131N) were also seen in clade D sequences. The second change was shared with the 2018 clade B3 viruses reported in the USA, which form a third cluster characterised by two additional amino acid changes in the VP1 BC loop (A83T and A86T). Clade B3 differed

from the other clades by six nucleotide substitutions, one (U54C) in the 3'UTR and five in the 5'UTR (C107U, C188U (domain III), U654C, U678C, and A681G) (data not shown).

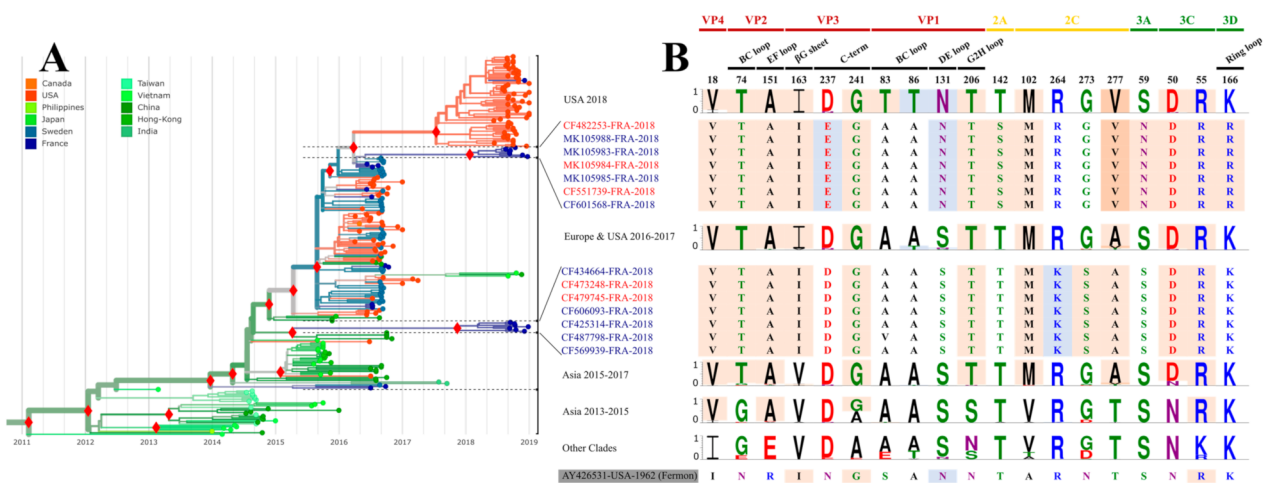


Figure 3. Phylogeny of EV-D68 clade B3 and molecular variation of viral proteins. **(A)** The phylogenetic tree was obtained with the Nextstrain pipeline using a global dataset of 734 EV-D68 whole genomes available in Genbank (as of 1 February 2020) and 30 new sequences obtained in this study. The solid red diamonds indicate statistical support of main nodes (posterior probability ≥ 0.98). The colours of sequence names match with age groups of related patients: red and blue colours match with adults (>16 years) and children (≤ 16 years), respectively. Sequence names in black had no corresponding information on related patient age. The branches are coloured according to the geographic origin. **(B)** Identification of protein positions having amino acid residues specific to clade B3. The amino acid positions from other EV-D68 clades are expressed in percentages on the graph with Weblogo 3 [14]. Amino acids with pink background indicate specific positions. Amino acids with blue background match unspecific positions. Amino acids are coloured according to their chemistry.

4. Discussion

This study shows that the prevalence of confirmed EV-D68 clade D1 was higher in adults than in children. Our study was made possible because since June 2014 all respiratory samples collected from patients of all ages admitted to or seen at the University Hospital of Clermont-Ferrand have been tested prospectively for enterovirus/rhinovirus, and all the positive cases have been tested for EV-D68. Despite a limited number of patients, this systematic evaluation enabled us to assess the frequency of EV-D68 in both children and adults, and together our data provide a consistent picture of virus transmission in both patient populations. The clinical presentations were dominated by respiratory symptoms, as previously reported [3,4,8]. EV-D68 was the most probable aetiological agent because viral and bacterial co-infections were infrequent in our patients. Upper respiratory tract infections and respiratory distress were reported in both paediatric and adult patients, but lung disease was more frequent in the adult group and only one case was associated with a co-infection with pneumococcus. Neurological signs were also more frequent in the adult patients and ranged from headache to signs of acute flaccid myelitis with muscle weakness of the lower limbs. In line with a previous observation [4], all adults had underlying conditions dominated by chronic respiratory diseases (60%), which were reported in 77% of the inpatient population. Respiratory comorbidities are recognized risk factors for severe infections with the respiratory syncytial virus, which frequently causes lung disease in adult patients [20]. Respiratory viruses such as rhinoviruses, respiratory syncytial virus, and influenza, are well-known exacerbation factors of COPD [21]. Like rhinoviruses, with which it shares common biological features [22], EV-D68 can act as a trigger for disease exacerbation in adults.

In our study, 12 adults (60%) with an EV-D68 infection were females of whom four were seen as outpatients during pregnancy. This figure was not significant in our patient population, but sex disparities have been reported in respiratory diseases caused by other

RNA viruses (influenza A virus, respiratory syncytial virus, and coronavirus) and been attributed in part to an effect of sex hormones on innate immune responses [23]. Hormone-triggered modulation of the expression of cellular receptors was reported to promote sex disparities in SARS coronavirus-2 infections [24]. Pregnancy is known as a risk factor for severe influenza A infections, possibly owing to immune suppression by elevated progesterone and oestrogen levels [23]. In our study, none of the four pregnant women had a severe respiratory infection.

Our phylogenetic analyses showed that clades B3 and D1 arose globally at the same time (between 2009 and 2010) but the upsurge of adult cases in our population was recorded in 2018, a year during which clade D1 re-emerged. Our data are consistent with those collected by the French National Reference Centre, which indicated a large increase in the proportion of adults infected with EV-D68, from 12% in 2014 to 9% in 2016 and 45% in 2018. In 2018, 79% ($n = 30/38$) of adult patients who tested positive for EV-D68 were infected with clade D1 (<https://cnr.chu-clermontferrand.fr/CNR> (accessed on 1 February 2020)). Previous studies suggested a predominance of the EV-D68 clade D1 in adults [17,25–28]. Analysis of our global dataset, which included VP1 sequences of worldwide origin and information on age, showed that 68% ($n = 67/99$) of clade D1 sequences were seen in respiratory samples of adults, which is consistent with a possible link between patient age and virus clade. These findings observed across countries suggest a high frequency of clade D1 among adults with an EV-D68 infection. However, our data show a twofold increase in the proportion of adults infected with EV-D68 clade B3 between 2016 (20%) and 2018 (38%), which indicates that the emergence of clade D1 is not the only factor associated with the upsurge of disease cases in adults. Overall, comorbidities or risk factors could account for the spread of EV-D68 within the adult population.

To examine the potential role of virus-associated factors in the emergence of EV-D68 in the adult patients, we expanded the number of full-length EV-D68 genomes from France and investigated the variations in viral proteins between clades B3 and D1. 59% of the 32 mutations found in clade D1 were in the capsid proteins but none occurred among the sites reported to bind sialic acid, the cell receptor reported for EV-D68 [15]. Five mutations arose in the epitopes displayed on the VP1 protein, which include the polymorphic position 86. In this protein, two additional variations could have an impact on the capsid surface, the deletion of an amino acid residue within the DE loop (position 128) and the insertion of two residues in the C-terminus (positions 295–296). The DE and BC loops are possible epitopes of EV-D68, and the C-terminus was recently described as an immunoreactive structure [15,18]. The amino acid changes found in clade D1 could lower cross-protection in adults by decreasing binding of antibodies generated in response to an earlier infection. Using sera collected in 2006 and 2016, two European studies showed that the neutralising antibody seroprevalence and geometric mean titres (GMT) to EV-D68 clade B3 increase with age [29,30]. Above the age of 20 years, which fits the characteristics of the adult population in our study, the seropositivity rate approaches 100% and is associated with high GMTs. Accordingly, it seems plausible that the adult patients of our study have been infected with an EV-D68 clade B3. Although evidence of cross-reactive immunity is not firmly established between EV-D68 clades, Karelehto and colleagues [29] showed that sera collected in 2006 and 2007 had high neutralising titres to the clade B3 CF183054 virus strain (isolated in the present study; Table S2), while in this study, we dated the emergence of this clade to 2009. In another study [31], adult sera collected in 2012 and 2013 (Kansas City population) neutralised the clade D1 virus KM851231-USA-2014 (see Figure 2A) less efficiently than clades B1 and B2 viruses, and the Fermon reference strain. The amino acid changes in the surface of clade D1 viruses could reduce cross-clade immunity and foster re-infection of adults, thereby explaining the increase in the adult case numbers in 2018 while D1 and B3 were in co-circulation. Gilrane and colleagues [2] recently reported clade D1 emergence during the 2018 outbreak in USA. These viruses are very close relatives of clade D1 viruses reported in our study and could have a similar epidemiological impact.

Selection bias in patient population can be excluded from our study, whose main limitations arise from its retrospective design. First, patient follow-up was not recorded. Acute exacerbation COPD caused by rhinovirus infection was associated with lung function decline and disease progression [21]. Accordingly, re-assessment of patients with underlying conditions would provide important clinical data on potential long-term respiratory sequelae after EV-D68 disease. Second, the retrospective collection of medical charts could have provided incomplete clinical data in some patients, and third, the origin of EV-D68 infections in the adult patients could not be investigated. Thus, an epidemiological survey was not possible to assess how the adults acquired their infection and whether they were in contact with sick children within familial or professional settings.

5. Conclusions

Widespread surveillance and routine screening of children and adults with comorbidities are essential to fill the gaps in knowledge about the dynamics of EV-D68 transmission between the different age groups. Health authorities and clinicians should be aware of the potentially severe complications in adults with underlying medical conditions arising from EV-D68 infection during periods of epidemic transmission. Systematic analysis of viral whole-genome data is important to trace the origin of EV-D68 outbreaks, investigate molecular drivers of virus transmission, and support evidence-informed public health decision.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/v13081607/s1>, Figure S1: Specific molecular evolution of EV-D68 clade D VP1, Figure S2: Phylogeny of EV-D68 clade D reconstructed from the 5' untranslated region (5'UTR) and nucleotide variations in the 5'UTR sequences. Table S1: In-house primers used for enterovirus D68 genome amplification, Table S2: Respiratory specimens available for isolation and/or whole genome sequencing and clinical characteristics of related 46 patients. Reference [32] is cited in Supplementary Materials.

Author Contributions: Conceptualization, M.D., A.M., and J.-L.B.; methodology, M.D., A.M., and J.-L.B.; validation, A.M. and J.-L.B.; formal analysis, M.D., A.M., M.B., and C.L.; investigation, M.D., G.J., and M.B.; resources, O.L., J.-O.B., D.C., D.G., A.L., S.M., J.S., and C.E.; data curation, M.D., A.M., and M.B.; writing—original draft preparation, M.D., A.M., and J.-L.B.; writing—review and editing, O.L., J.-O.B., D.C., D.G., A.L., S.M., J.S., C.E., C.A., and C.H.; visualization, M.D.; supervision, A.M., C.H., and J.-L.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding. The National Reference Center for enteroviruses and parechoviruses is supported by an annual grant from the French national public health network (Santé publique France).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and was approved by the ethics committee Sud-Est VI under the Institutional Review Board number 2019/CE23.

Informed Consent Statement: This non-interventional study included no additional procedures. Anonymized biological material was used for all analyses performed after the standard etiological diagnosis. All data were anonymised for the study. Informed consent for storage and further uses of samples was obtained from all patients at admission to the hospital.

Data Availability Statement: The genome sequences have been deposited to GenBank under the accession numbers MT789734–MT789755 and MT791927–MT791934.

Acknowledgments: We gratefully acknowledge all the hospital wards that took part in the collection of respiratory samples. We thank Adeline Duard and Nathalie Rodde for helpful technical assistance in virus molecular typing.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Messacar, K.; Asturias, E.J.; Hixon, A.M.; Van Leer-Buter, C.; Niesters, H.G.; Tyler, K.L.; Abzug, M.J.; Dominguez, S.R. Enterovirus D68 and acute flaccid myelitis—evaluating the evidence for causality. *Lancet Infect. Dis.* **2018**, *18*, e239–e247. [[CrossRef](#)]

2. Gilrane, V.L.; Zhuge, J.; Huang, W.; Nolan, S.M.; Dhand, A.; Yin, C.; Salib, C.; Shakil, F.; Engel, H.; Fallon, J.T.; et al. Biennial upsurge and molecular epidemiology of enterovirus D68 infection in New York, USA, 2014 to 2018. *J. Clin. Microbiol.* **2020**, *58*, e00284-20. [[CrossRef](#)]
3. Holm-Hansen, C.C.; Midgley, S.E.; Fischer, T.K. Global emergence of enterovirus D68: A systematic review. *Lancet Infect. Dis.* **2016**, *16*, e64–e75. [[CrossRef](#)]
4. Kramer, R.; Sabatier, M.; Wirth, T.; Pichon, M.; Lina, B.; Schuffenecker, I.; Josset, L. Molecular diversity and biennial circulation of enterovirus D68: A systematic screening study in Lyon, France, 2010 to 2016. *Eurosurveillance* **2018**, *23*, 1700711. [[CrossRef](#)]
5. Du, J.; Zheng, B.; Zheng, W.; Li, P.; Kang, J.; Hou, J.; Markham, R.; Zhao, K.; Yu, X.-F. Analysis of enterovirus 68 strains from the 2014 North American outbreak reveals a new clade, indicating viral evolution. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0144208. [[CrossRef](#)]
6. Yip, C.C.Y.; Lo, J.Y.C.; Sridhar, S.; Lung, D.C.; Luk, S.; Chan, K.-H.; Chan, J.F.W.; Cheng, V.C.C.; Woo, P.C.Y.; Yuen, K.-Y.; et al. First report of a fatal case associated with EV-D68 infection in Hong Kong and emergence of an interclade recombinant in China revealed by genome analysis. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1065. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Savolainen, C.; Blomqvist, S.; Mulders, M.N.; Hovi, T. Genetic clustering of all 102 human rhinovirus prototype strains: Serotype 87 is close to human enterovirus 70. *J. Gen. Virol.* **2002**, *83*, 333–340. [[CrossRef](#)]
8. Schuffenecker, I.; Mirand, A.; Josset, L.; Henquell, C.; Hecquet, D.; Pilorgé, L.; Petitjean-Lecherbonnier, J.; Manoha, C.; Legoff, J.; Deback, C.; et al. Epidemiological and clinical characteristics of patients infected with enterovirus D68, France, July to December 2014. *Eurosurveillance* **2016**, *21*, 30226. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Bisseux, M.; Colombet, J.; Mirand, A.; Roque-Afonso, A.-M.; Abravanel, F.; Izopet, J.; Archimbaud, C.; Peigue-Lafeuille, H.; Debros, D.; Bailly, J.-L.; et al. Monitoring human enteric viruses in wastewater and relevance to infections encountered in the clinical setting; a one-year experiment in central France, 2014 to 2015. *Eurosurveillance* **2018**, *23*, 17–00237. [[CrossRef](#)]
10. Lang, M.; Mirand, A.; Savy, N.; Henquell, C.; Maridet, S.; Perignon, R.; Labbé, A.; Peigue-Lafeuille, H. Acute flaccid paralysis following enterovirus D68 associated pneumonia, France, 2014. *Eurosurveillance* **2014**, *19*, 20952. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Hadfield, J.; Megill, C.; Bell, S.M.; Huddleston, J.; Potter, B.; Callender, C.; Sagulenko, P.; Bedford, T.; Neher, A.R. Nexstrain: Real-time tracking of pathogen evolution. *Bioinformatics* **2018**, *34*, 4121–4123. [[CrossRef](#)]
12. Bouckaert, B.; Heled, J.; Kühnert, D.; Vaughan, T.; Wu, C.-H.; Xie, D.; Suchard, M.A.; Rambaut, A.; Drummond, A.J. BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis. *PLoS Comput. Biol.* **2014**, *10*, e1003537. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Guindon, S.; Dufayard, J.F.; Lefort, V.; Anisimova, M.; Hordijk, W.; Gascuel, O. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* **2010**, *59*, 304–321. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Crooks, G.E.; Hon, G.; Ghandonia, J.M.; Brenner, S.E. WebLogo: A Sequence Logo Generator. *Genome Res.* **2004**, *14*, 1188–1190. [[CrossRef](#)]
15. Liu, Y.; Sheng, J.; Fokine, A.; Meng, G.; Shin, W.-H.; Long, F.; Kuhn, R.J.; Kihara, D.; Rossmann, M.G. Structure and inhibition of EV-D68, a virus that causes respiratory illness in children. *Science* **2015**, *347*, 71–74. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Wang, C.; Wang, C.; Li, Q.; Wang, Z.; Xie, W. Crystal Structure and Thermostability Characterization of Enterovirus D68 3D^{pol}. *J. Virol.* **2017**, *91*, e00876-17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Böttcher, S.; Prifert, C.; Weißrich, B.; Adams, O.; Aldabbagh, S.; Eis-Hübinger, A.M.; Diedrich, S. Detection of enterovirus D68 in patients hospitalised in three tertiary university hospitals in Germany, 2013 to 2014. *Eurosurveillance* **2016**, *21*, 30227. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Mishra, N.; Ng, T.F.F.; Marine, R.L.; Jain, K.; Ng, J.; Thakkar, R.; Caciula, A.; Price, A.; Garcia, J.A.; Burns, J.C.; et al. Antibodies to Enteroviruses in Cerebrospinal Fluid of Patients with Acute Flaccid Myelitis. *mBio* **2019**, *10*, e01903-19. [[CrossRef](#)]
19. Gong, Y.N.; Yang, S.L.; Shih, S.R.; Huang, Y.-C.; Chang, P.-Y.; Huang, C.-G.; Kao, K.-C.; Hu, H.-C.; Liu, Y.-C.; Tsao, K.-C. Molecular evolution and the global reemergence of enterovirus D68 by genome-wide analysis. *Medecine* **2016**, *95*, e4416. [[CrossRef](#)]
20. Ackerson, B.; Tseng, H.F.; Sy, L.S.; Solano, Z.; Slezak, J.; Luo, Y.; A Fischetti, C.; Shinde, V. Severe morbidity and mortality associated with respiratory syncytial virus versus influenza infection in hospitalized older adults. *Clin. Infect. Dis.* **2019**, *69*, 197–203. [[CrossRef](#)]
21. Linden, D.; Guo-Parke, H.; Coyle, P.V.; Fairley, D.; McAuley, D.; Taggart, C.C.; Kidney, J. Respiratory viral infection: A potential “missing link” in the pathogenesis of COPD. *Eur. Respir. Rev.* **2019**, *28*, 180063. [[CrossRef](#)]
22. Oberste, M.S.; Maher, K.; Schnurr, D.; Flemister, M.R.; Lovchik, J.C.; Peters, H.; Sessions, W.; Kirk, C.; Chatterjee, N.; Fuller, S.; et al. Enterovirus 68 is associated with respiratory illness and shares biological features with both the enteroviruses and the rhinoviruses. *J. Gen. Virol.* **2004**, *85*, 2577–2584. [[CrossRef](#)]
23. Kadel, S.; Kovats, S. Sex hormones regulate innate immune cells and promote sex differences in respiratory virus infection. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 1653. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. La Vignera, S.; Cannarella, R.; Condorelli, R.A.; Torre, F.; Aversa, A.; Calogero, A.E. Sex-specific SARS-CoV-2 mortality: Among hormone-modulated ACE2 expression, risk of venous thromboembolism and hypovitaminosis D. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 2948. [[CrossRef](#)]
25. Bal, A.; Sabatier, M.; Wirth, T.; Coste-Burel, M.; Lazrek, M.; Stefic, K.; Brengel-Pesce, K.; Morfin, F.; Lina, B.; Schuffenecker, I.; et al. Emergence of enterovirus D68 clade D1, France, August to November 2018. *Eurosurveillance* **2019**, *24*, 1800699. [[CrossRef](#)]
26. González-Sanz, R.; Taravillo, I.; Reina, J.; Navascués, A.; Moreno-Docón, A.; Aranzamendi, M.; Romero, M.P.; Del Cuerpo, M.; Pérez-González, C.; Castro, S.P.; et al. Enterovirus D68-associated respiratory and neurological illness in Spain, 2014–2018. *Emerg. Microbes Infect.* **2019**, *8*, 1438–1444. [[CrossRef](#)]

27. Lau, S.K.P.; Yip, C.C.Y.; Zhao, P.S.-H.; Chow, W.-N.; To, K.K.W.; Wu, A.K.L.; Yuen, K.-Y.; Woo, P.C.Y. Enterovirus D68 infections associated with severe respiratory illness in elderly patients and emergence of a novel clade in Hong Kong. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 25147. [[CrossRef](#)]
28. Pellegrinelli, L.; Giardina, F.; Lunghi, G.; Renteria, S.C.U.; Greco, L.; Fratini, A.; Galli, C.; Piralla, A.; Binda, S.; Pariani, E.; et al. Emergence of divergent enterovirus (EV) D68 sub-clade D1 strains, northern Italy, September to October 2018. *Eurosurveillance* **2019**, *24*, 1900090. [[CrossRef](#)]
29. Karelehto, E.; Koen, G.; Benschop, K.; Klis, F.; van der Pajkt, D.; Wolthers, K. Enterovirus D68 serosurvey: Evidence for endemic circulation in the Netherlands, 2006 to 2016. *Eurosurveillance* **2019**, *24*, 1800671. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Kamau, E.; Harvala, H.; Blomqvist, S.; Nguyen, D.; Horby, P.; Pebody, R.; Simmonds, P. Increase in Enterovirus D68 Infections in Young Children, United Kingdom, 2006-2016. *Emerg. Infect. Dis.* **2019**, *25*, 1200–1203. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Harrison, C.J.; Weldon, W.C.; Pahud, B.A.; Jackson, M.A.; Oberste, M.S.; Selvarangan, R. Neutralizing antibody against enterovirus D68 in children and adults before 2014 outbreak, Kansas City, Missouri, USA. *Emerg. Infect. Dis.* **2019**, *25*, 585–588. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Tan, Y.; Hassan, F.; Schuster, J.E.; Simenauer, A.; Selvarangan, R.; Halpin, R.A.; Lin, X.; Fedorova, N.; Stockwell, T.; Lam, T.Y.; et al. Molecular Evolution and Intraclade Recombination of enterovirus D68 during the 2014 Outbreak in the United States. *J. Virol.* **2016**, *90*, 1997–2007. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Retrospective study of the upsurge of enterovirus D68 clade D1 among adults (2014–2018)

Maxime Duval, Audrey Mirand, Olivier Lesens, Jacques-Olivier Bay, Denis Caillaud, Denis Gallot, Alexandre Lautrette, Sylvie Montcouquiol, Jeannot Schmidt, Carole Egron, Gwendoline Jugie, Maxime Bisseux, Christine Archimbaud, Céline Lambert, Cécile Henquell, Jean-Luc Bailly

Figure S1

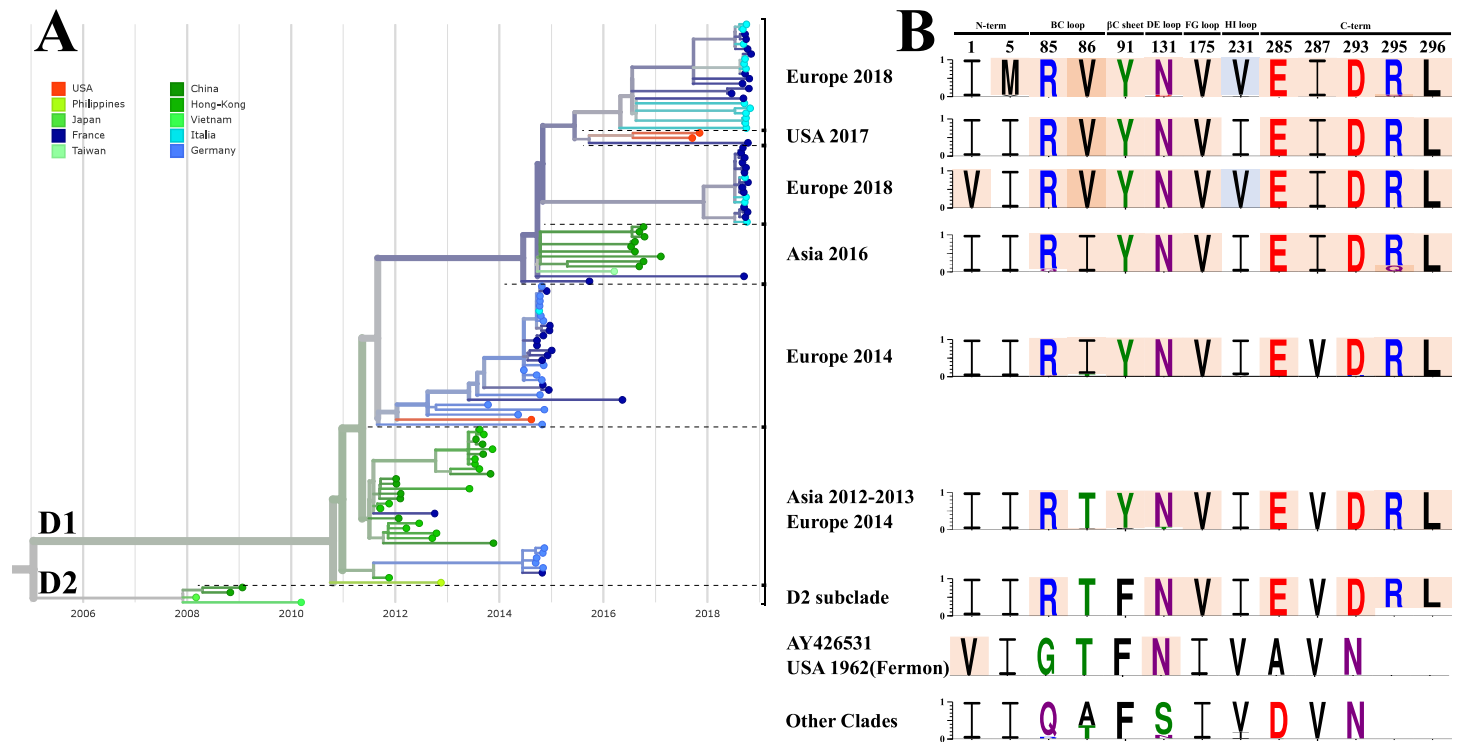


Figure S1. Phylogeny of EV-D68 clade D reconstructed from the VP1 gene and molecular evolution of the VP1 protein. (A) The phylogenetic tree was obtained with the Nextstrain pipeline 11 using a global dataset of 1433 EV-D68 whole VP1 sequences available on Genbank (as of 01.02.2020) including 64 sequences obtained in this study. The colours of sequence names match with age groups of related patients: red and blue colours match with adult (>16 years) and children (≤16 years) patients, respectively. Sequence names in black had no corresponding information on related patient age. (B) The molecular analysis was performed to identify amino-acid positions having amino-acid residues specific to clade D sequences. The amino-acid positions related to sequence clusters are expressed in percentages on the graph with Weblogo 3. 14 Amino acid residues with a pink background are specific to clade D and amino acid residues with a blue background are shared between different clades. Amino acids are coloured according to their chemistry.

Figure S2

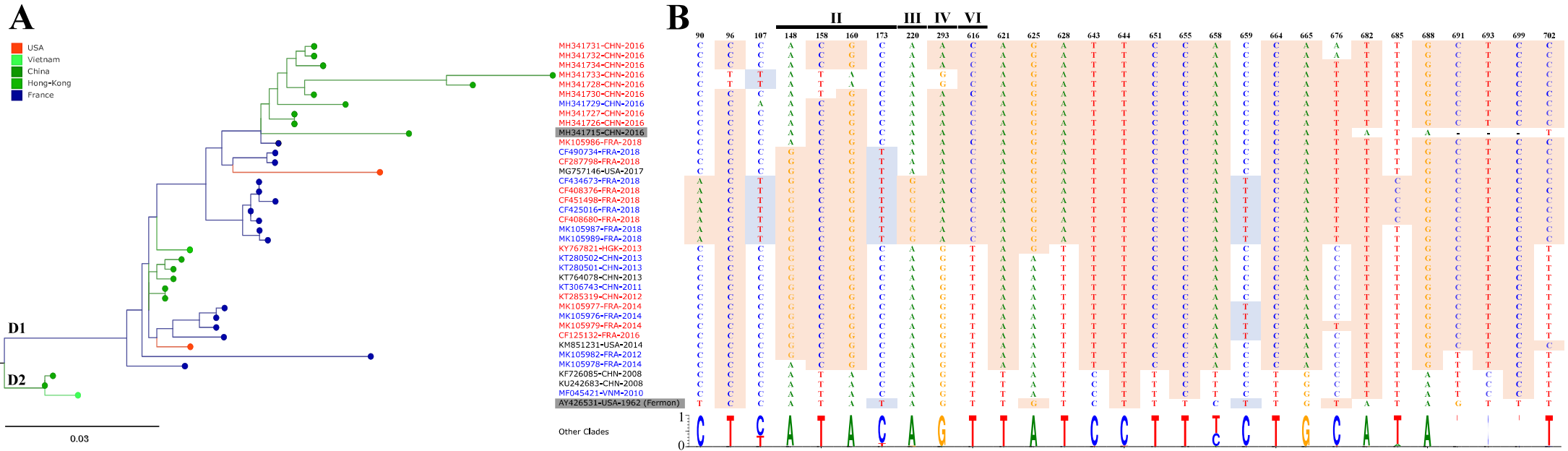


Figure S2. Phylogeny of EV-D68 clade D reconstructed from the 5' untranslated region (5'UTR) and variations in the 5'UTR sequences. (A) The phylogenetic tree was obtained with the program phym1 v3.0 13 using a global dataset of 660 EV-D68 whole 5'UTR sequences available on Genbank (as of 01.02.2020) including 30 sequences obtained in this study. The colours of sequence names match with age groups of related patients: red and blue colours match with adult (>16 years) and children (≤16 years) patients, respectively. Sequence names in black had no corresponding information on related patient age. (B) The molecular analysis was performed to identify positions having specific nucleotide changes. The nucleotide positions related to sequence clusters are expressed in percentages on the graph with Weblogo 3.¹⁴ Nucleotides with a pink background are specific to clade D and nucleotides with a blue background are shared between different clades.

Table S1. In-house primers used for enterovirus D68 genome amplification.

Reverse transcription into DNA	Reverse	5'-TTT-TTT-TTT-TTT-TTT-TTT-TTT-TTT-TGG-YCC-CCA-AGT-GRC-CAA-AAT-TTA-CCT-C-3'
Near full-length genome amplification	Forward	5'-GAC-AGC-TTA-TCA-TCG-TAA-TAC-GAC-TCA-CTA-TAG-GGT-TAA-AAC-AGC-CTT-GGG-GTT-G-3'
	Reverse	5'-CGT-CTA-AGA-CTA-GAR-TAT-GCA-GGT-AGT-G-3'
Whole genome amplification ^a	Reverse	5'-GGY-CCC-CAA-GTG-RCC-AAA-ATT-TAC-CTC-3'
3' untranslated region amplification ^b	Forward	5'-ATT-AGT-AAT-GAC-ACC-AGC-3'
	Reverse	5'-CAG-GAA-ACA-GCT-ATG-ACC-GTT-TTT-TTT-TTT-TTT-T-3'

^a Same forward primer used than for near full-length genome amplification.

^b Reverse transcription into DNA was performed with the same reverse primer used for amplification and obtained from Tan, Y. et al. 2016 [31]

Table S2. Respiratory specimens available for isolation and/or whole genome sequencing and clinical characteristics of related 46 patients

Specimen	Collection date	Age (years)	Sex	Clinical presentations	Specimen material	Ct	Strain designation	Clade	Accession number
1	05/10/2014	5-74	F	URTI, asthma, respiratory distress	NPA	NA	CF279027	B2	LN681325
2	14/10/2014	4-43	M	URTI, asthma, respiratory distress	NPA	NA	CF287062	B1	LN681327
3	25/10/2014	0-10	F	URTI, fever	NPA	NA	CF298032	B1	LN681332
4	02/11/2014	7-83	F	Asthma, respiratory distress	NPA	NA	CF307209	B2	MT791927
5	04/05/2016	53-60	F	COPD exacerbation, respiratory distress	NPS	20-87	CF125132	D1	MT791934
6	01/07/2016	0-17	M	URTI, bronchitis-bronchiolitis, fever	NPA	20-21	CF183054	B3	MT791933
7	06/07/2016	55-96	M	Lung disease, respiratory distress, fever	NPS	NA	CF188029	B3	MT795864
8	07/07/2016	1-92	M	Asthma, respiratory distress, fever	NPA	NA	CF190038	B3	MT791932
9	09/07/2016	4-00	M	URTI, asthma, respiratory distress, fever	NPA	22-62	CF193002	B3	MT789734
10	11/07/2016	78-00	F	Lung disease, cerebellitis, altered mental status, fever	BAF	NA	CF193158	B3	MT789735
11	11/07/2016	1-42	F	Asthma	NPA	NA	CF194006	B3	MT791930
12	12/07/2016	1-92	M	URTI, asthma, fever	NPS	24-51	CF195004	B3	MT789737
13	14/07/2016	6-21	F	URTI, asthma, fever	NPA	21-46	CF197014	B3	MT795863
14	13/08/2016	0-04	F	Bronchitis-bronchiolitis, fever	NPA	16-99	CF226028	B3	MT791929
15	11/09/2016	0-10	M	URTI	NPS	21-04	CF256006	B3	..
16	15/09/2016	3-90	M	Asthma	NPA	NA	CF259082	B3	..
17	22/09/2016	0-10	F	URTI, digestive signs, fever	NPA	22-82	CF266116	B3	MT789736
18	25/09/2016	0-17	M	URTI, bronchitis-bronchiolitis, respiratory distress	NPA	21-13	CF270004	B3	MT791928
19	29/09/2016	50-14	F	URTI, lung disease, fever	NPS	32-72	CF273012	B3	MT795868
20	02/10/2016	0-14	M	URTI, bronchitis-bronchiolitis	NPA	22-89	CF277014	B3	MT795867
21	02/10/2016	0-17	F	URTI	NPA	29-84	CF277009	B3	..
22	05/10/2016	0-42	F	URTI, respiratory distress, infant sudden death	NPA	38-69	CF279125	UT	..
23	12/10/2016	3-58	M	URTI, asthma, fever	NPS	24-86	CF241733	B3	MT791931
24	15/06/2018	34-17	F	URTI, headaches, fever	NPS	23-97	CF287798	D1	MT789751
25	24/06/2018	4-00	M	Asthma, respiratory distress, digestive signs	NPS	37-52	CF301306	B3	MT795861
26	30/08/2018	50-33	F	URTI, lung disease	NPS	30-63	CF408376	D1	MT789752
27	30/08/2018	69-42	F	COPD exacerbation, fever	NPS	23-53	CF408680	D1	MT789750
28	09/09/2018	0-17	M	URTI, irritability, fever	NPA	21-09	CF425016	D1	MT789749
29	10/09/2018	0-17	M	URTI, irritability, fever	NPA	23-75	CF425314	B3	MT789741
30	14/09/2018	0-92	M	URTI, bronchitis-bronchiolitis, respiratory distress, fever	NPS	26-38	CF434664	B3	MT789748
31	14/09/2018	3-50	M	Digestive signs	NPA	32-58	CF434673	D1	MT789753
32	24/09/2018	66-17	M	COPD exacerbation	NPS	31-62	CF451498	D1	MT789754
33	25/09/2018	57-40	M	URTI, headaches, digestive signs, fever	NPA	36-18	CF452824	D1	MT795858
34	08/10/2018	69-91	M	Muscle weakness, altered mental status, respiratory distress, cardiac signs	NPS	27-27	CF473248	B3	MT789739
35	11/10/2018	54-25	F	URTI	NPA	25-75	CF479745	B3	MT789743
36	12/10/2018	53-83	M	Respiratory distress, lung disease, altered mental status, fever	NPS	20-02	CF482253	B3	MT789747
37	15/10/2018	0-11	M	URTI, respiratory distress	NPA	40-70	CF485820	D1	MT795859
38	16/10/2018	2-33	F	URTI, respiratory distress	NPS	29-48	CF487798	B3	MT789740
39	18/10/2018	0-08	M	URTI, bronchitis-bronchiolitis, hypotonia	NPA	29-64	CF490734	D1	MT789755
40	19/10/2018	5-00	F	URTI, fever	NPS	ND	CF493730	B3	..

41	30/10/2018	65-20	M	Respiratory distress, lung disease, sepsis, altered mental status, multivisceral failure, digestive signs	BAF	31-62	CF511948	D1	MT795860
<u>42</u>	23/11/2018	41-75	M	URTI, asthma, fever	NPS	NA	CF551739	B3	MT789746
<u>43</u>	04/12/2018	7-83	M	URTI	NPS	NA	CF569939	B3	MT789738
<u>44</u>	05/12/2018	33-67	F	URTI, digestive signs	NPS	NA	CF572239	B3	MT789742
<u>45</u>	22/12/2018	0-08	M	URTI, respiratory distress, bronchitis-bronchiolitis, hypotonia, fever	NPA	NA	CF601568	B3	MT789745
<u>46</u>	26/12/2018	0-13	M	URTI, digestive signs, fever	NPA	NA	CF606093	B3	MT789744

Underlined specimen numbers match with obtention of whole genome sequence. URTI=upper respiratory tract infection. COPD=chronic obstructive pulmonary disease. NPA=nasopharyngeal aspirate. NPS=nasopharyngeal swab. BAF=bronchoalveolar fluid. ND=not detected. UT=untyped. NA= Not available

II. Commentaires de l'article

A. Caractéristiques épidémiologiques des infections à EV-D68

L'article ci-dessus présente les principaux résultats concernant trois des quatre objectifs de cette thèse. Nous rapportons les caractéristiques cliniques des patients infectés par l'EV-D68 admis ou vus en consultation entre 2014 et 2018 au CHU de Clermont-Ferrand et comparons les données de la population pédiatrique et des patients adultes.

La robustesse des résultats présentés repose sur la surveillance mise en place par le CHU de Clermont-Ferrand entre juin 2014 et décembre 2018. Une large majorité des échantillons respiratoires collectés chez des patients de tout âge, hospitalisés ou non, a été testée pour l'EV-D68. Malgré un nombre limité de patients, cette surveillance systématique a permis d'évaluer la fréquence des infections à EV-D68 chez les enfants et les adultes et offre une bonne représentation de la transmission du virus au sein de la population globale de patients.

Un sous-génotypage a aussi été réalisé permettant le traçage phylogénétique précis du virus détecté pour chaque patient. À partir des génomes viraux complets déterminés soit pour des isolats viraux ou directement dans les prélèvements cliniques, les variations génétiques des sous-clades B3 et D1 sont également décrites. L'étude a ainsi permis de montrer qu'il existait une corrélation entre l'émergence du sous-clade D1 et l'augmentation des infections chez les adultes. Nous montrons aussi que ce sous-clade présente une forte divergence génétique par rapport à tous les autres.

B. Actualisation des données épidémiologiques post 2018

2019. L'EV-D68 a été associé à 112 cas d'infections en Europe ([Tableau 3](#)), rapportées en majorité chez les enfants (n=78/112, 70%) et causés par des virus assignés aux clades B3 (n=47/55, 86%) et D1 (n=8/55, 15%). Ces cas ont été rapportés entre août et décembre dans les pays suivants : Allemagne (n=36/112, 32%), France (n=25/112, 22%), Danemark (n=21/112, 19%), Pays-Bas (n=19/112, 17%) et Suède (n=11/112, 10%) (Midgley et al., 2020). L'EV-D68 a également été rapporté aux États-Unis ([Tableau 2](#)) chez des enfants (n=6 ; Shah et al., 2021) ainsi qu'en Chine (n=3) où il était associé au clade D1 (Liu et al., 2021) ([Tableau 4](#)). Ce sont les

dernières données concernant des infections respiratoires à EV-D68 avant la pandémie de Covid-19.

2020 - 2021. Pendant cette période, le virus est redevenu un pathogène respiratoire rarement détecté, avant d'être associé à une nouvelle épidémie en Europe à la fin de l'année 2021. Les gestes barrières et les autres mesures sanitaires mises en place dans de nombreux pays pendant la pandémie de Covid-19 ont selon toute vraisemblance impacté la circulation de l'EV-D68. L'augmentation de l'activité de diagnostic liée au Covid-19 a pu aussi affecter la recherche de l'infection à EV-D68 par l'arrêt du diagnostic des infections à rhinovirus-EV et du génotypage au plus fort des différentes vagues épidémiques. Entre janvier et mars 2020, le Centre National de Référence des Entérovirus et Paréchovirus (<https://cnr.chu-clermontferrand.fr/CNR/Pages/Activit%C3%A9CNR.aspx>, au 01.09.21) a identifié 26 cas (Tableau 3) d'infections dont 18 pédiatriques (69%). En 2020, seuls la Malaisie (n=1 adulte, clade A ; Y. M. Chong et al., 2021) et les États-Unis (n=30 enfants ; Shah et al., 2021) ont rapporté des cas d'infection à EV-D68 (Tableaux 2 et 4).

À la mi-octobre 2021, 139 cas avaient été rapportés dans huit pays européens (Tableau 3) dont 129 infections (93%) chez des enfants (Benschop et al., 2021). Début décembre, ce chiffre dépassait le millier de cas dans 11 pays européens (Données du réseau ENPEN, non publiées). L'épidémie française représente un total de 171 cas, dont 162 (95%) chez des enfants (données non publiées). Toutes les infections étaient associées au clade B3. Un cluster de 33 infections pédiatriques, également associées au clade B3, a récemment été rapporté entre mai et octobre 2021 en Israël (Erster et al., 2022) (Tableau 5). Aux États-Unis, dans le Maryland (Tableau 2), un cluster de 17 infections majoritairement pédiatriques (n=15/17 ; 88%), rapporté entre septembre et octobre 2021, a été associé au clade B3 (Fall et al., 2022).

C. Méthodes de séquençage employées

Deux stratégies de séquençage ont été utilisées pour séquencer les génomes d'EV-D68 dans les échantillons cliniques disponibles pour 50 patients. Au total, 30 génomes d'EV-D68 complets (n=25) ou sans la région 3' non codante (n=5) ont été obtenus, trois d'entre eux avec les deux stratégies de séquençage. Les séquences ont été déposées dans la base de données GenBank, sous les numéros d'accès MT789734 – MT789755 et MT791927 – MT791934. Notre étude a permis d'augmenter le nombre des génomes disponibles pour la France (15

séquences au moment du dépôt) et notre échantillon représentait alors 18% (n=30/163) des génomes rapportés pour l'Europe.

C.1. Séquençage « Sanger » du génome d'isolats viraux

Méthodologie. Les échantillons respiratoires ont été filtrés avant l'inoculation de cellules A549 (adénocarcinome d'épithélium alvéolaire ; cellules présentant des propriétés biochimiques et morphologiques de pneumocytes de type II). Les cultures ont été maintenues à 33°C et examinées en microscopie quotidiennement. L'infection virale a été stoppée après une semaine d'incubation ou dès l'observation d'un effet cytopathique. Les cultures ont subi trois cycles de congélation/décongélation et les débris cellulaires ont été éliminés par centrifugation. Les surnageants ont ensuite été utilisés pour inoculer de nouvelles cellules en culture. Cette opération a été répétée quatre fois ou plus si nécessaire. Les acides nucléiques totaux extraits pour chaque passage et la charge virale a été déterminée par RT-PCR semi-quantitative (Rhinovirus/Enterovirus R-gene[®], bioMérieux). Les acides nucléiques extraits à partir du 4^{ème} passage ont été utilisés pour réaliser une transcription inverse (Superscript III, Invitrogen) à l'aide d'amorces aléatoires. L'ADNc a servi pour synthétiser quatre amplicons chevauchants (Phusion Flash, ThermoFisher Scientific) avec des amorces spécifiques. La séquence de la région 3' non codante a été déterminée avec une méthode RACE (rapid amplification of cDNA-ends) combinant une amorce sens dans la séquence 3D et une amorce inverse complémentaire M13-oligo(dT)₁₈ (Tan et al. 2016). La taille de l'amplicon, environ 400 nucléotides, a été contrôlée par électrophorèse en gel d'agarose. Les produits PCR purifiés ont été séquencés avec le kit Big Dye Terminator v1.1 (Applied Biosystems) et analysés à l'aide du séquenceur 3500 Dx Genetic Analyser (Applied Biosystems). Les chromatogrammes ont été analysés avec le logiciel BioEdit pour vérifier la qualité des séquences, éliminer les erreurs et assembler les contigs.

Résultats. Une souche a été isolée dans les cellules A549 en culture à partir de 11 des 23 (48%) échantillons respiratoires testés. La charge virale a augmenté au cours des passages successifs effectués et l'effet cytopathique était de plus en plus prononcé. Il existe une relation entre le succès de l'isolement et la charge virale évaluée avec la valeur Ct du test utilisé pour le diagnostic virologique. Les prélèvements avec lesquels une souche a été isolée, présentaient des Ct compris entre 16,99 et 24,86 (moyenne = 21,75 ; valeurs Ct connues pour 7/11 prélèvements). Lorsqu'une souche n'a pas été isolée, les Ct étaient compris entre 21,04

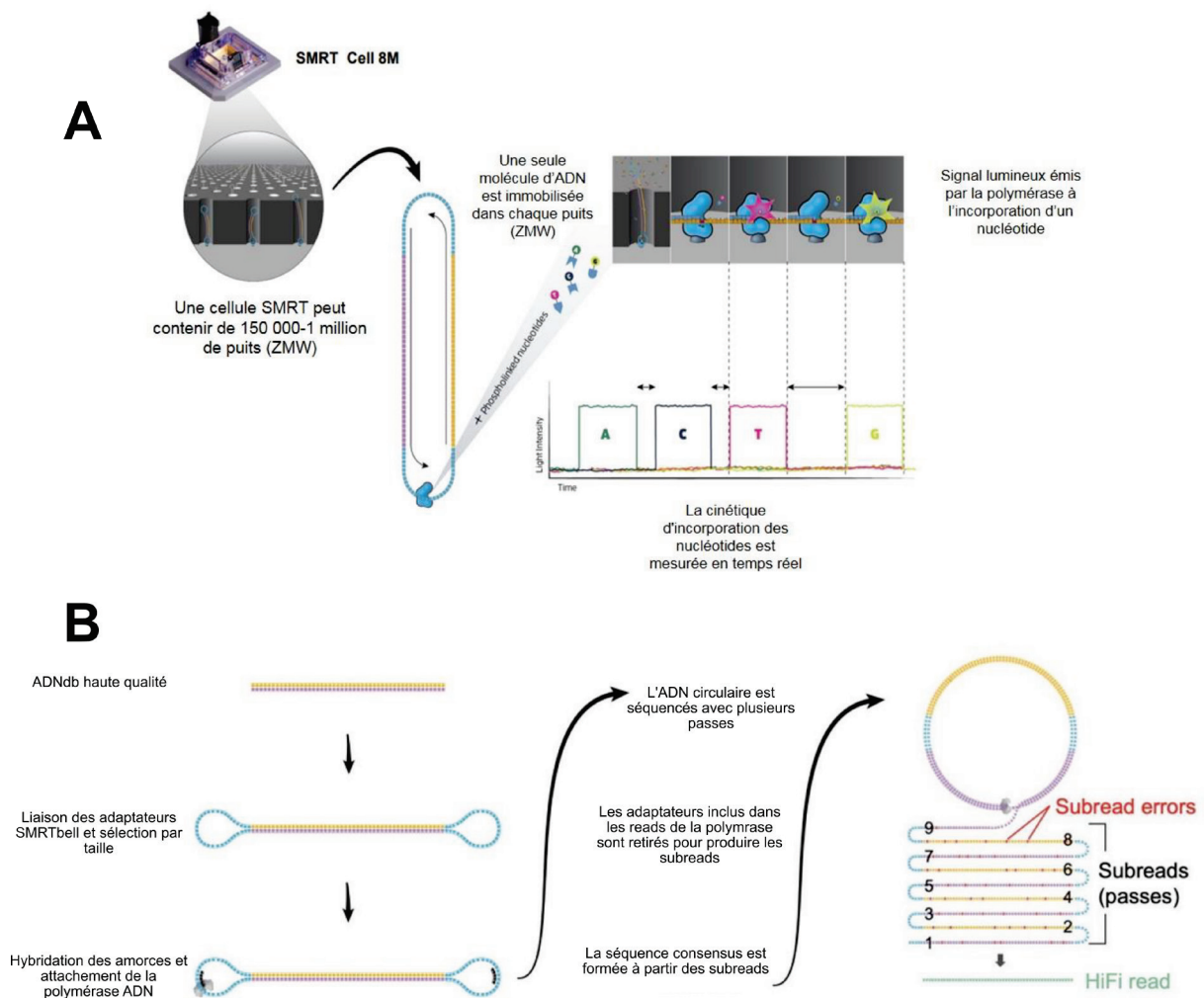


Figure 17 : Principe général de la technologie de séquençage SMRT (Single-molecule real-time). (A) Séquençage en temps réel des molécules d'ADN. Le séquençage en temps réel des molécules d'ADN est effectué dans des nano-puits désignés ZMW (zero-mode waveguides) d'une cellule pouvant en contenir entre 150 000 et 4 000 000 selon le type de séquenceur. Une ADN polymérase est fixée au fond de chaque nano-puits et incorpore les nucléotides pendant la lecture de l'ADN à séquencer, ce qui se traduit par l'émission d'un signal lumineux. (B) Stratégie de séquençage par circularisation. L'autre caractéristique de la méthode est la circularisation de la matrice ADN grâce à des adaptateurs (SMRTbells) qui lient l'extrémité 5' d'un brin et l'extrémité 3' de l'autre brin, formant ainsi une épingle à cheveux à chaque bout. Cette stratégie dite de Circular Consensus Sequence (CCS) permet ainsi plusieurs lectures des deux brins d'ADN par l'ADN polymérase. Les boucles de lecture réalisées permettent de générer plusieurs séquences sens et antisens dites « subreads ». (D'après la notice PacBio).

et 38,69 (moyenne = 27,73 ; n=6/12 prélèvements). Les génomes complets à 100% ont été déterminés pour les 11 souches isolées en culture. Selon les souches, les surnageants utilisés correspondaient aux passages 4 à 7 et les valeurs Ct étaient comprises entre 14,6 et 24,84 (moyenne = 16,6) (cf. Tableau S2, matériels supplémentaires de l'article).

C.2. Séquençage « SMRT » à partir des échantillons cliniques

Méthodologie. Les acides nucléiques totaux ont été extraits à partir des échantillons respiratoires. La synthèse d'ADNc a ensuite été effectuée à l'aide d'une amorce dont la cible couvre la fin de la région 3' non codante et la queue poly(A). Deux méthodes d'amplification, avec l'enzyme Platinum SuperFi (Invitrogen) ont ensuite été utilisées. (i) L'amplification d'un fragment d'environ 7250 nucléotides couvrant le génome viral depuis l'extrémité 5' non codante jusqu'à la fin de la séquence 3D. La méthode d'amplification RACE a été utilisée pour déterminer la région 3' non codante. (ii) L'amplification du génome viral complet en un seul amplicon. Les amplicons ont été traités et séquencés avec la technologie SMRT (Single-molecule real-time sequencing, PacBio) à la plateforme GENTYANE (UMR « Génétique, Diversité et Ecophysiologie des Céréales », INRAE, Université Clermont Auvergne). La préparation de la librairie est décrite dans l'annexe I. Le principe de cette technologie est décrit dans la [Figure 17](#). Elle repose sur le séquençage en temps réel des molécules d'ADN réparties dans des nano-puits au fond desquels une ADN polymérase est fixée. La méthode peut générer des reads d'une longueur moyenne de 15 kb. Le taux d'erreurs, introduction aléatoire d'insertions et de délétions, est de 10 à 15% par subread. La fidélité de la séquence circulaire consensus (CCS) augmente avec le nombre de subreads obtenus jusqu'à des valeurs supérieures à 99,9%. La fidélité de la séquence consensus finale, construite avec les CCS sens et antisens peut atteindre 99,999%.

Les données de séquençage obtenues sous forme de fichier BAM (.bam ou .bam.pi) ont été traitées avec les différents outils du pipeline SMRT link v 7.0 en ligne de commandes, hébergé sur le cluster de calcul du Mésocentre de l'Université Clermont-Auvergne (SMRT-Tools-Reference-Guide v 8.0). L'extraction des CCS a été réalisée à l'aide de l'outil pbsmrtpipe avec le paramétrage suivant : *min_passes=2 ; max_drop_fraction=0.34 ; max_length=10000 ; min_length=100 ; min_predicted_accuracy=0.9 ; min_passes=2 ; min_zscore=3.4 ; no_polish=TRUE*. Le fichier de sortie a été exporté au format CCS.BAM. Les adaptateurs SMRTbells 5' et 3', ainsi que la queue poly(A) ont été localisés pour trier les CCS selon la

couverture (complète ou partielle) de l'amplicon. Le démultiplexage, l'identification et la suppression des adaptateurs et des amorces de séquençage a été effectué avec l'application Lima (v 1.11.0) paramétrée ainsi : *min_length=100 ; max_input_length=100000 ; min_passes=1 ; split_bam ; num_threads=32*. Le fichier BAM a ensuite été converti en fichier fasta en utilisant un script personnalisé de samtool_fasta (v 1.11.0). Les séquences consensus ont été comparées à une base de données locale représentant la diversité des types d'entérovirus, par une analyse BLAST, pour valider l'assignation du type d'EV, rechercher la présence de « mistagging » et éviter l'assignation erronée d'une séquence à un échantillon. L'outil BLAST a été utilisé avec les paramètres par défaut : *./blastr_m=5 ; bestn=1 ; nproc=200*. Les séquences sens et antisens corrigées ont été compilées dans un fichier fasta pour chaque échantillon. Elles ont été alignées avec le logiciel MUSCLE v 3.5.31 paramétré de la façon suivante : *muscle_maxhours=24 ; diags_maxiters=2 ; quiet_in_\$file_out*. Les séquences de chaque alignement ont été vérifiées et éditées manuellement avec le logiciel BioEdit, avant de générer une séquence consensus en utilisant un seuil de similarité de 80%.

Résultats. Le séquençage réalisé dans 27 prélèvements cliniques obtenus en 2016 (n=4) et 2018 (n=23), a permis d'obtenir 22 (82%) génomes complets ou quasi-complets (cf. Tableau S2, matériels supplémentaires de l'article). Les prélèvements testés avec succès avaient des valeurs Ct comprises entre 20,02 et 32,58 (moyenne = 25,98 ; n=16/22) contre 36,51 (31,62 à 40,7 ; n = 5 et 1 sans valeur de Ct disponible) pour les prélèvements avec échec d'amplification. L'amplification du génome complet en un seul fragment a été obtenue pour 6/22 prélèvements (Ct moyen = 22,2 [20,02 - 23,75] ; n = 5/6 prélèvements).

La profondeur moyenne de séquençage des amplicons complets (463x, 353x à 607x) était inférieure à celle des amplicons quasi-complets (1767x, 282x à 4345x). La séquence de la région 3' non codante a été obtenue avec la méthode RACE pour 11/16 génomes. Les échantillons pour lesquels l'amplification était négative présentaient des Ct compris entre 29,64 et 32,58 (moyenne = 31,12 ; n=4/5 échantillons).

Les 22 amplicons ont tous été traités dans une seule librairie de séquençage préparée pour un total de 96 échantillons et à l'issue du démultiplexage, 171 991 CCS ont été collectées. Le génome viral de chaque échantillon résultait donc en moyenne de l'analyse de 1 792 CCS. Après l'élimination des séquences associées à un autre type d'entérovirus par mistagging, chaque génome était reconstruit en moyenne à partir de 1 709 CCS. Le taux d'erreurs de la

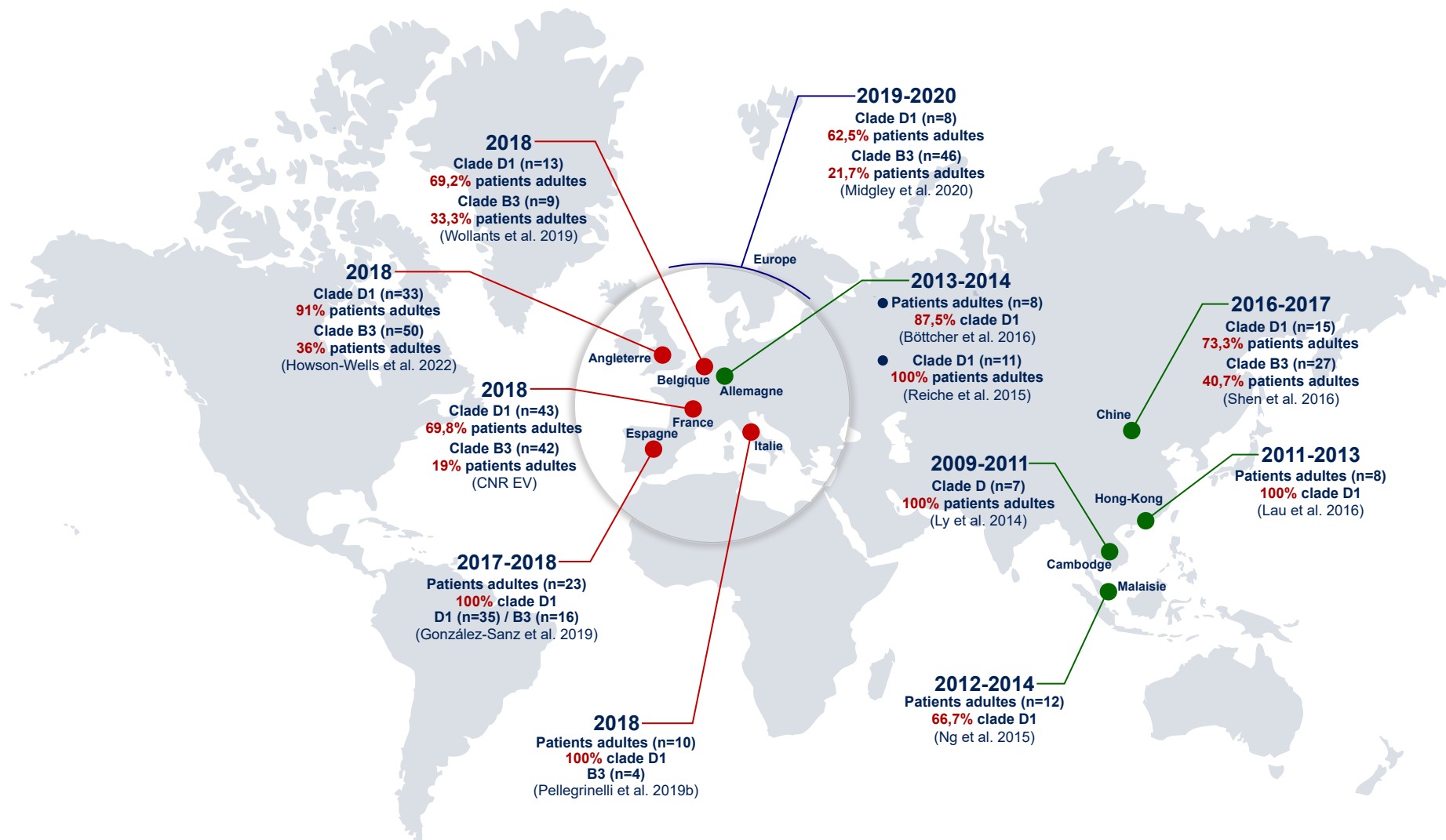


Figure 18 : Études rapportant une association entre les patients adultes et les EV-D68 appartenant au clade D1. Les points ciblant l'origine géographique des études sont colorés en vert, rouge ou bleu lorsque les cas d'infections rapportés datent respectivement d'avant 2018, de 2018 ou d'après 2018.

séquence la plus représentée par code-barre était inférieur à 0,9999% pour la majorité des échantillons.

C.3. Commentaires sur les méthodes proposées

L'isolement en culture cellulaire a été le principal facteur limitant de la première approche. Il est également rarement réalisé, l'EV-D68 étant un entérovirus difficilement cultivable : seuls 48% des prélèvements mis en culture ont permis d'obtenir le génome viral contre 82% en utilisant la stratégie de séquençage SMRT. L'amplification du génome complet est un autre facteur limitant. Parmi les deux méthodes d'amplification employées, celle qui utilise un oligonucléotide dans la région codant la protéine 3D présente une meilleure sensibilité par rapport à celle qui utilise un oligonucléotide dans la région 3' non traduite. Il est possible qu'une structure secondaire diminue l'efficacité de la synthèse du premier brin, mais la raison précise n'est pas connue.

La profondeur de séquençage moyenne, proche de celle obtenue par Tan et al (2016), est bien plus élevée avec la technique d'amplification du génome presque complet. La spécificité de l'amplification varie entre les échantillons, ce qui ne semble pas être lié à la charge virale du prélèvement clinique. L'amplification de fragments d'ADN non-spécifiques réduit la quantité d'amplicons cibles et donc la profondeur de séquençage. Ces biais sont également observés dans la littérature (Pakala et al., 2019; Tan et al., 2016).

D. Épidémiologie moléculaire : association adultes/clade D1

Les résultats concernant la distribution des clades dans notre population de patients sont confortés par les données rapportées dans d'autres pays que la France et qui décrivent une association plus élevée du clade D1 avec les patients adultes que l'association rapportée pour les autres clades (Figure 18). Dans l'ensemble des travaux publiés, 163 patients ont présenté une infection à EV-D68 de sous-clade D1 entre 2009 et 2018, et 129 (79%) sont des adultes. Les 47 autres adultes recensés étaient infectés par des souches des sous-clades B3 (n=42/47, 89%) et B1 (n=4/47, 8,5%) et du clade A (n=1/47, 2%) (Böttcher et al., 2016; González-Sanz et al., 2019; Howson-Wells et al., 2022; Lau et al., 2016; Ly et al., 2014; Midgley et al., 2020; Ng et al., 2015; Pellegrinelli et al., 2019a; Reiche et al., 2015; Shen et al., 2019; Wollants et al., 2019). Dans la littérature, les patients adultes infectés par un sous-clade B3 sont donc 3 fois moins nombreux que ceux infectés par le sous-clade D1. Récemment,

Hodcroft et al (2020) ont également mis en évidence à partir d'un jeu de données de 743 séquences d'EV-D68 que les infections associées au sous-clade D1 étaient significativement plus fréquentes chez les adultes qu'avec les autres clades.

La prévalence du sous-clade D1 chez les adultes peut être liée soit à des caractéristiques virales, soit à des facteurs de l'hôte. Les résultats des comparaisons moléculaires montrent des substitutions d'acides aminés dans les sites antigéniques du virus. La variation antigénique qui en résulte peut altérer l'immunité croisée qui résulte des souches du clade B. Ainsi, les adultes déjà infectés par un virus de clade B seraient moins protégés contre une infection par une souche de sous-clade D1, ce qui pourrait expliquer sa forte prévalence chez les adultes ; les aspects concernant la variation antigénique de l'EV-D68 et ses conséquences seront développés dans la partie III.B.7 des travaux personnels.

Chez les entérovirus, les substitutions nucléotidiques et d'acides aminés peuvent aussi modifier le tropisme et la virulence des souches, en particulier lorsqu'elles surviennent dans la région 5' non codante et les séquences codant les protéines VP1, 2A, 3C et 3D (Lin and Shih, 2014; Mandary and Poh, 2018; Yu et al., 2017). Il a été suggéré que l'augmentation des cas de paralysie lors de la large diffusion géographique du sous-clade B1 était liée à une virulence plus élevée que celle des autres sous-clades (Greninger et al., 2015). Les mutations ont pu aussi favoriser une meilleure transmission interhumaine sans pour autant accroître la virulence.

III. Autres travaux personnels

A. Stratégies de séquençage du génome de l'EV-D68 utilisées dans la littérature

A.1. Recherche des génomes et des métadonnées associées

Après la publication de l'article, un nouveau jeu de données de séquences a été créé dans le but de compiler de façon exhaustive les informations relatives aux stratégies de séquençage des génomes et de renforcer l'analyse moléculaire présentée dans la publication. Deux recherches des génomes d'EV-D68 ont été réalisées dans la base de données GenBank (au 13.09.2021) en utilisant les mots clés « enterovirus D68 » ou « EV-D68 » et en filtrant les

Tableau 6 : Stratégies de séquençage du génome de l'EV-D68 employées dans la littérature

	Type de séquençage	Type d'échantillon	Isolement du virus	Stratégie de séquençage	Séquences (n)
Oberste et al. 2004	Sanger	Respiratoire	Oui (RMK, HFKD)	A	1
Smura et al. 2007	Sanger	Selles	Oui (RD)	A	1
Kaida et al. 2011	NP	Respiratoire	Non	A	4
Tokarz et al. 2012	Sanger	Respiratoire	Non	A	1
Todd et al. 2013	454	Respiratoire	Oui (RD)	C	1
Brown et al. 2014	Illumina	Respiratoire	Oui (n=2, RD)	A	7
Xiang et al. 2014	NP	Respiratoire	NP	NP	1
Greninger et al. 2015	Illumina / Sanger	Respiratoire	Non	C	6
Huang et al. 2015	Illumina	Respiratoire	Non	B	20
Wylie et al. 2015	Illumina	Respiratoire	Non	C	1
Zhang et al. 2015	Sanger	Respiratoire	Non	A	1
Baggen et al. 2016	Sanger	Respiratoire	Oui (RD)	A	5
Chen et al. 2016	Sanger	Respiratoire	Non	A	4
El badry et al. 2016	Sanger	Plasma sanguin	Oui (NP)	A	1
Gong et al. 2016	Sanger	Respiratoire	Non	A	11
Huang et al. 2016	Illumina	Respiratoire	Non	B	9
Lednický et al. 2016	Sanger	Air	Non	A	1
Ng et al. 2016	Illumina	Respiratoire	Non	A	3
Tan et al. 2016	Illumina / Ion Torrent	Respiratoire	Non	A	58
Xiang et al. 2016b	NP	Respiratoire	Non	A	2
T. Zhang et al. 2016b	Sanger	Respiratoire	Non	A	12
Eshaghi et al. 2017	Illumina	Respiratoire	Non	B	2
Essaidi-Laziosi et al. 2017	Illumina	Respiratoire	Oui (MucilAir)	B	1
Hixon et al. 2017	Illumina / Sanger	ATCC	Oui (RD)	B	3
Kaida et al. 2017	Sanger	Respiratoire	Non	A	11
Ny et al. 2018	Illumina	Respiratoire	Non	C	9
G. Wang et al. 2017	Illumina	Respiratoire	Non	B	13
Wylie et al. 2017	Illumina	Respiratoire	Non	C	2
Yip et al. 2017	Sanger	Respiratoire	Non	A	3
Chien et al. 2018	NP	Respiratoire	Non	NP	1
Bal et al. 2019	Illumina	Respiratoire	Non	C	14
Dyrdak et al. 2019	Illumina	Respiratoire	Non	A	51
Pakala et al. 2019	Illumina	Clinique	Non	A	17
Shen et al. 2019	Sanger	Respiratoire	Non	A	26
Haichao Wang et al. 2019	Sanger	Respiratoire	Non	A	7
Hodcroft et al. 2020	Illumina	Respiratoire	Non	A	52
Midgley et al. 2020	Illumina / Sanger	Respiratoire	Non	A	4
Ayudhya et al. 2020	Illumina	Respiratoire	Oui (RD)	B	6
Gilrane et al. 2020	Illumina	Respiratoire	Non	B	47
Okamoto et al. 2021	Illumina	Respiratoire	Non	A	15
Total					434

A : Séquençage avec enrichissement spécifique du génome. B : Séquençage via une analyse méta-transcriptomique. C : Séquençage avec enrichissement non spécifique du virome. Les références bibliographiques en rouge ne donnent pas de précision sur la stratégie de séquençage employée. Les lignées cellulaires RMK (*Rhesus primary kidney*) et HFKD (Human fetal diploid kidney) sont d'origine rénale. MucilAir : modèle commercial d'épithélium respiratoire formé de cellules primaires. NP, non précisé dans l'étude

séquences de 5500 à 7500 nucléotides. Ces recherches ont permis d'obtenir 899 et 874 séquences. Après une phase de tri, nous avons obtenu un jeu de données incluant 930 génomes d'EV-D68. Toutes les séquences issues de prélèvements provenant d'un même patient, présentant un ORF incomplet ou dont la date était imprécise ont été retirées du jeu de données. 896 séquences incluant les 30 séquences issues de cette thèse ont été conservées.

A.2. Recherche bibliographique

Une recherche bibliographique a été réalisée en vue de recenser les publications associées aux séquences de génomes viraux disponibles. Les publications indiquées dans GenBank et celles obtenues après recherche sur Pubmed ou Google Scholar (jusqu'au 13.09.2021) via les noms d'auteurs, noms de publications, dates, origines géographiques et autres informations disponibles sur GenBank, ont été récupérées : 40 publications étaient associées à 434/866 (50%) séquences ([Tableau 6](#)). Parmi ces publications, 38 indiquaient la stratégie de séquençage employée pour obtenir le génome complet de l'EV-D68. La littérature référencée dans ces publications, pour la méthode d'obtention des génomes complets, a également été analysée.

A.3. Les différentes méthodes de séquençage décrites

Les informations relatives aux méthodes de séquençage ont été extraites à partir des 38 publications sélectionnées, qui ont rapporté 432 séquences ([Tableau 6](#)). 79% des séquences (340/432) ont été obtenues avec la technologie Illumina, avec pour 62 séquences un recours nécessaire à une méthode Sanger (n=10 séquences) ou IonTorrent (n=52). Le séquenceur utilisé et les caractéristiques de la réalisation du séquençage varient selon les études et ne sont pas systématiquement décrits. La majorité des études adoptent une stratégie de séquençage « paired-end » (depuis les deux extrémités des fragments). La taille des fragments séquencés varie selon le type de séquenceur utilisé. Les autres génomes (n=86/432 ; 20% ; 8 sans information) ont été obtenus par séquençage Sanger à l'exception d'un seul obtenu avec la technique 454. Pour 417 séquences dont l'origine était identifiée, 99% (411/417) proviennent d'un échantillon respiratoire. Le séquençage a été réalisé à partir des échantillons cliniques dans 95% (411/432) des cas, sinon, il a été réalisé après isolement en culture cellulaire. La lignée de cellules RD a été utilisée pour 86% (18/21) de ces isolements.

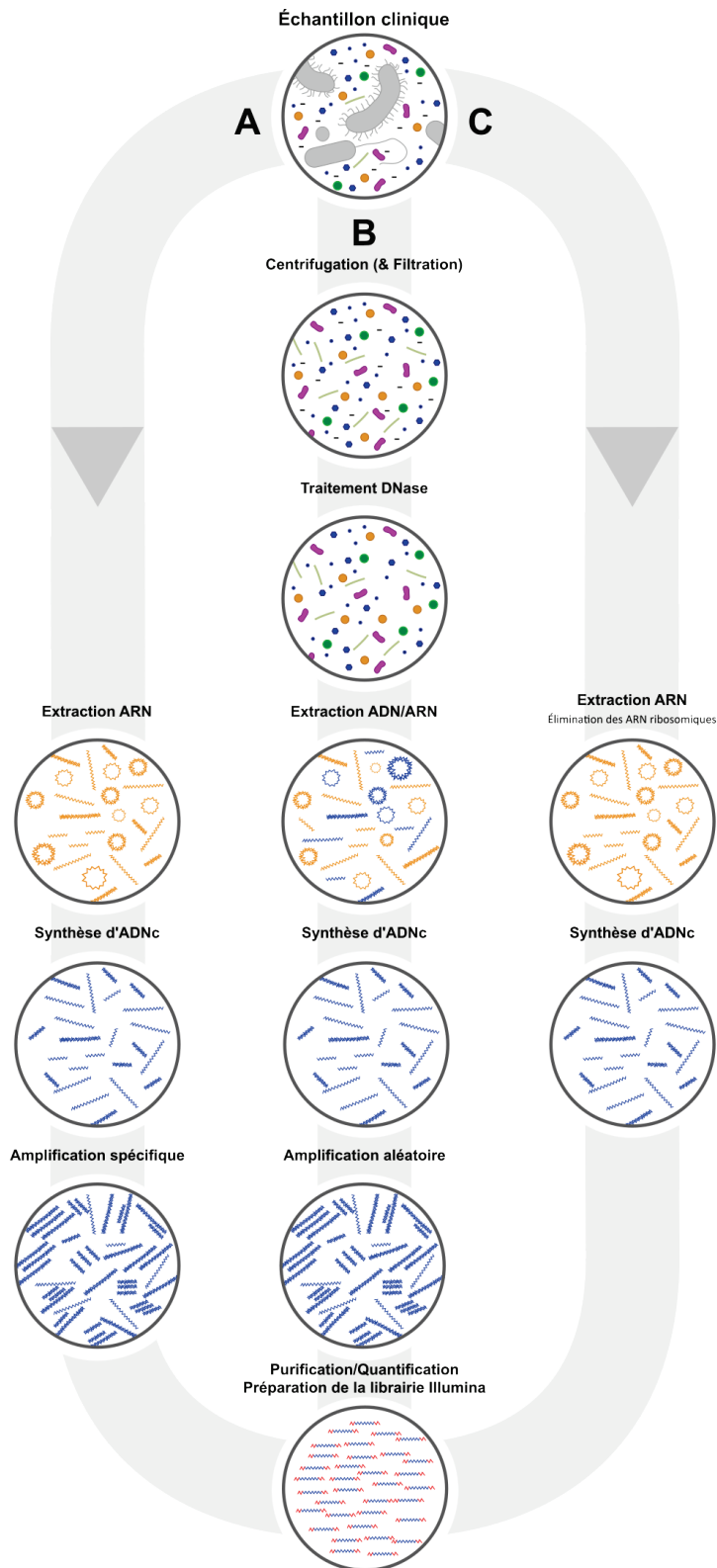


Figure 19 : Principe général des stratégies utilisées pour le séquençage des génomes complets d'EV-D68. **(A)** Stratégie incluant une amplification spécifique du génome de l'EV-D68 en un ou plusieurs fragments. **(B)** Stratégie d'analyse du virome d'un échantillon clinique. Le virome est d'abord isolé grâce à des étapes de centrifugation, filtration et traitement DNase. Les acides nucléiques sont extraits puis les ARN viraux sont utilisés pour synthétiser de l'ADNc (ADN complémentaire). Une amplification aléatoire de l'ADNc (cf. Figure 19) est réalisée avant la préparation de la librairie de séquençage. **(C)** Stratégie d'analyse méta-transcriptomique d'un échantillon clinique. Tout comme pour la stratégie A, une extraction d'ARN est réalisée suivie d'une synthèse d'ADNc. Aucune étape d'amplification n'est présente. L'ADNc est utilisé pour la préparation de la librairie de séquençage.

Pour les autres séquences, les informations de séquençage ont été extraites à partir des données GenBank. Au total, la technologie Illumina a été utilisée pour 77% (666/866) des séquences obtenues, avec recours à une autre méthode pour compléter la couverture pour 145 (22%), soit par séquençage Sanger (n=10), soit par la technique IonTorrent (n=135). 15% des génomes (129/866) ont été obtenus uniquement par séquençage Sanger et 6% (53/866) par séquençage IonTorrent.

Les méthodes d'obtention des génomes d'EV-D68 décrites dans la littérature varient selon deux grands objectifs : le diagnostic virologique ou l'analyse moléculaire du virus. Les stratégies de séquençage peuvent inclure une étape d'enrichissement par amplification spécifique du génome ou par amplification aléatoire, non spécifique (Figure 19).

A.4. Séquençage avec enrichissement spécifique du génome

Le principe général de cette méthode est d'obtenir plusieurs amplicons après l'étape de synthèse d'ADNc et de séquencer chacun d'eux pour reconstituer la séquence génomique. Cette stratégie d'amplification spécifique a été utilisée pour obtenir 298/432 (70%) séquences, décrites dans 24/38 publications (Tableau 6). Elle a systématiquement été utilisée lorsque seul le séquençage Sanger était employé (14 publications) et pour 207/340 séquences (61%) obtenues par séquençage Illumina (8 publications). Les deux méthodes majoritairement utilisées sont celles proposées par Tan et al (2016) et Dyrdak et al (2019). Elles ont respectivement permis l'obtention de 90 (Okamoto et al., 2021; Pakala et al., 2019; Tan et al., 2016) et 107 (Dyrdak et al., 2019; Hodcroft et al., 2020; Midgley et al., 2020) séquences grâce aux méthodes décrites ci-dessous.

L'extraction des acides nucléiques à partir d'un échantillon respiratoire est effectuée avec RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen) (Dyrdak et al., 2019) ou un protocole hybride combinant QIAamp viral RNA minikit (Qiagen) et ZR96 viral RNA kit (Zymo) (Tan et al., 2016). La stratégie proposée par Tan et al (2016) consiste ensuite à synthétiser l'ADNc via la transcriptase inverse Superscript III (Thermo Fisher Scientific) en utilisant une amorce oligo(dT)₂₀ qui s'hybride à la queue poly(A) de l'ARN viral, ou deux amorces spécifiques de l'extrémité 3' non traduite (D68_7333AR et D68_7333BR). Trois méthodes d'amplifications distinctes sont utilisées :

(i) L'amplification du génome complet avec queue poly(A) en utilisant une amorce sens (D68_1F) spécifique de l'extrémité 5' non codante associée à une amorce anti-sens (M13-dt18) hybridant sur la queue poly(A),

(ii) L'amplification du génome complet sans queue poly(A) en utilisant l'amorce D68_1F et les amorces D68_7333AR/BR (mix 1:1),

(iii) L'amplification de deux fragments chevauchants. Le premier amplicon de 904 pb, englobant la région 5' non codante, est généré via une RT-PCR one-step (kit Qiagen) en utilisant les amorces D68_1F et D68_904R. Le second amplicon, de 6,8 kpb, est généré en utilisant les amorces D68_536F et D68_7333AR/BR (mix 1:1) et permet d'obtention du reste du génome.

La méthode décrite par Dyrdak et al (2019) repose quant à elle sur l'amplification en duplicat, via une « one-step » RT-PCR, de 4 fragments chevauchants d'environ 2 kpb (transcriptase inverse Superscript III/Platinum Taq HiFi, Invitrogen). Suivent ensuite, pour les deux méthodes, un traitement par l'exonucléase I et la phosphatase alcaline (Tan et al., 2016) ou avec le kit AGENCOURT AMPure XP PCR purification (Life Technologies) (Dyrdak et al., 2019) et la quantification de l'ADN avec un kit de détection SYBR green dsDNA (ThermoFisher Scientific) (Tan et al., 2016) ou un dosage en utilisant un fluorimètre Qubit (Life Technologies) (Dyrdak et al., 2019). La librairie est préparée en utilisant un kit Nextera (Illumina) et le séquençage « paired-end » est réalisé avec un séquenceur HiSeq 2500 (Dyrdak et al., 2019), Miseq (Pakala et al., 2019) ou Nova Seq (Okamoto et al., 2021). Pour améliorer la couverture de certaines séquences, Tan et al (2016) ont également réalisé un séquençage IonTorrent.

Dyrdak et al (2019) réalisent un appel de base et le démultiplexage des données de séquençage via bcl2fastq v1.87. Les séquences sont nettoyées via TrimGalore et alignées sur une séquence de référence via bwa mem. Les séquences consensus sont générées via un script python. Le même traitement des données (démultiplexage, nettoyage des séquences et assemblage *de novo*) est réalisé en utilisant le logiciel CLC bio par Tan et al (2016). Les contigs obtenus sont ensuite blastés sur une base de données pour identifier une séquence de référence proche puis l'alignement est réalisé via le programme *clc_ref_assemble_long*. Les séquences consensus sont ensuite validées et annotées via le logiciel Viral Genome ORF Reader (VIGOR) 3.0.

A.5. Séquençage par une analyse méta-transcriptomique

Des méthodes de transcriptomique sont rapportées dans 8/38 (21%) publications (Tableau 6). Leur principe est de produire l'ADNc de manière non spécifique à partir du transcriptome d'un échantillon avant de séquencer la totalité de la librairie ADN produite. La détection de l'EV-D68 n'intervient qu'au niveau du traitement bio-informatique des données de séquençage. Cette stratégie a un objectif de diagnostic et elle peut aussi être utilisée pour évaluer la présence d'autres pathogènes : bactéries à Gram+, champignons et virus. Les méthodes utilisent toutes la technologie Illumina et ont permis d'obtenir 101/432 (23%) séquences. Elles se distinguent sur deux points : l'utilisation d'amorces aléatoires ou spécifiques pour une transcription inverse et sa réalisation en séparant ou non la synthèse des deux brins d'ADNc en deux étapes. Seules deux publications décrivent trois génomes et utilisent une stratégie RNA-Seq (Eshaghi et al., 2017; Essaidi-Laziosi et al., 2018). 88% des séquences rapportées (89/101) ont été obtenues avec la méthode proposée par Huang et al (2019) ou une version plus ancienne de cette méthode (Huang et al., 2016, 2015).

La lyse cellulaire de l'échantillon clinique est effectuée dans du TRIzol en présence d'un contrôle interne constitué de 8 ARN simple brin (fragments du vecteur pTZ19R et du phage λ) inclus dans l'échelle RiboRuler High Range RNA (Thermo Fisher Scientific). Ce contrôle, utile en premier lieu pour éliminer des résultats faux négatifs, est peu coûteux par rapport à des contrôles internes commerciaux et il interfère peu avec l'identification d'espèces pathogènes. Un premier contrôle négatif subit le même protocole que les échantillons. Le mélange est ensuite transféré dans un tube de lyse Matrix B de 2 mL contenant des billes de silices de 0,1 mm (MP Biomedicals) permettant de fixer les acides nucléiques. Les débris cellulaires sont éliminés via une étape de centrifugation puis le lysat est transféré dans un tube Heavy 2 mL Phase Lock Gel (Thermo Fisher Scientific) permettant une extraction des acides nucléiques au chloroforme. Les ARN totaux sont ensuite extraits via le kit Direct-zol RNA MicroPrep (Zymo Research) qui comprend un traitement à la DNase. Les ARN ribosomiques présents dans l'extrait sont éliminés via les kits RiboCop rRNA Depletion (Lexogen) ou RiboZero rRNA Depletion (Illumina). À ce stade, un second contrôle négatif (eau) est ajouté. La synthèse du premier brin d'ADNc est effectuée avec le kit QuantiTect Reverse Transcription (Qiagen). Le brin complémentaire d'ADNc est synthétisé dans un second temps. Une inactivation enzymatique par chauffage de l'échantillon à 85°C est réalisée. L'ADNc est ensuite quantifié

Amorce random

5' GCC GGA GCT CTG CAG ATA TCN NNN NN 3'

Amorce 3'

5' GCC GGA GCT CTG CAG ATA TC TTT TTT TTT TTT TTT TTT TT 3'

Amorce 5' virus spécifique (exemple: rhinovirus)

5' GCC GGA GCT CTG CAG ATA TC TTA AAA CTG G 3'

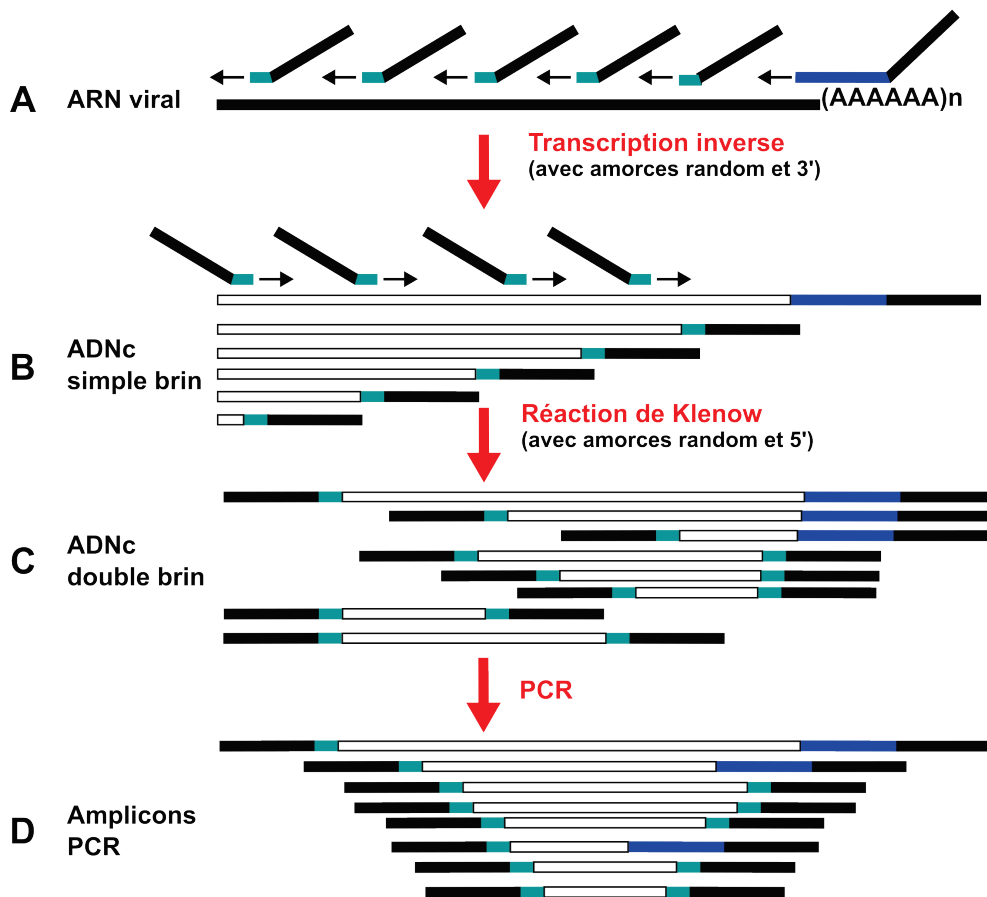


Figure 20 : Principe de l'amplification aléatoire. (A) L'ARN viral est converti en ADNc (ADN complémentaire) en utilisant des amorces random taguées et des amorces polyadénylées taguées (amorces 3'). **(B)** Le second brin d'ADN est synthétisé en utilisant des amorces random taguées. Il est également possible d'utiliser des amorces taguées spécifiques de l'extrémité 5' d'un génome viral cible. **(C)** Les ADN double-brin obtenus sont amplifiés en utilisant des amorces s'hybridant sur les tags précédemment utilisés. **(D)** Ceci permet d'obtenir une variété d'amplicons de tailles différentes. (Adaptée de Djikeng et al. 2008)

via le kit Qubit dsDNA HS (Thermo Fisher Scientific) ou le kit SpectraMax Quant dsDNA Assay (Molecular Devices). La librairie de séquençage est ensuite préparée via le kit Nextera XT DNA Sample Prep (Illumina). Un séquençage « paired-end » est réalisé avec un séquenceur Miseq ou NextSeq 550.

Les données de séquençage sont nettoyées avec Trimmomatic v 0.35 et les séquences sont alignées avec BWA v 0.7.12 et SAMTools v 1.3.1 par rapport à des séquences de référence de façon à identifier et retirer les séquences issues du contrôle interne et de l'hôte. Un assemblage *de novo* est ensuite réalisé avec Trinity v 2.4.0 puis les séquences sont identifiées avec Kraken v 0.10.5 associé à la base de données Kraken du NCBI.

A.6. Séquençage avec enrichissement non spécifique du virome

Parmi les 38 publications recensées, 6 rapportent 33 séquences (8% de 432 séquences) déterminées avec des stratégies de séquençage métagénomique s'appuyant sur un enrichissement par amplification aléatoire des acides nucléiques. Les méthodes utilisées par Bal et al (2019) (14 séquences) et Ny et al (2018) (9 séquences) sont notamment présentées pour le diagnostic d'infections virales par l'analyse du virome ADN/ARN ou ARN présent dans l'échantillon clinique (Bal et al., 2018; Nguyen et al., 2016). Leur principe est similaire à celui de la stratégie précédente mais l'inclusion d'une étape d'isolement des particules virales par centrifugation et filtration permet d'accroître la proportion des génomes viraux parmi les séquences obtenues.

La méthode décrite par Bal et al (2018) présente 3 étapes : une centrifugation à 6 000 g suivie d'une filtration du surnageant avec un filtre de 0,8 µm pour exclure les cellules eucaryotes et les bactéries, et finalement un traitement à la DNase. Nguyen et al (2016) utilisent une stratégie proche : une centrifugation à 10 000 g mais pas de filtration. L'extraction des acides nucléiques totaux (Bal et al., 2018) ou des ARN totaux (Nguyen et al., 2016) est suivie par l'amplification aléatoire. Bal et al (2018) utilisent le kit WTA 2 (Whole transcriptome amplification, Sigma-Aldrich) qui permet l'amplification des ADN et ARN viraux. Le principe de ce kit commercial est semblable à la méthode de Nguyen et al (2016), décrite auparavant (Djikeng et al., 2008 ; [Figure 20](#)). Un tag unique est couplé à son extrémité 3' soit à un hexanucléotide aléatoire soit à l'un des 96 hexanucléotides non-ribosomiques (Endoh et al., 2005). Le tag peut également être couplé à une séquence poly(T) qui va s'hybrider à la queue

poly(A) des ARN viraux. Les oligonucléotides tagués servent d'amorces pour la transcription inverse de l'ARN et à la synthèse du brin complémentaire à l'ADNc. Ceux-ci ont donc des extrémités 5' et 3' porteuses de la même séquence tag, qui permettent ensuite une amplification à l'aide de la même amorce sens et anti-sens. Le produit obtenu est purifié via le kit QiaQuick (Qiagen) puis quantifié via le kit Qubit dsDNA HS (Thermo Fisher Scientific). La librairie de séquençage est préparée avec le kit Nextera XT DNA Sample Prep (Illumina). Le séquençage est réalisé en « paired-end ».

Nguyen et al (2016) utilisent le logiciel Geneious v 8.1.5 pour le traitement des données de séquençage. Bal et al (2018) filtrent les données avec BLAST contre les bases de données GRCh38.p2 et RefSeq dans le but de retirer les séquences d'origine humaine, de bactéries d'archaea et fongiques. La fraction restante des séquences est ensuite alignée sur la base de données ezVIR v 1.0 via le logiciel bwa-mem.

A.7. Commentaires

Les résultats des stratégies qui comportent une étape d'amplification spécifique de plusieurs fragments chevauchants sont proches (Dyrdak et al., 2019; Tan et al., 2016). Les taux de réussite sont de 95% (59/62 ; Tan et al., 2016) et 92% (54/59 ; Dyrdak et al., 2019). Les échantillons dans lesquels les génomes viraux ont été séquencés par Dyrdak et al (2019), présentent une valeur Ct comprise entre 13,91 et 33,8 (moyenne, 22,83) ; valeurs déterminées avec le test de diagnostic virologique. Les valeurs Ct des échantillons négatifs sont de 30,99 et 33,89, et celles des génomes incomplets (n=3) sont comprises entre 20,58 et 32,31. La profondeur de séquençage est supérieure à 100x pour tous les génomes complets mais varie entre les 4 amplicons. Elle est de 1000x pour 46/54 génomes (85%). Les méthodes proposées par Tan et al (2016) incluant une amplification du génome complet en un unique amplicon ont un taux de réussite plus faible de 53% (amplicon avec queue poly A) et 58% (amplicon sans queue poly A). La profondeur de séquençage moyenne obtenue est de 1 569x (219x à 3 324x) avec une moyenne de 62 265 reads par échantillon. En utilisant la stratégie à deux amplicons de Tan et al (2016), Pakala et al (2019) indiquent un nombre de reads médian de 376 488 par échantillon (IQR 326 824 – 421 360 reads) et une profondeur de séquençage comprise entre 224x et 4 228x. Via la même stratégie, Okamoto et al (2021) obtiennent une moyenne de 33 678 346 reads par échantillon (IQR 28 930 471 - 39 390 346) et une profondeur de séquençage moyenne de 604x (483x à 721x).

La méthode de méta-transcriptomique utilisée par Huang et al (2015) présente un taux de séquençage moindre (28%, 20/72) pour des échantillons positifs associés à un Ct moyen de 21,83 (18,71 – 24,65). Les Ct associés aux échantillons négatifs sont compris dans un large intervalle de valeurs comprises entre 15,12 et 35,3 (moyenne, 28,36). Gilrane et al (2020) indiquent avoir séquencé le génome complet dans un seul échantillon clinique sur 5 testés positifs pour l'EV-D68 et confirmés en méta-transcriptomique. La profondeur de séquençage moyenne obtenue par Huang et al (2015) est faible (63x). Enfin, avec une méthode incluant une étape d'amplification aléatoire, Ny et al (2018) indiquent un taux de séquençage de 60% (9 génomes obtenus /15 échantillons testés) ; les échantillons associés à un Ct supérieur à 32 n'ont pas été analysés.

Dans notre étude, les génomes d'EV-D68 sont obtenus après enrichissement par amplification spécifique. Cette approche est la plus employée dans la littérature pour l'EV-D68. Elle semble être la plus efficace pour obtenir le plus grand nombre de génomes complets car son taux de réussite et la profondeur de séquençage sont plus élevés. Avec un taux de réussite de séquençage de 82%, la méthode SMRT donne des résultats supérieurs à ceux obtenus à l'aide des méthodes sans enrichissement spécifique du génome de l'EV-D68 (Gilrane et al., 2020; Huang et al., 2015; Ny et al., 2018). Les études basées sur des stratégies proches de la nôtre (Dyrdak et al., 2019; Tan et al., 2016) présentent un taux de séquençage supérieur, mais les auteurs indiquent avoir exclus les échantillons dont la charge virale était faible, ce qui n'est pas le cas dans notre étude. Les prélèvements testés par Dyrdak et al (2019) ont une valeur Ct moyenne de 23,29 contre 28,08 dans notre étude. Les tests utilisés pour le diagnostic étant différents dans les deux études, la comparaison des charges virales est seulement indicative. À notre connaissance, le séquençage SMRT n'a jamais été utilisé pour déterminer les génomes d'EV-D68 ni pour d'autres EV. La méthode est une bonne alternative au séquençage Illumina mais reste plus onéreuse. Séquencer de longs fragments permet également d'obtenir une profondeur et une couverture de séquençage uniforme tout au long de l'amplicon et de s'affranchir de l'étape de "mapping". Cette stratégie écourte le temps d'obtention des génomes d'EV-D68 et pourrait être généralisée afin de remplacer le typage basé sur les séquences 1D^{VP1}.

B. Analyse complémentaire des génomes complets

L'étude moléculaire décrite dans notre article est focalisée sur les deux sous-clades (B3 et D1) les plus fréquents dans la population de patients et sur la période étudiée. Le jeu de données construit et présenté ci-dessus a été utilisé pour effectuer une analyse complémentaire de l'évolution moléculaire de tous les clades de l'EV-D68.

B.1. Méthodes d'analyses des données génomiques

L'analyse du jeu de 896 séquences génomiques a été réalisée avec le logiciel Microsoft Excel. Les séquences couvrant les régions 5' et 3' non codantes et l'ORF ont été analysées séparément. Pour chaque jeu de séquences, en acides aminés pour l'ORF et en nucléotides pour les régions non codantes, un tri a été réalisé pour conserver les positions pour lesquelles au moins trois séquences étaient polymorphes.

Les séquences ont été alignées avec le logiciel BioEdit, et une analyse phylogénétique a été réalisée avec le programme PhyML v3.0 en utilisant la méthode de maximum de vraisemblance et le modèle de substitutions nucléotidiques GTR (Generalised Time-Reversible). La fiabilité des embranchements a été évaluée à l'aide du test statistique aBayes, ce qui a permis d'attribuer les séquences à un clade et un sous-clade. Les séquences ont été regroupées par clade pour analyser le polymorphisme en acides aminés (ou nucléotides) à chaque position et déterminer le pourcentage de séquences qui présentent l'acide aminé (ou nucléotide) majoritaire. La fréquence des acides aminés (ou nucléotides) aux positions d'intérêt est ensuite visualisée en utilisant le programme Weblogo 3.0 (Crooks et al., 2004). Les positions polymorphes et les mutations spécifiques à un clade ou sous-clade ont été identifiées dans les protéines (le génome) de l'EV-D68. Les structures tridimensionnelles des protéines de capsid (Souche prototype Fermon, code PDB 4WM8), de la 3D polymérase (Souche JPOC10-378, clade C, numéro d'accèsion AB601883, code PDB 5XE0) et de la protéase 3C (Souche 3799, numéro d'accèsion EF107098, code PDB 3ZV8) de l'EV-D68 (Liu et al., 2015b; Tan et al., 2013; C. Wang et al., 2017) ont été utilisées pour localiser chaque position d'intérêt et la position des sites de fixation des acides sialiques en α 2,6 (Souche prototype Fermon, code PDB 5BNN) et α 2,3 (Souche prototype Fermon, code PDB 5BNP) (Liu et al., 2015a).

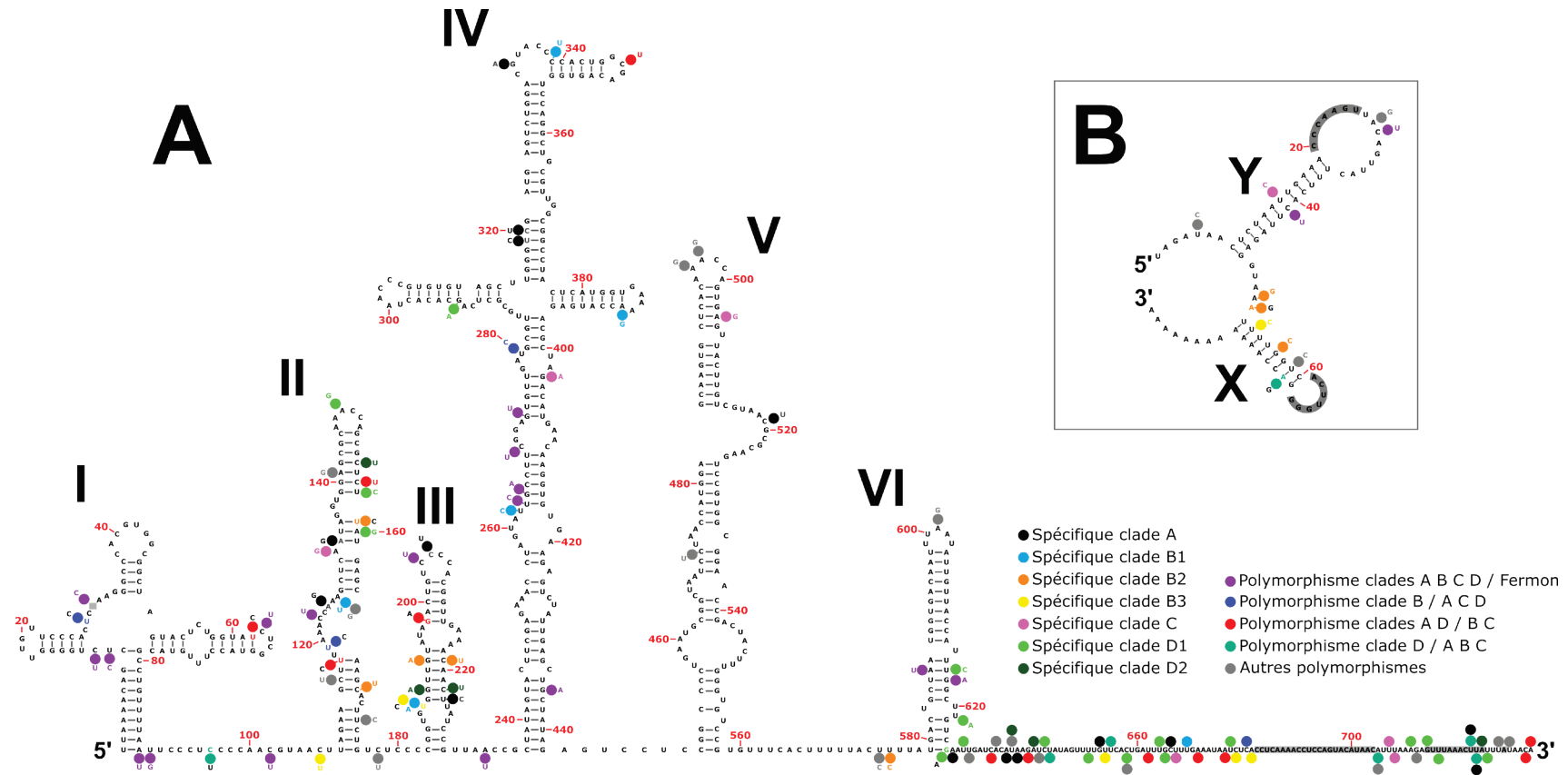


Figure 21 : Positions polymorphes dans les régions 5' et 3' non traduites du génome de l'EV-D68. (A) La structure secondaire prédite de la région 5' non traduite de la souche Fermon provient de l'étude de Furuse et al (2019). Pour chaque position polymorphe, la couleur du cercle et du nucléotide qui l'accompagne correspond au type de polymorphisme décrit dans la légende. Exemple : à la position 198, le nucléotide présent dans la séquence de la souche Fermon est une guanine (G). Le nucléotide G est coloré en rouge car il est présent dans les séquences appartenant aux clades A et D. Les séquences des clades B et C contiennent une adénine (A) à la même position. Le type de substitution n'est pas indiqué pour les polymorphismes de la région variable (positions 626-733). Les surlignages en gris indiquent des insertions/délétions. Comparées à la souche Fermon, les souches récentes contiennent une insertion à la position 30 et une délétion aux positions 682 à 704. Deux délétions successives aux positions 714-724 et 728 différencient les clades B et C. **(B)** La structure secondaire prédite de la région 3' non traduite de la souche Fermon provient de l'étude de Xiang et al (2016b). La lecture se fait de la même manière que pour le panneau A. Les deux groupes de 7 nucléotides surlignés en gris font partie du domaine kissing-like. Ils sont complémentaires et forment un pseudonoed.

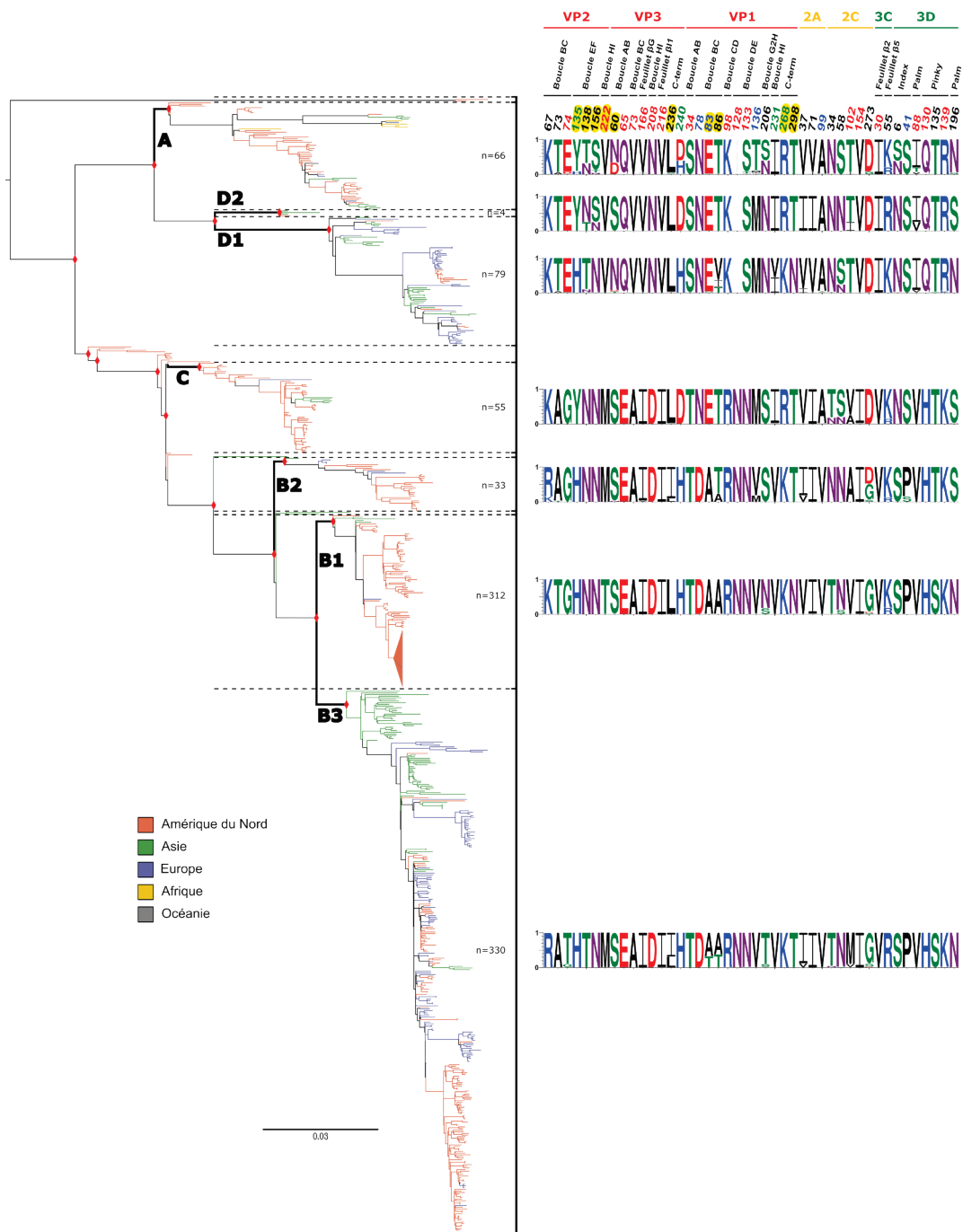


Figure 22 : Phylogénie globale de l'EV-D68 et variations moléculaires des protéines virales. La phylogénie a été inférée à partir du jeu de 896 séquences. La description de l'arbre phylogénétique est identique à celle de la figure 12. Les acides aminés présents à chaque position sont exprimés en pourcentage sur les graphiques obtenus via Weblogo 3 (Crooks et al. 2004). Les acides aminés sont colorés selon leurs caractéristiques chimiques. Certaines positions permettent de différencier les clades A et D de B et C (rouge), d'autres sont spécifiques au clade B (bleu) et d'autres différencient les clades B et D1 des clades A, C et D2 (vert). Les positions surlignées en jaune font partie des épitopes conformationnels prédits dans l'étude bio-informatique de Fang et al (2021).

B.2. Analyse générale des clades

Régions non codantes. L'analyse de la diversité des séquences a permis d'identifier 95 positions nucléotidiques polymorphes réparties dans la région 5' non codante et 11 dans la région 3' non codante (Figure 21). Les clades de l'EV-D68 sont apparentés dans deux groupes phylogénétiques : A et D, dans l'un et B et C, dans l'autre. Les deux groupes phylogénétiques se différencient par 12 positions nucléotidiques polymorphes et 2 délétions communes aux clades B et C. La première délétion est localisée aux positions 714 à 724 et la seconde à la position 728 ; elles sont placées dans la région variable après l'IRES de même que 7 positions polymorphes. Les autres positions polymorphes se répartissent dans les domaines tige-boucle I (C62U), II (C117U, C157U), III (A198G) et IV (C346U) (Figure 21). La souche prototype Fermon se distingue par 17 autres positions nucléotidiques, conservées au sein des différents clades. Treize d'entre elles sont réparties dans les domaines I, II, III, IV et VI dont 12 substitutions et une insertion d'une cytosine à la position 30 localisée dans le domaine tige-boucle I. Une délétion dans la région variable aux positions 682 à 704 caractérise également les séquences des souches récentes. La quasi-totalité de ces positions polymorphes avait déjà été mise en évidence dans une étude antérieure récente (Furuse et al., 2019a) tout comme les délétions successives de la région variable qui elles, ont été observées avant même l'épidémie de 2014 (Hasegawa et al., 2011). Contrairement à la région 5' non codante, aucune position nucléotidique polymorphe ne distingue les clades A et D des clades C et B dans la région 3' non codante. Toutefois, deux substitutions nucléotidiques, C29U et C41U, sont conservées chez l'ensemble des clades de l'EV-D68 à l'exception de la souche prototype Fermon.

Régions codantes. Les séquences présentent 138 positions aminoacides polymorphes dans l'ORF et les 2 groupes phylogénétiques évoqués ci-dessus se différencient par des substitutions à 17 positions (Figure 22). Certaines variations avaient déjà été mises en évidence dans des études antérieures (Du et al., 2015; Y.-P. Huang et al., 2017; Kaida et al., 2011; Pabbaraju et al., 2016). La majorité des positions (n=11/17, 65%) sont localisées dans les protéines de capsid. Une délétion (position 128) et la substitution N133S sont présentes dans la boucle DE de la protéine VP1, un des épitopes supposés du virus (Liu et al., 2015b). Elles sont caractéristiques des clades A et D, comme la substitution M222V (boucle HI, protéine VP3) qui fait partie de l'un des trois épitopes conformationnels prédits dans une étude récente (Fang et al., 2021).

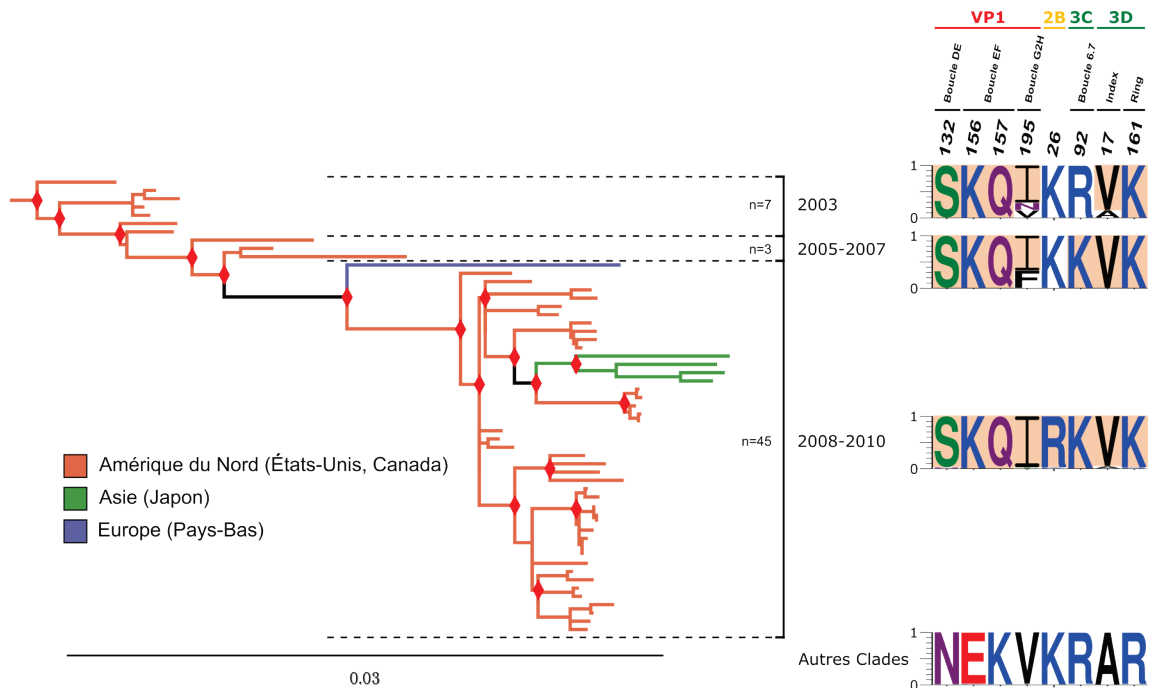


Figure 23 : Phylogénie détaillée du clade C et variations moléculaires des protéines virales. L'arbre phylogénétique est celui de la figure 22. Les losanges rouges indiquent une fiabilité des nœuds supérieure à 99% (probabilité postérieure = 0,99) estimée via le test statistique aBayes. Les acides aminés présents à chaque position sont exprimés en pourcentage sur les graphiques obtenus via Weblogo 3 (Crooks et al. 2004) et sont colorés selon leurs caractéristiques chimiques. Les acides aminés surlignés en couleur saumon indiquent des positions spécifiques au clade C.

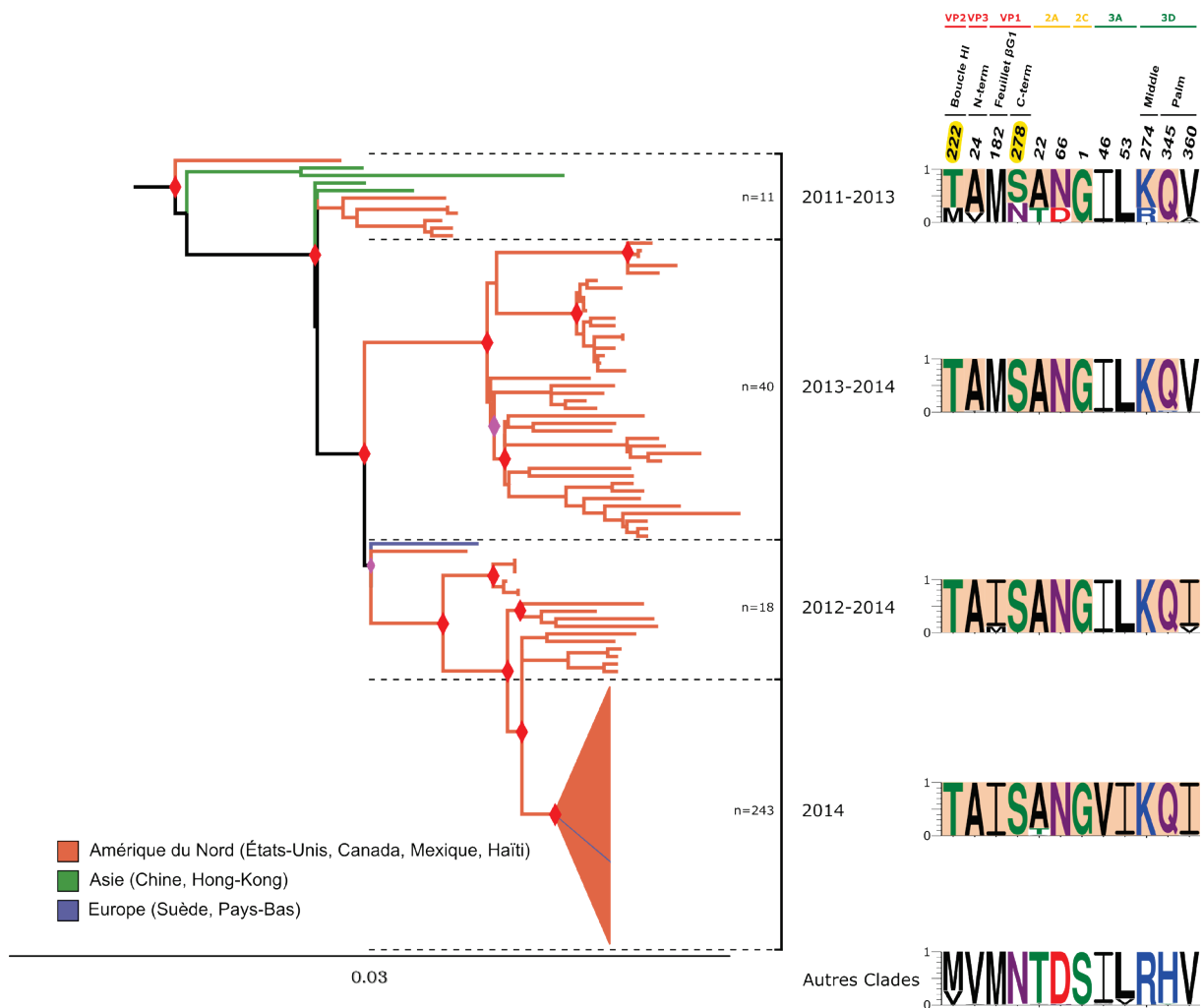


Figure 24 : Phylogénie détaillée du clade B1 et variations moléculaires des protéines virales. L'arbre phylogénétique est celui de la figure 22. Les losanges rouges indiquent une fiabilité des nœuds supérieure à 97% (probabilité postérieure = 0,97) estimée via le test statistique aBayes. Les acides aminés présents à chaque position sont exprimés en pourcentage sur les graphiques obtenus via Weblogo 3 (Crooks et al. 2004) et sont colorés selon leurs caractéristiques chimiques. Les acides aminés surlignés en couleur saumon indiquent des positions spécifiques au clade B1. Les positions surlignées en jaune font parties des épitopes conformationnels prédits dans l'étude bio-informatique de Fang et al (2021).

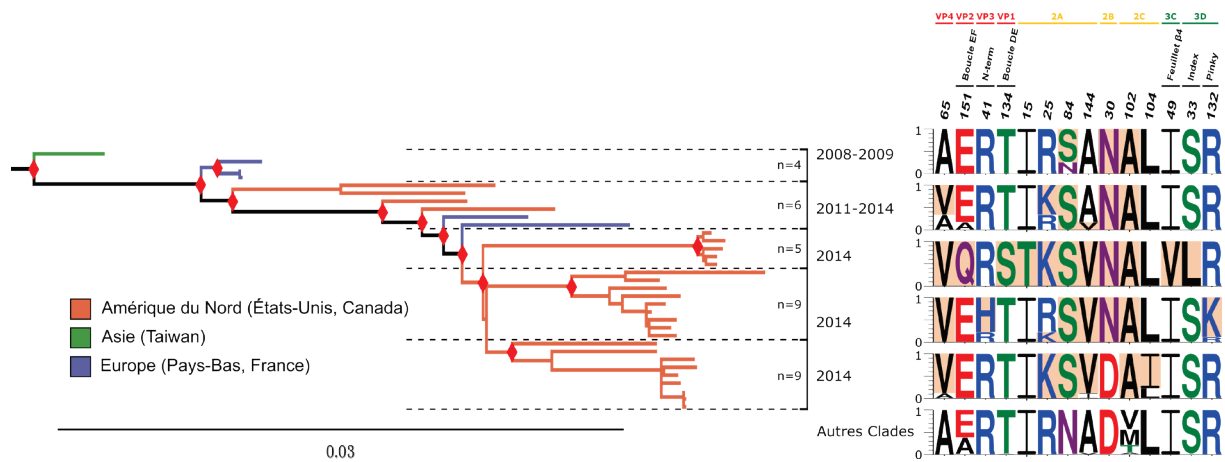


Figure 25 : Phylogénie détaillée du clade B2 et variations moléculaires des protéines virales. L'arbre phylogénétique est celui de la figure 22. Les losanges rouges indiquent une fiabilité des nœuds de 100% (probabilité postérieure = 1) estimée via le test statistique aBayes. Les acides aminés présents à chaque position sont exprimés en pourcentage sur les graphiques obtenus via Weblogo 3 (Crooks et al. 2004) et sont colorés selon leurs caractéristiques chimiques. Les acides aminés surlignés en couleur saumon indiquent des positions spécifiques au clade B2.

B.3. Différenciation du clade C

Le clade C, restreint aux années 2000, se distingue par 8 substitutions aminoacides spécifiques, ce qui en fait le clade le moins polymorphe (Figure 23). Quatre positions sont localisées dans la protéine VP1 (Du et al., 2015; Y.-P. Huang et al., 2017; Pabbaraju et al., 2016). Parmi elles, la substitution N132D est localisée dans la boucle DE. Le clade C se distingue également par six positions spécifiques dans la région 5' non codante dont trois sont localisées dans les domaines II (A132G), IV (G403A) et V (A504G) (Furuse et al., 2019a) ; la substitution U14C dans la région 3' non codante est aussi spécifique à ce clade (Figure 21).

B.4. Différenciation du clade B

Le clade B, à l'origine de la grande majorité des cas d'infections rapportés à ce jour, se différencie des autres clades par 5 substitutions aminoacides (Figure 22) dont 3 ont déjà été mises en évidence (Du et al., 2015; Y.-P. Huang et al., 2017; Ng et al., 2015; Pabbaraju et al., 2016) et sont localisées dans des épitopes prédits dans la protéine VP1 : boucles BC (N78D, E83A) et DE (M736V). Dans la région 5' non codante, 4 substitutions nucléotidiques différencient le clade B des autres clades, trois sont localisées dans les structures tige-boucle I (C28U), II (C119U) et III (U280C).

Le **sous-clade B1** (épidémie en 2014), se distingue par 12 substitutions en aminoacides déjà bien décrites dans la littérature (Eshaghi et al., 2017; Gong et al., 2016; Greninger et al., 2015; Huang et al., 2015; G. Wang et al., 2017; Xiang et al., 2016b; Y. Zhang et al., 2016). Quatre seulement sont localisées dans les protéines de capsid (Figure 24) dont deux (boucle HI et C-term, VP1) font partie des épitopes prédits par l'étude de Fang et al (2021). Seul le cluster auquel est assignée la majorité des séquences de 2014 (n=243/290, 84%) se distingue des autres clusters par deux substitutions localisées dans la protéine 3A (I46V et L53I). Le sous-clade B1 se singularise par les substitutions S1G (ATPase 2C, jonction 2B-2C) et H345Q (région Palm, polymérase 3D, motif D) conservée chez tous les entérovirus (C. Wang et al., 2017). Le sous-clade B1 présente également six substitutions nucléotidiques (Y. Zhang et al., 2016) dans la région 5' non codante (Figure 21)

Le **sous-clade B2** se caractérise par 14 substitutions spécifiques (Figure 25) pour la plupart déjà décrites par Gong et al (2016). Six sont localisées dans les protéines VP4 (A65V), 2A (R25K, N84S, A144V), 2B (D30N) et 2C (V/M/T102A). Cette dernière position est l'une des

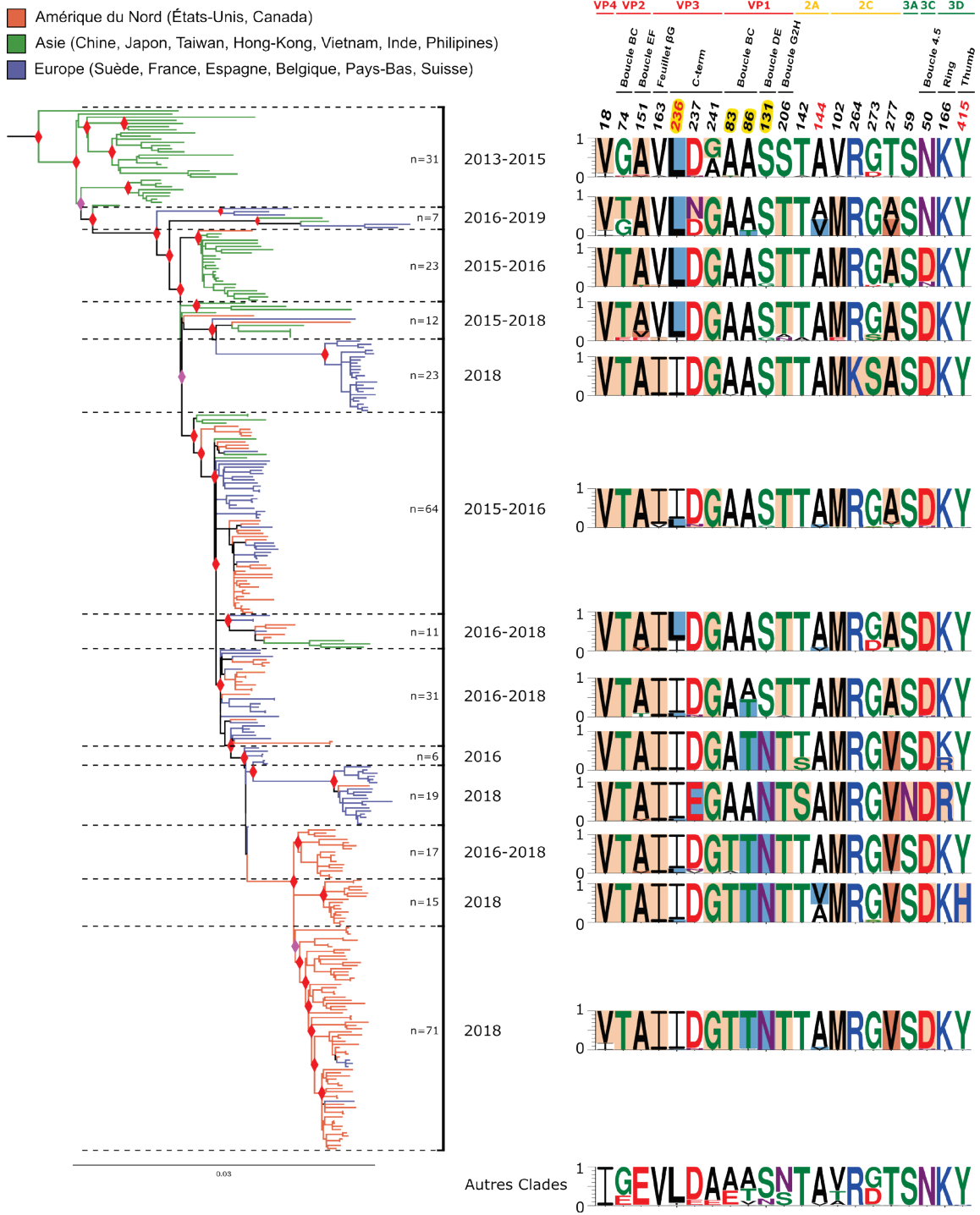


Figure 26 : Phylogénie détaillée du clade B3 et variations moléculaires des protéines virales. L'arbre phylogénétique est celui de la figure 22. Les losanges rouges indiquent une fiabilité des nœuds supérieure à 98% (probabilité postérieure = 0,98) estimée via le test statistique aBayes. Les acides aminés présents à chaque position sont exprimés en pourcentage sur les graphiques obtenus via Weblogo 3 (Crooks et al. 2004) et sont colorés selon leurs caractéristiques chimiques. Les acides aminés surlignés en saumon indiquent des positions spécifiques au clade B3. Les acides aminés surlignés en bleu indiquent des positions non spécifiques. Les positions surlignées en jaune font parties des épitopes conformationnels prédits dans l'étude bioinformatique de Fang et al (2021). Les positions colorées en rouge n'étaient pas présentes dans l'article publié dans Viruses.

plus polymorphes du génome viral : une thréonine (clades A et D), une valine (sous-clade B1 et clade C) ou une méthionine (sous-clade B3) remplace l'alanine du sous-clade B2 (Figure 22). L'analyse phylogénétique montre la circulation de plusieurs clusters de B2 en 2014 dont un seul renferme les deux substitutions spécifiques : E151Q (boucle EF, VP2) et T134S (boucle DE, VP1), dans deux épitopes potentiels du virus (Figure 25). Ces deux positions ne sont pas prédites comme épitopes conformationnels de l'EV-D68 dans l'étude de Fang et al (2021). Le sous-clade B2 présente également 5 substitutions dans la région 5' non codante : 2 (C159U et C169U) dans le domaine II et 2 situées à des positions appariées du domaine III (G193A et C219U). Trois positions spécifiques au sous-clade B2 sont également présentes dans la région 3' non codante (Figure 21).

Le **sous-clade B3** est le plus polymorphe : il se caractérise par des substitutions d'acides aminés spécifiques à 16 positions et par 5 positions polymorphes (Figure 26). La moitié seulement de ces positions étaient déjà décrites (Gong et al., 2016; Piralla et al., 2018; Shen et al., 2019; G. Wang et al., 2017). Cette analyse confirme les résultats rapportés dans notre article: les substitutions d'acides aminés spécifiques à 6 positions (BP3/74, VP3/163, VP1/206, 2C/102, 2C/277 et 3C/50) différencient le sous-clade B3 des autres clades. En résumé, il existe 2 clusters européens en 2018 issus de substitutions d'acides aminés à 8 positions dont 2 dans les protéines de capsides VP3 et VP1, la mutation dans VP1 (S131N) étant retrouvée chez les trois clusters américains de 2018. Les données issues de notre étude montrent l'existence d'un troisième cluster américain qui se distingue par la substitution Y415H (3D). Les séquences du clade B3 présentent un polymorphisme à 4 positions dans des épitopes prédits par l'étude de Fang et al (2021). Il y a en particulier la position 131 dans la boucle DE de VP1 qui peut être occupée par une asparagine comme chez le clade D. La position 236 dans la région C-terminale de VP3 (site antigénique prédit) est polymorphe (leucine chez les clusters anciens et isoleucine chez les clusters récents) tout comme les positions 83 et 86 dans la boucle BC de la protéine VP1. Sur les cinq substitutions spécifiques au sous-clade B3 localisées dans la région 5' non codante (Figure 21), une seule est localisée dans un domaine-tige boucle, elle est également retrouvée dans le sous-clade B1 (domaine III, U188C). La région 3' non codante renferme également une substitution spécifique au sous-clade B3 (U54C).

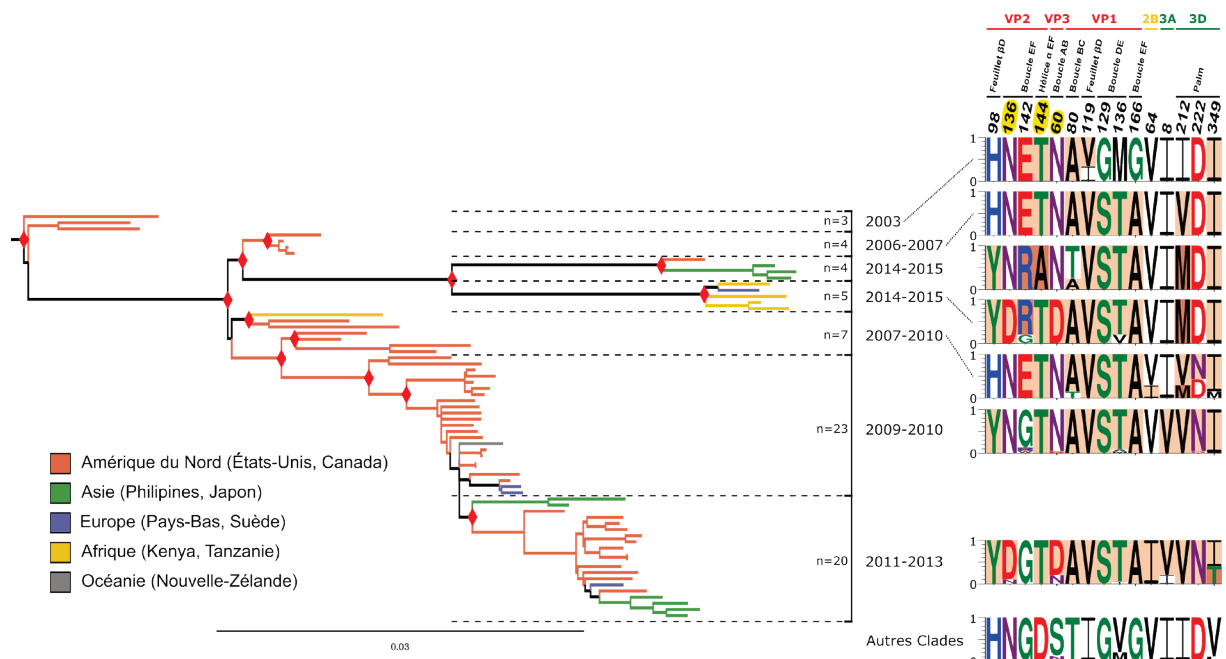


Figure 27 : Phylogénie détaillée du clade A et variations moléculaires des protéines virales. L'arbre phylogénétique est celui de la figure 22. Les losanges rouges indiquent une fiabilité des nœuds minimale de 99,99% (probabilité postérieure = 0,9999) estimée via le test statistique aBayes. Les acides aminés présents à chaque position sont exprimés en pourcentage sur les graphiques obtenus via Weblogo 3 (Crooks et al. 2004) et sont colorés selon leurs caractéristiques chimiques. Les acides aminés surlignés en saumon indiquent des positions spécifiques au clade A. Les positions surlignées en jaune font parties des épitopes conformationnels prédits dans l'étude bioinformatique de Fang et al (2021).

B.5. Différenciation du clade A

Le clade A se distingue des autres clades par 15 positions aminoacides polymorphes en majorité (n=10/15) situées dans les protéines de capsid du virus (Figure 27) ; la plupart sont déjà décrites (Du et al., 2015; Y.-P. Huang et al., 2017; Pabbaraju et al., 2016; Xiang et al., 2016b). Sept appartiennent à des épitopes supposés du virus. Deux substitutions (G129S et M136T) dans la boucle DE de VP1, sont majoritaires parmi les séquences. C'est aussi le cas des substitutions T80A (boucle BC de VP1) et D144S (hélice α EF de VP2), celle-ci faisant partie des épitopes prédits dans l'étude de Fang et al (2021). Le polymorphisme des positions 136 et 142 (boucle EF de VP2) et 60 (boucle AB de VP3) différencient les sous-groupes phylogénétiques. Au niveau de la polymérase 3D, le clade A est différent des autres clades par la substitution V349I/T située dans le motif D (Figure 27). Cette position 349 est aussi un marqueur de différenciation du sous-clade D1 (substitution V349L, Figure 28). Le clade A présente 15 substitutions spécifiques dans la région 5' non codante (Figure 21). Huit sont localisées dans les domaines II (A125G, A133G), III (C205U, C223U), IV (U319C, C320U, A334G) et V (U519C).

B.6. Différenciation du clade D

Le degré de variabilité du clade D est le plus élevé (Du et al., 2015; Y.-P. Huang et al., 2017; Ng et al., 2015; Pellegrinelli et al., 2019a; Yip et al., 2017). Notre seconde analyse est basée sur un nombre de séquences plus élevé que la première (72 versus 36) et confirme les résultats obtenus. Douze positions aminoacides présentent des substitutions spécifiques, la majorité (n=8/12, 67%) sont situées dans la capsid du virus (Figure 28). La région C-terminale de VP1 est un marqueur de différenciation important de ce clade : deux insertions aux positions 295 (arginine) et 296 (leucine) (Böttcher et al., 2016; Gong et al., 2016; Ikeda et al., 2012) et les substitutions D285E et N293D. Ces variations potentiellement antigéniques sont renforcées par les substitutions Q85R et S131N situées respectivement dans les boucles BC et DE de VP1 (Fang et al., 2021). Le clade D se caractérise aussi par 5 variations nucléotidiques dans la région 5' non codante (hors des domaines tige-boucles) et la substitution G69A dans la région 3' non codante (Figure 21).

Sous-clade D1. Son polymorphisme repose sur 28 positions aminoacides tout au long de l'ORF (Figure 28). Les positions 204 de la boucle HI de VP3 et 86 de la boucle BC de VP1 font partie d'épitopes prédits (Fang et al., 2021). L'un des deux clusters européens de 2018

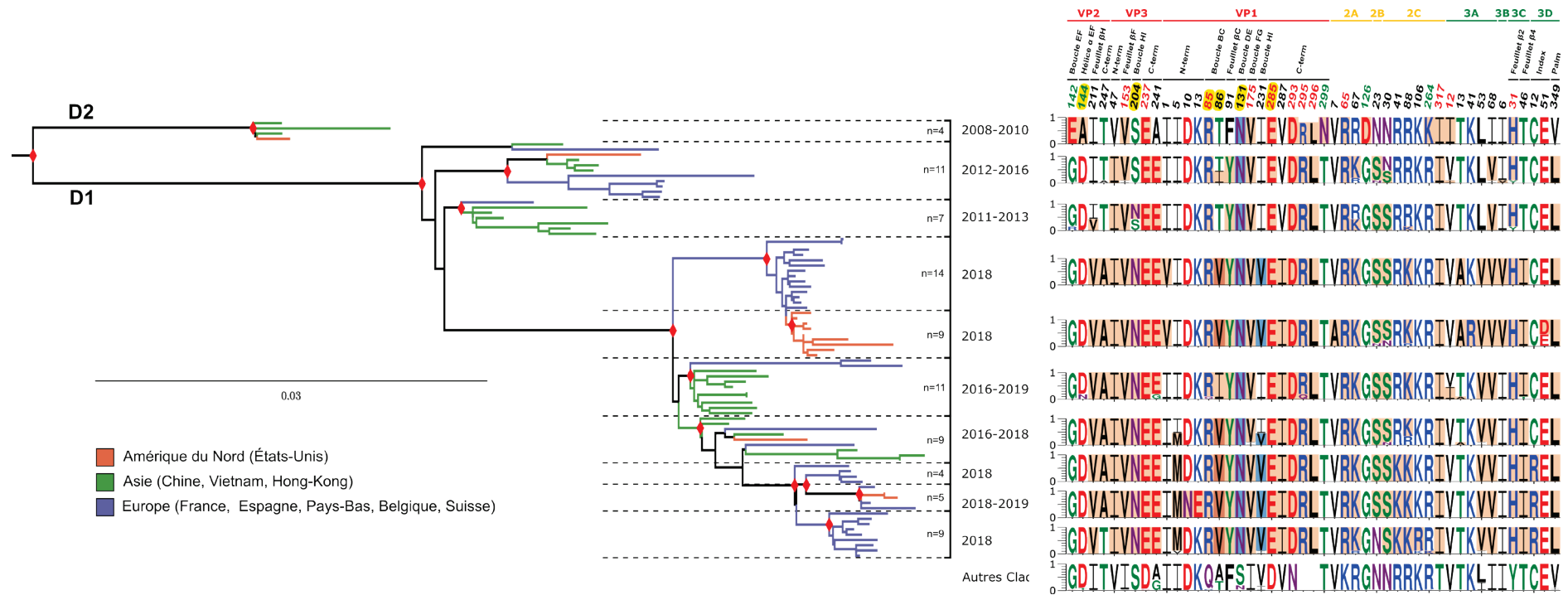


Figure 28 : Phylogénie détaillée du clade D et variations moléculaires des protéines virales. L'arbre phylogénétique est celui de la figure 22. Les losanges rouges indiquent une fiabilité des nœuds minimale de 99,99% (probabilité postérieure = 0,9999) estimée via le test statistique aBayes. Les acides aminés présents à chaque position sont exprimés en pourcentage sur les graphiques obtenus via Weblogo 3 (Crooks et al. 2004) et sont colorés selon leurs caractéristiques chimiques. Les acides aminés surlignés en saumon indiquent des positions spécifiques au clade D ou aux sous-clades D1 et D2. Les acides aminés sous-lignés en bleu indiquent des positions non spécifiques. Les positions surlignées en jaune font parties des épitopes conformationnels prédits dans l'étude bioinformatique de Fang et al (2021). Les positions colorées en rouge sont spécifiques au clade D. Les positions colorées en vert sont spécifiques au clade D2.

mis en évidence dans notre article apparaît maintenant subdivisé en trois clusters qui se distinguent aux positions 247 de la région C-terminale de VP2, 10 et 13 de la région N-terminale de VP1 et 106 de l'ATPase 2C. Le cluster majoritaire aux États-Unis en 2018, absent de l'analyse précédente, est proche du second cluster européen, ne se distinguant qu'aux positions 7 de la protéine 2A et 51 de la polymérase 3D. Les deux séquences européennes de 2019 (Midgley et al., 2020) ont des origines phylogénétiques différentes et se distinguent par la substitution D144N dans VP2. Le sous-clade D1 se caractérise également à 17 positions nucléotidiques dans la région 5' non codante dont 7 sont situées dans les domaines II (A148G, U158C, A160G), IV (G293A) et VI (U616C, U621A, A625G) (Figure 21). La substitution A220G (domaine III) est aussi apparue dans certaines séquences de 2018.

Sous-clade D2. Très peu de séquences (n=3) sont disponibles pour une analyse fiable. Il tire sa spécificité de cinq positions aminoacides (Figure 28) et se distingue des autres clades par 6 positions nucléotidiques dans la région 5' non codante (Figure 21), une (C155U) dans le domaine II et 2 appariées (G190A, C222U) dans le domaine III.

B.7. Commentaires

Impact des variations antigéniques prédites. Notre étude analyse les facteurs moléculaires viraux. Nos résultats et ceux d'autres travaux montrent que les variations moléculaires inter-clades dans les sites antigéniques prédits *in silico* pourraient avoir favorisé la réémergence de l'EV-D68 (Fang et al., 2021). Ces variations antigéniques expliquent aussi une grande partie du polymorphisme à l'origine des sous-clades et des clusters phylogénétiques. Ceci est clairement visible au sein du clade A (Figure 27). Il existe en effet deux groupes phylogénétiques qui ont co-circulé en 2014 - 2015 et on peut supposer que les variations antigéniques ont contribué à leur diffusion dans des régions géographiques différentes : Asie - Amérique du Nord pour l'un et Afrique - Europe pour l'autre.

Le sous-clade D1 se distingue nettement de l'ensemble du clade B par ses propriétés antigéniques dans plusieurs épitopes prédits dans VP1 : les substitutions dans la région C-terminale et la boucle BC (Figure 28), ainsi que la délétion dans la boucle DE partagée avec le clade A (Figure 22). Ce polymorphisme antigénique devrait conduire à la diminution de l'immunité inter-clade, hypothèse confortée par l'étude séro-épidémiologique de Harrison et al (2019) qui montrent que des sérums d'adultes collectés en 2012 et 2013 neutralisent moins

efficacement un EV-D68 de clade D1 que des virus de clade B1 et B2 ainsi que la souche prototype Fermon.

À l'inverse, en utilisant des sérums de 2006 et 2007, une étude néerlandaise montre que la séroprévalence et le titre moyen en anticorps neutralisants un EV-D68 de clade B3 augmentent avec l'âge. La séroprévalence étant proche de 100% chez les plus de 20 ans et associée à un titre neutralisant moyen élevé (160,3 pour les 21-30 ans), équivalent à celui obtenu avec des sérums de 2015-2016 (Karelehto et al., 2019). Ces résultats sont confirmés par l'étude de Kamau et al (2019) au Royaume-Uni. Pour autant, aux Pays-Bas en 2006, seuls des virus de clade A et C avaient été rapportés. Les premiers EV-D68 clairement identifiés comme appartenant au sous-clade B3 n'ayant été rapportés qu'en 2013 en Asie et 2014 en Europe (Tableaux 3-4). Selon l'analyse phylogénétique menée dans notre article, l'émergence du sous-clade B3 aurait eu lieu en 2009. Il paraît probable qu'une forte immunité croisée existe, à minima entre les différents sous-clade B, lesquels affichent une spécificité antigénique beaucoup plus faible que le sous-clade D1. La population adulte ayant déjà probablement été en contact avec un EV-D68 de clade B, est alors susceptible d'être réinfectée par un virus de sous-clade D1.

Le sous-clade B3 n'a que peu évolué au niveau antigénique (1 seule position polymorphe) entre les épidémies européennes de 2016 et 2018 (Figure 26). Ceci pourrait avoir permis l'accroissement de la circulation du sous-clade D1 observée en 2018 en Europe (Bal et al., 2019; Duval et al., 2021; González-Sanz et al., 2019; Pellegrinelli et al., 2019a; Wollants et al., 2019). A contrario, la même année, le sous-clade D1 n'a été rapporté que dans l'état de New-York aux États-Unis (Gilrane et al., 2020). Les virus de sous-clade B3 circulant aux États-Unis affichent une plus grande évolution antigénique (3 positions polymorphes) entre 2016 et 2018 que les clusters européens (Figure 26). Au cours de l'épidémie d'infection à EV-D68 de 2018, la circulation du sous-clade D1 pourrait avoir été plus réduite aux États-Unis qu'en Europe.

Bien que l'évolution antigénique soit un facteur essentiel pour expliquer la circulation et la réémergence de l'EV-D68, d'autres facteurs (moléculaires et épidémiologiques) interviennent probablement en particulier pour la survenue d'une épidémie. Les cas du sous-clade B2 et du clade C sont intéressants à cet égard. Aucun polymorphisme antigénique ne les distingue des autres clades (Figure 25). Le virus B2 est devenu prédominant en Europe en 2014

mais il circulait auparavant puisqu'il avait déjà été rapporté entre 2009 et 2013 sur le continent (Tableau 3). Quant au clade C, il ne présente globalement que très peu de polymorphisme (Figure 23), il est rapporté pour la première fois au Japon en 2005, mais ne provoque une épidémie qu'en 2010 (Tableau 4).

Impact des autres variations aminoacides. La polymérase virale 3D pourrait jouer un rôle majeur dans les propriétés de virulence ou de transmissibilité entre les clades et ainsi dans la circulation et la neurovirulence du virus. La faible circulation du sous-clade D1 avant 2018 pourrait être associée à la substitution V349L dans le motif D de la polymérase virale (Figure 28). Une substitution spécifique à la même position est également retrouvée chez le clade A (Figure 27). Concernant le sous-clade B1, un avantage en termes de neurovirulence pourrait provenir de la substitution R345K dans la polymérase 3D. Le même motif D, dans lequel elle est située, permet par une interaction avec le motif F, de gouverner l'état ouvert/fermé du site actif de la polymérase virale (C. Wang et al., 2017). Cette substitution pourrait fournir un avantage répliatif aux souches du sous-clade B1. De manière générale, la région codant la polymérase 3D est la deuxième la plus polymorphe chez l'EV-D68 (après VP1). Elle permet la distinction entre tous les clades du virus.

Les variations moléculaires au niveau des autres protéines virales ont pu favoriser la réémergence épidémique du virus (Figure 24). Les caractéristiques moléculaires du sous-clade B1 ont été bien étudiées, en particulier pour comprendre l'augmentation des cas de myélite flasque aiguë aux États-Unis à partir de 2014. Cinq substitutions d'acides aminés qui caractérisent ce sous-clade sont disséminées hors des sites antigéniques décrits dans les protéines : VP2 (M222T), VP3 (V24A), 2A (D66N), 2C (S1G) et 3D (R274K). Greninger et al (2015) ont fait l'hypothèse qu'elles étaient associées à la recrudescence des cas de paralysie en 2014 car elles sont retrouvées chez l'EV-D70, le poliovirus ou l'EV-A71, trois entérovirus responsables d'atteintes paralytiques. La substitution S1G dans la protéine 2C, modifie la jonction entre les protéines 2B et 2C, et pourrait rendre le clivage protéolytique plus efficace. Une jonction glutamine/glycine est plus favorable à l'activité de la protéase 3C qu'une jonction glutamine/sérine (Greninger et al., 2015; O'Donoghue et al., 2012; Tan et al., 2013). La substitution T298N dans la région C-terminale de VP1 (Figure 22), associée à une variation antigénique potentielle, pourrait aussi avoir un effet favorable au clivage de la jonction P1/P2 par la protéase 2A avec comme conséquence une association aux atteintes neurologiques

pendant l'épidémie de 2014 (Greninger et al., 2015; Huang et al., 2015). Les deux positions spécifiques localisées dans la protéine 3A et distinguant le cluster majoritaire du sous-clade B1 en 2014, pourraient également moduler l'interaction de la protéine avec PI4KB et ACBD3 comme c'est le cas pour des mutations proches chez l'EV-A71 (Xiao et al., 2017). Ainsi, elles pourraient impacter positivement la formation des organelles de réplication virale.

Cet ensemble de substitutions propres au sous-clade B1 pourrait lui donner un avantage répliatif. Or, elles ne sont pas retrouvées dans les sous-clades B2 et B3, ce dernier étant pourtant majoritairement rapporté depuis 2014 en Asie et depuis 2016 dans le reste du monde. Les sous-clades B2 et B3 affichent une spécificité aminoacide à la position 102 de la protéine 2C, l'une des plus polymorphes chez l'EV-D68 (Figures 25-26). Une autre substitution est présente dans le sous-clade B3 à la position 277, particulièrement polymorphe, de la même protéine (Figure 26). Ces mutations de la protéine 2C pourraient potentiellement favoriser la multiplication virale comme pour la mutation K216R chez l'EV-A71 (Chua et al., 2008) et ainsi être liées à la prévalence du sous-clade B3.

Les positions affichant le plus de polymorphisme inter-clades hors des sites antigéniques, telle la position 102 de la protéine 2C, pourraient être des facteurs importants liés à la prévalence des clades lors des épidémies d'infections à EV-D68.

Impact des variations dans l'IRES. On considère que l'IRES joue un rôle important dans la virulence des poliovirus (Semler, 2004). Concernant l'EV-D68, Furuse et al (2019a) suggèrent que l'activité *in vitro* de l'IRES de souches des clades A, B et C est plus élevée que celle de l'IRES de la souche prototype Fermon dans des cellules A172 d'origine neuronale. L'augmentation de l'activité de l'IRES pourrait affecter la traduction de l'ARN viral *in vivo*, accroître la production des protéines virales et faciliter l'échappement immunitaire qui favorise la dissémination du virus. Toutefois, l'activité élevée de l'IRES n'est pas associée à une multiplication virale élevée *in vitro*. Les résultats de Furuse et al (2019a) nécessitent une confirmation car l'activité de l'IRES n'est pas augmentée avec d'autres types cellulaires, notamment d'origine pulmonaire. Ces variations inter-cellulaires pourraient être une conséquence de différences au niveau des facteurs cellulaires transactivateurs nécessaires à l'activité de l'IRES.

Furuse et al (2019a) ont également montré que l'activité de l'IRES d'une souche du sous-clade B1 (Ph397/2013, numéro d'accèsion KX789229) était plus élevée, comparativement à d'autres souches de l'étude. En testant différents IRES chimères par rapport à celui de la souche prototype Fermon, les auteurs montrent que cet avantage est lié au domaine IV (Figure 21). L'origine de cet avantage du sous-clade B1 n'a pas été précisée, il pourrait donc être une conséquence d'une ou plusieurs variations moléculaires parmi l'ensemble des mutations qui le distinguent des autres clades. De plus, l'étude de Furuse et al (2019a) ne testant pas les effets synergiques potentiels de plusieurs domaines spécifiques au clade B1, une mutation hors du domaine IV pourrait également avoir un effet positif sur l'activité général de l'IRES. Plusieurs substitutions présentes dans les domaines II (A127U), III (C188A) et IV (U262C, U280C, C339U) de l'IRES B1 sont retrouvées dans les IRES d'autres entérovirus : poliovirus, EV-D70 ou EV-A71 (Y. Zhang et al., 2016). Parmi toutes les positions citées, une seule (U280C), dans le domaine IV de l'IRES, est spécifique à l'ensemble du clade B et pourrait être à l'origine d'un avantage réplcatif impliquant donc les sous-clades B1, B2 et B3 (Figure 21).

Le clade D1 est quant à lui particulièrement polymorphe dans le domaine II de la région 5' non traduite ce qui pourrait impacter la traduction virale. La mutation C157U en particulier, spécifique aux clades A et D, est proche de la mutation C158U décrite chez l'EV-A71 (Figure 21). Cette dernière, provoquant un changement de conformation de la structure secondaire du domaine II en cassant un appariement G-C, inhibe la traduction virale ainsi que la virulence en modèle murin *in vivo* (Yeh et al., 2011). Plusieurs autres substitutions localisées dans les différents domaines de l'IRES pourraient avoir impacté l'efficacité de la traduction virale. Les trois mutations U263C, G264U et G436A, différenciant les virus récents de la souche prototype Fermon, semblent notamment renforcer les appariements et pourraient donc stabiliser le domaine IV tout en favorisant l'initiation de la traduction virale. Les mutations différenciant les virus récents de la souche Fermon pourraient avoir joué un rôle dans la réémergence de l'EV-D68.

C. Exploration du pouvoir pathogène des isolats dans des modèles cellulaires *in vitro*

Une étude comparative des souches d'EV-D68 (sous-clades B2, B3 et D1) isolées en culture a été initiée dans le but de comparer les caractéristiques de l'infection dans deux modèles cellulaires, en fonction des caractéristiques phylogénétiques. L'axe principal des travaux a été de développer un modèle *in vitro* de barrière mimant l'épithélium bronchique en utilisant la lignée cellulaire Calu-3 pour effectuer une analyse fonctionnelle des souches. Ces cellules d'origine bronchique ont la propriété de se différencier en un pseudo-épithélium polarisé lorsqu'elles sont cultivées à l'interface air/liquide (Grainger et al., 2006; Kreft et al., 2015).

C.1. Matériels et méthodes

1.1. Isolement des souches d'EV-D68 par inoculation directe

L'isolement des souches virales a été réalisé tel que décrit en amont (cf. Travaux personnels II.C.1). La concentration de virus infectieux des stocks viraux a été déterminée selon la méthode standard de titrage par dilutions limites, en utilisant les cellules de la lignée RD (rhabdomyosarcome) comme cellules tests.

1.2. Isolement des souches d'EV-D68 par transfection d'ARN

Les amplicons représentant les génomes complets ont été utilisés pour ces tests. L'oligonucléotide sens (dont la cible est le début de la région 5' non codante) contient le promoteur de la polymérase du phage T7 et l'oligonucléotide antisens contient une séquence poly(T)₂₀ (cf. Tableau S1, matériels supplémentaires de l'article). Les amplicons purifiés avec les colonnes [NucleoSpin Gel et PCR Clean-up, Machery-Nagel] ont servi de matrices de transcription avec le kit T7 RiboMAX Express Large Scale (Promega). Le protocole de transcription a été réalisé selon les instructions du fabricant hormis le temps d'incubation qui a été adapté à la quantité d'ADNc utilisée. Les dosages d'ADN et d'ARN ont été réalisés avec les kits de dosage Qubit d'ADNdb et d'ARN BR (broad range, ThermoFisher Scientific). Les cellules A549 en culture dans des plaques 6 puits ont été transfectées avec les ARN génomiques à l'aide de la Lipofectamine MessengerMAX (Invitrogen) en suivant les instructions du fabricant.

1.3. Titrage et évaluation de la charge virale

Le titre infectieux a été calculé avec un programme “maison” utilisant la méthode du maximum de vraisemblance qui estime le nombre le plus probable d’unités infectieuses en fonction des paramètres suivants : le nombre de répétitions, la raison de dilution utilisée et le nombre de répétitions positives (lyse cellulaire) pour chaque dilution. La charge virale des différents échantillons a aussi été évaluée par RT-PCR semi-quantitative (cf. Travaux personnels II.C.1). Les échantillons analysés pour les différents tests correspondent à des extraits cellulaires totaux (lysats cellulaires + surnageant). L’analyse statistique des données a été effectuée avec le logiciel GraphPad Prism 5 (GraphPad Software).

1.4. Culture cellulaire et modèle d’épithélium bronchique

La culture des cellules Calu-3 (ATCC, HB-55, passages 24-36), A549 (ATCC, passages 95-110) et RD (ECACC, 85111502, passages 60-70), a été réalisée avec des passages bi-hebdomadaires et le maintien à 37 °C en atmosphère à 5% de CO₂ dans du milieu DMEM supplémenté par 5 à 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (SVFhi) et 1 % d’antibiotiques (1% streptomycine 10 mg/mL ; pénicilline 10 000 U). Le milieu utilisé pour les cellules Calu-3 était aussi supplémenté avec 1% d’acides aminés non essentiels.

Les cellules Calu-3 ont été cultivées dans des dispositifs Transwell à la surface d’une membrane semi-perméable microporeuse (Costar, surface : 1,12 cm² ; diamètre des pores : 0,4 µm). Les dispositifs utilisés, disposés dans des plaques 12 puits, possèdent une membrane en polyester transparent pour permettre l’observation en microscopie à contraste de phase. Les cellules sont maintenues dans le milieu DMEM supplémenté avec 10% de SVFhi, 1,5 mL dans le compartiment basal et 0,5 mL dans le compartiment apical du modèle. À confluence, les cellules peuvent être infectées. La différenciation des cellules s’opère en retirant le milieu du compartiment apical soit à l’interface air-liquide. Certaines cultures ont été observées en microscopie électronique à balayage (appareil Joel 6060-LV).

1.5. Mesure de la résistance électrique transépithéliale

La résistance électrique transépithéliale (TEER) reflète la fonctionnalité des jonctions serrées et ainsi l’intégrité générale de la barrière épithéliale. Les mesures ont été réalisées avec un instrument EVOM2 (Epithelial Voltometer, World Precision Instruments) couplé à une sonde STX2 (World Precision Instruments) selon les instructions du fabricant. Les plaques 12 puits de culture ont été maintenues sur une plaque chauffante à 37 °C lors des mesures. La

- Amérique du Nord (États-Unis, Canada)
- Asie (Chine, Japon, Taiwan, Hong-Kong, Vietnam, Inde, Philippines)
- Europe (Suède, France, Espagne, Belgique, Pays-Bas, Suisse)

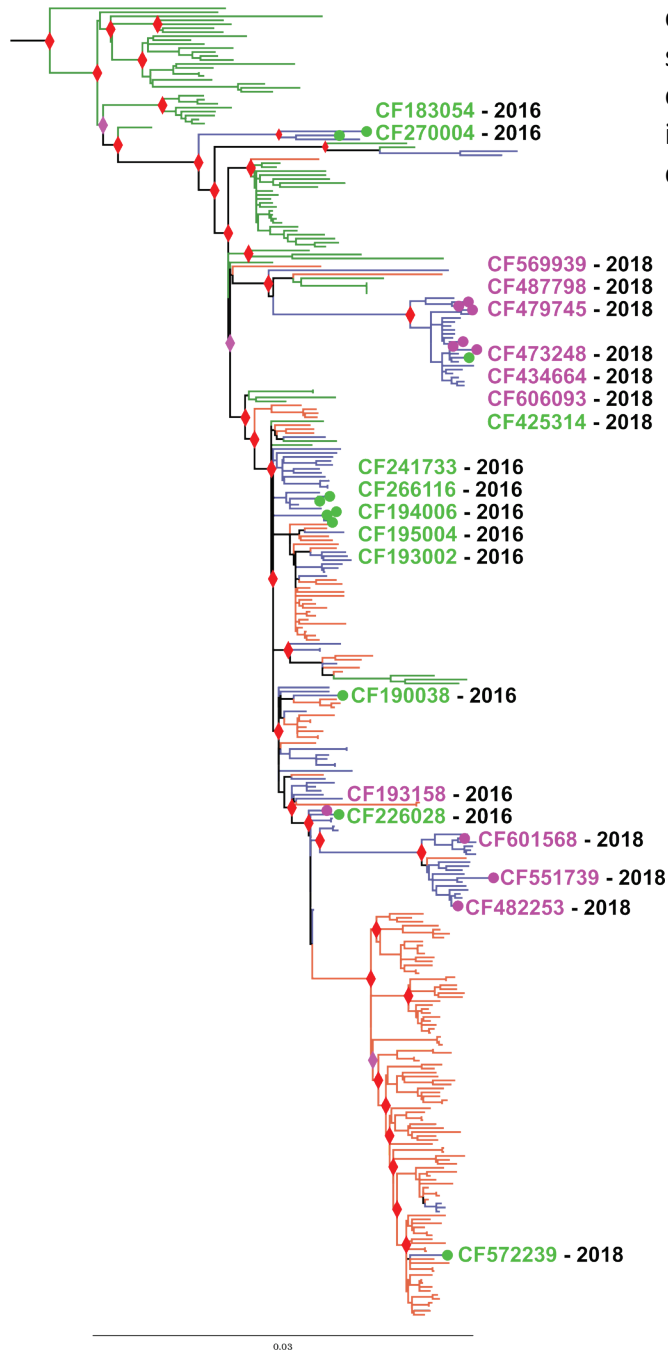


Figure 19 : Génomes complets d'EV-D68 séquencés et souches isolées appartenant au clade B3. L'arbre phylogénétique est celui de la figure 26. Les cercles et noms de souches virales colorés en vert et rose correspondent respectivement aux virus isolés et non isolés en culture *in vitro* au cours de cette thèse.

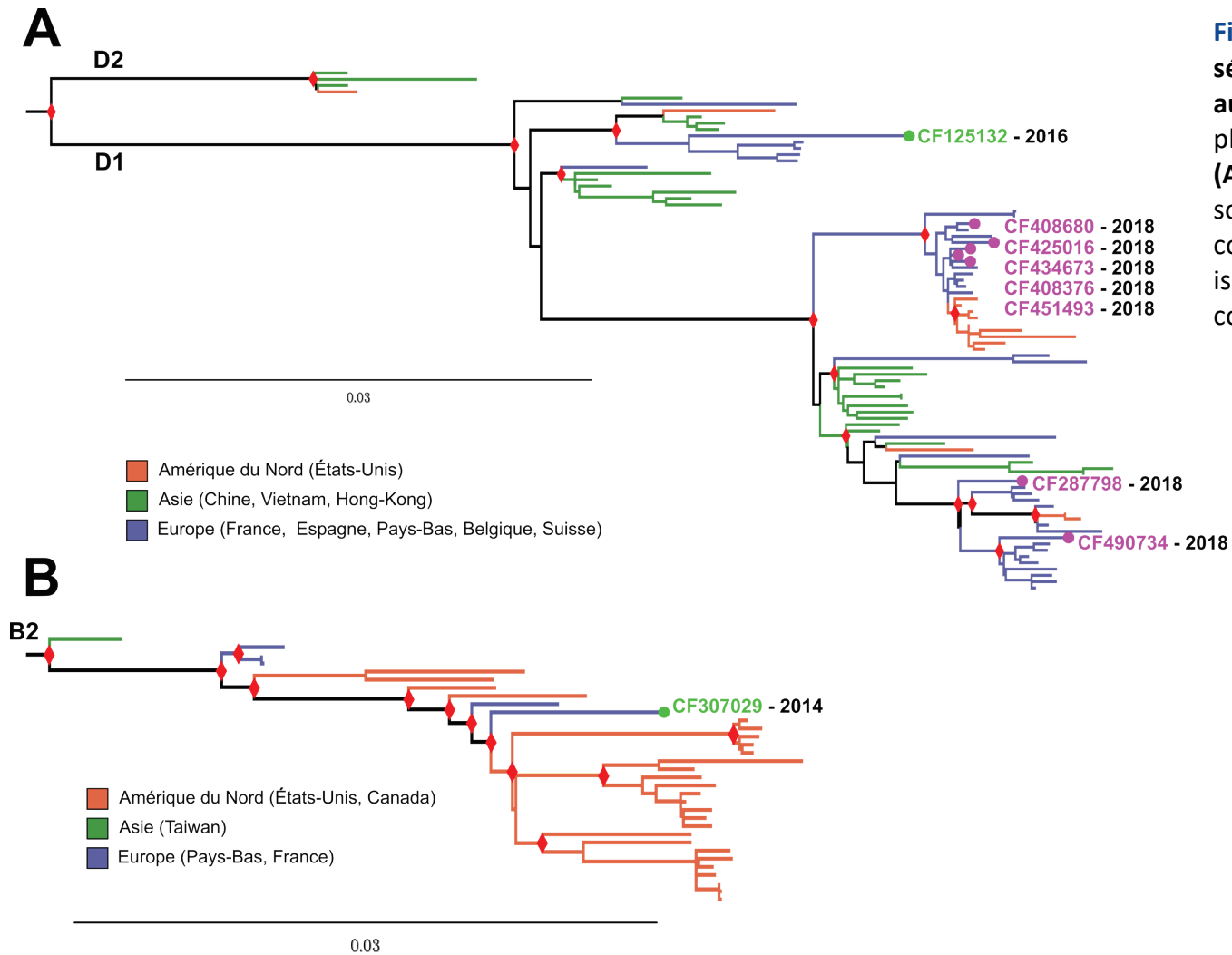


Figure 20 : Génomes complets d'EV-D68 séquencés et souches isolées appartenant aux clades D1 (A) et B2 (B). Les arbres phylogénétiques sont ceux des figures 28 (A) et 25 (B). Les cercles et noms de souches virales colorés en vert et rose correspondent respectivement aux virus isolés et non isolés en culture *in vitro* au cours de cette thèse.

sonde est équipée d'une paire d'électrodes permettant la mesure de part et d'autre de la barrière épithéliale. La résistance transépithéliale correspond au courant mesuré (I) converti en résistance (R) selon la loi d'Ohm ($R=U/I$). U correspondant au voltage appliqué aux électrodes. Cette valeur R est mesurée en trois points du dispositif de culture. On obtient ainsi une moyenne de résistance à travers l'épithélium (R_E) à laquelle est soustraite la moyenne de résistance de la membrane en l'absence de cellules (R_M). La valeur TEER est exprimée en fonction de la surface (S) de la membrane selon la formule suivante :

$$TEER(\Omega. cm^2) = (R_E - R_M) \times S$$

1.6. Tests d'infections cellulaires

Les tests d'inhibition de l'entrée des EV-D68 ont été réalisés avec des cellules A549 et Calu-3 (passages 24-36) cultivées dans les dispositifs Transwell, en traitant au préalable les cellules avec la neuraminidase de *Vibrio Cholerae* (Sigma Aldrich) à 0,05 ou 0,1 U/mL (dilué dans du DMEM) pendant 2 h à 37 °C. La neuraminidase hydrolyse les liaisons glycosidiques reliant en $\alpha 2,3$ ou $\alpha 2,6$ les acides sialiques aux oligosaccharides présents à la surface cellulaire. Deux virus témoins, provenant des stocks de l'équipe, ont été utilisés : EV-D70 et CVB3. Le premier utilise les acides sialiques comme récepteurs (comme l'EV-D68), ce qui n'est pas le cas du second virus. Pour l'ensemble des tests d'infection, les cultures ont été lavées avec du PBS puis inoculées avec 50 μ L des suspensions mères dans du DMEM, puis incubées pendant 1 h 30 à 33 °C. L'inoculum résiduel est ensuite retiré avant de laver la nappe cellulaire avec du PBS puis d'incuber la culture à 33 °C. À l'issue de la période d'incubation, l'infection est stoppée en plaçant les cultures à -20 °C. Les différents lots de culture de cellules Calu-3 maintenus en système transwell ont été inoculés par la voie apicale à l'exception d'un test d'infection réalisé par la voie basale.

C.2. Résultats

2.1. Souches d'EV-D68 isolées

Treize souches d'EV-D68 ont été isolées avec les cellules A549 à partir de prélèvements cliniques : 11 pour le sous-clade B3 (Figure 29) et une pour chacun des sous-clades B2 et D1 (Figure 30), confirmant par ailleurs la sensibilité et la permissivité de ce type cellulaire. Deux d'entre elles seulement (sous-clade B3) ont été isolées à partir des prélèvements les plus récents de notre échantillon (2018) et nous n'avons obtenu qu'un seul isolat du sous-clade

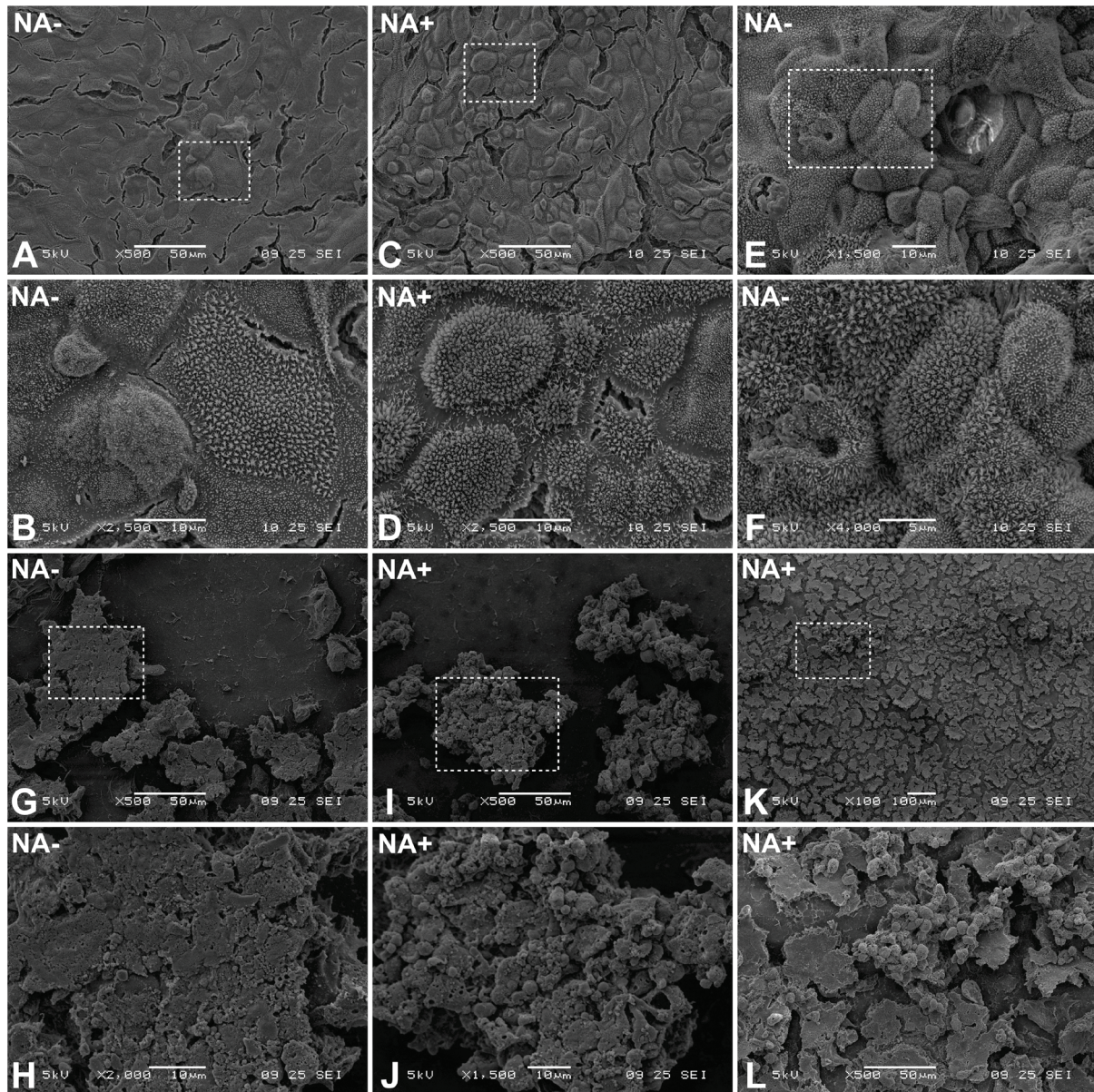


Figure 31 : Sensibilité de la barrière épithéliale formée par les cellules Calu-3 à l'infection par l'EV-D68. Les cultures cellulaires ont été observées 24 h après l'inoculation en microscopie électronique à balayage. **(A-F)** Cultures témoins négatifs. **(G-J)** Cultures inoculées avec la souche CF125132. **(K-L)** Cultures infectées avec la souche CF270004. **(A, C, G, I, L)** Grossissement $\times 500$, barre d'échelle $50\ \mu\text{m}$. **(B, D)** Grossissement $\times 2500$, barre d'échelle $10\ \mu\text{m}$. **(E, J)** Grossissement $\times 1500$, barre d'échelle $10\ \mu\text{m}$. **(F)** Grossissement $\times 4000$, barre d'échelle $5\ \mu\text{m}$. **(H)** Grossissement $\times 2000$, barre d'échelle $10\ \mu\text{m}$. **(K)** Grossissement $\times 100$, barre d'échelle $100\ \mu\text{m}$. Chaque zone délimitée par des pointillés blancs correspond à l'image suivante. NA-/NA+, cultures non traitées / traitées avec la neuraminidase.

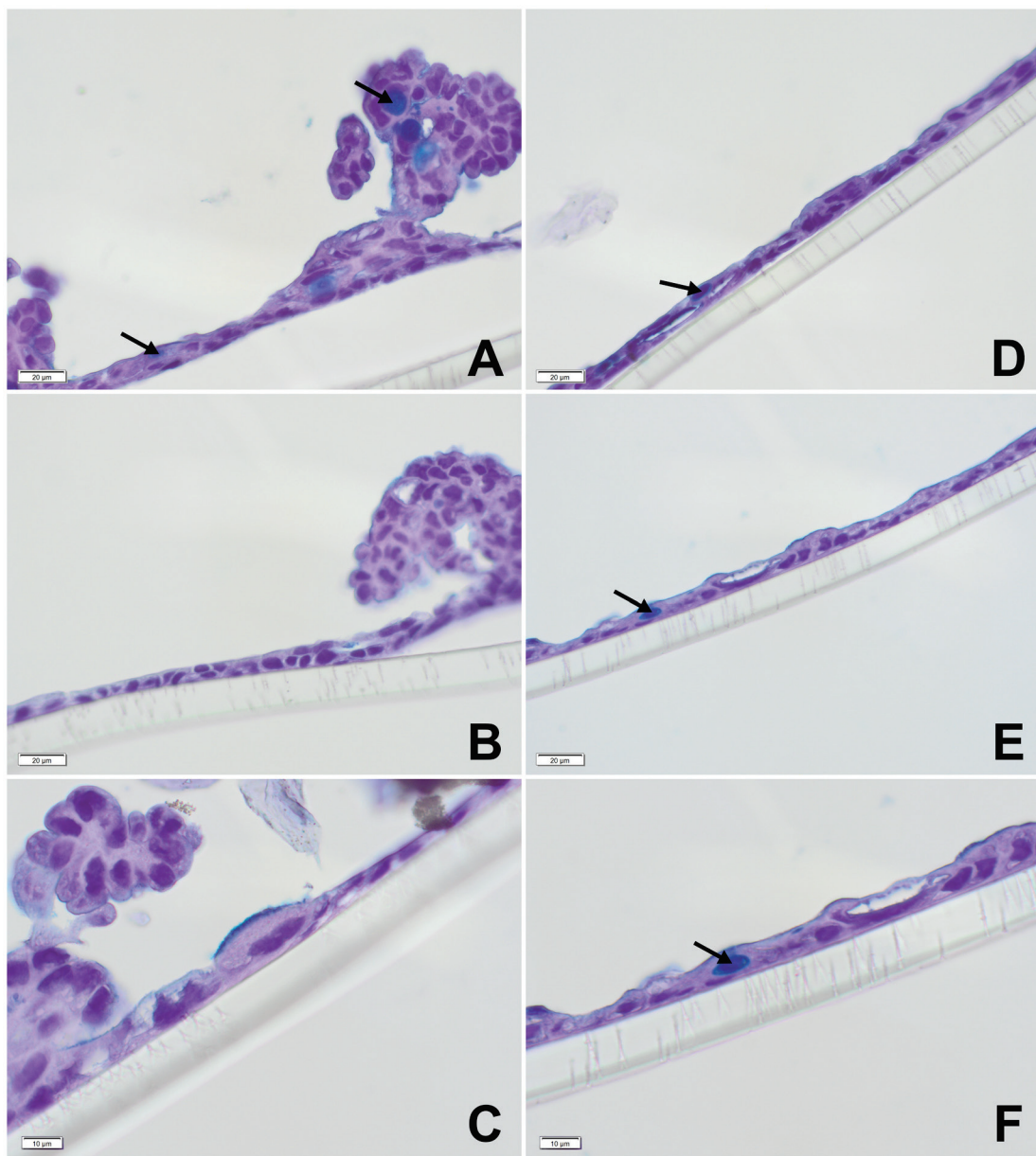


Figure 32 : Morphologie générale de la barrière épithéliale formée par les cellules Calu-3. L'analyse histologique a été effectuée suivant le protocole de Kreft et al (2015). Une double coloration à l'hématoxyline (violet) et au bleu alcian (colore le mucus en bleu) a été réalisée. Les cultures ont été observées en microscopie optique. Certaines vésicules contenant du mucus sont indiquées par une flèche noire. Du mucus est également visible à la surface de la nappe cellulaire. **(A, B)** Culture à l'interface air/liquide, grossissement x600 ; **(C)** Culture à l'interface air/liquide, grossissement x1000 ; **(D, E)** Cultures à l'interface liquide/liquide, grossissement x600 ; **(F)** Culture à l'interface liquide/liquide, grossissement x1000.

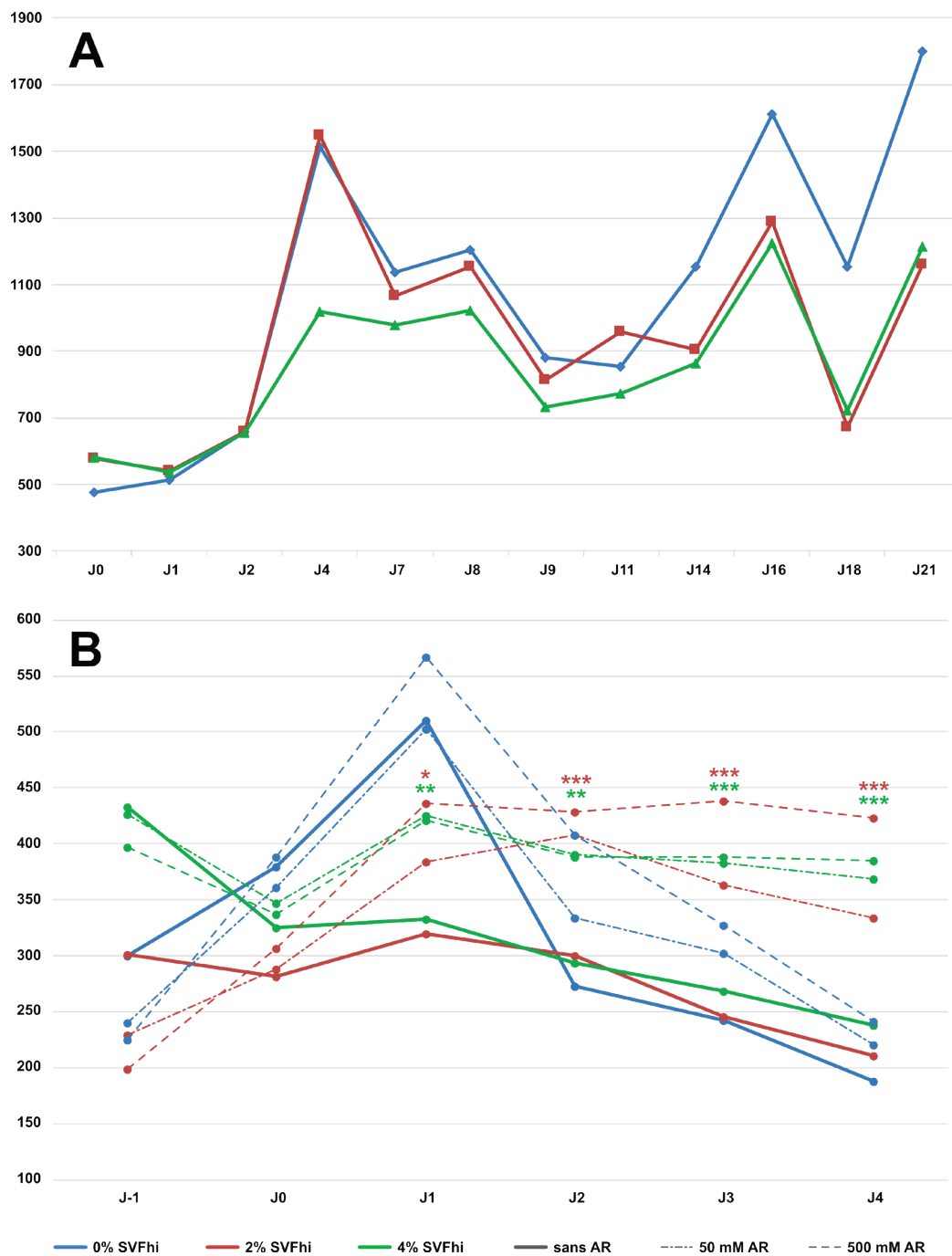


Figure 33 : Effets de la supplémentation en sérum de veau fœtal décomplémenté (SVFhi) et de l'acide rétinoïque sur la résistance électrique transépithéliale (TEER) de barrières épithéliales polarisées (cellules Calu-3 différenciées). (A) Suivi de la TEER de barrières épithéliales maintenues à l'interface liquide/liquide (confluence à J0) sous trois conditions de supplémentation en SVFhi. La légende est la même que pour le panneau B. (B) Suivi de la TEER de barrières épithéliales maintenues à l'interface air/liquide (à partir de J0, confluence à J-1) sous trois conditions de supplémentation en SVFhi et trois conditions de traitement avec l'acide rétinoïque. Les astérisques indiquent une TEER significativement différente entre les conditions sans et avec acide rétinoïque (50 et 500 mM) et sont colorées suivant la condition de supplémentation en SVFhi pour laquelle le test statistique a été effectué (ANOVA 2, * P<0,05 ; **P<0,01 ; *** P<0,001).

D1. C'est la raison pour laquelle, le protocole de transfection a été utilisé pour tenter d'isoler trois souches de 2018 (CF482253 [B3], CF408680 [D1] et CF425016 [D1]) pour lesquelles un amplicon représentant le génome complet avait été obtenu. Une lyse des cultures transfectées a été observée 24 h après la transfection avec les 3 ARN, contrairement aux témoins négatifs. Les tests doivent être poursuivis pour identifier le virus présent dans les surnageants issus des transfections pour valider la méthode.

2.2. Optimisation du modèle de barrière épithéliale

Culture air/liquide. Dans un premier test exploratoire, les cellules Calu-3 ont été maintenues dans des dispositifs Transwell à l'interface liquide/liquide pendant 32 jours. Pendant la phase de culture à l'interface liquide/liquide, la TEER maximum atteinte était comprise entre 400 et 500 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ après 4 semaines d'entretien. Ensuite, une transition vers l'interface air/liquide a été effectuée pour enclencher la différenciation des cellules. Après 17 jours à l'interface air/liquide, la résistance électrique transépithéliale des barrières a été mesurée entre 330 et 500 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ (données non montrées). L'observation des cultures en microscopie électronique à balayage (Figure 31A-F) montre des tapis cellulaires plats, formés de cellules jointives dont certaines zones plus renflées suggèrent la présence de plusieurs couches de cellules. Deux types de villosités, courtes et longues, sont visibles à la surface des cellules. Les brèches intercellulaires sont des artefacts de préparation pour l'observation en microscopie électronique à balayage. Une analyse histologique a également été effectuée sur des cultures réalisées aux interfaces air/liquide et liquide/liquide et confirme les observations décrites ci-dessus (Figure 32). À l'interface air/liquide, la barrière épithéliale est formée d'une monocouche et d'excroissances pluristratifiées qui ne sont pas observées pour les cultures à l'interface liquide/liquide. Des vésicules sécrétrices de mucus ainsi que du mucus en surface des cellules sont également visibles dans les 2 types de culture.

Effet de la concentration en SVFhi. La concentration en SVFhi a été réduite dans une nouvelle série de cultures, pour évaluer les conséquences sur la différenciation cellulaire pendant la phase de culture liquide/liquide (Figure 33A). Les cultures maintenues en milieu sans ou avec 2% de SVFhi ont atteint des TEER moyennes comprises entre 1500 et 1550 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ 4 jours après la confluence. Finalement, les cultures en l'absence de SVFhi atteignent une TEER moyenne maximale de 1800 $\Omega \cdot \text{cm}^2$, 3 semaines après la confluence. D'autres cultures ont été utilisées pour tester l'impact de la concentration en SVFhi pendant la phase de culture air/liquide

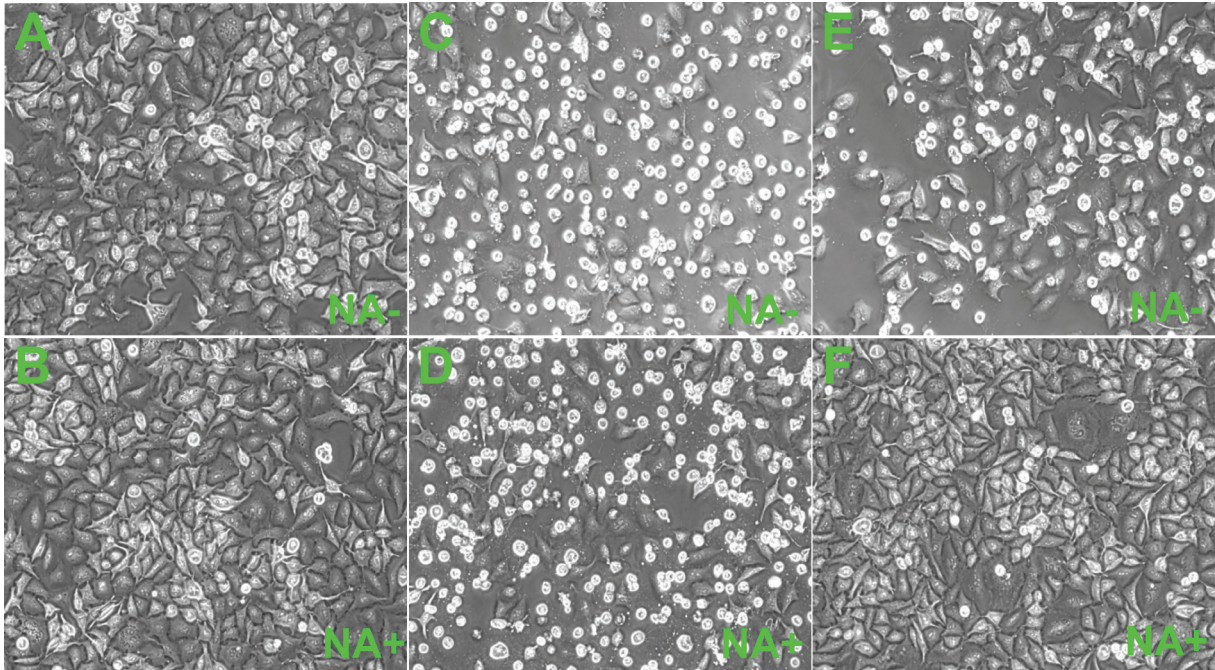


Figure 34 : Effet d'un traitement par la neuraminidase sur les cellules A549 infectées ou non par l'EV-D68. (A, B) Cellules témoins non infectées. (C, D) Cellules infectée avec une souche du clade B3 (CF270004). (E, F) Cellules infectées avec une souche du clade D1 (CF125132). Les cellules A549 ont été traitées à 37 °C pendant 2 heures avec une solution de neuraminidase (0,05 U/mL) avant l'inoculation. Les cultures cellulaires ont été observées en microscopie à contraste de phase (grossissement x200) 24 heures après l'inoculation. L'absence d'altération des cellules témoins montre l'innocuité du traitement avec la neuraminidase (B). En l'absence de traitement à la neuraminidase (C, E), la présence de nombreuses cellules rondes et réfringentes (caractéristiques d'un effet cytopathique, ECP) parmi les cellules infectées montre la sensibilité des cellules au virus. Traiter les cultures cellulaires avec la neuraminidase avant l'infection a un effet variable selon la souche. Les cellules infectées avec la souche CF270004 présentent un ECP massif contrairement aux cultures inoculées avec la souche CF125132. NA-/NA+, cultures non traitées / traitées avec la neuraminidase.

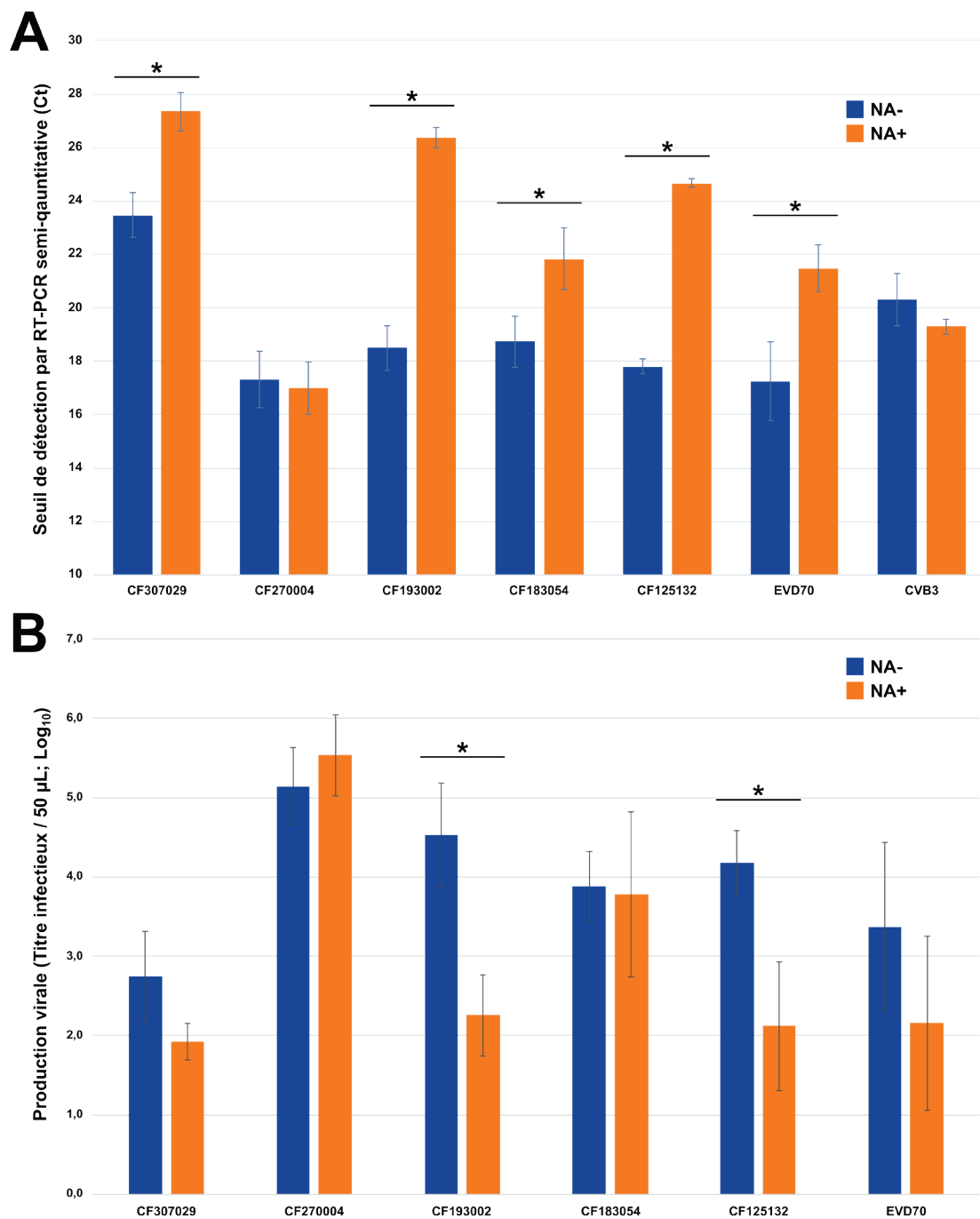


Figure 35 : Effet du traitement préalable des cellules A549 par la neuraminidase sur l'infection à EV-D68. (A) Le seuil de détection (valeurs Ct) a été utilisé pour représenter la charge virale dans chaque échantillon. **(B)** Le titre infectieux (Log₁₀ nombre de particules infectieuses pour 50 µL d'échantillon) dans les échantillons a été déterminé par titrage. Les tests ont été effectués en 4 réplicas ; les différences significatives (test de Mann-Whitney ; P<0,05) sont indiquées par un astérisque. NA-/NA+, cultures non traitées / traitées avec la neuraminidase.

(Figure 33B). Les valeurs de TEER obtenues pour les trois conditions ne sont pas significativement différentes hormis à J1 entre 0 (510 Ω .cm²) et 2% (319 Ω .cm²) de SVFhi (test ANOVA 2, P<0,001). Le pic de TEER se situe à J1 pour les trois conditions.

Effet de l'acide rétinoïque. L'acide rétinoïque, connu comme facteur de différenciation cellulaire (Fernandes-Silva et al., 2020), a été introduit (J0) dans le milieu basal des cultures maintenues à l'interface air/liquide 24 h après avoir atteint la confluence (Figure 33B). Les valeurs de TEER mesurées sont inférieures à celles mesurées dans le test précédent, réalisé à l'interface liquide/liquide (Figure 33A). Toutefois, les cultures n'avaient été maintenues à l'interface liquide/liquide que pendant 24 h, durée insuffisante pour une augmentation de la TEER (Figure 33A). L'effet de l'acide rétinoïque est significatif pour les cultures supplémentées en SVFhi (test ANOVA 2, P<0,05). L'acide rétinoïque augmente significativement les valeurs de TEER entre J1 et J4 (P<0,05). Les valeurs de TEER pour les cultures maintenues avec 2% de SVFhi présentent une différence significative entre des concentrations de 50 et 500 mM d'acide rétinoïque, à J3 et J4. Les cultures non supplémentées en SVFhi atteignent des TEER moyennes significativement supérieures (P<0,01) aux autres cultures à J1. Ces valeurs de TEER chutent ensuite et rejoignent celles associées aux cultures non supplémentées en acide rétinoïque. Le traitement des cultures avec l'acide rétinoïque semble également diminuer la formation d'excroissances pluristratifiées (observations en microscopie à contraste de phase, non montrées).

2.3. Inhibition de l'entrée du virus dans le modèle A549

Les cellules A549 traitées ou non avec la neuraminidase ont été inoculées avec cinq isolats (sous-clade ; titre infectieux) : CF270004 (B3 ; $4,78 \pm 0,11 \log_{10}$), CF193002 (B3 ; $3,66 \pm 0,06 \log_{10}$), CF183054 (B3 ; $4,63 \pm 0,72 \log_{10}$), CF307029 (B2 ; $3,05 \pm 0,06 \log_{10}$) et CF125132 (D1 ; $3,85 \pm 0,23 \log_{10}$). Toutes les cultures cellulaires non traitées présentaient un ECP plus ou moins marqué 24 h après l'inoculation. À l'inverse, les cultures préalablement traitées avec la neuraminidase ne présentaient pas d'ECP à l'exception de celles inoculées avec la souche du sous-clade B3 CF270004 (Figure 34). L'effet du traitement a été évalué par RT-PCR semi-quantitative (Figure 35A). Les valeurs seuils de détection sont significativement plus élevées (test non paramétrique de Mann-Whitney, P<0,05), indiquant une charge virale plus faible, dans les cultures traitées avec la neuraminidase que dans les cultures non traitées, exceptions faites des cultures inoculées avec la souche de sous-clade B3 CF270004 et le CVB3. Une

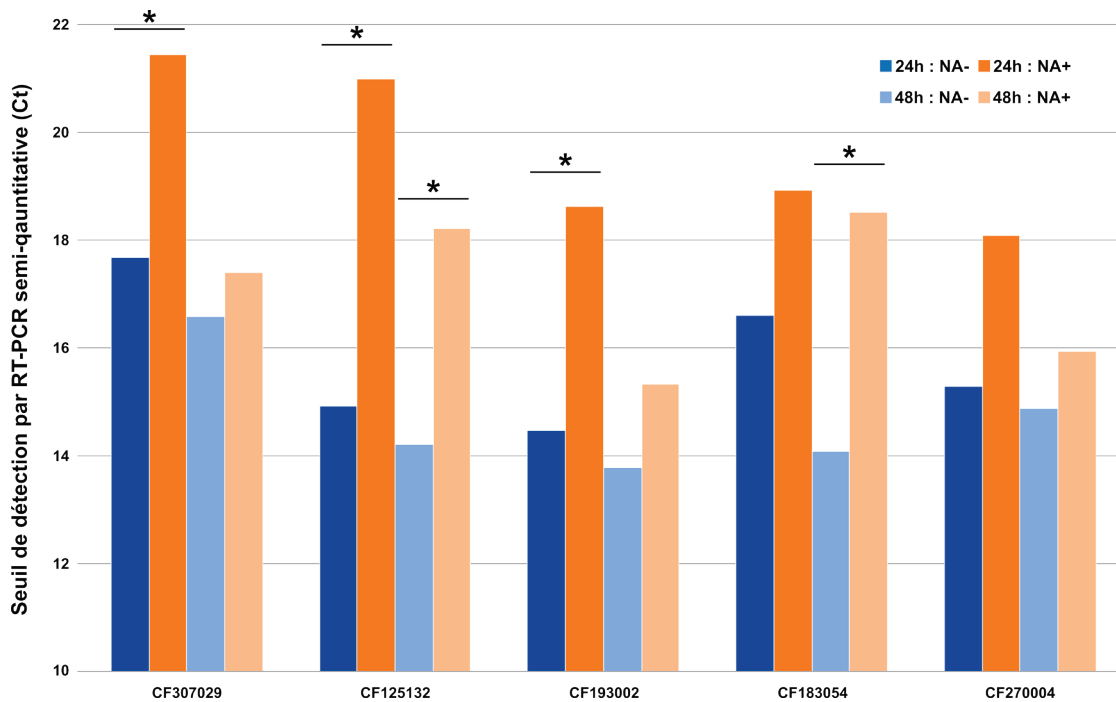


Figure 36 : Effet du traitement préalable des cellules Calu-3 par la neuraminidase sur l'infection à EV-D68. Le seuil de détection (valeurs Ct) a été utilisé pour représenter la charge virale dans chaque échantillon. Une variation $\Delta Ct > 3$ entre deux tests est indiquée par un astérisque. NA-/NA+, cultures non traitées / traitées avec la neuraminidase.

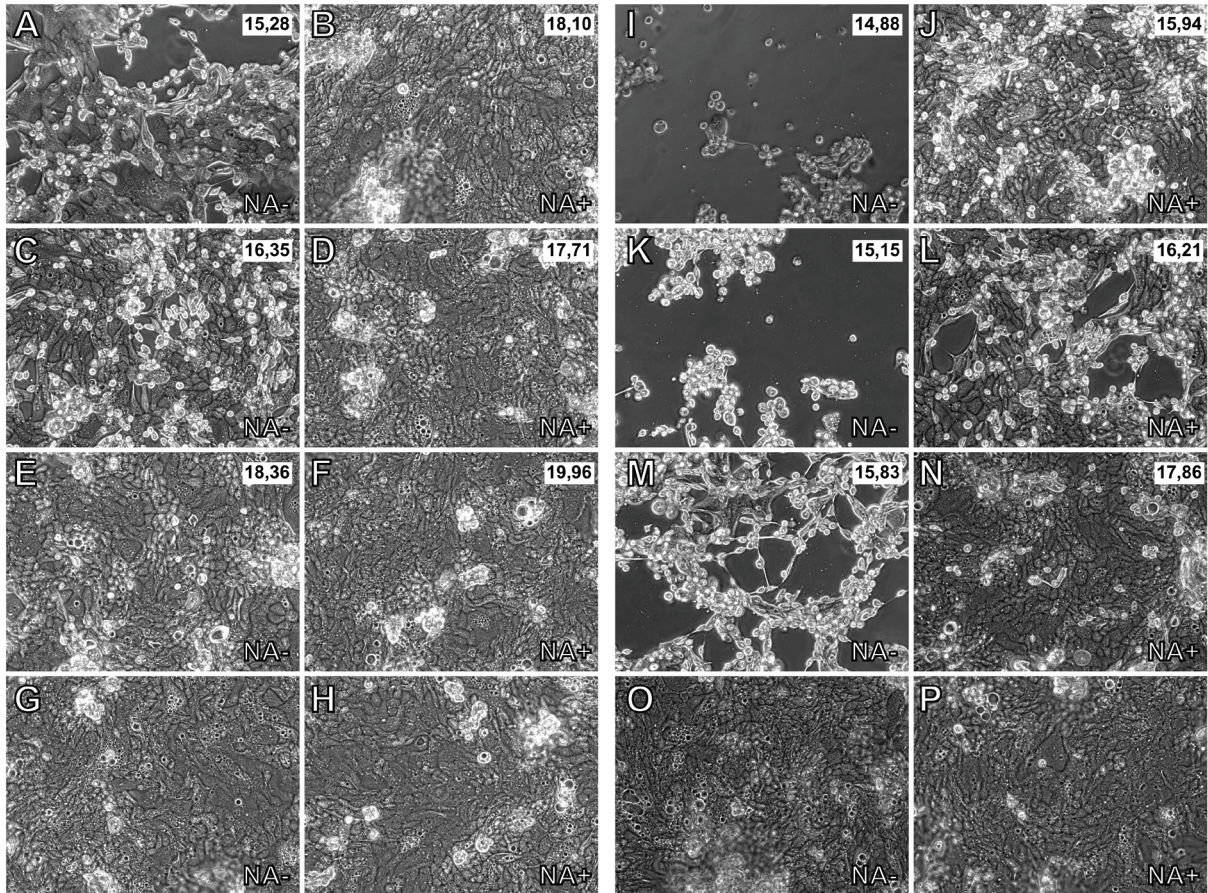


Figure 37 : Sensibilité des cellules Calu-3 à l'infection par l'EV-D68 CF270004. Les cultures cellulaires ont été observées en microscopie à contraste de phase après 24 et 48h d'incubation (grossissement x200). Les nombreuses cellules rondes blanches ainsi que les plages de lyse (**A, C, I-M**) sont caractéristiques d'un effet cytopathique (ECP). (**A-H**) Observations après 24h d'incubation. (**I-P**) Observations après 48h d'incubation. Le seuil de détection (valeurs Ct) a permis de représenter la charge virale dans chaque échantillon. Ces valeurs sont indiquées en haut à droite des images. Le titre infectieux des inocula de virus utilisés (Log_{10} nombre de particules infectieuses pour 50 μL d'échantillon) est de 4,78 (**A, B, I, J**), 3,78 (**C, D, K, L**) ou 2,78 (**E, F, M, N**), il a été déterminé à partir du titre infectieux du stock de virus utilisé et du facteur de dilution employé. L'analyse des témoins négatifs par RT-PCR n'a pas détecté d'ARN viral montrant l'absence de contamination intra essai. NA-/NA+, cultures non traitées / traitées avec la neuraminidase.

inhibition de la réplication du génome viral est donc observée pour 4/5 souches d'EV-D68. La production de virus infectieux a également été déterminée dans les mêmes échantillons (à l'exception de ceux associées à la souche de CVB3) (Figure 35B). La production virale est significativement inhibée ($P < 0,05$) par le traitement avec la neuraminidase pour les souches CF193002 (sous-clade B3) et CF125132 (sous-clade D1), et ne l'est pas pour la souche CF270004. Les résultats de la charge virale par RT-PCR concordent avec ceux de la production virale pour ces 3 virus, ce qui n'est pas le cas pour les autres EV-D68 et l'EV-D70. Il y a tout de même une tendance à l'inhibition de la production virale pour l'EV-D70 et la souche CF307029 (sous-clade B2).

2.4. Inhibition de l'entrée du virus dans le modèle Calu-3

Après avoir confirmé la sensibilité et permissivité des cellules Calu-3 non différenciées à l'infection par l'EV-D68, un test d'inhibition de l'entrée dans les cellules a été réalisé (pas de réplica). Seules les cultures inoculées non traitées avec la neuraminidase présentaient un ECP 24 h après l'inoculation, ce qui suggère que l'infection est inhibée en l'absence d'acides sialiques pour tous les virus. Les charges virales des différents échantillons semblent confirmer ces observations pour trois souches : une variation $\Delta Ct > 3$ entre les cultures traitées et non traitées est observée seulement pour les souches CF307029, CF125132 et CF193002 (Figure 36-37). 48 h après l'inoculation, l'inhibition semble réduite pour la plupart des souches (hormis CF125132 et CF183054). Les cultures traitées avec la neuraminidase affichent alors de faibles ECP. Pour la souche CF270004, le test a été reproduit à différentes concentrations. L'intensité de l'ECP observé à 24 h et 48 h post-inoculation pour les cultures non traitées varie en fonction de la concentration de l'inoculum, suggérant une relation dose-effet (Figure 37).

2.5. Inhibition de l'infection de la barrière épithéliale

L'effet de la neuraminidase sur l'inhibition de l'infection virale a été testé (pas de réplica) avec les cultures air-liquide en utilisant deux virus : CF270004 (pas d'inhibition observée avec le modèle cellulaire A549) et CF125132 (effet inhibiteur observé avec le même modèle). Le traitement des cultures avec la neuraminidase n'affecte pas l'aspect de la surface cellulaire (Figure 31C-D). La barrière épithéliale est en grande partie détruite, 24 h après l'inoculation, pour toutes les cultures (Figure 31G-L). Les cellules qui adhèrent encore au support présentent une surface lisse dépourvue de villosités. De nombreuses cellules nécrosées présentent une membrane perforée.

Tableau 7 : Charge virale (Ct) des souches CF125132 et CF270004 à 24 et 48h post-inoculation de la barrière épithéliale bronchique (Calu-3).

		NA-		NA+	
		Surnageant apical	Milieu de culture basal	Surnageant apical	Milieu de culture basal
CF125132 (Air/Liquide)	J1 (24h)	18,01	30,96	20,70	32,73
	J2 (48h)	14,32	27,17	17,23	28,65
CF125132 (Air/Liquide)	J1 (24h)	16,14	29,30	18,59	30,40
	J2 (48h)	14,43	25,95	14,83	27,85
CF270004 (Liquide/Liquide)	J1 (24h)	15,49	32,84	18,36	ND
	J2 (48h)	15,29	29,97	17,57	34,68

NA-, cultures non traitées avec la neuraminidase ; NA+, cultures traitées avec la neuraminidase

Ce test a été reproduit avec des cultures maintenues à l'interface liquide/liquide pour le virus CF270004 et des cultures liquide/liquide et air/liquide pour le virus CF125132. Les observations en microscopie à contraste de phase, 24 h après l'inoculation, confirment les résultats précédents. La charge virale a été évaluée 24 h et 48 h après l'inoculation dans le compartiment apical et basal. Les valeurs de Ct sont proches ($\Delta Ct < 3$) entre les cultures traitées ou non avec la neuraminidase, ce qui indique une absence ou une faible inhibition de l'infection. L'ARN viral est détecté dans le compartiment basal pour 11/12 cultures et la charge virale dans ces compartiments augmente à 48 h post-inoculation ([Tableau 7](#)).

C.3. Commentaires

L'isolement de souches de virus récents est une pratique qui disparaît du diagnostic virologique. Malgré les variations phénotypiques qui surviennent en culture, isoler une souche présente un intérêt essentiel pour améliorer les connaissances scientifiques dans plusieurs domaines. Même s'il existe des techniques alternatives, les souches cultivables présentent un intérêt pour le développement de traitements antiviraux spécifiques et de candidats vaccins, pour l'étude de la pathogenèse virale ainsi que les études de séroprévalence (Kamau et al., 2019; Karelehto et al., 2019; Xiang et al., 2017). La souche CF183054, isolée au cours de cette thèse, a notamment été utilisée dans l'étude séro-épidémiologique de Karelehto et al (2019). Parmi les souches isolées dans notre travail pourtant phylogénétiquement proches, il existe de nettes différences de pouvoir infectieux. Identifier les déterminants de ces variations permettrait de comprendre le processus de multiplication et les interactions avec la cellule et l'organisme hôte de façon à mieux cerner le caractère pathogène.

L'isolement de souches d'EV-D68 par l'inoculation de cultures cellulaires avec un prélèvement clinique est relativement difficile et aléatoire. La transfection de génomes complets pourrait contribuer à isoler des souches qui présentent un intérêt particulier. Seule une étude a décrit la transfection de génome EV-D68 dans des cellules HeLa à 33°C (Royston et al., 2018). La limite principale de notre stratégie est l'obtention de génomes complets. La technique d'amplification utilisée présente une très faible sensibilité et devrait être remplacée par une technique de clonage (après une amplification de plusieurs fragments) permettant l'isolement d'un plus grand nombre de souches virales. La transfection pourrait également limiter le nombre de passages nécessaires pour obtenir un stock concentré de virus, réduisant ainsi l'apparition de variants génétiques dans la population virale (Essaidi-Laziosi et al., 2018).

Bien que les cellules Calu-3 aient déjà servi de modèle d'étude pour d'autres virus respiratoires tel que le virus influenza (Zeng et al., 2007) ou plus récemment le SARS-CoV-2 (Shaath and Alajez, 2020), notre étude est la seule à montrer la sensibilité et la permissivité à l'infection par l'EV-D68. La culture de ces cellules à l'interface air-liquide a permis d'obtenir une différenciation convaincante sous la forme d'un pseudo-épithélium bronchique polarisé, en accord avec les résultats d'études antérieures (Grainger et al., 2006; Kreft et al., 2015). La présence de villosités de différentes tailles pourrait correspondre à des stades de développement cellulaire. Les observations réalisées en microscopie électronique à balayage concernent les cultures les moins maîtrisées réalisées au cours de cette thèse. Les valeurs de résistance électrique transépithéliale (TEER) obtenues via une faible supplémentation en SVFhi sont supérieures à celles mentionnées dans la littérature (Grainger et al., 2006; Kreft et al., 2015) et démontrent une bonne étanchéité. Celle-ci pourrait toutefois être contrôlée en testant le passage d'un marqueur fluorescent depuis le compartiment apical vers le compartiment basal (Kreft et al., 2015).

Nos résultats permettent de dresser un protocole de culture des cellules Calu-3 : (i) maintien des cellules à l'interface liquide/liquide dans du milieu supplémenté par 10% de SVFhi jusqu'à la confluence de la nappe cellulaire. (ii) Réduction de la supplémentation en SVFhi pour atteindre 2% puis maintien des conditions de culture en suivant l'évolution de la TEER jusqu'à atteindre environ 1500 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ (4-5 jours). (iii) Passage à l'interface air/liquide et ajout de 50 mM d'acide rétinoïque dans le milieu de culture puis maintien des conditions de culture pendant 2 à 5 jours en suivant l'évolution de la TEER. Ce protocole devra être validé en contrôlant l'étanchéité de la barrière et la présence de cellules ciliées. Après validation, ce modèle de barrière épithéliale bronchique serait facilement utilisable pour un coût plus faible que les modèles *in vitro* commerciaux. La capacité des cellules Calu-3 à produire une réponse interféron de type I (Zeng et al., 2007) accroît l'intérêt du modèle et offre des perspectives d'études de la réponse antivirale. Toutefois, la réponse immunitaire et la fonction de barrière des cellules Calu-3 diffèrent de celles de cellules nasales primaires (Martens et al., 2018).

Par la suite, il sera important de comparer notre modèle avec un modèle d'épithélium bronchique comme par exemple MucilAir (commercialisé par Epithelix), déjà utilisé pour l'étude de l'EV-D68 (Essaidi-Laziosi et al., 2018; Royston et al., 2018). Formé de divers types cellulaires primaires (cellules ciliées, en gobelet, basales et non différenciées), il semble

actuellement être le modèle de culture *in vitro* le plus proche de l'état *in vivo* pour l'étude du tropisme respiratoire de l'EV-D68. Évaluer la possibilité de l'installation d'une infection chronique dans les cellules Calu-3 différenciées, comme observée avec le modèle MucilAir (Essaidi-Laziosi et al., 2018) est un autre aspect de la validation de notre modèle. L'absence de cellules basales dans le modèle Calu-3 est un biais certain, réduit par l'absence de multiplication de l'EV-D68 dans ce type cellulaire (Essaidi-Laziosi et al., 2018).

Bien que l'utilisation de la neuraminidase de *Vibrio cholerae*, aux concentrations employées dans cette thèse, abolisse totalement l'infection par l'EV-D70 de différentes lignées cellulaires (Nokhbeh et al., 2005), son efficacité n'a pas été contrôlée au cours des travaux. Ce contrôle est réalisable en marquant spécifiquement les acides sialiques α 2,3 et α 2,6 respectivement avec les lectines MAII (Maackia amurensis lectin II) et SNA (Sambucus nigra agglutinin) (Schmier et al., 2015; Zeng et al., 2007). Nos résultats, comme ceux de Baggen et al (2016), montrent la capacité des EV-D68 à utiliser une voie d'entrée cellulaire alternative aux acides sialiques. La comparaison de l'infection dans le modèle de cellules Calu-3 différenciées ou non, via une analyse transcriptomique, pourrait alors permettre d'identifier ces facteurs.

Conclusions et Perspectives

I. Dynamique épidémique et surveillance de la circulation du virus

Les facteurs à l'origine de la réémergence de l'EV-D68 dans les années 2000 et le mode de circulation de ce virus dans la population générale à l'échelle mondiale depuis 2014 suscitent encore de nombreuses questions dans la communauté scientifique. Le potentiel épidémique et le neurotropisme du virus en font un pathogène à ne pas négliger tant il risque de représenter une cause importante de paralysie chez les enfants dans les années à venir. Il est donc essentiel de progresser dans la connaissance de ce virus pour disposer des moyens nécessaires pour anticiper et prévenir une épidémie de grande ampleur. La pandémie que nous traversons actuellement est un reflet très net de cette nécessité.

Une caractéristique importante de la dynamique épidémique de l'EV-D68 est la fréquence biennale. Ce n'est pas un aspect nouveau dans l'histoire des maladies infectieuses,

les épidémies de rougeole - maladie qui affecte aussi les moins de 15 ans - survenaient déjà sur un mode biennal, avant la généralisation de la vaccination. La dynamique épidémique de ce virus est liée à trois facteurs principaux : l'induction d'une puissante immunité à long terme, un taux de reproduction parmi les plus élevés chez les virus et une faible variation antigénique du virus. L'interaction avec le système immunitaire est donc une perspective d'étude majeure pour comprendre la dynamique épidémique de l'EV-D68 à la fois pour bien établir ses caractéristiques antigéniques et pour déterminer l'efficacité des réponses immunitaires. La mise en place d'études de séroprévalence à grande échelle est nécessaire pour progresser sur ce dernier aspect. Les études réalisées jusqu'à présent sont difficilement comparables, c'est pourquoi un protocole est en cours dans un groupe de travail du réseau ENPEN (European Non-Poliiovirus Enterovirus Network) pour standardiser les méthodes dans ce domaine.

Plusieurs limites ont été identifiées dans les études d'épidémiologie clinique réalisées sur les infections à EV-D68. Les données publiées sont souvent biaisées car elles sont restreintes aux années épidémiques ou à certaines populations (enfants, immunodéprimés, hospitalisés) ou encore ne concernent qu'un type d'atteinte respiratoire ou neurologique. Par ailleurs, les infections à EV-D68 ont été rapportées sur tous les continents mais il existe des gaps de surveillance notamment en Afrique. En adaptant la surveillance des paralysies flasques, il serait possible d'inclure la détection des cas d'infections à EV-D68 en associant aux prélèvements de selles, préconisés pour la détection des poliovirus, un échantillon respiratoire pour la recherche des entérovirus. Cela permettrait d'identifier les types d'entérovirus associés à des paralysies flasques autres que l'EV-D68 et les poliovirus. L'entérovirus C105 qui présente également un tropisme respiratoire a, par exemple, été identifié dans des cas de paralysies flasques (Horner et al., 2015).

La surveillance des infections à entérovirus, lorsqu'elle existe, s'appuie le plus souvent sur des réseaux hospitaliers. Sans recherche spécifique ou génotypage systématique des échantillons respiratoires positifs pour détecter les rhinovirus-entérovirus, la fréquence et la saisonnalité des infections à EV-D68 sera sous-estimée. Les infections respiratoires virales sont surveillées en France grâce aux données issues du Réseau unique de surveillance communautaire Sentinelles et du réseau de laboratoires hospitaliers RENAL, et compilées par le centre coordinateur du CNR des virus respiratoires sous l'égide de Santé publique France. Concernant les infections respiratoires à rhinovirus-EV, les données collectées sont le nombre



d'échantillons respiratoires testés et positifs pour un rhinovirus-EV par RT-PCR, sans précision du type. De plus, et ce jusqu'en 2020, cette surveillance n'était active qu'en période de surveillance de la grippe (d'octobre à mai). À notre connaissance, le laboratoire de Virologie du CHU de Clermont-Ferrand est le seul à systématiquement génotyper tous les échantillons respiratoires positifs à Rhinovirus-EV, sans aucune sélection des échantillons. Pour améliorer la surveillance des infections à EV-D68 et des entérovirus en général, il pourrait être envisagé de demander à certains laboratoires du RSE d'envoyer un échantillon des prélèvements positifs afin de détecter plus précocement la circulation d'EV-D68 et d'alerter sur le risque de survenue d'atteintes neurologiques associées à une plus forte circulation de ce virus, ce qui permettrait le diagnostic étiologique des MFA.

L'absence d'homogénéité entre les données démographiques et cliniques rapportées au sein des différents réseaux de surveillance nationaux constitue une limite importante pour identifier les facteurs qui déterminent la circulation du virus au cours du temps et à différentes échelles géographiques. En Europe, la surveillance de la circulation de l'EV-D68 pourrait être améliorée au cours des prochaines années grâce à la mise en place du réseau ENPEN, initiée en 2016 en réponse à l'augmentation du nombre de cas d'atteintes paralytiques du type poliomyélite. Ce réseau a déjà produit une série de préconisations concernant le diagnostic et la caractérisation des entérovirus dont l'EV-D68. Trois protocoles de surveillance portant sur les atteintes neuroméningées, respiratoires et cutanéomuqueuses ont été proposés aux membres du réseau. La mise en place de ces protocoles, retardée par la pandémie de Covid-19, devrait être réalisée en 2022 avec des laboratoires volontaires en Europe : 60 laboratoires localisés dans 25 pays sont prêts à mettre en place au moins un protocole (Fischer et al., 2021; Harvala et al., 2018).

Un réseau de surveillance s'est constitué en 2017 dans la région Asie-Pacifique ou APNES (« Asia-Pacific Network for Enterovirus Surveillance ») avec 6 membres fondateurs localisés au Cambodge, en Malaisie (2 laboratoires), au Vietnam (2 laboratoires) et à Taïwan (Chiu et al., 2020). Le réseau est orienté vers la surveillance de l'EV-A71, dont la prévalence est très supérieure à celle de l'EV-D68 dans cette région. Les membres souhaitent contribuer à améliorer la surveillance de ce virus qui est à l'origine d'atteintes neurologiques sévères et pour lequel 3 vaccins ont été développés. Le réseau a aussi pour ambition, comme ENPEN en

Europe, de participer à l'harmonisation du diagnostic et du suivi épidémiologique des autres entérovirus ré-émergents actuellement en Asie, comme l'EV-D68.

Enfin, la surveillance environnementale peut aussi être mobilisée pour rechercher l'EV-D68 dans les eaux-usées dans la perspective d'anticiper de prochaines épidémies. Cette approche a pris un essor important avec la pandémie de Covid-19 et permettrait de suivre en temps réel la circulation de l'EV-D68 et d'autres entérovirus d'intérêt en particulier lorsque la surveillance clinique n'est pas réalisée ou insuffisante (Majumdar et al., 2019). Bien que l'EV-D68 soit un virus respiratoire et qu'il présente des caractéristiques qui le rapprochent des rhinovirus, il est excrété dans les selles et a été détecté dans les eaux usées par RT-PCR (Bisseux et al., 2018) ou par séquençage NGS (Majumdar and Martin, 2018), y compris pendant la pandémie de Covid-19 (Tedcastle et al., 2022). Une étude toute récente montre la faisabilité d'une surveillance ciblée sur l'EV-D68 en Israël (Erster et al., 2022). Le virus a été recherché pendant 29 semaines en 2021 et il a été détecté juste avant le pic épidémique (juin - juillet) rapporté chez les patients. Le virus de sous-type B3 détecté dans les eaux usées est semblable à celui identifié chez les patients. Une approche de surveillance environnementale ciblée combinant une détection quantitative et le séquençage NGS peut donc être envisagée pour l'EV-D68 et l'EV-A71. Cette approche présente en outre l'intérêt de surveiller la totalité de la population sans cibler les individus symptomatiques comme les systèmes de surveillance conventionnelle.

II. Épidémiologie génomique

Le séquençage des génomes complets d'entérovirus n'est pas encore couramment appliqué dans les études d'épidémiologie moléculaire. Les données générées restent faibles au regard de l'ampleur des épidémies associées à l'EV-A71 ou l'EV-D68, voire anecdotiques lorsque l'on considère les infections asymptomatiques. Par exemple, seulement 38 génomes complets supplémentaires ont été déposés dans GenBank (qui en compte 938) depuis la dernière extraction de données effectuée pour compléter notre étude. Au total, ce sont 5 222 séquences d'EV-D68 qui sont disponibles dont 38 % pour 9 pays européens et 28 % pour les États-Unis. À eux seuls, ces chiffres indiquent les biais de représentation géographique qui excluent toute utilisation des données de séquençage pour évaluer la prévalence de l'infection

ou faire un suivi de l'infection en temps réel. Par ailleurs, l'analyse bibliographique et des métadonnées montre que les informations sur les méthodes de séquençage, sur les aspects cliniques ou démographiques sont souvent incomplètes. Un peu moins de la moitié des génomes d'EV-D68 disponibles dans la base de données publique GenBank sont décrits dans une publication et associés à des informations détaillées concernant les stratégies de séquençage. Les informations associées aux séquences qui n'ont pas fait l'objet d'une publication sont plus limitées et peuvent manquer d'exhaustivité. Il est donc difficile de comparer les résultats de séquençage issus de la littérature. La généralisation du séquençage du génome complet associé à des données épidémiologiques et cliniques précises a montré tout son intérêt dans le suivi épidémiologique d'épidémies causées par plusieurs virus, comme le SARS-CoV-2 (<https://nextstrain.org/ncov/gisaid/global/6m>), le virus Ebola (Dudas et al., 2017) ou le virus Zika (Thézé et al., 2018). De nombreux laboratoires ont pu s'équiper en séquenceurs de nouvelle génération et intégrer ces méthodes dans la pratique courante, ce qui devrait permettre de démocratiser celles-ci à d'autres virus épidémiques. La stratégie d'obtention de génomes complets proposée dans cette thèse a été validée en pratique pour l'étude des souches responsables de l'épidémie en 2018 (Duval et al., 2021 ; 82 % d'obtention de séquences). Cette technique d'amplification génomique à partir d'échantillons cliniques, sans sélection sur la charge virale, a été utilisée à nouveau pour l'épidémie récente de 2021 en combinaison avec le séquençage 2^{ème} génération : le génome a été déterminé pour 28/40 (70 %) échantillons. Cette dernière étude confirme que la méthode d'amplification des génomes d'EV-D68 est sensible et peut donc être réutilisée dans d'autres études, quelle que soit l'approche de séquençage disponible.

L'épidémiologie génomique des entérovirus devrait aussi pouvoir bénéficier d'une base de données centralisée sur le modèle de la base GISAID, actuellement limitée aux séquences des virus grippaux et SARS-CoV-2, ou de la base Emergen. Cette dernière, mise en place sous l'égide de Santé publique France par l'Institut français de bio-informatique, est actuellement restreinte au SARS-CoV-2 mais pourrait être élargie à d'autres virus émergents dans le cadre des missions de la nouvelle agence ANRS - Maladies infectieuses émergentes. L'association données cliniques / génomiques / méthodologiques permettrait un suivi optimal des infections à entérovirus. Le site Nextstrain permet un suivi de la dynamique évolutive de certains pathogènes dont celle de l'EV-D68 (<https://nextstrain.org/enterovirus/d68/genome>)

mais cela nécessite là encore un apport régulier et en temps réel de séquences par la communauté internationale.

La constitution d'une base de 896 séquences de génomes complets d'EV-D68 associée à une recherche la plus complète possible des informations associées a aussi permis d'actualiser les données sur les caractéristiques moléculaires spécifiques de chaque clade et sous-clade. Cette étude permet d'analyser plus en détail l'impact potentiel des variations génomiques identifiées dans les régions non codantes et les régions codant les protéines virales sur la dynamique évolutive de l'EV-D68 et sa (neuro)-virulence. La réémergence de l'EV-D68 pourrait être liée à différents facteurs moléculaires viraux ayant pour origine des mutations spécifiques.

Les caractéristiques de la capsid font partie des facteurs déterminant la transmission des souches dans la population en induisant des réponses immunitaires, en particulier humorales neutralisantes (Huang et al., 2020; Vogt and Crowe, 2018). La diversité génétique observée à partir des séquences codant les protéines structurales et caractérisant chaque sous-clade majoritaire des épidémies depuis 2014 porte majoritairement sur des épitopes antigéniques connus de l'EV-D68. La diversité antigénique pouvant en résulter, par exemple entre les clades B et D, en accord avec la faible immunité croisée, pourrait expliquer que les 2 sous-clades B3 et D1 puissent co-circuler en 2018 (Duval et al., 2021; Harrison et al., 2019). La succession d'épidémies régulières et associées à différents génogroupes ou sous-génogroupes d'entérovirus A71 a notamment été associée à des différences antigéniques, plusieurs études ayant montré des différences de neutralisation croisée entre les virus des génogroupes B et C (Huang et al., 2009; van der Sanden et al., 2010). En 2016, l'émergence d'un nouveau variant C1v2015 (sous-génogroupe C1) s'est traduite par une nouvelle épidémie avec de nombreux cas rapportés en Europe. L'étude des séquences P1 de ce nouveau variant a mis en évidence des mutations proches d'épitopes reconnus par les anticorps neutralisants humains ou murins, ce qui a pu favoriser sa transmission à grande échelle (Huang et al., 2020; Zhu et al., 2018). D'autres facteurs moléculaires viraux, autres que ceux associés à la diversité antigénique, peuvent avoir favorisé l'émergence de l'EV-D68, comme ceux impactant l'infectiosité et la transmissibilité via une meilleure réplication ou traduction virale. Chez l'entérovirus A71, plusieurs déterminants de la virulence ont été identifiés au niveau de la protéine VP1, la position VP1-145 améliore la fixation du virus à des cellules neuronales

murines (Huang et al., 2012) ou détermine l'infectiosité du virus dans les voies respiratoires (van der Sanden et al., 2018).

L'impact des mutations spécifiques au clade B3 de l'EV-D68 n'a pas été étudié mais une meilleure infectiosité des voies respiratoires supérieures pourrait favoriser une plus grande transmission du virus. Les recherches menées sur le lien entre génétique moléculaire et virulence des poliovirus ont montré que des variations ponctuelles de la région 5' non codante ou de protéines non structurales impliquées dans la réplication pouvaient influencer le tropisme cellulaire et la (neuro)-virulence (Gromeier et al., 1999). Les clades de l'EV-D68 se différencient par des substitutions spécifiques au niveau des domaines de l'IRES, l'efficacité de la traduction pourrait donc être différente d'un virus à l'autre (Furuse et al., 2019a). Si l'impact potentiel de mutations ponctuelles tout le long du génome des entérovirus sur la diversité antigénique, l'infectiosité ou la réplication virale ne peut être nié, l'histoire évolutive des entérovirus est surtout marquée par la survenue d'évènements de recombinaison génétique (McWilliam Leitch et al., 2012), qui permet en assemblant *de novo* des génomes viraux de générer de tout nouveaux variants. Plus que l'accumulation de mutations ponctuelles, c'est l'association optimale de séquences génomiques entre elles *via* la recombinaison génétique qui constitue souvent un facteur déterminant dans la diffusion des souches, comme ce fut le cas avec le nouveau variant d'EV-A71/C1v2015 (Ngangas et al., 2019). L'analyse des génomes complets d'EV-D68 dans notre étude n'a pas montré de signal de recombinaison génétique. Cette particularité, observée également au début de l'histoire évolutive de l'EV-A71, pourrait être liée à plusieurs facteurs : 1) la très faible circulation d'autres types d'entérovirus appartenant à l'espèce D, notamment en France ([données du CNR](#), Bisseux et al., 2020), 2) une probabilité de co-infection cellulaire plus faible pour ce virus à tropisme essentiellement respiratoire contrairement aux autres entérovirus.

III. Le pouvoir pathogène de l'EV-D68

La détection de l'EV-D68 au CHU de Clermont-Ferrand s'est appuyée sur une méthode de diagnostic inchangée entre 2014 et 2018 et non ciblée sur un groupe d'âge. C'est la raison pour laquelle, nous avons pu déceler en 2018 l'augmentation de la proportion d'adultes parmi les patients positifs à l'EV-D68. La réalisation d'un sous-génotypage exhaustif nous a

également permis de confirmer que le sous-clade D1 était associé aux patients adultes. Dans notre population de patients, les adultes présentaient plus de signes pulmonaires et neurologiques (maux de tête, myélite flasque aiguë), alors que les manifestations respiratoires hautes n'étaient pas discriminantes par rapport aux enfants.

À partir des données cliniques des patients adultes inclus dans notre étude, il serait intéressant de poursuivre l'exploration de l'impact des comorbidités respiratoires sur l'infection virale. Dans cette perspective, il est possible d'utiliser des modèles cellulaires *ex vivo* produits avec des cellules primaires de patients présentant des comorbidités, tabagisme ou encore maladie pulmonaire chronique obstructive. Ces modèles commercialisés pourraient être utilisés pour comparer la multiplication des souches des sous-clades B3 et D1 que nous avons isolé. Recréer les effets du tabagisme est également possible avec un modèle *in vitro* classique tel que celui que nous avons cherché à développer avec les cellules Calu-3. En les comparant à des modèles « sains », il serait par exemple possible d'évaluer les impacts sur le cycle viral, la réponse immunitaire et l'installation d'une infection chronique.

Actuellement, les complications neurologiques et les paralysies observées chez certains patients sont expliquées par un mécanisme de transport axonal du virus, mais la question du pouvoir pathogène de ce virus est loin d'être résolue. Le génome viral est peu retrouvé dans le sang et le LCS des patients qui présentent une MFA (Messacar et al., 2018). Ceci peut avoir deux causes, le délai entre la réalisation de l'échantillon et le début de l'infection et/ou une concentration en ARN viral très faible dans ces deux compartiments pendant l'infection. Ces observations posent la question de la dissémination intra-individuelle du virus. Dans cette perspective, il serait important d'étudier de façon exhaustive le tropisme du virus vis-à-vis des cellules immunitaires pour déterminer si le virus est transporté par un type particulier de leucocytes, transitoirement au début de l'infection par exemple. Une étude a montré la capacité du virus à infecter certains types leucocytaires *in vitro*, comme les cellules T et B (Smura et al., 2010). La limite de cette étude est qu'elle a été réalisée à partir de lignées cellulaires ; à notre connaissance, l'étude du tropisme de l'EV-D68 n'a pas été effectuée en utilisant des cellules du sang périphérique. Dans une étude, les auteurs ont détecté des anticorps anti-EV-D68 dans le LCS de patients présentant une MFA (Mishra et al., 2019). Ils trouvent des anticorps contre un peptide de 22 acides aminés de la protéine VP1 du virus dans 6/11 échantillons de LCS et 8/11 échantillons de sang ; les anticorps n'ont pas été retrouvés

dans les échantillons contrôles. Des résultats similaires ont été rapportés dans une seconde étude (Schubert et al., 2019). On ne peut pas exclure que les anticorps proviennent du sang, mais ces résultats suggèrent aussi qu'ils résultent d'une production intrathécale en réponse à une infection locale à un moment de l'infection.

L'analyse comparée des génomes viraux montre que les clades et certains sous-clades se distinguent par plusieurs positions polymorphes distribuées tout le long des séquences génomiques. Toutefois, il est actuellement difficile d'apporter la preuve définitive que l'une ou l'autre de ces mutations est associée à la virulence. Deux perspectives peuvent être proposées pour étudier cet aspect. La première est l'étude comparée *in vitro* de l'efficacité de l'initiation interne de la traduction à partir de l'IRES de l'EV-D68. Ce type d'analyse, initiée par Furuse et al (2019a), a mis en lumière les positions polymorphes dans différents domaines tige-boucle de l'IRES. Cette analyse mérite d'être élargie en comparant l'IRES du sous-clade D1 à ceux des autres virus épidémiques et des 4 autres membres de l'espèce D (EV-D70, D94, D111 et D120). En effet, l'IRES de l'EV-D68 est phylogénétiquement distinct des 4 autres. Il serait aussi instructif de comparer l'efficacité de l'initiation interne d'un IRES "EV-D68" à celle des IRES d'autres entérovirus. La comparaison avec l'IRES du poliovirus apporterait une indication importante sur les propriétés de l'EV-D68, car l'efficacité de la traduction du poliovirus est très élevée dans des cellules d'origine neuronale ou en présence de facteurs issus de ces cellules. La seconde approche qui peut être proposée à partir de notre travail est l'étude de la diversité virale qui se manifeste pendant l'infection *in vivo*. Plusieurs études montrent qu'il existe des variants génétiques (haplotypes) au cours de l'infection *in vivo* par le poliovirus et l'EV-A71, et les résultats suggèrent qu'il s'agit d'un facteur associé à la manifestation de leurs propriétés neurovirulentes (Cordey et al., 2012; S.-W. Huang et al., 2017; Pfeiffer and Kirkegaard, 2006). Pour mettre en évidence l'existence d'une diversité d'haplotypes au cours de l'infection à EV-D68, il serait nécessaire de séquencer les génomes viraux dans les échantillons d'un même patient, idéalement des compartiments tissulaires différents. Toutefois, la difficulté d'obtenir un échantillon de LCS positif chez les patients qui présentent une atteinte neurologique, limite l'intérêt de cette approche pour détecter les "haplotypes neurovirulents".

IV. Conclusion

Pour conclure, cette thèse a permis d'intégrer dans la même étude des données d'épidémiologie clinique et d'épidémiologie moléculaire ou génomique, et les résultats contribuent à une meilleure connaissance de certains aspects de l'EV-D68. La réémergence de ce virus au début des années 2000 reste énigmatique, mais comme pour d'autres virus à ARN, on peut penser que plusieurs facteurs se sont combinés pour cette réémergence. Par ailleurs, les difficultés de l'isolement de ce virus en culture cellulaire et celles du diagnostic moléculaire (faux-négatifs en RT-PCR, échantillons inadéquats) ne sont pas totalement étrangères à la longue période pendant laquelle le virus n'a pas été rapporté après sa détection princeps en 1962. Notre analyse génomique comparative détaillée suggère que plusieurs mutations dans tout le génome sont nécessaires pour faire émerger un clade ou sous-clade épidémique pérenne. Des mutations dans les protéines non structurales combinées à des variations antigéniques peuvent conduire à un avantage sélectif plus décisif que chaque mutation isolément. Enfin, il est nécessaire de disposer de modèles cellulaires et animaux fiables pour valider les fonctions des mutations détectées à partir des comparaisons génomiques faites *in silico*. Ces comparaisons génomiques peuvent aussi être utilisées pour détecter des associations avec des manifestations cliniques à conditions de pouvoir réaliser des études prospectives solides à grande échelle et de disposer de bases de données bien construites.

Références bibliographiques

- Abedi, G.R., Watson, J.T., Nix, W.A., Oberste, M.S., Gerber, S.I., 2018. Enterovirus and Parechovirus Surveillance — United States, 2014–2016. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 67, 515–518. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6718a2>
- Andrés, C., Vila, J., Gimferrer, L., Piñana, M., Esperalba, J., Codina, M.G., Barnés, M., Martín, M.C., Fuentes, F., Rubio, S., Alcubilla, P., Rodrigo, C., Pumarola, T., Antón, A., 2019. Surveillance of enteroviruses from paediatric patients attended at a tertiary hospital in Catalonia from 2014 to 2017. *J. Clin. Virol.* 110, 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2018.11.004>
- Aubart, M., Gitiaux, C., Roux, C.J., Levy, R., Schuffenecker, I., Mirand, A., Bach, N., Moulin, F., Bergounioux, J., Leruez-Ville, M., Rozenberg, F., Sterlin, D., Musset, L., Antona, D., Boddaert, N., Zhang, S.Y., Kossorotoff, M., Desguerre, I., 2020. Severe Acute Flaccid Myelitis Associated With Enterovirus in Children: Two Phenotypes for Two Evolution Profiles? *Front. Neurol.* 11, 343. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.00343>
- Ayudhya, S.S.N., Meijer, A., Bauer, L., Munnink, B.O., Embregts, C., Leijten, L., Siegers, J.Y., Laksono, B.M., Kuppeveld, F. van, Kuiken, T., Kessel, C.G., Riel, D. van, 2020. Enhanced Enterovirus D68 Replication in Neuroblastoma Cells Is Associated with a Cell Culture-Adaptive Amino Acid Substitution in VP1. *mSphere* 5. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00941-20>
- Baertl, S., Pietsch, C., Maier, M., Hönemann, M., Bergs, S., Liebert, U.G., 2021. Enteroviruses in Respiratory Samples from Paediatric Patients of a Tertiary Care Hospital in Germany. *Viruses* 13. <https://doi.org/10.3390/v13050882>
- Baggen, J., Liu, Y., Lyoo, H., van Vliet, A.L.W., Wahedi, M., de Bruin, J.W., Roberts, R.W., Overduin, P., Meijer, A., Rossmann, M.G., Thibaut, H.J., van Kuppeveld, F.J.M., 2019. Bypassing pan-enterovirus host factor PLA2G16. *Nat. Commun.* 10. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11256-z>
- Baggen, J., Thibaut, H.J., Staring, J., Jae, L.T., Liu, Y., Guo, H., Slager, J.J., de Bruin, J.W., van Vliet, A.L.W., Blomen, V.A., Overduin, P., Sheng, J., de Haan, C.A.M., de Vries, E., Meijer, A., Rossmann, M.G., Brummelkamp, T.R., van Kuppeveld, F.J.M., 2016. Enterovirus D68 receptor requirements unveiled by haploid genetics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 1399–1404. <https://doi.org/10.1073/pnas.1524498113>
- Baggen, J., Thibaut, H.J., Strating, J.R.P.M., Kuppeveld, F.J.M. van, 2018. The life cycle of non-polio enteroviruses and how to target it. *Nat. Rev. Microbiol.* 16, 368. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0005-4>
- Bal, A., Pichon, M., Picard, C., Casalegno, J.S., Valette, M., Schuffenecker, I., Billard, L., Vallet, S., Vilchez, G., Cheynet, V., Oriol, G., Trouillet-Assant, S., Gillet, Y., Lina, B., Brengel-Pesce, K., Morfin, F., Josset, L., 2018. Quality control implementation for universal characterization of DNA and RNA viruses in clinical respiratory samples using single metagenomic next-generation sequencing workflow. *BMC Infect. Dis.* 18, 537. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3446-5>
- Bal, A., Sabatier, M., Wirth, T., Coste-Burel, M., Lazrek, M., Stefic, K., Brengel-Pesce, K., Morfin, F., Lina, B., Schuffenecker, I., Josset, L., 2019. Emergence of enterovirus D68 clade D1, France, August to November 2018. *Eurosurveillance* 24, 1800699. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.3.1800699>
- Benschop, K.S., Albert, J., Anton, A., Andrés, C., Aranzamendi, M., Armannsdóttir, B., Bailly, J.-L., Baldanti, F., Baldvinsdóttir, G.E., Beard, S., Berginc, N., Böttcher, S., Blomqvist, S., Bubba, L., Calvo, C., Cabrerizo, M., Cavallero, A., Celma, C., Ceriotti, F., Costa, I., Cottrell, S., Cuerpo, M. del, Dean, J., Dembinski, J.L., Diedrich, S., Diez-Domingo, J., Dorenberg, D., Duizer, E., Dyrdak, R., Fanti, D., Farkas, A., Feeney, S., Flipse, J., Gascun, C.D., Galli, C., Georgieva, I., Gifford, L., Guiomar, R., Hönemann, M., Ikonen, N., Jeannoël, M., Josset, L., Keeren, K., López-Labrador, F.X., Maier, M., McKenna, J., Meijer, A., Mengual-Chuliá, B., Midgley, S.E., Mirand, A., Montes, M., Moore, C., Morley, U., Murk, J.-L., Nikolaeva-Glomb, L., Numanovic, S., Oggioni, M., Palminha, P., Pariani, E., Pellegrinelli, L., Piralla, A., Pietsch, C., Piñeiro, L., Rabella, N., Rainetova, P., Renteria, S.C.U., Romero, M.P., Reynders, M., Roorda, L., Savolainen-Kopra, C., Schuffenecker, I., Soynova, A., Swanink, C.M., Ursic, T., Verweij, J.J., Vila, J., Vuorinen, T., Simmonds, P., Fischer, T.K., Harvala, H., 2021. Re-emergence of enterovirus D68 in Europe after easing the COVID-19 lockdown, September 2021. *Eurosurveillance* 26, 2100998. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2021.26.45.2100998>
- Bhardwaj, S.D., Potdar, V.A., Yadav, P.D., Chaudhary, M.L., Chadha, M.S., Mourya, D., 2019. A case report of the enterovirus-D68 associated severe acute respiratory illness in a pediatric case from India. *J. Infect. Public Health* 12, 900–903. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2019.04.013>

- Biggs, H.M., Nix, W.A., Zhang, J., Rogers, S., Clara, W., Jara, J.H., Gonzalez, R., Luciani, K., Brizuela, Y.S., Estripeaut, D., Castillo, J.M., Leon, T.D., Corro, M., Vergara, O., Rauda, R., Chong, E.G., Watson, J.T., Azziz-Baumgartner, E., Gerber, S.I., Tong, S., Dawood, F.S., 2021. Enterovirus D68 infection among hospitalized children with severe acute respiratory illness in El Salvador and Panama, 2012-2013. *Influenza Other Respir. Viruses* 15, 181–187. <https://doi.org/10.1111/irv.12815>
- Bisseux, M., Colombet, J., Mirand, A., Roque-Afonso, A.-M., Abravanel, F., Izopet, J., Archimbaud, C., Peigue-Lafeuille, H., Debroas, D., Bailly, J.-L., Henquell, C., 2018. Monitoring human enteric viruses in wastewater and relevance to infections encountered in the clinical setting: a one-year experiment in central France, 2014 to 2015. *Eurosurveillance* 23, 17. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.7.17-00237>
- Bisseux, M., Debroas, D., Mirand, A., Archimbaud, C., Peigue-Lafeuille, H., Bailly, J.-L., Henquell, C., 2020. Monitoring of enterovirus diversity in wastewater by ultra-deep sequencing: An effective complementary tool for clinical enterovirus surveillance. *Water Res.* 169, 115246. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115246>
- B'Krong, N.T.T.C., Minh, N.N.Q., Qui, P.T., Chau, T.T.H., Nghia, H.D.T., Do, L.A.H., Nhung, N.N., Van Vinh Chau, N., Thwaites, G., Van Tan, L., van Doorn, H.R., Thanh, T.T., 2018. Enterovirus serotypes in patients with central nervous system and respiratory infections in Viet Nam 1997–2010. *Viol. J.* 15. <https://doi.org/10.1186/s12985-018-0980-0>
- Blomqvist, S., Savolainen, C., Råman, L., Roivainen, M., Hovi, T., 2002. Human Rhinovirus 87 and Enterovirus 68 Represent a Unique Serotype with Rhinovirus and Enterovirus Features. *J. Clin. Microbiol.* 40, 4218–4223. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.11.4218-4223.2002>
- Böttcher, S., Prifert, C., Weißbrich, B., Adams, O., Aldabbagh, S., Eis-Hübinger, A.M., Diedrich, S., 2016. Detection of enterovirus D68 in patients hospitalised in three tertiary university hospitals in Germany, 2013 to 2014. *Eurosurveillance* 21, 30227. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.19.30227>
- Bove, R., Rowles, W., Carleton, M., Olivera, E., Sheehan, M., Werdal, H.P., Scott, R., Axton, L., Benson, L., 2019. Unmet Needs in the Evaluation, Treatment, and Recovery for 167 Children Affected by Acute Flaccid Myelitis Reported by Parents Through Social Media. *Pediatr. Neurol.* <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2019.08.009>
- Brown, B.A., Nix, W.A., Sheth, M., Frace, M., Oberste, M.S., 2014. Seven Strains of Enterovirus D68 Detected in the United States during the 2014 Severe Respiratory Disease Outbreak. *Genome Announc.* 2. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01201-14>
- Brown, D.M., Hixon, A.M., Oldfield, L.M., Zhang, Y., Novotny, M., Wang, W., Das, S.R., Shabman, R.S., Tyler, K.L., Scheuermann, R.H., 2018. Contemporary Circulating Enterovirus D68 Strains Have Acquired the Capacity for Viral Entry and Replication in Human Neuronal Cells. *mBio* 9. <https://doi.org/10.1128/mBio.01954-18>
- Calvo, C., Cuevas, M.T., Pozo, F., García-García, M.L., Molinero, M., Calderón, A., Gonzalez-Esguevillas, M., Pérez-Sautu, U., Casas, I., 2016. Respiratory Infections by Enterovirus D68 in Outpatients and Inpatients Spanish Children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 35, 45–49. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000000908>
- Carballo, C.M., Erro, M.G., Sordelli, N., Vazquez, G., Mistchenko, A.S., Cejas, C., Rodriguez, M., Cisterna, D.M., Freire, M.C., Contrini, M.M., Lopez, E.L., 2019. Acute Flaccid Myelitis Associated with Enterovirus D68 in Children, Argentina, 2016. *Emerg. Infect. Dis.* 25, 573–576. <https://doi.org/10.3201/eid2503.170897>
- Carney, S., Brown, D., Siqueira, M.M., Dias, J.P., da Silva, E.E., 2015. Enterovirus D68 detected in children with severe acute respiratory illness in Brazil. *Emerg. Microbes Infect.* 4, 1–2. <https://doi.org/10.1038/emi.2015.66>
- Caylan, E., Weinblatt, E., Welter, J., Dozor, A., Wang, G., Nolan, S.M., 2018. Comparison of the Severity of Respiratory Disease in Children Testing Positive for Enterovirus D68 and Human Rhinovirus. *J. Pediatr.* 197, 147-153.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2018.02.027>
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2011. Clusters of acute respiratory illness associated with human enterovirus 68--Asia, Europe, and United States, 2008-2010. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 60, 1301–1304.
- Chan, W.Y.K., Chim, S.H.Y., Tse, D.M.L., Ho, P.L., 2021. Acute flaccid paralysis associated with enterovirus D68 infection: a case report. *Hong Kong Med. J. Xianggang Yi Xue Za Zhi* 27, 355–357. <https://doi.org/10.12809/hkmj208931>
- Chen, I.-J., Hu, S.-C., Hung, K.-L., Lo, C.-W., 2018. Acute flaccid myelitis associated with enterovirus D68 infection. *Medicine (Baltimore)* 97. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000011831>

- Chen, L., Shi, L., Yang, H., Gu, D.-Y., Meng, J., Xu, Y.-Q., Yao, X.-J., Zhang, H.-L., Cheng, J.-Q., Ma, H.-W., Zhang, R.-L., He, Y.-Q., 2016. Identification and Whole-Genome Sequencing of Four Enterovirus D68 Strains in Southern China in Late 2015. *Genome Announc.* 4. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01014-16>
- Cheng, J., Gao, S., Zhu, C., Liu, S., Li, J., Kang, J., Wang, Z., Wang, T., 2020. Typical Stress Granule Proteins Interact with the 3' Untranslated Region of Enterovirus D68 To Inhibit Viral Replication. *J. Virol.* 94. <https://doi.org/10.1128/JVI.02041-19>
- Chien, Y.-S., Luo, S.-T., Tsao, K.-C., Wang, Y.-H., Lin, T.-Y., Huang, Y.-C., Lee, M.-S., 2018. Genomic analysis of enterovirus D68, including one strain isolated from a child with Wilson's disease in Taiwan. *J. Formos. Med. Assoc.* <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2018.09.021>
- Chiu, M.-L., Luo, S.-T., Chen, Y.-Y., Chung, W.-Y., Duong, V., Dussart, P., Chan, Y.-F., Perera, D., Ooi, M.H., Thao, N.T.T., Truong, H.K., Lee, M.-S., 2020. Establishment of Asia-Pacific Network for Enterovirus Surveillance. *Vaccine* 38, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.09.111>
- Chong, P.F., Kira, R., Mori, H., Okumura, A., Torisu, H., Yasumoto, S., Shimizu, H., Fujimoto, T., Hanaoka, N., Kusunoki, S., Takahashi, T., Oishi, K., Tanaka-Taya, K., 2018. Clinical Features of Acute Flaccid Myelitis Temporally Associated With an Enterovirus D68 Outbreak: Results of a Nationwide Survey of Acute Flaccid Paralysis in Japan, August–December 2015. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 66, 653–664. <https://doi.org/10.1093/cid/cix860>
- Chong, P.F., Kira, R., Torisu, H., Yasumoto, S., Okumura, A., Mori, H., Tanaka-Taya, K., Sato, T., Kanazawa, A., Suzuki, K., Toyofuku, E., Fukuyama, T., Asaoka, M., Fujita, T., Yano, T., Kumakura, A., Kawabata, T., Miyatake, C., Hiyane, M., Moriyama, N., Kawamura, N., Tanaka, K., Ohta, G., Ono, S., Ban, K., Sugiyama, N., Ohta, K., Inoue, M., Sakajiri, K., Yamamuro, M., Endo, Y., Nakano, K., Yoshida, N., Suzuki, Y., Takami, Y., Kasai, M., Takahashi, Y., Miyamoto, T., Ishida, Y., Takeshita, E., Abe, Y., Kubota, S., Ishii, W., Tsuyusaki, Y., Hattori, A., Nagura, M., Koran, N., Toki, T., Goto, S., Terashima, H., Kikuchi, E., Mikami, H., Konishi, Y., 2021. Three-Year Longitudinal Motor Function and Disability Level of Acute Flaccid Myelitis. *Pediatr. Neurol.* 116, 14–19. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2020.11.019>
- Chong, Y.M., Chan, Y.F., Jamaluddin, M.F.H., Hasan, M.S., Pang, Y.K., Ponnampalavanar, S., Syed Omar, S.F., Voon, K.G.L., Sam, I.-C., 2021. Detection of respiratory viruses in adults with suspected COVID-19 in Kuala Lumpur, Malaysia. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 145, 105000. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2021.105000>
- Christy, A., Messacar, K., 2019. Acute Flaccid Myelitis Associated With Enterovirus D68: A Review. *J. Child Neurol.* 883073819838376. <https://doi.org/10.1177/0883073819838376>
- Chua, B.H., Phuektes, P., Sanders, S.A., Nicholls, P.K., McMinn, P.C., 2008. The molecular basis of mouse adaptation by human enterovirus 71. *J. Gen. Virol.* 89, 1622–1632. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83676-0>
- Cordey, S., Petty, T.J., Schibler, M., Martinez, Y., Gerlach, D., van Belle, S., Turin, L., Zdobnov, E., Kaiser, L., Tapparel, C., 2012. Identification of site-specific adaptations conferring increased neural cell tropism during human enterovirus 71 infection. *PLoS Pathog.* 8, e1002826. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002826>
- Corona, A.K., Saulsbery, H.M., Velazquez, A.F.C., Jackson, W.T., 2018. Enteroviruses Remodel Autophagic Trafficking through Regulation of Host SNARE Proteins to Promote Virus Replication and Cell Exit. *Cell Rep.* 22, 3304–3314. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.003>
- Cortese, M.M., Kambhampati, A.K., Schuster, J.E., Alhinai, Z., Nelson, G.R., Guzman Perez-Carrillo, G.J., Vossough, A., Smit, M.A., McKinstry, R.C., Zinkus, T., Moore, K.R., Rogg, J.M., Candee, M.S., Sejvar, J.J., Hopkins, S.E., 2020. A ten-year retrospective evaluation of acute flaccid myelitis at 5 pediatric centers in the United States, 2005–2014. *PLoS ONE* 15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228671>
- Cottrell, S., Moore, C., Perry, M., Hilvers, E., Williams, C., Shankar, A.G., 2018. Prospective enterovirus D68 (EV-D68) surveillance from September 2015 to November 2018 indicates a current wave of activity in Wales. *Eurosurveillance* 23. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.46.1800578>
- Crooks, G.E., Hon, G., Chandonia, J.-M., Brenner, S.E., 2004. WebLogo: A Sequence Logo Generator. *Genome Res.* 14, 1188–1190. <https://doi.org/10.1101/gr.849004>
- Demirkan, E., Kırdar, S., Ceylan, E., Yenigün, A., Kurt Ömürlü, İ., 2017. [Genotypes of rhinoviruses in children and adults patients with acute respiratory tract infections]. *Mikrobiyol. Bul.* 51, 350–360. <https://doi.org/10.5578/mb.61820>
- Djikeng, A., Halpin, R., Kuzmickas, R., DePasse, J., Feldblyum, J., Sengamalay, N., Afonso, C., Zhang, X., Anderson, N.G., Ghedin, E., Spiro, D.J., 2008. Viral genome sequencing by random priming methods. *BMC Genomics* 9, 5. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-5>

- Downey, R., McElvain, D., Murphey, D.K., Bailey, A., Patel, B., Fernandez, M., Loftis, L., Carreno, C.G., Eger, L., Aguilera, E.A., Wootton, S., Castagnini, L.A., Hauger, S.B., 2020. Acute Flaccid Myelitis Among Hospitalized Children in Texas, 2016. *Pediatr. Neurol.* 106, 50–55. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2020.01.007>
- Du, J., Zheng, B., Zheng, W., Li, P., Kang, J., Hou, J., Markham, R., Zhao, K., Yu, X.-F., 2015. Analysis of Enterovirus 68 Strains from the 2014 North American Outbreak Reveals a New Clade, Indicating Viral Evolution. *PLoS ONE* 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144208>
- Dudas, G., Carvalho, L.M., Bedford, T., Tatem, A.J., Baele, G., Faria, N.R., Park, D.J., Ladner, J.T., Arias, A., Asogun, D., Bielejec, F., Caddy, S.L., Cotten, M., D'Ambrozio, J., Dellicour, S., Di Caro, A., DiClaro, J.W., Duraffour, S., Elmore, M.J., Fakoli, L.S., Faye, O., Gilbert, M.L., Gevao, S.M., Gire, S., Gladden-Young, A., Gnirke, A., Goba, A., Grant, D.S., Haagmans, B.L., Hiscox, J.A., Jah, U., Kugelman, J.R., Liu, D., Lu, J., Malboeuf, C.M., Mate, S., Matthews, D.A., Matranga, C.B., Meredith, L.W., Qu, J., Quick, J., Pas, S.D., Phan, M.V.T., Pollakis, G., Reusken, C.B., Sanchez-Lockhart, M., Schaffner, S.F., Schieffelin, J.S., Sealfon, R.S., Simon-Loriere, E., Smits, S.L., Stoecker, K., Thorne, L., Tobin, E.A., Vandi, M.A., Watson, S.J., West, K., Whitmer, S., Wiley, M.R., Winnicki, S.M., Wohl, S., Wölfel, R., Yozwiak, N.L., Andersen, K.G., Blyden, S.O., Bolay, F., Carroll, M.W., Dahn, B., Diallo, B., Formenty, P., Fraser, C., Gao, G.F., Garry, R.F., Goodfellow, I., Günther, S., Happi, C.T., Holmes, E.C., Kargbo, B., Keita, S., Kellam, P., Koopmans, M.P.G., Kuhn, J.H., Loman, N.J., Magassouba, N., Naidoo, D., Nichol, S.T., Nyenswah, T., Palacios, G., Pybus, O.G., Sabeti, P.C., Sall, A., Ströher, U., Wurie, I., Suchard, M.A., Lemey, P., Rambaut, A., 2017. Virus genomes reveal factors that spread and sustained the Ebola epidemic. *Nature* 544, 309–315. <https://doi.org/10.1038/nature22040>
- Duval, M., Mirand, A., Lesens, O., Bay, J.-O., Caillaud, D., Gallot, D., Lautrette, A., Montcouquiol, S., Schmidt, J., Egron, C., Jugie, G., Bisseux, M., Archimbaud, C., Lambert, C., Henquell, C., Bailly, J.-L., 2021. Retrospective Study of the Upsurge of Enterovirus D68 Clade D1 among Adults (2014–2018). *Viruses* 13, 1607. <https://doi.org/10.3390/v13081607>
- Dyda, A., Stelzer-Braid, S., Adam, D., Chughtai, A.A., MacIntyre, C.R., 2018. The association between acute flaccid myelitis (AFM) and Enterovirus D68 (EV-D68) – what is the evidence for causation? *Eurosurveillance* 23. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.3.17-00310>
- Dyrdak, R., Grabbe, M., Hammas, B., Ekwall, J., Hansson, K.E., Luthander, J., Naucler, P., Reinius, H., Rotzén-Östlund, M., Albert, J., 2016. Outbreak of enterovirus D68 of the new B3 lineage in Stockholm, Sweden, August to September 2016. *Eurosurveillance* 21. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.46.30403>
- Dyrdak, R., Mastafa, M., Hodcroft, E.B., Neher, R.A., Albert, J., 2019. Intra- and interpatient evolution of enterovirus D68 analyzed by whole-genome deep sequencing. *Virus Evol.* 5. <https://doi.org/10.1093/ve/vez007>
- ElBadry, M., Lednicky, J., Cella, E., Telisma, T., Chavannes, S., Loeb, J., Ciccozzi, M., Okech, B., Beau De Rochars, V.M., Salemi, M., Morris, J.G., 2016. Isolation of an Enterovirus D68 from Blood from a Child with Pneumonia in Rural Haiti: Close Phylogenetic Linkage with New York Strain. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 35, 1048–1050. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000001283>
- Elrick, M.J., Pekosz, A., Duggal, P., 2021. Enterovirus D68 molecular and cellular biology and pathogenesis. *J. Biol. Chem.* 296, 100317. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100317>
- Endoh, D., Mizutani, T., Kirisawa, R., Maki, Y., Saito, H., Kon, Y., Morikawa, S., Hayashi, M., 2005. Species-independent detection of RNA virus by representational difference analysis using non-ribosomal hexanucleotides for reverse transcription. *Nucleic Acids Res.* 33, e65. <https://doi.org/10.1093/nar/gni064>
- Erster, O., Bar-Or, I., Levy, V., Shatzman-Steuerman, R., Sofer, D., Weiss, L., Vasserman, R., Fratty, I.S., Kestin, K., Elul, M., Levi, N., Alkrenawi, R., Mendelson, E., Mandelboim, M., Weil, M., 2022. Monitoring of Enterovirus D68 Outbreak in Israel by a Parallel Clinical and Wastewater Based Surveillance. *Viruses* 14, 1010. <https://doi.org/10.3390/v14051010>
- Eshaghi, A., Duvvuri, V.R., Isabel, S., Banh, P., Li, A., Peci, A., Patel, S.N., Gubbay, J.B., 2017. Global Distribution and Evolutionary History of Enterovirus D68, with Emphasis on the 2014 Outbreak in Ontario, Canada. *Front. Microbiol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00257>
- Essaidi-Laziosi, M., Brito, F., Benaoudia, S., Royston, L., Cagno, V., Fernandes-Rocha, M., Piuze, I., Zdobnov, E., Huang, S., Constant, S., Boldi, M.-O., Kaiser, L., Tapparel, C., 2018. Propagation of respiratory viruses in human airway epithelia reveals persistent virus-specific signatures. *J. Allergy Clin. Immunol.* 141, 2074–2084. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.07.018>

- Fall, A., Gallagher, N., Morris, C.P., Norton, J.M., Pekosz, A., Klein, E., Mostafa, H.H., 2022. Circulation of Enterovirus D68 during Period of Increased Influenza-Like Illness, Maryland, USA, 2021 - Volume 28, Number 7—July 2022 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. <https://doi.org/10.3201/eid2807.212603>
- Fall, A., Jallow, M.M., Kebe, O., Kiori, D.E., Sy, S., Goudiaby, D., Boye, C.S.B., Niang, M.N., Dia, N., 2019a. Low Circulation of Subclade A1 Enterovirus D68 Strains in Senegal during 2014 North America Outbreak. *Emerg. Infect. Dis.* 25, 1404–1407. <https://doi.org/10.3201/eid2507.181441>
- Fall, A., Ndiaye, N., Jallow, M.M., Barry, M.A., Touré, C.S.B., Kebe, O., Kiori, D.E., Sy, S., Dia, M., Goudiaby, D., Ndiaye, K., Niang, M.N., Dia, N., 2019b. Enterovirus D68 Subclade B3 Circulation in Senegal, 2016: Detection from Influenza-like Illness and Acute Flaccid Paralysis Surveillance. *Sci. Rep.* 9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50470-z>
- Fall, A., Ndiaye, N., Messacar, K., Kebe, O., Jallow, M.M., Harouna, H., Kiori, D.E., Sy, S., Goudiaby, D., Dia, M., Niang, M.N., Ndiaye, K., Dia, N., 2020. Enterovirus D68 Subclade B3 in Children with Acute Flaccid Paralysis in West Africa, 2016. *Emerg. Infect. Dis.* 26, 2227–2230. <https://doi.org/10.3201/eid2609.200312>
- Fang, Y., Chen, Q., Wang, H., Wang, L., Rong, H., Liao, Q., Dong, C., 2021. The role of conformational epitopes in the evolutionary divergence of enterovirus D68 clades: A bioinformatics-based study. *Infect. Genet. Evol.* 93, 104992. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.104992>
- Fernandes-Silva, H., Araújo-Silva, H., Correia-Pinto, J., Moura, R.S., 2020. Retinoic Acid: A Key Regulator of Lung Development. *Biomolecules* 10, 152. <https://doi.org/10.3390/biom10010152>
- Filipe, I.C., Guedes, M.S., Zdobnov, E.M., Tapparel, C., 2021. Enterovirus D: A Small but Versatile Species. *Microorganisms* 9, 1758. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081758>
- Fischer, T.K., Simmonds, P., Harvala, H., 2021. The importance of enterovirus surveillance in a post-polio world. *Lancet Infect. Dis.* [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30852-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30852-5)
- Force, T.U.K.A.F.P. (AFP) T., 2019. An increase in reports of acute flaccid paralysis (AFP) in the United Kingdom, 1 January 2018–21 January 2019: early findings. *Eurosurveillance* 24, 1900093. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.6.1900093>
- Funakoshi, Y., Ito, K., Morino, S., Kinoshita, K., Morikawa, Y., Kono, T., Doan, Y.H., Shimizu, H., Hanaoka, N., Konagaya, M., Fujimoto, T., Suzuki, A., Chiba, T., Akiba, T., Tomaru, Y., Watanabe, K., Shimizu, N., Horikoshi, Y., 2019. Enterovirus D68 respiratory infection in a children's hospital in Japan in 2015. *Pediatr. Int.* 61, 768–776. <https://doi.org/10.1111/ped.13903>
- Furuse, Y., Chaimongkol, N., Okamoto, M., Imamura, T., Saito, Mariko, Tamaki, R., Saito, Mayuko, Lupisan, S.P., Oshitani, H., 2015. Molecular Epidemiology of Enterovirus D68 from 2013 to 2014 in Philippines. *J. Clin. Microbiol.* 53, 1015–1018. <https://doi.org/10.1128/JCM.03362-14>
- Furuse, Y., Chaimongkol, N., Okamoto, M., Oshitani, H., 2019a. Evolutionary and Functional Diversity of the 5' Untranslated Region of Enterovirus D68: Increased Activity of the Internal Ribosome Entry Site of Viral Strains during the 2010s. *Viruses* 11, 626. <https://doi.org/10.3390/v11070626>
- Furuse, Y., Tamaki, R., Okamoto, M., Saito-Obata, M., Suzuki, A., Saito, M., Imamura, T., Khandaker, I., Dapat, I., Ueno, F., Alday, P.P., Tan, A.G., Inobaya, M.T., Segubre-Mercado, E., Tallo, V., Lupisan, S., Oshitani, H., 2019b. Association Between Preceding Viral Respiratory Infection and Subsequent Respiratory Illnesses Among Children: A Prospective Cohort Study in the Philippines. *J. Infect. Dis.* 219, 197–205. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy515>
- Gamiño-Arroyo, A.E., Sánchez-Huerta, J.L., Garza-López, A.E. de la, Parra-Ortega, I., Escobar-Escamilla, N., Mendieta-Condado, E., Garcés-Ayala, F., Barrera-Badillo, G., Ramírez-González, J.E., Díaz-Quiñonez, J.A., Rosa-Zamboni, D. de la, 2018. Surveillance for the identification of cases of acute respiratory infection by enterovirus D68 in children in a tertiary level care hospital during 2014–2016. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* 75, 23–30. <https://doi.org/10.24875/BMHIM.M18000002>
- Gilrane, V.L., Zhuge, J., Huang, W., Nolan, S.M., Dhand, A., Yin, C., Salib, C., Shakil, F., Engel, H., Fallon, J.T., Wang, G., 2020. Biennial Upsurge and Molecular Epidemiology of Enterovirus D68 Infection in New York, USA, 2014 to 2018. *J. Clin. Microbiol.* 58. <https://doi.org/10.1128/JCM.00284-20>
- Gong, L., Wang, Y., Zhang, W., Chen, C., Yang, X., Xu, L., Zhao, C., Jiang, L., Yuan, Z., Xia, Z., Jiang, P., Ge, Q., Yan, J., Sun, Y., Chen, Y., Zhao, Z., Zhang, Y., Gao, F., 2020. Acute Flaccid Myelitis in Children in Zhejiang Province, China. *Front. Neurol.* 11. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.00360>
- Gong, Y.-N., Yang, S.-L., Shih, S.-R., Huang, Y.-C., Chang, P.-Y., Huang, C.-G., Kao, K.-C., Hu, H.-C., Liu, Y.-C., Tsao, K.-C., 2016. Molecular evolution and the global reemergence of enterovirus D68 by genome-wide analysis. *Medicine (Baltimore)* 95. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000004416>

- González-Sanz, R., Taravillo, I., Reina, J., Navascués, A., Moreno-Docón, A., Aranzamendi, M., Romero, M.P., Cuerpo, M. del, Pérez-González, C., Pérez-Castro, S., Otero, A., Cabrerizo, M., 2019. Enterovirus D68-associated respiratory and neurological illness in Spain, 2014–2018. *Emerg. Microbes Infect.* 8, 1438–1444. <https://doi.org/10.1080/22221751.2019.1668243>
- Grainger, C.I., Greenwell, L.L., Lockley, D.J., Martin, G.P., Forbes, B., 2006. Culture of Calu-3 Cells at the Air Interface Provides a Representative Model of the Airway Epithelial Barrier. *Pharm. Res.* 23, 1482–1490. <https://doi.org/10.1007/s11095-006-0255-0>
- Greninger, A.L., Naccache, S.N., Messacar, K., Clayton, A., Yu, G., Somasekar, S., Federman, S., Stryke, D., Anderson, C., Yagi, S., Messenger, S., Wadford, D., Xia, D., Watt, J.P., Van Haren, K., Dominguez, S.R., Glaser, C., Aldrovandi, G., Chiu, C.Y., 2015. A novel outbreak enterovirus D68 strain associated with acute flaccid myelitis cases in the USA (2012–14): a retrospective cohort study. *Lancet Infect. Dis.* 15, 671–682. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)70093-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)70093-9)
- Gromeier, M., Wimmer, E., Gorbalenya, A.E., 1999. Chapter 12 - Genetics, Pathogenesis and Evolution of Picornaviruses, in: Domingo, E., Webster, R., Holland, J. (Eds.), *Origin and Evolution of Viruses*. Academic Press, London, pp. 287–343. <https://doi.org/10.1016/B978-012220360-2/50013-1>
- Harrison, C.J., Weldon, W.C., Pahud, B.A., Jackson, M.A., Oberste, M.S., Selvarangan, R., 2019. Neutralizing Antibody against Enterovirus D68 in Children and Adults before 2014 Outbreak, Kansas City, Missouri, USA1. *Emerg. Infect. Dis.* 25, 585–588. <https://doi.org/10.3201/eid2503.180960>
- Harvala, H., Broberg, E., Benschop, K., Berginc, N., Ladhani, S., Susi, P., Christiansen, C., McKenna, J., Allen, D., Makiello, P., McAllister, G., Carmen, M., Zakikhany, K., Dyrdak, R., Nielsen, X., Madsen, T., Paul, J., Moore, Catherine, von Eije, K., Piralla, A., Carlier, M., Vanoverschelde, L., Poelman, R., Anton, A., López-Labrador, F.X., Pellegrinelli, L., Keeren, K., Maier, M., Cassidy, H., Derdas, S., Savolainen-Kopra, C., Diedrich, S., Nordbø, S., Buesa, J., Bailly, J.-L., Baldanti, F., MacAdam, A., Mirand, A., Dudman, S., Schuffenecker, I., Kadambari, S., Neyts, J., Griffiths, M.J., Richter, J., Margaretto, C., Govind, S., Morley, U., Adams, O., Krokstad, S., Dean, J., Pons-Salort, M., Prochazka, B., Cabrerizo, M., Majumdar, M., Nebbia, G., Wiewel, M., Cottrell, S., Coyle, P., Martin, J., Moore, Catrin, Midgley, S., Horby, P., Wolthers, K., Simmonds, P., Niesters, H., Fischer, T.K., 2018. Recommendations for enterovirus diagnostics and characterisation within and beyond Europe. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 101, 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2018.01.008>
- Harvala, H., Jasir, A., Penttinen, P., Pastore Celentano, L., Greco, D., Broberg, E., 2017. Surveillance and laboratory detection for non-polio enteroviruses in the European Union/European Economic Area, 2016. *Eurosurveillance* 22. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.45.16-00807>
- Hasegawa, S., Hirano, R., Okamoto-Nakagawa, R., Ichiyama, T., Shirabe, K., 2011. Enterovirus 68 infection in children with asthma attacks: virus-induced asthma in Japanese children. *Allergy* 66, 1618–1620. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2011.02725.x>
- Hatayama, K., Goto, S., Yashiro, M., Mori, H., Fujimoto, T., Hanaoka, N., Tanaka-Taya, K., Zuzan, T., Inoue, M., 2019. Acute flaccid myelitis associated with enterovirus D68 in a non-epidemic setting. *IDCases* 17. <https://doi.org/10.1016/j.idcr.2019.e00549>
- Helfferich, J., Knoester, M., Van Leer-Buter, C.C., Neuteboom, R.F., Meiners, L.C., Niesters, H.G., Brouwer, O.F., 2019. Acute flaccid myelitis and enterovirus D68: lessons from the past and present. *Eur. J. Pediatr.* 178, 1305–1315. <https://doi.org/10.1007/s00431-019-03435-3>
- Hellferscee, O., Tempia, S., Walaza, S., Variava, E., Dawood, H., Wolter, N., Madhi, S.A., du Plessis, M., Cohen, C., Treurnicht, F.K., 2017a. Enterovirus genotypes among patients with severe acute respiratory illness, influenza-like illness, and asymptomatic individuals in South Africa, 2012–2014. *J. Med. Virol.* 89, 1759–1767. <https://doi.org/10.1002/jmv.24869>
- Hellferscee, O., Treurnicht, F.K., Tempia, S., Variava, E., Dawood, H., Kahn, K., Cohen, A.L., Pretorius, M., Cohen, C., Madhi, S.A., Venter, M., 2017b. Enterovirus D68 and other enterovirus serotypes identified in South African patients with severe acute respiratory illness, 2009–2011. *Influenza Other Respir. Viruses* 11, 211–219. <https://doi.org/10.1111/irv.12444>
- Hixon, A.M., Clarke, P., Tyler, K.L., 2019a. Contemporary circulating enterovirus D68 strains infect and undergo retrograde axonal transport in spinal motor neurons independent of sialic acid. *J. Virol.* JVI.00578-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.00578-19>
- Hixon, Alison M, Clarke, P., Tyler, K.L., 2017. Evaluating Treatment Efficacy in a Mouse Model of Enterovirus D68-Associated Paralytic Myelitis. *J. Infect. Dis.* 216, 1245–1253. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix468>
- Hixon, A.M., Frost, J., Rudy, M.J., Messacar, K., Clarke, P., Tyler, K.L., 2019b. Understanding Enterovirus D68-Induced Neurologic Disease: A Basic Science Review. *Viruses* 11, 821. <https://doi.org/10.3390/v11090821>

- Hixon, Alison M., Yu, G., Leser, J.S., Yagi, S., Clarke, P., Chiu, C.Y., Tyler, K.L., 2017. A mouse model of paralytic myelitis caused by enterovirus D68. *PLoS Pathog.* 13. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006199>
- Hodcroft, E.B., Dyrdak, R., Andrés, C., Egli, A., Reist, J., Artola, D.G.M. de, Flórez, J.A., Niesters, H.G.M., Antón, A., Poelman, R., Reynders, M., Wollants, E., Neher, R.A., Albert, J., 2020. Evolution, geographic spreading, and demographic distribution of Enterovirus D68. *bioRxiv* 2020.01.10.901553. <https://doi.org/10.1101/2020.01.10.901553>
- Holm-Hansen, C.C., Midgley, S.E., Fischer, T.K., 2016. Global emergence of enterovirus D68: a systematic review. *Lancet Infect. Dis.* 16, e64–e75. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00543-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00543-5)
- Horner, L.M., Poulter, M.D., Brenton, J.N., Turner, R.B., 2015. Acute Flaccid Paralysis Associated with Novel Enterovirus C105. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 1858–1860. <https://doi.org/10.3201/eid2110.150759>
- Howson-Wells, H.C., Tsoleridis, T., Zainuddin, I., Tarr, A.W., Irving, W.L., Ball, J.K., Berry, L., Clark, G., McClure, C.P., 2022. Enterovirus D68 epidemic, UK, 2018, was caused by subclades B3 and D1, predominantly in children and adults, respectively, with both subclades exhibiting extensive genetic diversity. *Microb. Genomics* 8, 000825. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000825>
- Hu, Y., Musharrafieh, R., Zheng, M., Wang, J., 2020. Enterovirus D68 antivirals: past, present and future. *ACS Infect. Dis.* 6, 1572–1586. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.0c00120>
- Hu, Y.-L., Chang, L.-Y., 2020. Current status of enterovirus D68 worldwide and in Taiwan. *Pediatr. Neonatol.* 61, 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.pedneo.2019.09.007>
- Hu, Y.-L., Huang, L.-M., Lu, C.-Y., Fang, T.-Y., Cheng, A.-L., Chang, L.-Y., 2019. Manifestations of enterovirus D68 and high seroconversion among children attending a kindergarten. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 52, 858–864. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2019.04.010>
- Huang, K.-Y.A., Huang, P.-N., Huang, Y.-C., Yang, S.-L., Tsao, K.-C., Chiu, C.-H., Shih, S.-R., Lin, T.-Y., 2020. Emergence of genotype C1 Enterovirus A71 and its link with antigenic variation of virus in Taiwan. *PLOS Pathog.* 16, e1008857. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008857>
- Huang, S.-W., Hsu, Y.-W., Smith, D.J., Kiang, D., Tsai, H.-P., Lin, K.-H., Wang, S.-M., Liu, C.-C., Su, I.-J., Wang, J.-R., 2009. Reemergence of enterovirus 71 in 2008 in taiwan: dynamics of genetic and antigenic evolution from 1998 to 2008. *J. Clin. Microbiol.* 47, 3653–3662. <https://doi.org/10.1128/JCM.00630-09>
- Huang, S.-W., Huang, Y.-H., Tsai, H.-P., Kuo, P.-H., Wang, S.-M., Liu, C.-C., Wang, J.-R., 2017. A Selective Bottleneck Shapes the Evolutionary Mutant Spectra of Enterovirus A71 during Viral Dissemination in Humans. *J. Virol.* 91, e01062-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.01062-17>
- Huang, S.-W., Wang, Y.-F., Yu, C.-K., Su, I.-J., Wang, J.-R., 2012. Mutations in VP2 and VP1 capsid proteins increase infectivity and mouse lethality of enterovirus 71 by virus binding and RNA accumulation enhancement. *Virology* 422, 132–143. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.10.015>
- Huang, W., Wang, G., Zhuge, J., Nolan, S.M., Dimitrova, N., Fallon, J.T., 2015. Whole-Genome Sequence Analysis Reveals the Enterovirus D68 Isolates during the United States 2014 Outbreak Mainly Belong to a Novel Clade. *Sci. Rep.* 5. <https://doi.org/10.1038/srep15223>
- Huang, W., Yin, C., Wang, G., Rosenblum, J., Krishnan, S., Dimitrova, N., Fallon, J.T., 2019. Optimizing a Metatranscriptomic Next-Generation Sequencing Protocol for Bronchoalveolar Lavage Diagnostics. *J. Mol. Diagn.* 21, 251–261. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2018.09.004>
- Huang, W., Yin, C., Zhuge, J., Farooq, T., Yoon, E.C., Nolan, S.M., Chen, D., Fallon, J.T., Wang, G., 2016. Complete Genome Sequences of Nine Enterovirus D68 Strains from Patients of the Lower Hudson Valley, New York, 2016. *Genome Announc.* 4. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01394-16>
- Huang, Y.-P., Lin, T.-L., Lin, T.-H., Wu, H.-S., 2017. Molecular and epidemiological study of enterovirus D68 in Taiwan. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 50, 411–417. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2015.07.015>
- Hurst, B.L., Evans, W.J., Smeets, D.F., Van Wettere, A.J., Tarbet, E.B., 2019. Evaluation of antiviral therapies in respiratory and neurological disease models of Enterovirus D68 infection in mice. *Virology* 526, 146–154. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.10.014>
- Hy, L., At, W., Yc, T., Bs, T., 2016. Prevalence and phylogenetic characterization of human enterovirus D68 among children with respiratory infection in Hong Kong. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 85. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.02.024>
- Ikeda, T., Mizuta, K., Abiko, C., Aoki, Y., Itagaki, T., Katsushima, F., Katsushima, Y., Matsuzaki, Y., Fuji, N., Imamura, T., Oshitani, H., Noda, M., Kimura, H., Ahiko, T., 2012. Acute respiratory infections due to enterovirus 68 in Yamagata, Japan between 2005 and 2010. *Microbiol. Immunol.* 56, 139–143. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2012.00411.x>
- Ikuse, T., Aizawa, Y., Yamanaka, T., Habuka, R., Watanabe, K., Otsuka, T., Saitoh, A., 2021. Outbreak of Enterovirus D68 Among Children in Japan—Worldwide Circulation of Enterovirus D68 Clade B3 in 2018. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 40, 6–10. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000002889>

- Imamura, T., Fuji, N., Suzuki, A., Tamaki, R., Saito, M., Aniceto, R., Galang, H., Sombrero, L., Lupisan, S., Oshitani, H., 2011. Enterovirus 68 among Children with Severe Acute Respiratory Infection, the Philippines. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 1430–1435. <https://doi.org/10.3201/eid1708.101328>
- Imamura, T., Okamoto, M., Nakakita, S., Suzuki, A., Saito, M., Tamaki, R., Lupisan, S., Roy, C.N., Hiramatsu, H., Sugawara, K., Mizuta, K., Matsuzaki, Y., Suzuki, Y., Oshitani, H., 2014. Antigenic and Receptor Binding Properties of Enterovirus 68. *J. Virol.* 88, 2374–2384. <https://doi.org/10.1128/JVI.03070-13>
- Ishiko, H., Miura, R., Shimada, Y., Hayashi, A., Nakajima, H., Yamazaki, S., Takeda, N., 2002. Human rhinovirus 87 identified as human enterovirus 68 by VP4-based molecular diagnosis. *Intervirol.* 45, 136–141. <https://doi.org/10.1159/000065866>
- Itagaki, T., Aoki, Y., Matoba, Y., Tanaka, S., Ikeda, T., Mizuta, K., Matsuzaki, Y., 2018. Clinical characteristics of children infected with enterovirus D68 in an outpatient clinic and the association with bronchial asthma. *Infect. Dis. Lond. Engl.* 50, 303–312. <https://doi.org/10.1080/23744235.2017.1400176>
- Jacobson, L.M., Redd, J.T., Schneider, E., Lu, X., Chern, S.-W.W., Oberste, M.S., Erdman, D.D., Fischer, G.E., Armstrong, G.L., Kodani, M., Montoya, J., Magri, J.M., Cheek, J.E., 2012. Outbreak of lower respiratory tract illness associated with human enterovirus 68 among American Indian children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 31, 309–312. <https://doi.org/10.1097/INF.0b013e3182443eaf>
- Kaida, A., Iritani, N., Yamamoto, S.P., Kanbayashi, D., Hirai, Y., Togawa, M., Amo, K., Kohdera, U., Nishigaki, T., Shiomi, M., Asai, S., Kageyama, T., Kubo, H., 2017. Distinct genetic clades of enterovirus D68 detected in 2010, 2013, and 2015 in Osaka City, Japan. *PLoS ONE* 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184335>
- Kaida, A., Kubo, H., Sekiguchi, J., Kohdera, U., Togawa, M., Shiomi, M., Nishigaki, T., Iritani, N., 2011. Enterovirus 68 in Children with Acute Respiratory Tract Infections, Osaka, Japan. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 1494–1497. <https://doi.org/10.3201/eid1708.110028>
- Kamau, E., Harvala, H., Blomqvist, S., Nguyen, D., Horby, P., Pebody, R., Simmonds, P., 2019. Increase in Enterovirus D68 Infections in Young Children, United Kingdom, 2006–2016. *Emerg. Infect. Dis.* 25. <https://doi.org/10.3201/eid2506.181759>
- Kane, M.S., Sonne, C., Zhu, S., Malhotra, A., Van Haren, K., Messacar, K., Glaser, C.A., 2019. Incidence, Risk Factors and Outcomes Among Children With Acute Flaccid Myelitis: A Population-based Cohort Study in a California Health Network Between 2011 and 2016. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 38, 667–672. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000002276>
- Kang, J., Pang, Z., Zhou, Z., Li, X., Liu, S., Cheng, J., Liu, P., Tan, W., Wang, Z., Wang, T., 2020. Enterovirus D68 Protease 2Apro Targets TRAF3 to Subvert Host Innate Immune Responses. *J. Virol.* <https://doi.org/10.1128/JVI.01856-20>
- Kapikian, A.Z., Conant, R.M., Hamparian, V.V., Chanock, R.M., Dick, E.C., Gwaltney, J.M., Hamre, D., Jordan, W.S., Kenny, G.E., Lennette, E.H., Melnick, J.L., Mogabgab, W.J., Phillips, C.A., Schieble, J.H., Stott, E.J., Tyrrell, D.A.J., 1971. A collaborative report: Rhinoviruses—Extension of the numbering system. *Virology* 43, 524–526. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(71\)90329-1](https://doi.org/10.1016/0042-6822(71)90329-1)
- Karelehto, E., Koen, G., Benschop, K., Klis, F. van der, Pajkrt, D., Wolthers, K., 2019. Enterovirus D68 serosurvey: evidence for endemic circulation in the Netherlands, 2006 to 2016. *Eurosurveillance* 24, 1800671. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.35.1800671>
- Khetsuriani, N., Lamonte-Fowlkes, A., Oberst, S., Pallansch, M.A., Centers for Disease Control and Prevention, 2006. Enterovirus surveillance--United States, 1970–2005. *Morb. Mortal. Wkly. Rep. Surveill. Summ.* Wash. DC 2002 55, 1–20.
- Kidd, S., 2020. Vital Signs: Clinical Characteristics of Patients with Confirmed Acute Flaccid Myelitis, United States, 2018. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 69. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6931e3>
- Kidd, S., Yee, E., English, R., Rogers, S., Emery, B., Getachew, H., Routh, J.A., Lopez, A.S., 2021. National Surveillance for Acute Flaccid Myelitis - United States, 2018–2020. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 70, 1534–1538. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm7044a2>
- Kirolos, A., Mark, K., Shetty, J., Chinchankar, N., Mcdougall, C., Eunson, P., Stevenson, J., Templeton, K., 2019. Outcome of paediatric acute flaccid myelitis associated with enterovirus D68: a case series. *Dev. Med. Child Neurol.* 61, 376–380. <https://doi.org/10.1111/dmcn.14096>
- Knoester, M., Helfferich, J., Poelman, R., Van Leer-Buter, C., Brouwer, O.F., Niesters, H.G.M., 2019. Twenty-nine Cases of Enterovirus-D68-associated Acute Flaccid Myelitis in Europe 2016. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 38, 16–21. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000002188>
- Knoester, M., Schölvinck, E.H., Poelman, R., Smit, S., Vermont, C.L., Niesters, H.G.M., Van Leer-Buter, C.C., 2017. Upsurge of Enterovirus D68, the Netherlands, 2016. *Emerg. Infect. Dis.* 23, 140–143. <https://doi.org/10.3201/eid2301.161313>

- Korematsu, S., Nagashima, K., Sato, Y., Nagao, M., Hasegawa, S., Nakamura, H., Sugiura, S., Miura, K., Okada, K., Fujisawa, T., 2018. "Spike" in acute asthma exacerbations during enterovirus D68 epidemic in Japan: A nation-wide survey. *Allergol. Int.* 67, 55–60. <https://doi.org/10.1016/j.alit.2017.04.003>
- Kramer, R., Sabatier, M., Wirth, T., Pichon, M., Lina, B., Schuffenecker, I., Josset, L., 2018. Molecular diversity and biennial circulation of enterovirus D68: a systematic screening study in Lyon, France, 2010 to 2016. *Eurosurveillance* 23. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.37.1700711>
- Kreft, M.E., Jerman, U.D., Lasič, E., Hevir-Kene, N., Rižner, T.L., Peternel, L., Kristan, K., 2015. The characterization of the human cell line Calu-3 under different culture conditions and its use as an optimized in vitro model to investigate bronchial epithelial function. *Eur. J. Pharm. Sci.* 69, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2014.12.017>
- Kreuter, J.D., Barnes, A., McCarthy, J.E., Schwartzman, J.D., Oberste, M.S., Rhodes, C.H., Modlin, J.F., Wright, P.F., 2011. A fatal central nervous system enterovirus 68 infection. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 135, 793–796. <https://doi.org/10.5858/2010-0174-CR.1>
- Kubi, J.A., Mutocheluh, M., Bonney, J.H.K., Ampofo, W.K., Odoom, J.K., 2019. Molecular detection of enterovirus D68 among children with acute respiratory tract infection in Ghana. *Afr. J. Lab. Med.* 8. <https://doi.org/10.4102/ajlm.v8i1.732>
- Kujawski, S.A., Midgley, C.M., Rha, B., Lively, J.Y., Nix, W.A., Curns, A.T., Payne, D.C., Englund, J.A., Boom, J.A., Williams, J.V., Weinberg, G.A., Staat, M.A., Selvarangan, R., Halasa, N.B., Klein, E.J., Sahni, L.C., Michaels, M.G., Shelley, L., McNeal, M., Harrison, C.J., Stewart, L.S., Lopez, A.S., Routh, J.A., Patel, M., Oberste, M.S., Watson, J.T., Gerber, S.I., 2019. Enterovirus D68–Associated Acute Respiratory Illness — New Vaccine Surveillance Network, United States, July–October, 2017 and 2018. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 68, 277–280. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6812a1>
- Laitinen, O.H., Svedin, E., Kapell, S., Nurminen, A., Hytönen, V.P., Flodström-Tullberg, M., 2016. Enteroviral proteases: structure, host interactions and pathogenicity. *Rev. Med. Virol.* 26, 251–267. <https://doi.org/10.1002/rmv.1883>
- Lang, M., Mirand, A., Savy, N., Henquell, C., Maridet, S., Perignon, R., Labbé, A., Peigue-Lafeuille, H., 2014. Acute flaccid paralysis following enterovirus D68 associated pneumonia, France, 2014. *Eurosurveillance* 19, 20952. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2014.19.44.20952>
- Lau, S.K.P., Yip, C.C.Y., Zhao, P.S.-H., Chow, W.-N., To, K.K.W., Wu, A.K.L., Yuen, K.-Y., Woo, P.C.Y., 2016. Enterovirus D68 Infections Associated with Severe Respiratory Illness in Elderly Patients and Emergence of a Novel Clade in Hong Kong. *Sci. Rep.* 6. <https://doi.org/10.1038/srep25147>
- Lauinger, I.L., Bible, J.M., Halligan, E.P., Aarons, E.J., MacMahon, E., Tong, C.Y.W., 2012. Lineages, sub-lineages and variants of enterovirus 68 in recent outbreaks. *PloS One* 7, e36005. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036005>
- Launes, C., Armero, G., Anton, A., Hernandez, L., Gimferrer, L., Cisneros, C., Jordan, I., Muñoz-Almagro, C., 2015. Molecular epidemiology of severe respiratory disease by human rhinoviruses and enteroviruses at a tertiary paediatric hospital in Barcelona, Spain. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 21, 799.e5–7. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.04.021>
- Lednický, J.A., Bonny, T.S., Morris, J.G., Loeb, J.C., 2016. Complete Genome Sequence of Enterovirus D68 Detected in Classroom Air and on Environmental Surfaces. *Genome Announc.* 4. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00579-16>
- Lee, K.-M., Chen, C.-J., Shih, S.-R., 2017. Regulation Mechanisms of Viral IRES-Driven Translation. *Trends Microbiol.* 25, 546–561. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.01.010>
- Levy, A., Roberts, J., Lang, J., Tempone, S., Kesson, A., Dofai, A., Daley, A.J., Thorley, B., Speers, D.J., 2015. Enterovirus D68 disease and molecular epidemiology in Australia. *J. Clin. Virol.* 69, 117–121. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2015.06.079>
- Li, X., Wang, M., Cheng, A., Wen, X., Ou, X., Mao, S., Gao, Q., Sun, D., Jia, R., Yang, Q., Wu, Y., Zhu, D., Zhao, X., Chen, S., Liu, M., Zhang, S., Liu, Y., Yu, Y., Zhang, L., Tian, B., Pan, L., Chen, X., 2020. Enterovirus Replication Organelles and Inhibitors of Their Formation. *Front. Microbiol.* 11, 1817. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01817>
- Lin, J.-Y., Shih, S.-R., 2014. Cell and tissue tropism of enterovirus 71 and other enteroviruses infections. *J. Biomed. Sci.* 21, 18. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-21-18>
- Linster, M., Donato, C., Mah, M.G., Grau, M.L., Low, J.G., Ooi, E.E., Su, Y.C.F., Smith, G.J.D., Vijaykrishna, D., 2020. Genetic diversity of respiratory enteroviruses and rhinoviruses in febrile adults, Singapore, 2007–2013. *Influenza Other Respir. Viruses* 14, 67–71. <https://doi.org/10.1111/irv.12662>

- Linsuwanon, P., Puenpa, J., Suwannakarn, K., Auksornkitti, V., Vichiwattana, P., Korkong, S., Theamboonlers, A., Poovorawan, Y., 2012. Molecular Epidemiology and Evolution of Human Enterovirus Serotype 68 in Thailand, 2006–2011. *PLOS ONE* 7, e35190. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035190>
- Liu, Y., Gong, C., Luo, M., Zhang, T., Li, M., Shen, L., Zhang, H., Huang, F., 2021. Seroepidemiology of enterovirus D68 in a healthy population in Beijing, China, between 2012 and 2017: A retrospective study. *J. Med. Virol.* 93, 3524–3531. <https://doi.org/10.1002/jmv.26132>
- Liu, Y., Sheng, J., Baggen, J., Meng, G., Xiao, C., Thibaut, H.J., van Kuppeveld, F.J.M., Rossmann, M.G., 2015a. Sialic acid-dependent cell entry of human enterovirus D68. *Nat. Commun.* 6. <https://doi.org/10.1038/ncomms9865>
- Liu, Y., Sheng, J., Fokine, A., Meng, G., Shin, W.-H., Long, F., Kuhn, R.J., Kihara, D., Rossmann, M.G., 2015b. Structure and inhibition of EV-D68, a virus that causes respiratory illness in children. *Science* 347, 71–74. <https://doi.org/10.1126/science.1261962>
- Liu, Y., Sheng, J., van Vliet, A.L.W., Buda, G., van Kuppeveld, F.J.M., Rossmann, M.G., 2018. Molecular basis for the acid-initiated uncoating of human enterovirus D68. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, E12209–E12217. <https://doi.org/10.1073/pnas.1803347115>
- Lopez, A., 2019. Vital Signs: Surveillance for Acute Flaccid Myelitis — United States, 2018. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 68. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6827e1>
- Lozano, G., Martínez-Salas, E., 2015. Structural insights into viral IRES-dependent translation mechanisms. *Curr. Opin. Virol., Antiviral strategies • Virus structure and expression* 12, 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.04.008>
- Lu, Q.-B., Wo, Y., Wang, H.-Y., Wei, M.-T., Zhang, L., Yang, H., Liu, E.-M., Li, T.-Y., Zhao, Z.-T., Liu, W., Cao, W.-C., 2014. Detection of enterovirus 68 as one of the commonest types of enterovirus found in patients with acute respiratory tract infection in China. *J. Med. Microbiol.* 63, 408–414. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.068247-0>
- Lulla, V., Dinan, A.M., Hosmillo, M., Chaudhry, Y., Sherry, L., Irigoyen, N., Nayak, K.M., Stonehouse, N.J., Zilbauer, M., Goodfellow, I., Firth, A.E., 2019. An Upstream Protein-Coding Region in Enteroviruses Modulates Virus Infection in Gut Epithelial Cells. *Nat. Microbiol.* 4, 280–292. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0297-1>
- Ly, N., Tokarz, R., Mishra, N., Sameroff, S., Jain, K., Rachmat, A., An, U.S., Newell, S., Harrison, D.J., Lipkin, W.I., 2014. Multiplex PCR analysis of clusters of unexplained viral respiratory tract infection in Cambodia. *Virol. J.* 11, 224. <https://doi.org/10.1186/s12985-014-0224-x>
- Lyou, H., van der Schaar, H.M., Dorobantu, C.M., Rabouw, H.H., Strating, J.R.P.M., van Kuppeveld, F.J.M., 2019. ACBD3 Is an Essential Pan-enterovirus Host Factor That Mediates the Interaction between Viral 3A Protein and Cellular Protein PI4KB. *mBio* 10, e02742-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.02742-18>
- Majumdar, M., Martin, J., 2018. Detection by Direct Next Generation Sequencing Analysis of Emerging Enterovirus D68 and C109 Strains in an Environmental Sample From Scotland. *Front. Microbiol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01956>
- Majumdar, M., Wilton, T., Hajarha, Y., Klapsa, D., Martin, J., 2019. Detection of Enterovirus D68 in wastewater samples from the United Kingdom during outbreaks reported globally between 2015 and 2018.
- Mandary, M.B., Poh, C.L., 2018. Changes in the EV-A71 Genome through Recombination and Spontaneous Mutations: Impact on Virulence. *Viruses* 10. <https://doi.org/10.3390/v10060320>
- Martens, K., Hellings, P.W., Steelant, B., 2018. Calu-3 epithelial cells exhibit different immune and epithelial barrier responses from freshly isolated primary nasal epithelial cells in vitro. *Clin. Transl. Allergy* 8. <https://doi.org/10.1186/s13601-018-0225-8>
- Martin, A.I.C., Pebody, R.G., Danis, K., Ellis, J., Niazi, S., Lusignan, S.D., Brown, K.E., Zambon, M., Allen, D.J., 2017. The emergence of enterovirus D68 in England in autumn 2014 and the necessity for reinforcing enterovirus respiratory screening. *Epidemiol. Infect.* 145, 1855–1864. <https://doi.org/10.1017/S0950268817000590>
- Martin, G., Li, R., Cook, V.E., Carwana, M., Tilley, P., Sauve, L., Tang, P., Kapur, A., Yang, C.L., 2016. Respiratory Presentation of Pediatric Patients in the 2014 Enterovirus D68 Outbreak. *Can. Respir. J.* 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/8302179>
- Martin, J.A., Messacar, K., Yang, M.L., Maloney, J.A., Lindwall, J., Carry, T., Kenyon, P., Sillau, S.H., Oleszek, J., Tyler, K.L., Dominguez, S.R., Schreiner, T.L., 2017. Outcomes of Colorado children with acute flaccid myelitis at 1 year. *Neurology* 89, 129–137. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000004081>
- Mawuntu, A.H.P., Bernadus, J.B.B., Dhenni, R., Wiyatno, A., Anggreani, R., Feliana, null, Yudhaputri, F.A., Jaya, U.A., Ma'roef, C.N., Dewantari, A.K., Fadhilah, A., Ledermann, J.P., Powers, A.M., Safari, D., Myint, K.S.A.,

2018. Detection of central nervous system viral infections in adults in Manado, North Sulawesi, Indonesia. *PLoS One* 13, e0207440. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207440>
- McLaren, N., Lopez, A., Kidd, S., Zhang, J., Nix, W.A., Link-Gelles, R., Lee, A., Routh, J.A., 2020. Characteristics of Patients with Acute Flaccid Myelitis, United States, 2015–2018. *Emerg. Infect. Dis.* 26, 212–219. <https://doi.org/10.3201/eid2602.191453>
- McWilliam Leitch, E.C., Cabrerizo, M., Cardosa, J., Harvala, H., Ivanova, O.E., Koike, S., Kroes, A.C.M., Lukashev, A., Perera, D., Roivainen, M., Susi, P., Trallero, G., Evans, D.J., Simmonds, P., 2012. The Association of Recombination Events in the Founding and Emergence of Subgenogroup Evolutionary Lineages of Human Enterovirus 71. *J. Virol.* 86, 2676–2685. <https://doi.org/10.1128/JVI.06065-11>
- Meijer, A., Benschop, K.S., Donker, G.A., Avoort, H.G. van der, 2014. Continued seasonal circulation of enterovirus D68 in the Netherlands, 2011–2014. *Eurosurveillance* 19, 20935. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2014.19.42.20935>
- Meijer, A., van der Sanden, S., Snijders, B.E.P., Jaramillo-Gutierrez, G., Bont, L., van der Ent, C.K., Overduin, P., Jenny, S.L., Jusic, E., van der Avoort, H.G.A.M., Smith, G.J.D., Donker, G.A., Koopmans, M.P.G., 2012. Emergence and epidemic occurrence of enterovirus 68 respiratory infections in The Netherlands in 2010. *Virology* 423, 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.11.021>
- Messacar, K., Abzug, M.J., Dominguez, S.R., 2016a. The Emergence of Enterovirus-D68. *Microbiol. Spectr.* 4. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.EI10-0018-2016>
- Messacar, K., Asturias, E.J., Hixon, A.M., Van Leer-Buter, C., Niesters, H.G.M., Tyler, K.L., Abzug, M.J., Dominguez, S.R., 2018. Enterovirus D68 and acute flaccid myelitis—evaluating the evidence for causality. *Lancet Infect. Dis.* 18, e239–e247. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30094-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30094-X)
- Messacar, K., Hawkins, S.M.M., Baker, J., Pearce, K., Tong, S., Dominguez, S.R., Parker, S., 2016b. Resource Burden During the 2014 Enterovirus D68 Respiratory Disease Outbreak at Children’s Hospital Colorado: An Unexpected Strain. *JAMA Pediatr.* 170, 294. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2015.3879>
- Messacar, K., Pretty, K., Reno, S., Dominguez, S.R., 2019a. Continued biennial circulation of enterovirus D68 in Colorado. *J. Clin. Virol.* 113, 24–26. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2019.01.008>
- Messacar, K., Robinson, C.C., Pretty, K., Yuan, J., Dominguez, S.R., 2017. Surveillance for Enterovirus D68 in Colorado Children Reveals Continued Circulation. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 92, 39–41. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2017.05.009>
- Messacar, K., Schreiner, T.L., Van Haren, K., Yang, M., Glaser, C.A., Tyler, K.L., Dominguez, S.R., 2016c. Acute Flaccid Myelitis: A Clinical Review of US Cases 2012–2015. *Ann. Neurol.* 80, 326–338. <https://doi.org/10.1002/ana.24730>
- Messacar, K., Sillau, S., Hopkins, S.E., Otten, C., Wilson-Murphy, M., Wong, B., Santoro, J.D., Treister, A., Bains, H.K., Torres, A., Zabrocki, L., Glanternik, J.R., Hurst, A.L., Martin, J.A., Schreiner, T., Makhani, N., DeBiasi, R.L., Kruer, M.C., Tremoulet, A.H., Haren, K.V., Desai, J., Benson, L.A., Gorman, M.P., Abzug, M.J., Tyler, K.L., Dominguez, S.R., 2019b. Safety, tolerability, and efficacy of fluoxetine as an antiviral for acute flaccid myelitis. *Neurology* 92, e2118–e2126. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000006670>
- Messacar, K., Spence-Davison, E., Osborne, C., Press, C., Schreiner, T.L., Martin, J., Messer, R., Maloney, J., Burakoff, A., Barnes, M., Rogers, S., Lopez, A.S., Routh, J., Gerber, S.I., Oberste, M.S., Nix, W.A., Abzug, M.J., Tyler, K.L., Herlihy, R., Dominguez, S.R., 2020. Clinical characteristics of enterovirus A71 neurological disease during an outbreak in children in Colorado, USA, in 2018: an observational cohort study. *Lancet Infect. Dis.* 20, 230–239. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(19\)30632-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30632-2)
- Metoki, T., Okamoto, M., Suzuki, A., Kitaoka, S., Miyabayashi, H., Rokugo, Y., Onuma, R., Noguchi, R., Sato, T., Watanabe, Y., Ohmiya, S., Sato, K., Nishimura, H., Oshitani, H., Kumaki, S., 2018. Concurrent Community Transmission of Enterovirus D68 With Human Rhinoviruses and Respiratory Syncytial Virus Among Children in Sendai, Japan. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 37, 394–400. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000001768>
- Midgley, C.M., Jackson, M.A., Selvarangan, R., Turabelidze, G., Obringer, E., Johnson, D., Giles, B.L., Patel, A., Echols, F., Oberste, M.S., Nix, W.A., Watson, J.T., Gerber, S.I., 2014. Severe respiratory illness associated with enterovirus D68 - Missouri and Illinois, 2014. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 63, 798–799.
- Midgley, C.M., Watson, J.T., Nix, W.A., Curns, A.T., Rogers, S.L., Brown, B.A., Conover, C., Dominguez, S.R., Feikin, D.R., Gray, S., Hassan, F., Hoferka, S., Jackson, M.A., Johnson, D., Leshem, E., Miller, L., Nichols, J.B., Nyquist, A.-C., Obringer, E., Patel, A., Patel, M., Rha, B., Schneider, E., Schuster, J.E., Selvarangan, R., Seward, J.F., Turabelidze, G., Oberste, M.S., Pallansch, M.A., Gerber, S.I., 2015. Severe respiratory illness associated with a nationwide outbreak of enterovirus D68 in the USA (2014): a descriptive epidemiological investigation. *Lancet Respir. Med.* 3, 879–887. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(15\)00335-5](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(15)00335-5)

- Midgley, S.E., Benschop, K., Dyrdak, R., Mirand, A., Bailly, J.-L., Bierbaum, S., Buderus, S., Böttcher, S., Eis-Hübinger, A.-M., Hönemann, M., Jensen, V.V., Hartling, U.B., Henquell, C., Panning, M., Thomsen, M.K., Hodcroft, E.B., Meijer, A., 2020. Co-circulation of multiple enterovirus D68 subclades, including a novel B3 cluster, across Europe in a season of expected low prevalence, 2019/20. *Eurosurveillance* 25, 1900749. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.2.1900749>
- Mishra, N., Ng, T.F.F., Marine, R.L., Jain, K., Ng, J., Thakkar, R., Caciula, A., Price, A., Garcia, J.A., Burns, J.C., Thakur, K.T., Hetzler, K.L., Routh, J.A., Konopka-Anstadt, J.L., Nix, W.A., Tokarz, R., Briese, T., Oberste, M.S., Lipkin, W.I., 2019. Antibodies to Enteroviruses in Cerebrospinal Fluid of Patients with Acute Flaccid Myelitis. *mBio* 10. <https://doi.org/10.1128/mBio.01903-19>
- Mohamad, Y., Shi, J., Qu, J., Poon, T., Xue, Y.C., Deng, H., Zhang, J., Luo, H., 2018. Enteroviral Infection Inhibits Autophagic Flux via Disruption of the SNARE Complex to Enhance Viral Replication. *Cell Rep.* 22, 3292–3303. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.02.090>
- Molet, L., Saloum, K., Marque-Juillet, S., Garbarg-Chenon, A., Henquell, C., Schuffenecker, I., Peigue-Lafeuille, H., Rozenberg, F., Mirand, A., 2016. Enterovirus infections in hospitals of Ile de France region over 2013. *J. Clin. Virol.* 74, 37–42. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2015.11.024>
- Montes, M., Oñate, E., Muguruza, A., Tamayo, E., Martí Carrera, I., Iturzaeta, A., Cilla, G., 2019. Enterovirus D68 Causing Acute Respiratory Infection: Clinical Characteristics and Differences With Acute Respiratory Infections Associated With Enterovirus Non-D68. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 38, 687–691. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000002289>
- Morrey, J.D., Wang, H., Hurst, B.L., Zukor, K., Siddharthan, V., Van Wettere, A.J., Sinex, D.G., Tarbet, E.B., 2018. Causation of Acute Flaccid Paralysis by Myelitis and Myositis in Enterovirus-D68 Infected Mice Deficient in Interferon $\alpha\beta/\gamma$ Receptor Deficient Mice. *Viruses* 10. <https://doi.org/10.3390/v10010033>
- Mozhgani, S.-H., Keshavarz, M., Mousavi, N., Namdari, H., Salimi, V., Mokhtari-Azad, T., Zarei-Ghobadi, M., Nadji, S.A., Ghavami, N., Rezaei, F., 2021. Frequent detection of enterovirus D68 and rhinovirus type C in children with acute respiratory infections. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 40, 637–642. <https://doi.org/10.1007/s10096-020-04051-y>
- Murphy, O.C., Messacar, K., Benson, L., Bove, R., Carpenter, J.L., Crawford, T., Dean, J., DeBiasi, R., Desai, J., Elrick, M.J., Farias-Moeller, R., Gombolay, G.Y., Greenberg, B., Harmelink, M., Hong, S., Hopkins, S.E., Oleszek, J., Otten, C., Sadowsky, C.L., Schreiner, T.L., Thakur, K.T., Haren, K.V., Carballo, C.M., Chong, P.F., Fall, A., Gowda, V.K., Helfferich, J., Kira, R., Lim, M., Lopez, E.L., Wells, E.M., Yeh, E.A., Pardo, C.A., Salazar-Camelo, A., Mithal, D., Wilson-Murphy, M., Bauer, A., Watkins, C., Abzug, M., Dominguez, S., Press, C., Yang, M., Ahsan, N., Ramos-Platt, L., Tiongson, E., Seruya, M., Tilton, A., Katz, E., Kirschen, M., Shah, A., Ulloa, E., Yum, S., Mondok, L., Blaufuss, M., Rosenfeld, A., Vargas, W., Zucker, J., Yeshokumar, A., Navis, A., Chao, K., Hagen, K., Melicosta, M., Porter, C., Tunney, M., Scheuermann, R., Duggal, P., Pekosz, A., Bayliss, A., Moore, M., Belzberg, A., Bembea, M., O'Brien, C., Riggs, R., Nance, J., Milstone, A., Rice, J., Garcia-Dominguez, M.A., Flanagan, E., Tillema, J.-M., Bosques, G., Bhatia, S., Gordon-Lipkin, E., Deike, D., Revivo, G., Zlotolow, D., deFiebre, G., Lazerow, P., Lotze, T., Bitnun, A., Davidge, K., Vajsar, J., Moore, A., Konersman, C., Nash, K., Strober, J., Gupta, N., Chiu, C., Sweeney, M., Jackson, W., Simon, D., Thakkar, K., Cheng, J., Luce, J., Das, S., Vogt, M., Vu, N., Gofshteyn, J., Makhani, N., Patel, P., 2021. Acute flaccid myelitis: cause, diagnosis, and management. *The Lancet* 397, 334–346. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32723-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32723-9)
- Murphy, O.C., Pardo, C.A., 2020. Acute Flaccid Myelitis: A Clinical Review. *Semin. Neurol.* 40, 211–218. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1705123>
- Nath, R.K., Somasundaram, C., 2019. Functional Improvement of Upper and Lower Extremity After Decompression and Neurolysis and Nerve Transfer in a Pediatric Patient with Acute Flaccid Myelitis. *Am. J. Case Rep.* 20, 668–673. <https://doi.org/10.12659/AJCR.915235>
- Nathaniel, S., Ahmed, S., Wilson, J., Gutierrez, C., Chadee, D.D., Olowokure, B., de Salazar, P.M., 2017. First reported enterovirus D68 infection in pediatric patients from the Caribbean region: evidence of spread from the U.S. outbreak. *Rev. Panam. Salud Pública* 41. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2017.11>
- Ng, K.T., Oong, X.Y., Pang, Y.K., Hanafi, N.S., Kamarulzaman, A., Tee, K.K., 2015. Outbreaks of enterovirus D68 in Malaysia: genetic relatedness to the recent US outbreak strains. *Emerg. Microbes Infect.* 4, 1–3. <https://doi.org/10.1038/emi.2015.47>
- Ng, T.F.F., Montmayeur, A., Castro, C., Cone, M., Stringer, J., Lamson, D.M., Rogers, S.L., Wang Chern, S.-W., Magaña, L., Marine, R., Rubino, H., Serinaldi, D., George, K.St., Nix, W.A., 2016. Detection and Genomic Characterization of Enterovirus D68 in Respiratory Samples Isolated in the United States in 2016. *Genome Announc.* 4. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01350-16>

- Ngangas, S.T., Lukashov, A., Jugie, G., Ivanova, O., Mansuy, J.-M., Mengelle, C., Izopet, J., L'honneur, A.-S., Rozenberg, F., Leyssene, D., Hecquet, D., Marque-Juillet, S., Boutolleau, D., Burrel, S., Peigue-Lafeuille, H., Archimbaud, C., Benschop, K., Henquell, C., Mirand, A., Bailly, J.-L., 2019. Multirecombinant Enterovirus A71 Subgenogroup C1 Isolates Associated with Neurologic Disease, France, 2016-2017. *Emerg. Infect. Dis.* 25, 1204–1208. <https://doi.org/10.3201/eid2506.181460>
- Nguyen, A.T., Tran, T.T., Hoang, V.M.T., Nghiem, N.M., Le, Nhu Nguyen Truc, Le, T.T.M., Phan, Q.T., Truong, K.H., Le, Nhan Nguyen Thanh, Ho, V.L., Do, V.C., Ha, T.M., Nguyen, H.T., Nguyen, C.V.V., Thwaites, G., van Doorn, H.R., Le, T.V., 2016. Development and evaluation of a non-ribosomal random PCR and next-generation sequencing based assay for detection and sequencing of hand, foot and mouth disease pathogens. *Viol. J.* 13, 125. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0580-9>
- Nokhbeh, M.R., Hazra, S., Alexander, D.A., Khan, A., McAllister, M., Suuronen, E.J., Griffith, M., Dimock, K., 2005. Enterovirus 70 Binds to Different Glycoconjugates Containing α 2,3-Linked Sialic Acid on Different Cell Lines. *J. Virol.* 79, 7087–7094. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.11.7087-7094.2005>
- Ny, N.T.H., Anh, N.T., Hang, V.T.T., Nguyet, L.A., Thanh, T.T., Ha, D.Q., Minh, N.N.Q., Ha, D.L.A., McBride, A., Tuan, H.M., Baker, S., Tam, P.T.T., Phuc, T.M., Huong, D.T., Loi, T.Q., Vu, N.T.A., Hung, N.V., Minh, T.T.T., Xang, N.V., Dong, N., Nghia, H.D.T., Chau, N.V.V., Thwaites, G., van Doorn, H.R., Anscombe, C., Le Van, T., 2018. Enterovirus D68 in Viet Nam (2009-2015). *Wellcome Open Res.* 2. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.11558.2>
- Oberste, M.S., Maher, K., Schnurr, D., Flemister, M.R., Lovchik, J.C., Peters, H., Sessions, W., Kirk, C., Chatterjee, N., Fuller, S., Hanauer, J.M., Pallansch, M.A., 2004. Enterovirus 68 is associated with respiratory illness and shares biological features with both the enteroviruses and the rhinoviruses. *J. Gen. Virol.* 85, 2577–2584. <https://doi.org/10.1099/vir.0.79925-0>
- O'Donoghue, A.J., Eroy-Reveles, A.A., Knudsen, G.M., Ingram, J., Zhou, M., Statnekov, J.B., Greninger, A.L., Hostetter, D.R., Qu, G., Maltby, D.A., Anderson, M.O., Derisi, J.L., McKerrow, J.H., Burlingame, A.L., Craik, C.S., 2012. Global identification of peptidase specificity by multiplex substrate profiling. *Nat. Methods* 9, 1095–1100. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2182>
- Okamoto, M., Sakamoto, M., Dapat, C., Saito, M., Saito-Obata, M., Tamaki, R., Lupisan, S.P., Quiambao, B.P., Oshitani, H., 2021. Complete Genome Sequences of Enterovirus D68 Clade A and D Strains in the Philippines. *Microbiol. Resour. Announc.* 10, e00709-21. <https://doi.org/10.1128/MRA.00709-21>
- Okumura, A., Numoto, S., Iwayama, H., Kurahashi, H., Natsume, J., Saitoh, S., Yoshikawa, T., Fukao, T., Hirayama, M., Takahashi, Y., 2020. Respiratory illness and acute flaccid myelitis in the Tokai district in 2018. *Pediatr. Int.* 62, 337–340. <https://doi.org/10.1111/ped.14128>
- Opanda, S.M., Wamunyokoli, F., Khamadi, S., Coldren, R., Bulimo, W.D., 2016. Genotyping of enteroviruses isolated in Kenya from pediatric patients using partial VP1 region. *SpringerPlus* 5. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-1834-0>
- Pabbaraju, K., Wong, S., Drews, S.J., Tipples, G., Tellier, R., 2016. Full genome analysis of enterovirus D-68 strains circulating in Alberta, Canada. *J. Med. Virol.* 88, 1194–1203. <https://doi.org/10.1002/jmv.24444>
- Pakala, S.B., Tan, Y., Hassan, F., Mai, A., Markowitz, R.H., Shilts, M.H., Rajagopala, S.V., Selvarangan, R., Das, S.R., 2019. Nearly Complete Genome Sequences of 17 Enterovirus D68 Strains from Kansas City, Missouri, 2018. *Microbiol. Resour. Announc.* 8. <https://doi.org/10.1128/MRA.00388-19>
- Park, S.W., Farrar, J., Messacar, K., Meyers, L., Pons-Salort, M., Grenfell, B.T., 2021. Epidemiological dynamics of enterovirus D68 in the US: implications for acute flaccid myelitis. *medRxiv.* <https://doi.org/10.1101/2020.07.23.20069468>
- Pascal, S.M., Garimella, R., Warden, M.S., Ponniah, K., 2020. Structural Biology of the Enterovirus Replication-Linked 5'-Cloverleaf RNA and Associated Virus Proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* <https://doi.org/10.1128/MMBR.00062-19>
- Pastula, D.M., Aliabadi, N., Haynes, A.K., Messacar, K., Schreiner, T., Maloney, J., Dominguez, S.R., Davizon, E.S., Leshem, E., Fischer, M., Nix, W.A., Oberste, M.S., Seward, J., Feikin, D., Miller, L., Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2014. Acute neurologic illness of unknown etiology in children - Colorado, August-September 2014. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 63, 901–902.
- Paul, A.V., Wimmer, E., 2015. Initiation of protein-primed picornavirus RNA synthesis. *Virus Res.* 206, 12–26. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.12.028>
- Pellegrinelli, L., Giardina, F., Lunghi, G., Renteria, S.C.U., Greco, L., Fratini, A., Galli, C., Piralla, A., Binda, S., Pariani, E., Baldanti, F., 2019a. Emergence of divergent enterovirus (EV) D68 sub-clade D1 strains, northern Italy, September to October 2018. *Eurosurveillance* 24, 1900090. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.24.7.1900090>

- Pellegrinelli, L., Uceda Renteria, S.C., Galli, C., Greco, L., Primache, V., Lunghi, G., Binda, S., Pariani, E., 2019b. Epidemiologic and Molecular Study of EVs in Hospitalized Children With Severe Acute Respiratory Infection. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 38, 1141–1146. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000002444>
- Petitjean-Lecherbonnier, J., Dina, J., Nguyen, E., Gouarin, S., Lebigot, E., Vabret, A., 2011. Diagnostic moléculaire des infections respiratoires à entérovirus : apport de la PCR et du génotypage pour une meilleure approche de la circulation des souches en Basse-Normandie au cours de l'année 2008. *Pathol. Biol. (Paris)* 59, 113–121. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2010.07.010>
- Pfeiffer, H.C., Bragstad, K., Skram, M.K., Dahl, H., Knudsen, P.K., Chawla, M.S., Holberg-Petersen, M., Vainio, K., Dudman, S.G., Kran, A.M., Rojahn, A.E., 2015. Two cases of acute severe flaccid myelitis associated with enterovirus D68 infection in children, Norway, autumn 2014. *Eurosurveillance* 20, 21062. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2015.20.10.21062>
- Pfeiffer, J.K., Kirkegaard, K., 2006. Bottleneck-mediated quasispecies restriction during spread of an RNA virus from inoculation site to brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 5520–5525. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600834103>
- Phan, M.V.T., Agoti, C.N., Munywoki, P.K., Otieno, G.P., Ngama, M., Kellam, P., Cotten, M., Nokes, D.J., 2022. Identification of missed viruses by metagenomic sequencing of clinical respiratory samples from Kenya. *Sci. Rep.* 12, 202. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03987-1>
- Piralla, A., Girello, A., Grignani, M., Gozalo-Margüello, M., Marchi, A., Marseglia, G., Baldanti, F., 2014. Phylogenetic characterization of enterovirus 68 strains in patients with respiratory syndromes in Italy. *J. Med. Virol.* 86, 1590–1593. <https://doi.org/10.1002/jmv.23821>
- Piralla, A., Principi, N., Ruggiero, L., Girello, A., Giardina, F., De Sando, E., Caimmi, S., Bianchini, S., Marseglia, G.L., Lunghi, G., Baldanti, F., Esposito, S., 2018. Enterovirus-D68 (EV-D68) in pediatric patients with respiratory infection: The circulation of a new B3 clade in Italy. *J. Clin. Virol.* 99, 91–96. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2018.01.005>
- Poelman, R., Schuffenecker, I., Van Leer-Buter, C., Josset, L., Niesters, H.G.M., Lina, B., 2015. European surveillance for enterovirus D68 during the emerging North-American outbreak in 2014. *J. Clin. Virol.* 71, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2015.07.296>
- Pons-Salort, M., Grassly, N.C., 2018. Trends in serotype-specific immunity explain the incidence patterns of diseases caused by human enteroviruses. *Science* 361, 800–803. <https://doi.org/10.1126/science.aat6777>
- Pons-Salort, M., Oberste, M.S., Pallansch, M.A., Abedi, G.R., Takahashi, S., Grenfell, B.T., Grassly, N.C., 2018. The seasonality of nonpolio enteroviruses in the United States: Patterns and drivers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, 3078–3083. <https://doi.org/10.1073/pnas.1721159115>
- Raboni, S.M., Giamberardino, H.I., Debur, M.C., Santos, J.S., 2020. Enterovirus D68-associated respiratory infection in southern Brazil, 2018 – A population-based laboratory surveillance. *J. Clin. Virol.* 129, 104503. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104503>
- Rahamat-Langendoen, J., Riezebos-Brilman, A., Borger, R., van der Heide, R., Brandenburg, A., Schölvink, E., Niesters, H.G.M., 2011. Upsurge of human enterovirus 68 infections in patients with severe respiratory tract infections. *J. Clin. Virol.* 52, 103–106. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2011.06.019>
- Reiche, J., Böttcher, S., Diedrich, S., Buchholz, U., Buda, S., Haas, W., Schweiger, B., Wolff, T., 2015. Low-level Circulation of Enterovirus D68–Associated Acute Respiratory Infections, Germany, 2014. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 837–841. <https://doi.org/10.3201/eid2105.141900>
- Renois, F., Bouin, A., Andreoletti, L., 2013. Enterovirus 68 in pediatric patients hospitalized for acute airway diseases. *J. Clin. Microbiol.* 51, 640–643. <https://doi.org/10.1128/JCM.02640-12>
- Roberts, J.A., Hobday, L.K., Ibrahim, A., Thorley, B.R., 2020a. Australian National Enterovirus Reference Laboratory annual report, 2016. *Commun. Dis. Intell.* 2018 44. <https://doi.org/10.33321/cdi.2020.44.25>
- Roberts, J.A., Hobday, L.K., Ibrahim, A., Thorley, B.R., 2020b. Australian National Enterovirus Reference Laboratory annual report, 2018. *Commun. Dis. Intell.* 2018 44. <https://doi.org/10.33321/cdi.2020.44.26>
- Rodríguez-Morales, A.J., Failoc-Rojas, V.E., Díaz-Vélez, C., 2019. Gastrointestinal, respiratory and/or arboviral infections? What is the cause of the Guillain-Barré syndrome epidemics in Perú? Current status – 2019. *Travel Med. Infect. Dis.* 30, 114–116. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2019.06.015>
- Rosenfeld, A.B., Warren, A.L., Racaniello, V.R., 2019. Neurotropism of Enterovirus D68 Isolates Is Independent of Sialic Acid and Is Not a Recently Acquired Phenotype. *mBio* 10, e02370-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.02370-19>
- Roux, A., Lulu, S., Waubant, E., Glaser, C., Haren, K.V., 2014. A Polio-Like Syndrome in California: Clinical, Radiologic, and Serologic Evaluation of Five Children Identified by a Statewide Laboratory over a Twelve-Months Period. *Neurology* 82.

- Royston, L., Essaidi-Laziosi, M., Pérez-Rodríguez, F.J., Piuze, I., Geiser, J., Krause, K.-H., Huang, S., Constant, S., Kaiser, L., Garcin, D., Tapparel, C., 2018. Viral chimeras decrypt the role of enterovirus capsid proteins in viral tropism, acid sensitivity and optimal growth temperature. *PLoS Pathog.* 14. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006962>
- Ruggieri, V., Paz, M.I., Peretti, M.G., Rugilo, C., Bologna, R., Freire, C., Vergel, S., Savransky, A., 2017. Enterovirus D68 infection in a cluster of children with acute flaccid myelitis, Buenos Aires, Argentina, 2016. *Eur. J. Paediatr. Neurol. EJPJN Off. J. Eur. Paediatr. Neurol. Soc.* 21, 884–890. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2017.07.008>
- Rui, Y., Su, J., Wang, H., Chang, J., Wang, S., Zheng, W., Cai, Y., Wei, W., Gordy, J.T., Markham, R., Kong, W., Zhang, W., Yu, X.-F., 2017. Disruption of MDA5-Mediated Innate Immune Responses by the 3C Proteins of Coxsackievirus A16, Coxsackievirus A6, and Enterovirus D68. *J. Virol.* 91. <https://doi.org/10.1128/JVI.00546-17>
- Sanjay, R.E., Sabeena, S., Robin, S., Shaji, J.T., Jayakrishnan, M.P., Suresh, E.K.K., Michael, C.J., Aswathyraj, S., Josmi, J., Shahin, S., Anup, J., Arunkumar, G., 2021. Genetic analysis of Enterovirus D68 associated with pneumonia in children from South India. *J. Med. Microbiol.* 70. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001356>
- Schieble, J.H., Fox, V.L., Lennette, E.H., 1967. A probable new human picornavirus associated with respiratory diseases. *Am. J. Epidemiol.* 85, 297–310. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a120693>
- Schmier, S., Mostafa, A., Haarmann, T., Bannert, N., Ziebuhr, J., Veljkovic, V., Dietrich, U., Pleschka, S., 2015. In Silico Prediction and Experimental Confirmation of HA Residues Conferring Enhanced Human Receptor Specificity of H5N1 Influenza A Viruses. *Sci. Rep.* 5. <https://doi.org/10.1038/srep11434>
- Schubert, R.D., Hawes, I.A., Ramachandran, P.S., Ramesh, A., Crawford, E.D., Pak, J.E., Wu, W., Cheung, C.K., O'Donovan, B.D., Tato, C.M., Lyden, A., Tan, M., Sit, R., Sowa, G.M., Sample, H.A., Zorn, K.C., Banerji, D., Khan, L.M., Bove, R., Hauser, S.L., Gelfand, A.A., Johnson-Kerner, B.L., Nash, K., Krishnamoorthy, K.S., Chitnis, T., Ding, J.Z., McMillan, H.J., Chiu, C.Y., Briggs, B., Glaser, C.A., Yen, C., Chu, V., Wadford, D.A., Dominguez, S.R., Ng, T.F.F., Marine, R.L., Lopez, A.S., Nix, W.A., Soldatos, A., Gorman, M.P., Benson, L., Messacar, K., Konopka-Anstadt, J.L., Oberste, M.S., DeRisi, J.L., Wilson, M.R., 2019. Pan-viral serology implicates enteroviruses in acute flaccid myelitis. *Nat. Med.* 25, 1748–1752. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0613-1>
- Schuffenecker, I., Mirand, A., Josset, L., Henquell, C., Hecquet, D., Pilorgé, L., Petitjean-Lecherbonnier, J., Manoha, C., Legoff, J., Deback, C., Pillet, S., Lepiller, Q., Mansuy, J.M., Marque-Juillet, S., Antona, D., Peigue-Lafeuille, H., Lina, B., 2016. Epidemiological and clinical characteristics of patients infected with enterovirus D68, France, July to December 2014. *Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull.* 21. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.19.30226>
- Sejvar, J.J., Lopez, A.S., Cortese, M.M., Leshem, E., Pastula, D.M., Miller, L., Glaser, C., Kambhampati, A., Shioda, K., Aliabadi, N., Fischer, M., Gregoricus, N., Lanciotti, R., Nix, W.A., Sakthivel, S.K., Schmid, D.S., Seward, J.F., Tong, S., Oberste, M.S., Pallansch, M., Feikin, D., 2016. Acute Flaccid Myelitis in the United States, August–December 2014: Results of Nationwide Surveillance. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 63, 737–745. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw372>
- Semler, B.L., 2004. Poliovirus proves IRES-istible in vivo. *J. Clin. Invest.* 113, 1678–1681. <https://doi.org/10.1172/JCI22139>
- Setianingsih, T.Y., Wiyatno, A., Hartono, T.S., Hindawati, E., Rosamarlina, Dewantari, A.K., Myint, K.S., Lisdawati, V., Safari, D., 2019. Detection of multiple viral sequences in the respiratory tract samples of suspected Middle East respiratory syndrome coronavirus patients in Jakarta, Indonesia 2015–2016. *Int. J. Infect. Dis.* 86, 102–107. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.06.022>
- Shaath, H., Alajez, N.M., 2020. Computational and Transcriptome Analyses Revealed Preferential Induction of Chemotaxis and Lipid Synthesis by SARS-CoV-2. *Biology* 9, 260. <https://doi.org/10.3390/biology9090260>
- Shah, M.M., Perez, A., Lively, J.Y., Avadhanula, V., Boom, J.A., Chappell, J., Englund, J.A., Fregoe, W., Halasa, N.B., Harrison, C.J., Hickey, R.W., Klein, E.J., McNeal, M.M., Michaels, M.G., Moffatt, M.E., Otten, C., Sahni, L.C., Schlaudecker, E., Schuster, J.E., Selvarangan, R., Staat, M.A., Stewart, L.S., Weinberg, G.A., Williams, J.V., Ng, T.F.F., Routh, J.A., Gerber, S.I., McMorrow, M.L., Rha, B., Midgley, C.M., 2021. Enterovirus D68-Associated Acute Respiratory Illness – New Vaccine Surveillance Network, United States, July–November 2018–2020. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 70, 1623–1628. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm7047a1>
- Shen, L., Gong, C., Xiang, Z., Zhang, T., Li, M., Li, A., Luo, M., Huang, F., 2019. Upsurge of Enterovirus D68 and Circulation of the New Subclade D3 and Subclade B3 in Beijing, China, 2016. *Sci. Rep.* 9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42651-7>

- Smura, T., Ylipaasto, P., Klemola, P., Kaijalainen, S., Kyllönen, L., Sordi, V., Piemonti, L., Roivainen, M., 2010. Cellular tropism of human enterovirus D species serotypes EV-94, EV-70, and EV-68 in vitro: implications for pathogenesis. *J. Med. Virol.* 82, 1940–1949. <https://doi.org/10.1002/jmv.21894>
- Smura, T.P., Junttila, N., Blomqvist, S., Norder, H., Kaijalainen, S., Paananen, A., Magnius, L.O., Hovi, T., Roivainen, M., 2007. Enterovirus 94, a proposed new serotype in human enterovirus species D. *J. Gen. Virol.* 88, 849–858. <https://doi.org/10.1099/vir.0.82510-0>
- Srinivasan, M., Niesen, A., Storch, G.A., 2018. Enterovirus D68 Surveillance, St. Louis, Missouri, USA, 2016. *Emerg. Infect. Dis.* 24, 2115–2117. <https://doi.org/10.3201/eid2411.180397>
- Stacpoole, S.R.L., Molyneux, A., Bäumer, D., 2017. Acute segmental poliomyelitis-like flaccid paralysis in an adult in the UK, associated with enterovirus D68. *Pract. Neurol.* 17, 297–301. <https://doi.org/10.1136/practneurol-2017-001609>
- Staring, J., von Castelmur, E., Blomen, V.A., van den Hengel, L.G., Brockmann, M., Baggen, J., Thibaut, H.J., Nieuwenhuis, J., Janssen, H., van Kuppeveld, F.J.M., Perrakis, A., Carette, J.E., Brummelkamp, T.R., 2017. PLA2G16 represents a switch between entry and clearance of Picornaviridae. *Nature* 541, 412–416. <https://doi.org/10.1038/nature21032>
- Strating, J.R., van Kuppeveld, F.J., 2017. Viral rewiring of cellular lipid metabolism to create membranous replication compartments. *Curr. Opin. Cell Biol.* 47, 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2017.02.005>
- Sun, J., Hu, X.-Y., Yu, X.-F., 2019. Current Understanding of Human Enterovirus D68. *Viruses* 11. <https://doi.org/10.3390/v11060490>
- Sun, S., Bian, L., Gao, F., Du, R., Hu, Y., Fu, Y., Su, Y., Wu, X., Mao, Q., Liang, Z., 2019. A neonatal mouse model of Enterovirus D68 infection induces both interstitial pneumonia and acute flaccid myelitis. *Antiviral Res.* 161, 108–115. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.11.013>
- Sweeney, T.R., Abaeva, I.S., Pestova, T.V., Hellen, C.U.T., 2014. The mechanism of translation initiation on Type 1 picornavirus IRESs. *EMBO J.* 33, 76–92. <https://doi.org/10.1002/embj.201386124>
- Tan, J., George, S., Kusov, Y., Perbandt, M., Anemüller, S., Mesters, J.R., Norder, H., Coutard, B., Lacroix, C., Leyssen, P., Neyts, J., Hilgenfeld, R., 2013. 3C Protease of Enterovirus 68: Structure-Based Design of Michael Acceptor Inhibitors and Their Broad-Spectrum Antiviral Effects against Picornaviruses. *J. Virol.* 87, 4339–4351. <https://doi.org/10.1128/JVI.01123-12>
- Tan, Y., Hassan, F., Schuster, J.E., Simenauer, A., Selvarangan, R., Halpin, R.A., Lin, X., Fedorova, N., Stockwell, T.B., Lam, T.T.-Y., Chappell, J.D., Hartert, T.V., Holmes, E.C., Das, S.R., 2016. Molecular Evolution and Intraclade Recombination of Enterovirus D68 during the 2014 Outbreak in the United States. *J. Virol.* 90, 1997–2007. <https://doi.org/10.1128/JVI.02418-15>
- Tang, S.-H., Yuan, Y., Xie, Z.-H., Chen, M.-J., Fan, X.-D., Guo, Y.-H., Hong, M.-H., Tao, S.-H., Yu, N., 2021. Enterovirus D68 in hospitalized children with respiratory symptoms in Guangdong from 2014 to 2018: Molecular epidemiology and clinical characteristics. *J. Clin. Virol.* 141, 104880. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2021.104880>
- Tedcastle, A., Wilton, T., Pegg, E., Klapsa, D., Bujaki, E., Mate, R., Fritzsche, M., Majumdar, M., Martin, J., 2022. Detection of Enterovirus D68 in Wastewater Samples from the UK between July and November 2021. *Viruses* 14, 143. <https://doi.org/10.3390/v14010143>
- Thézé, J., Li, T., du Plessis, L., Bouquet, J., Kraemer, M.U.G., Somasekar, S., Yu, G., de Cesare, M., Balmaseda, A., Kuan, G., Harris, E., Wu, C.-H., Ansari, M.A., Bowden, R., Faria, N.R., Yagi, S., Messenger, S., Brooks, T., Stone, M., Bloch, E.M., Busch, M., Muñoz-Medina, J.E., González-Bonilla, C.R., Wolinsky, S., López, S., Arias, C.F., Bonsall, D., Chiu, C.Y., Pybus, O.G., 2018. Genomic Epidemiology Reconstructs the Introduction and Spread of Zika Virus in Central America and Mexico. *Cell Host Microbe* 23, 855–864.e7. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.04.017>
- Thongpan, I., Wanlapakorn, N., Vongpunsawad, S., Linsuwanon, P., Theamboonlers, A., Payungporn, S., Poovorawan, Y., 2016. Prevalence and Phylogenetic Characterization of Enterovirus D68 in Pediatric Patients with Acute Respiratory Tract Infection in Thailand. *Jpn. J. Infect. Dis.* 69, 426–430. <https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2015.352>
- Todd, A.K., Hall, R.J., Wang, J., Peacey, M., McTavish, S., Rand, C.J., Stanton, J.-A., Taylor, S., Huang, Q.S., 2013. Detection and whole genome sequence analysis of an enterovirus 68 cluster. *Virol. J.* 10, 103. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-103>
- Tokarz, R., Firth, C., Madhi, S.A., Howie, S.R.C., Wu, W., Sall, A.A., Haq, S., Briese, T., Lipkin, W.I., 2012. Worldwide emergence of multiple clades of enterovirus 68. *J. Gen. Virol.* 93, 1952–1958. <https://doi.org/10.1099/vir.0.043935-0>

- Tokarz, R., Kapoor, V., Wu, W., Lurio, J., Jain, K., Mostashari, F., Briese, T., Ian Lipkin, W., 2011. Longitudinal molecular microbial analysis of influenza-like illness in New York City, may 2009 through may 2010. *Viol. J.* 8, 288. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-288>
- Torres, J.P., Farfan, M.J., Izquierdo, G., Piemonte, P., Henriquez, J., O’Ryan, M.L., 2015. Enterovirus D68 Infection, Chile, Spring 2014. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 728–729. <https://doi.org/10.3201/eid2104.141766>
- Uprety, P., Curtis, D., Elkan, M., Fink, J., Rajagopalan, R., Zhao, C., Bittinger, K., Mitchell, S., Ulloa, E.R., Hopkins, S., Graf, E.H., 2019. Association of Enterovirus D68 with Acute Flaccid Myelitis, Philadelphia, Pennsylvania, USA, 2009–2018. *Emerg. Infect. Dis.* 25, 1676–1682. <https://doi.org/10.3201/eid2509.190468>
- van der Sanden, S., van der Avoort, H., Lemey, P., Uslu, G., Koopmans, M., 2010. Evolutionary trajectory of the VP1 gene of human enterovirus 71 genogroup B and C viruses. *J. Gen. Virol.* 91, 1949–1958. <https://doi.org/10.1099/vir.0.019695-0>
- van der Sanden, S.M.G., Sachs, N., Koekkoek, S.M., Koen, G., Pajkrt, D., Clevers, H., Wolthers, K.C., 2018. Enterovirus 71 infection of human airway organoids reveals VP1-145 as a viral infectivity determinant. *Emerg. Microbes Infect.* 7, 84. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0077-2>
- Van Haren, K., Ayscue, P., Waubant, E., Clayton, A., Sheriff, H., Yagi, S., Glenn-Finer, R., Padilla, T., Strober, J.B., Aldrovandi, G., Wadford, D.A., Chiu, C.Y., Xia, D., Harriman, K., Watt, J.P., Glaser, C.A., 2015. Acute Flaccid Myelitis of Unknown Etiology in California, 2012–2015. *JAMA* 314, 2663. <https://doi.org/10.1001/jama.2015.17275>
- Varghese, R., Iyer, A., Hunter, K., Cargill, J.S., Cooke, R.P.D., 2015. Sampling the upper respiratory tract for enteroviral infection is important in the investigation of an acute neurological illness in children. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* 19, 494–495. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2015.03.009>
- Vazquez-Perez, J.A., Ramirez-Gonzalez, J.E., Moreno-Valencia, Y., Hernandez-Hernandez, V.A., Romero-Espinoza, J.A.I., Castillejos-Lopez, M., Hernandez, A., Perez-Padilla, R., Oropeza-Lopez, L.E., Escobar-Escamilla, N., Gonzalez-Villa, M., Alejandro-Garcia, A., Regalado-Pineda, J., Santillan-Doherty, P., Lopez-Martínez, I., Diaz-Quiñonez, A., Salas-Hernandez, J., 2016. EV-D68 infection in children with asthma exacerbation and pneumonia in Mexico City during 2014 autumn. *Influenza Other Respir. Viruses* 10, 154–160. <https://doi.org/10.1111/irv.12384>
- Visser, L.J., Langereis, M.A., Rabouw, H.H., Wahedi, M., Muntjewerff, E.M., de Groot, R.J., van Kuppeveld, F.J.M., 2019. Essential Role of Enterovirus 2A Protease in Counteracting Stress Granule Formation and the Induction of Type I Interferon. *J. Virol.* 93. <https://doi.org/10.1128/JVI.00222-19>
- Vogt, M.R., Crowe, J.E., 2018. Current Understanding of Humoral Immunity to Enterovirus D68. *J. Pediatr. Infect. Dis. Soc.* 7, S49–S53. <https://doi.org/10.1093/jpids/piy124>
- Vogt, M.R., Fu, J., Kose, N., Williamson, L.E., Bombardi, R., Setliff, I., Georgiev, I.S., Klose, T., Rossmann, M.G., Bochkov, Y.A., Gern, J.E., Kuhn, R.J., Crowe, J.E., 2020. Human antibodies neutralize enterovirus D68 and protect against infection and paralytic disease. *Sci. Immunol.* 5. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aba4902>
- Vogt, M.R., Wright, P.F., Hickey, W.F., Boyd, K.L., Crowe, J.E., 2021. #16: Enterovirus D68 Visualized in the Anterior Horn of the Spinal Cord of a Pediatric Patient with Flaccid Paralysis. *J. Pediatr. Infect. Dis. Soc.* 10, S8–S8. <https://doi.org/10.1093/jpids/piab031.015>
- Wang, C., Wang, Caiyan, Li, Q., Wang, Z., Xie, W., 2017. Crystal Structure and Thermostability Characterization of Enterovirus D68 3Dpol. *J. Virol.* 91. <https://doi.org/10.1128/JVI.00876-17>
- Wang, G., Zhuge, J., Huang, W., Nolan, S.M., Gilrane, V.L., Yin, C., Dimitrova, N., Fallon, J.T., 2017. Enterovirus D68 Subclade B3 Strain Circulating and Causing an Outbreak in the United States in 2016. *Sci. Rep.* 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01349-4>
- Wang, Huanyu, Diaz, A., Moyer, K., Mele-Casas, M., Ara-Montojo, M.F., Torrus, I., McCoy, K., Mejias, A., Leber, A.L., 2019. Molecular and Clinical Comparison of Enterovirus D68 Outbreaks among Hospitalized Children, Ohio, USA, 2014 and 2018. *Emerg. Infect. Dis.* 25, 2055–2063. <https://doi.org/10.3201/eid2511.190973>
- Wang, Haichao, Tao, K., Leung, C.Y., Hon, K.L., Yeung, C.M.A., Chen, Z., Chan, K.S.P., Leung, T.-F., Chan, W.Y.R., 2019. Molecular epidemiological study of enterovirus D68 in hospitalised children in Hong Kong in 2014–2015 and their complete coding sequences. *BMJ Open Respir. Res.* 6. <https://doi.org/10.1136/bmjresp-2019-000437>
- Wang, X., Zhang, P., Li, J., Chu, Y., Li, Z., Yang, Y., Li, F., Cui, S., Huo, D., Wang, Y., Wang, Q., 2020. Enterovirus D68 in a 6-year-old acute flaccid myelitis case in China, 2018: a case report. *BMC Infect. Dis.* 20. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-4829-y>

- Wang, Z., Malanoski, A.P., Lin, B., Long, N.C., Leski, T.A., Blaney, K.M., Hansen, C.J., Brown, J., Broderick, M., Stenger, D.A., Tibbetts, C., Russell, K.L., Metzgar, D., 2010. Broad Spectrum Respiratory Pathogen Analysis of Throat Swabs from Military Recruits Reveals Interference Between Rhinoviruses and Adenoviruses. *Microb. Ecol.* 59, 623–634. <https://doi.org/10.1007/s00248-010-9636-3>
- Wei, H.-Y., Yeh, T.-K., Hsieh, J.-Y., Lin, I.-P., Yang, J.-Y., 2018. Updates on the molecular epidemiology of Enterovirus D68 after installation of screening test among acute flaccid paralysis patients in Taiwan. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 51, 688–691. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2017.12.001>
- Wei, W., Guo, H., Chang, J., Yu, Y., Liu, G., Zhang, N., Willard, S.H., Zheng, S., Yu, X.-F., 2016. ICAM-5/Telencephalin Is a Functional Entry Receptor for Enterovirus D68. *Cell Host Microbe* 20, 631–641. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.09.013>
- Weil, M., Mandelboim, M., Mendelson, E., Manor, Y., Shulman, L., Ram, D., Barkai, G., Shemer, Y., Wolf, D., Kraoz, Z., Weiss, L., Pando, R., Hindiyeh, M., Sofer, D., 2017. Human enterovirus D68 in clinical and sewage samples in Israel. *J. Clin. Virol.* 86, 52–55. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2016.11.013>
- Williams, C.J., Thomas, R.H., Pickersgill, T.P., Lyons, M., Lowe, G., Stiff, R.E., Moore, C., Jones, R., Howe, R., Brunt, H., Ashman, A., Mason, B.W., 2016. Cluster of atypical adult Guillain-Barré syndrome temporally associated with neurological illness due to EV-D68 in children, South Wales, United Kingdom, October 2015 to January 2016. *Eurosurveillance* 21, 30119. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.4.30119>
- Wollants, E., Beller, L., Beuselink, K., Bloemen, M., Lagrou, K., Reynders, M., Van Ranst, M., 2019. A decade of enterovirus genetic diversity in Belgium. *J. Clin. Virol.* 121, 104205. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2019.104205>
- Wylie, K.M., Wylie, T.N., Orvedahl, A., Buller, R.S., Herter, B.N., Magrini, V., Wilson, R.K., Storch, G.A., 2015. Genome Sequence of Enterovirus D68 from St. Louis, Missouri, USA. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 184–186. <https://doi.org/10.3201/eid2101.141605>
- Wylie, K.M., Wylie, T.N., Storch, G.A., 2017. Genome Sequence of Enterovirus D68 from St. Louis, Missouri, USA, 2016. *Genome Announc.* 5. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01630-16>
- Xiang, Z., Gonzalez, R., Wang, Z., Ren, L., Xiao, Y., Li, J., Li, Y., Vernet, G., Paranhos-Baccalà, G., Jin, Q., Wang, J., 2012. Coxsackievirus A21, Enterovirus 68, and Acute Respiratory Tract Infection, China. *Emerg. Infect. Dis.* 18, 821–824. <https://doi.org/10.3201/eid1805.111376>
- Xiang, Z., Li, L., Lei, X., Zhou, H., Zhou, Z., He, B., Wang, J., 2014. Enterovirus 68 3C Protease Cleaves TRIF To Attenuate Antiviral Responses Mediated by Toll-Like Receptor 3. *J. Virol.* 88, 6650–6659. <https://doi.org/10.1128/JVI.03138-13>
- Xiang, Z., Li, L., Ren, L., Guo, L., Xie, Z., Liu, C., Li, T., Luo, M., Paranhos-Baccalà, G., Xu, W., Wang, J., 2017. Seroepidemiology of enterovirus D68 infection in China. *Emerg. Microbes Infect.* 6, e32. <https://doi.org/10.1038/emi.2017.14>
- Xiang, Z., Liu, L., Lei, X., Zhou, Z., He, B., Wang, J., 2016a. 3C Protease of Enterovirus D68 Inhibits Cellular Defense Mediated by Interferon Regulatory Factor 7. *J. Virol.* 90, 1613–1621. <https://doi.org/10.1128/JVI.02395-15>
- Xiang, Z., Xie, Z., Liu, L., Ren, L., Xiao, Y., Paranhos-Baccalà, G., Wang, J., 2016b. Genetic divergence of enterovirus D68 in China and the United States. *Sci. Rep.* 6. <https://doi.org/10.1038/srep27800>
- Xiao, Q., Ren, L., Zheng, S., Wang, L., Xie, X., Deng, Y., Zhao, Y., Zhao, X., Luo, Z., Fu, Z., Huang, A., Liu, E., 2015. Prevalence and molecular characterizations of enterovirus D68 among children with acute respiratory infection in China between 2012 and 2014. *Sci. Rep.* 5. <https://doi.org/10.1038/srep16639>
- Xiao, X., Lei, X., Zhang, Z., Ma, Y., Qi, J., Wu, C., Xiao, Y., Li, L., He, B., Wang, J., 2017. Enterovirus 3A Facilitates Viral Replication by Promoting Phosphatidylinositol 4-Kinase IIIβ–ACBD3 Interaction. *J. Virol.* 91, e00791-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.00791-17>
- Yea, C., Bitnun, A., Branson, H.M., Ciftci-Kavaklioglu, B., Rafay, M.F., Fortin, O., Moresoli, P., Sébire, G., Srouf, M., Decaluwe, H., Marois, L., Pelletier, F., Barton, M., Nouri, M.N., Brophy, J., Venkateswaran, S., Pohl, D., Selby, K., Jones, K., Robinson, J., Mineyko, A., Licht, C., Ertl-Wagner, B., Yeh, E.A., 2020. Association of outcomes in acute flaccid myelitis with identification of enterovirus at presentation: a Canadian, nationwide, longitudinal study. *Lancet Child Adolesc. Health* 4, 828–836. [https://doi.org/10.1016/S2352-4642\(20\)30176-0](https://doi.org/10.1016/S2352-4642(20)30176-0)
- Yea, C., Bitnun, A., Robinson, J., Mineyko, A., Barton, M., Mah, J.K., Vajsar, J., Richardson, S., Licht, C., Brophy, J., Crone, M., Desai, S., Hukin, J., Jones, K., Muir, K., Pernica, J.M., Pless, R., Pohl, D., Rafay, M.F., Selby, K., Venkateswaran, S., Bernard, G., Yeh, E.A., 2017. Longitudinal Outcomes in the 2014 Acute Flaccid Paralysis Cluster in Canada. *J. Child Neurol.* 32, 301–307. <https://doi.org/10.1177/0883073816680770>

- Yeh, M.-T., Wang, S.-W., Yu, C.-K., Lin, K.-H., Lei, H.-Y., Su, I.-J., Wang, J.-R., 2011. A Single Nucleotide in Stem Loop II of 5'-Untranslated Region Contributes to Virulence of Enterovirus 71 in Mice. *PLoS ONE* 6, e27082. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027082>
- Yip, C.C.Y., Lo, J.Y.C., Sridhar, S., Lung, D.C., Luk, S., Chan, K.-H., Chan, J.F.W., Cheng, V.C.C., Woo, P.C.Y., Yuen, K.-Y., Lau, S.K.P., 2017. First Report of a Fatal Case Associated with EV-D68 Infection in Hong Kong and Emergence of an Interclade Recombinant in China Revealed by Genome Analysis. *Int. J. Mol. Sci.* 18. <https://doi.org/10.3390/ijms18051065>
- Yu, P., Bao, L., Xu, L., Li, F., Lv, Q., Deng, W., Xu, Y., Qin, C., 2017. Neurotropism In Vitro and Mouse Models of Severe and Mild Infection with Clinical Strains of Enterovirus 71. *Viruses* 9, E351. <https://doi.org/10.3390/v9110351>
- Zeng, H., Goldsmith, C., Thawatsupha, P., Chittaganpitch, M., Waicharoen, S., Zaki, S., Tumpey, T.M., Katz, J.M., 2007. Highly Pathogenic Avian Influenza H5N1 Viruses Elicit an Attenuated Type I Interferon Response in Polarized Human Bronchial Epithelial Cells. *J. Virol.* 81, 12439–12449. <https://doi.org/10.1128/JVI.01134-07>
- Zhang, C., Zhang, X., Dai, W., Liu, Q., Xiong, P., Wang, S., Geng, L., Gong, S., Huang, Z., 2018. A Mouse Model of Enterovirus D68 Infection for Assessment of the Efficacy of Inactivated Vaccine. *Viruses* 10, 58. <https://doi.org/10.3390/v10020058>
- Zhang, T.G., Li, H.Q., Li, A.H., Chen, M., Gong, C., Luo, M., Dong, M., Huang, F., 2016. The Genomic Characterization of Enterovirus D68 from 2011 to 2015 in Beijing, China. *Biomed. Environ. Sci.* BES 29, 675–677. <https://doi.org/10.3967/bes2016.089>
- Zhang, T., Li, A., Chen, M., Wu, J., Huang, F., 2016. Respiratory infections associated with enterovirus D68 from 2011 to 2015 in Beijing, China. *J. Med. Virol.* 88, 1529–1534. <https://doi.org/10.1002/jmv.24505>
- Zhang, T., Ren, L., Luo, M., Li, A., Gong, C., Chen, M., Yu, X., Wu, J., Deng, Y., Huang, F., 2015. Enterovirus D68–Associated Severe Pneumonia, China, 2014. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 916–918. <https://doi.org/10.3201/eid2105.150036>
- Zhang, Y., Cao, J., Zhang, S., Lee, A.J., Sun, G., Larsen, C.N., Zhao, H., Gu, Z., He, S., Klem, E.B., Scheuermann, R.H., 2016. Genetic changes found in a distinct clade of Enterovirus D68 associated with paralysis during the 2014 outbreak. *Virus Evol.* 2. <https://doi.org/10.1093/ve/vew015>
- Zhang, Y., Moore, D.D., Nix, W.A., Oberste, M.S., Weldon, W.C., 2015. Neutralization of Enterovirus D68 isolated from the 2014 US outbreak by commercial intravenous immune globulin products. *J. Clin. Virol.* 69, 172–175. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2015.06.086>
- Zhang, Y., Wang, S.-Y., Guo, D.-Z., Pan, S.-Y., Lv, Y., 2021. Acute flaccid paralysis and neurogenic respiratory failure associated with enterovirus D68 infection in children: Report of two cases. *World J. Clin. Cases* 9, 3327–3333. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v9.i14.3327>
- Zhu, R., Xu, L., Zheng, Q., Cui, Y., Li, Shaowei, He, M., Yin, Z., Liu, D., Li, Shuxuan, Li, Z., Chen, Z., Yu, H., Que, Y., Liu, C., Kong, Z., Zhang, J., Baker, T.S., Yan, X., Hong Zhou, Z., Cheng, T., Xia, N., 2018. Discovery and structural characterization of a therapeutic antibody against coxsackievirus A10. *Sci. Adv.* 4, eaat7459. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aat7459>

Références Web

CDC (page sur la MFA) : www.cdc.gov/acute-flaccid-myelitis

CDC (page surveillance): <https://www.cdc.gov/surveillance/nvsn/index.html>

CNR des entérovirus et paréchovirus : <https://cnr.chu-clermontferrand.fr/CNR/Pages/Activit%C3%A9CNR.aspx>

Association pour les patients et familles touchés par la MFA : <https://www.afmanow.org/>

Picornavirus : <https://www.picornaviridae.com>

Nexstrain : <https://nextstrain.org>

Annexe

I. Préparation de la librairie de séquençage par la technique SMRT

La librairie SMRTbell a été préparée avec un kit de préparation de modèles d'ADN 1.0 en suivant la procédure standard pour le séquençage SMRT multiplex d'amplicon avec des adaptateurs PacBio. La concentration en ADN des produits PCR a été quantifiée via le kit Qubit dsDNA HS (Thermo Fisher Scientific) puis une étape de purification a été réalisée avec des billes PacBio 0,45X AMPure avant de normaliser les concentrations en ADN à 20 ng/μL. La qualité et la taille des fragments ont ensuite été contrôlées par électrophorèse via un analyseur (Agilent Technologies). Une série de réactions enzymatiques a été effectuée sur chaque produit PCR en vue d'éliminer l'excédent d'ADN simple brin, de réparer les extrémités et de circulariser les molécules d'ADN. Chaque amplicon maintenant identifié par un "code-barre" a été purifié puis mélangé de façon équimolaire. Les fragments d'une taille supérieure à 3 kb ont ensuite été sélectionnés. La qualité de la librairie SMRTbell a été inspectée via un analyseur de fragments (Agilent Technologies) et une quantification d'ADN a été réalisée. Le kit de liaison 3.0 et l'amorce V4 (Pacific Biosciences) ont été utilisés pour créer un complexe de polymérase SMRTbell prêt à séquencer. La librairie concentrée à 8 pM d'ADN, a été chargée sur une plaque avec le système Sequel I via la méthode de diffusion selon les instructions du fabricant. Les échantillons d'EV-D68 ont été traités dans une librairie regroupant au total 96 échantillons et ont été analysés avec un séquenceur PacBio Sequel dans une cellule SMRT. Le séquenceur a été programmé pour charger des cellules SMRT PacBio v2.0 (Pacific Biosciences) et séquencer les échantillons sur une durée d'approximativement 20 heures par cellule pour générer 25 Go de données et un insert N50 à 7,9kb.

Résumé

L'entérovirus D68 (EV-D68), isolé pour la première fois en 1962, a été ensuite peu détecté pendant plusieurs décennies. Depuis 2014, des épidémies sont rapportées tous les deux ans en Europe et aux USA. L'analyse moléculaire des souches qui circulent à l'échelle mondiale montre qu'elles se répartissent en quatre clades A à D ; le clade B a été à l'origine de la majorité des épidémies récentes. Ce virus est responsable d'infections respiratoires sévères rapportées chez l'enfant principalement, en particulier en cas de maladie respiratoire sous-jacente. Des complications neurologiques proches de celles associées aux poliovirus ou à l'EV-A71, sont rattachées à une entité neurologique propre à l'EV-D68, la myélite flasque aiguë, caractérisée par des séquelles fréquentes. L'objectif de la thèse était d'analyser les données épidémiologiques concernant les infections à EV-D68 recueillies sans sélection des patients, entre 2014 et 2018 au CHU de Clermont-Ferrand et de comparer les souches détectées chez les enfants et les adultes à celles qui circulent à l'échelle mondiale. Les souches identifiées chez les patients appartiennent aux sous-clades B3 et D1. Nous montrons que l'augmentation du nombre d'adultes infectés au cours de la période coïncide avec l'émergence du sous-clade D1. Pour franchir le cap de l'épidémiologie moléculaire basée sur l'étude des séquences VP1 et passer à l'épidémiologie génomique, nous avons développé une technique d'amplification du génome complet applicable aux échantillons cliniques. Elle a été combinée au séquençage NGS. L'analyse des variations moléculaires a été réalisée de façon exhaustive pour tous les sous-clades. Plusieurs substitutions nucléotidiques dans les régions non codantes et d'acides aminés dans les sites antigéniques ont été mises en évidence pour chacun des groupes phylogénétiques. Nous avons aussi analysé l'histoire évolutive du virus et exploré la diffusion géographique. Ces travaux ont permis d'intégrer dans la même étude des données d'épidémiologie clinique et d'épidémiologie génomique. Notre analyse comparative suggère que plusieurs mutations dans tout le génome sont nécessaires pour faire émerger un clade ou sous-clade épidémique pérenne. Des mutations dans les protéines non structurales combinées à des variations antigéniques peuvent conduire à un avantage sélectif plus décisif que chaque mutation isolée.

Mots-clés : Entérovirus D, infections respiratoires, enfants, adultes, épidémiologie clinique, épidémiologie génomique, séquençage NGS, émergence virale

Abstract

Enterovirus D68 (EV-D68), first isolated in 1962, was subsequently poorly detected for several decades. Since 2014, outbreaks have been reported every two years in Europe and the USA. Molecular analysis of the circulating strains shows that they fall into four clades A to D; clade B was involved in most of the recent outbreaks. This virus is associated with severe respiratory infections reported mainly in children and in patients with underlying respiratory disease. Neurological complications similar to those associated with polioviruses or EV-A71 are designated as a neurological entity specific to EV-D68, acute flaccid myelitis, characterised by frequent sequelae. The aim of the thesis was to analyse unbiased epidemiological data concerning EV-D68 infections between 2014 and 2018 at the Clermont-Ferrand University Hospital and to compare the strains detected in children and adults to those circulating worldwide. The strains identified in patients belong to subclades B3 and D1. We showed that the increase in the number of infected adults over the period coincides with the emergence of the D1 subclade. To move from molecular epidemiology based on VP1 sequences to genomic epidemiology, we developed a whole genome amplification technique applicable to clinical samples. This was combined with NGS sequencing. Comprehensive molecular variation analysis was performed for all subclades. Several nucleotide substitutions in non-coding regions and amino acid substitutions in antigenic sites were identified for each phylogenetic group. We also analysed the evolutionary history of the virus and explored the geographical spread. This work allowed the combined analysis of clinical and genomic epidemiological data. Our comparative analysis suggests that several mutations throughout the genome are required to give rise to a perennial epidemic clade or subclade. Mutations in non-structural proteins combined with antigenic variations may lead to a more decisive selective advantage than each isolated mutation.

Key words: enterovirus D, respiratory infections, children, adults, clinical epidemiology, genomic epidemiology, new generation sequencing, viral emergence