



HAL
open science

Etude des codétections virales dans les prélèvements respiratoires : apport de la quantification virale normalisée pour la compréhension des infections respiratoires virales multiples.

Hortense Petat

► To cite this version:

Hortense Petat. Etude des codétections virales dans les prélèvements respiratoires : apport de la quantification virale normalisée pour la compréhension des infections respiratoires virales multiples.. Biologie moléculaire. Normandie Université, 2023. Français. NNT : 2023NORMR023 . tel-04190569

HAL Id: tel-04190569

<https://theses.hal.science/tel-04190569v1>

Submitted on 29 Aug 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.



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité ASPECTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Etude des codétectations virales dans les prélèvements respiratoires : apport de la quantification virale normalisée pour la compréhension des infections respiratoires virales multiples.

Présentée et soutenue par
HORTENSE PETAT

Thèse soutenue le 04/07/2023
devant le jury composé de

MME DIANE DESCAMPS	PROFESSEUR DES UNIV - PRATICIEN HOSP., UNIVERSITE PARIS 7 PARIS DIDEROT	Rapporteur du jury
MME VERONIQUE HOUDOUIN	PROFESSEUR DES UNIV - PRATICIEN HOSP., UNIVERSITE PARIS 6 PIERRE ET MARIE CURIE	Rapporteur du jury
MME CLAIRE ANDREJAK	PROFESSEUR DES UNIV - PRATICIEN HOSP., UNIVERSITE AMIENS PICARDIE JULES VERNE	Membre du jury
M. BRUNO POZZETTO	PROFESSEUR DES UNIV - PRATICIEN HOSP., UNIVERSITE SAINT ETIENNE JEAN MONNET	Membre du jury
MME ASTRID VABRET	PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université de Caen Normandie	Membre du jury
M. CHRISTOPHE MARGUET	PROFESSEUR DES UNIV - PRATICIEN HOSP., Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse
M. MERIADEG LE GOUIL	CHARGE DE RECHERCHE, Université de Caen Normandie	Co-directeur de thèse

Thèse dirigée par CHRISTOPHE MARGUET (Dynamique Microbienne associée aux Infections Urinaires et Respiratoires) et MERIADEG LE GOUIL (Dynamique Microbienne associée aux Infections Urinaires et Respiratoires)

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier les membres du jury d'avoir accepté pour ma plus grande fierté de faire partie de mon jury de thèse. J'ai pour chacun d'entre eux un respect et une estime profonds.

Merci à mon chef, Monsieur le Professeur Marguet, qui m'a soutenue depuis que l'on se connaît, depuis le début de mon internat, où j'ai très vite exprimé mon désir de poursuivre une carrière hospitalo-universitaire. Ses conseils ont toujours été bienveillants, éclairés et m'ont permis de pouvoir, à chaque fois, atteindre mes objectifs. J'ai une profonde admiration pour vous Monsieur Marguet, pour ce que vous avez fait, ce que vous faites au quotidien et également pour la façon dont vous dirigez votre service, avec cette âme humaine, que l'on connaît dans notre spécialité qu'est la pédiatrie, mais qui est souvent oubliée à l'hôpital.

Un grand merci à Madame la Professeure Astrid Vabret, qui m'a accueillie à bras ouverts dans son équipe. Merci pour votre pédagogie, la transmission de votre passion, la façon avec laquelle vous transmettez tout votre savoir. Merci de m'avoir présenté Meriadeg, avec qui j'ai réalisé ma seconde partie de thèse en codirection.

Merci à Meriadeg d'avoir été présent pour la réalisation de mon doctorat, malgré les nombreuses sollicitations pandémiques et universitaires. Meriadeg est un professeur soucieux de transmettre à ses élèves. Il est animé de la passion de la virologie, et emmène chacun dans ses cheminements avec une grande facilité, malgré leur complexité. Merci à Bryce pour son aide statistique sur la fin de ma thèse.

Merci aux médecins généralistes des départements de médecine générale des universités de Rouen et de Caen : Matthieu Shuers, Lucile Pellerin, Andry Rabiaza, François Le Bas, Xavier Humbert.

Merci aux internes de médecine générale qui m'ont aidée à recueillir les données cliniques par téléphone (Bertille Deseille, Thomas Poupon, Louise Gosse, Pierre-Alexandre Lambert, Emmeline Vervisch), et qui m'ont conviée à la soutenance de leur thèse en tant que membre du jury.

Merci à Sandrine, qui m'a énormément appris, tant sur le plan de la recherche que sur le plan humain. J'ai pu apprendre à connaître un métier de la recherche que je ne connaissais pas. Sandrine est passionnée, passionnante, toujours disponible et bienveillante.

Merci aux personnes du laboratoire de virologie du CHU de Caen qui m'ont accueillie, et m'ont aidée lors de mes manipulations.

Je tiens à remercier personnellement tous les médecins généralistes qui ont inclus des patients pour l'étude ECOVIR. Je sais combien cela n'était pas évident de pratiquer le prélèvement naso-pharyngé avant l'ère de la pandémie.

Merci à l'équipe de Dynamicure, mon laboratoire de recherche.

Merci à Naomi Stones, ma professeure d'anglais, qui relit, avant leur soumission, mes articles.

Merci à ma famille et mes amis qui me soutiennent au quotidien dans mon désir d'avancer professionnellement. Merci à ma mère, qui en plus de cela, est également ma correctrice d'orthographe, mais aussi ma « rapatrieuse » de prélèvements durant mon congé maternité.

Merci à Quentin d'être toujours présent, bienveillant, soutenant dans tout ce que j'entreprends. Merci pour les sacrifices que tu as faits. Je ne les oublie pas.

Abréviations

ADV : adénovirus



ARN : acide ribonucléique
BoV : bocavirus
BPCO : broncho-pneumopathie chronique obstructive
CDHR-3 : cadherin-related family member 3
Ct : *Cycle threshold*
CoV : coronavirus
HRV: human rhino virus
IAV : influenza A virus
IFN : interféron
ICAM-1 : intracellular adhesion molecule 1
IgG : immunoglobulines G
IgM : immunoglobulines M
IL : interleukine
IRA: infections respiratoires aiguës
ISGs : *IFN-stimulated genes*
LDL : *low-density lipoprotein*
MGI : médecins généralistes investigateurs
MT : médecin traitant
nsp : *non structural proteins*
PCR : *Polymerase Chain Reaction*
POCT : *point-of-care test*
SRAS : syndrome respiratoire aigu sévère
VRS : virus respiratoire syncytial





Sommaire

Remerciements	1
Abréviations	2
Sommaire	5
Introduction générale	7
A. Rhinovirus (HRV)	10
1. Classification et structure	10
2. Cycle viral	11
3. Transmission	12
4. Pathogénicité	13
5. Épidémiologie	13
6. HRV et maladies chroniques respiratoires	14
B. Virus Respiratoire Syncytial (VRS)	15
1. Classification et structure	15
2. Cycle viral	17
3. Immunité	18
4. Pathogénicité	19
5. Variabilité génique et antigénique	20
6. Epidémiologie	20
7. Prévention et traitement	21
C. Coronavirus	23
1. Classification et structure	24
2. Organisation génomique	26
3. Cycle viral	26
4. Pathogénicité	27
5. Ecologie	29
D. Méthodes de détection des virus respiratoires	29
1. Culture virale	29
2. PCR Multiplex	30
3. Méthodes récentes	30
4. Positivité des prélèvements respiratoires	31
E. Études en soins primaires	31
F. Codétectations virales	32
1. Interactions virus/virus	33
2. Codétectations virales et données cliniques	36



G. Charges virales respiratoires	38
1. Définitions	38
2. Charges virales et données cliniques	38
Objectifs du travail	41
Protocoles, matériels et méthodes	43
A. Etude ECOVIR	43
1. Mise en place	43
2. Appel d'offre Innov'Eclair	43
3. Première saison	44
4. Deuxième saison	48
5. Bilan du nombre de patients inclus par les médecins généralistes investigateurs	49
B. Première publication : protocole de la cohorte ECOVIR	51
C. Deuxième publication : Méthodes et difficultés rencontrées à la mise en place d'une cohorte en Soins Primaires	63
D. Etude Guérande	72
E. Matériels et Méthodes	72
1. Conservation des extraits d'acides nucléiques	73
2. Transcription Inverse PCR (RT-PCR) sur les extraits d'acides nucléiques	73
3. Méthode de séquençage des rhinovirus	74
4. Construction des systèmes de RT-PCR en temps réel	78
RESULTATS	85
Chapitre 1 : Fréquence élevée des codétectations virales chez les enfants atteints de bronchiolite aiguë	85
Chapitre 2 : Interférences virales dans les infections respiratoires aiguës en soins primaires	93
Chapitre 3 : Quantification virale respiratoire et codétectations virales	119
CONCLUSION	153
ANNEXES	155
BIBLIOGRAPHIE	177



Introduction générale

Les premières épidémies hivernales liées aux maladies respiratoires infectieuses rapportées dans l'Histoire sont décrites par Hippocrate, et datent du 5^{ème} siècle avant Jésus Christ. Depuis, de nombreux virus respiratoires ont été identifiés comme responsables de ces épidémies (1). Les Infections Respiratoires Aiguës (IRA) représentent les infections les plus fréquentes en population générale (0 à 6 IRA par individu par saison épidémique) (2). Leur prévalence reste difficilement estimable (environ 25 millions de cas de rhinopharyngites par an, ainsi que 10 millions de cas de bronchites selon Santé Publique France). Aux États-Unis, le coût estimé du simple rhume est de 40 milliards de dollars par an (3), et de 87 milliards concernant la grippe (4). Chez les jeunes enfants, les ARI sont responsables de 20 à 40% des hospitalisations (5). Elles sont presque exclusivement traitées en ville: 97% des IRA basses sont prises en charge par les médecins généralistes selon la Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française. La morbidité et les coûts sociaux qu'elles induisent sont considérables : absentéisme, prescription inappropriée d'antibiotiques, recours aux hospitalisations pour les populations à risque. Elles sont source de transmission nosocomiale au sein des centres de soins ou de centres de vie communautaires tels que les crèches et les maisons de retraite. Récemment, la pandémie à SARS-CoV2 a touché plus de 761 millions de personnes à travers le monde, et entraîné de plus de 6,9 millions de décès au 1^{er} mars 2023, et rappelle que l'enjeu social et économique est quotidiennement soulevé par les IRA.

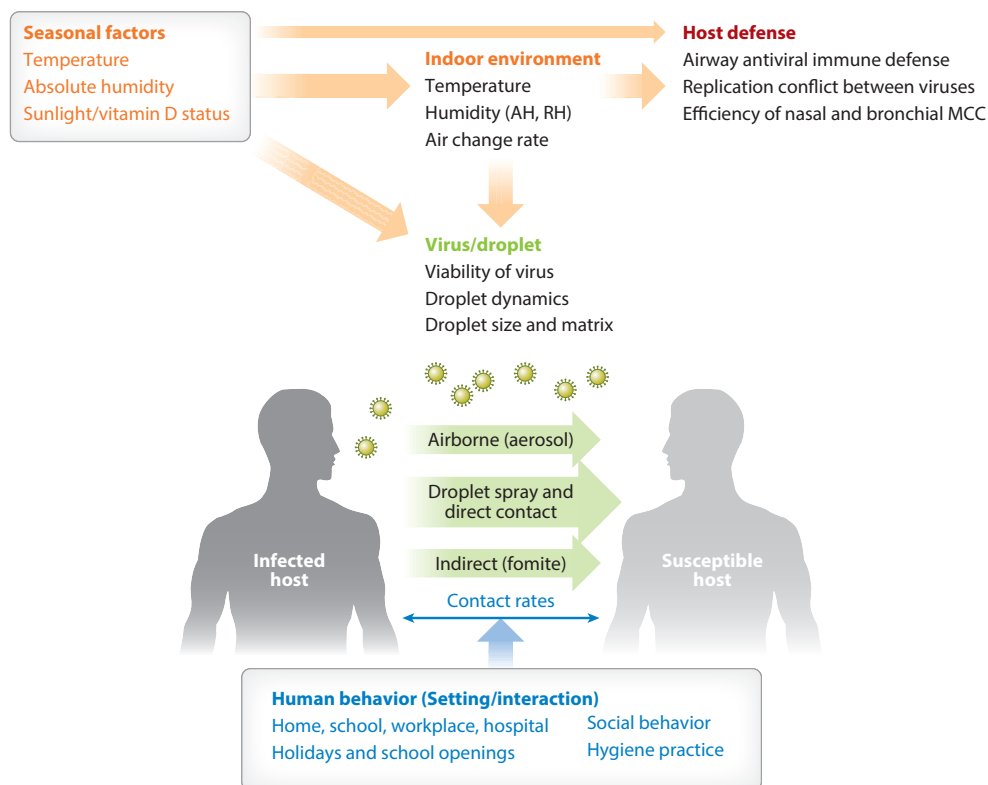
Comprendre et traiter les infections virales respiratoires représentent donc un enjeu majeur pour la santé de l'enfant avec pour objectif de préserver le capital respiratoire à l'âge adulte (6) (7). Elles sont responsables d'une importante morbidité respiratoire : bronchiolite aiguë, asthme du nourrisson, exacerbations des maladies respiratoires chroniques (asthme, bronchopneumopathies chroniques obstructives (BPCO)) (8) (9). Les virus responsables appartiennent à une quinzaine d'espèces différentes ayant un tropisme préférentiel pour l'arbre respiratoire. Cependant, la majorité des données sont hospitalières. Le diagnostic respiratoire virologique est effectué en effet exclusivement en milieu hospitalier du fait de son coût élevé et du mode de prélèvement par écouvillonnage naso-pharyngé. Une des conséquences est la connaissance limitée de ces virus en médecine ambulatoire.

Les IRA virales peuvent se transmettre par contact direct ou indirect, par pulvérisation de gouttelettes dans le cadre d'une transmission à courte distance, ou par aérosol dans la transmission à longue distance (transmission par voie aérienne) (Figure 1) (10). On distingue les IRA virales hautes peu sévères (« the common cold »), rassemblant un groupe hétérogène d'infections symptomatiques dues à des virus appartenant à différentes familles virales, et les IRA virales basses, plus sévères (bronchites, bronchiolites, bronchopneumopathies, pneumopathies, syndrome de détresse respiratoire aiguë), associées surtout à certains virus respiratoires tels que la grippe, le VRS (Virus Respiratoire



Syncytial), le SARS-CoV2, où des populations à risque sont identifiées (patients âgés, immunodéprimés, patientes enceintes, etc) (11). Il n'existe pas de spécificité clinique permettant de connaître le virus infectant responsable de la symptomatologie. Récemment, des techniques de diagnostic virologique moléculaire ont été mises au point et rendues facilement accessibles aux hôpitaux, mais les stratégies d'utilisation et de prise en charge restent peu claires. L'arsenal thérapeutique et vaccinal reste pauvre, et surtout développé pour certains virus d'intérêt (grippe, SARS-CoV2).

Figure 1- Facteurs influençant la transmission des virus respiratoires- Selon Moriyama et al.,2020 (12)



AH : absolute humidity ; MCC : mucociliary clearance ; RH : relative humidity

Plusieurs facteurs contribuent à l'hétérogénéité des résultats publiés par les études portant sur les virus respiratoires : le type et le nombre de virus recherchés, le type de prélèvement, la période où l'étude est réalisée, la zone géographique, la population (hospitalière, soins ambulatoires) avec ses propres caractéristiques (âge, comorbidités, genre, statut immunitaire, etc), ainsi que la taille des séries. Cela rend les études difficilement comparables, car très hétérogènes d'une étude à l'autre, et amène également à des données qui peuvent se contredire. De plus, il existe une vraie saisonnalité décrite et connue des virus respiratoires, dépendant des différents lieux géographiques (Figure 2) (12).



Figure 2- Saisonnalité des virus respiratoires dans les régions tempérées – Selon Moriyama et al., 2020 (12)

Month	June	July	Aug.	Sep.	Oct.	Nov.	Dec.	Jan.	Feb.	Mar.	Apr.	May	
Winter virus						Influenza virus							
						HCoV							
						RSV							
All-year virus	Adenovirus/HBoV												
Type-specific	PIV3	PIV1											
Spring	hMPV												
Spring/Fall	Rhinovirus												
Summer virus	Non-rhinovirus enteroviruses												

Le virus de la grippe, les coronavirus (CoV) et le virus respiratoire syncytial humain (RSV) présentent des pics en hiver (virus hivernaux). L'adénovirus, le bocavirus humain (BoV), les virus parainfluenza (PIV), le métapneumovirus humain (hMPV) et le rhinovirus (HRV) peuvent être détectés tout au long de l'année. Les schémas saisonniers du PIV sont spécifiques à chaque type. Les épidémies de PIV de type 1 (PIV1) et de PIV de type 3 (PIV3) culminent respectivement à l'automne et au printemps-été. La prévalence de certains entérovirus non rhinovirus augmente en été (virus d'été).

Parmi les virus responsables des épidémies hivernales, le rhinovirus (HRV pour Human RhinoVirus) est le plus fréquent. Le VRS, principal virus responsable de bronchiolites chez les nourrissons, est également responsable d'IRA dans l'ensemble de la population générale, générant un important coût lié aux soins chez les personnes fragilisées (nourrissons, personnes âgées). Enfin, les Coronavirus « communs » endémiques (NL63, HKU1, 229E et OC43), circulent également, responsables d'IRA de façon épidémique. C'est autour de ces virus respiratoires que nous avons travaillé.



A. Rhinovirus (HRV)

1. Classification et structure

HRV est un virus petit (environ 30 nm de diamètre), non enveloppé, à ARN (acide ribonucléique), à brin unique positif (13), appartenant à la famille des Picornaviridae. On distingue 3 espèces (A, B et C) (Figure 2), et environ 150 sérotypes sont décrits actuellement. Le génome est composé d'environ 7200 kb (Figure 3).

Figure 2- Rhinovirus observés en microscopie électronique (A), et modélisation de la capside externe des différentes espèces de Rhinovirus (B)

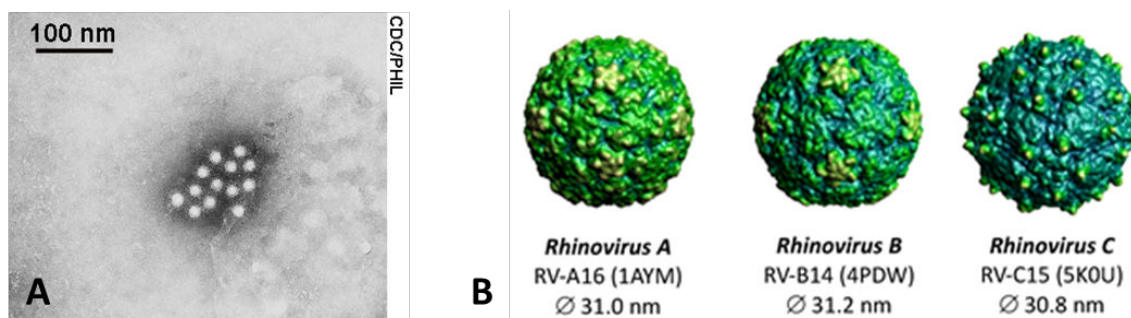
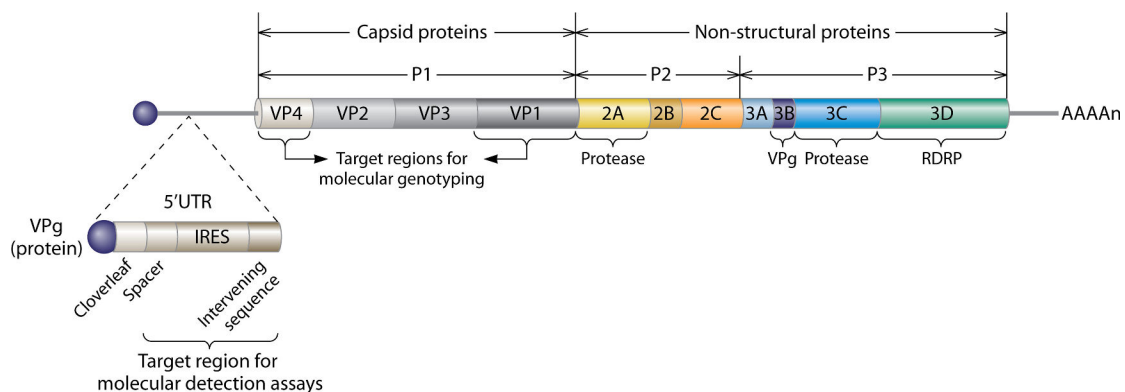


Figure 3- Structure génomique de l'HRV- Selon Jacobs et al. (14)

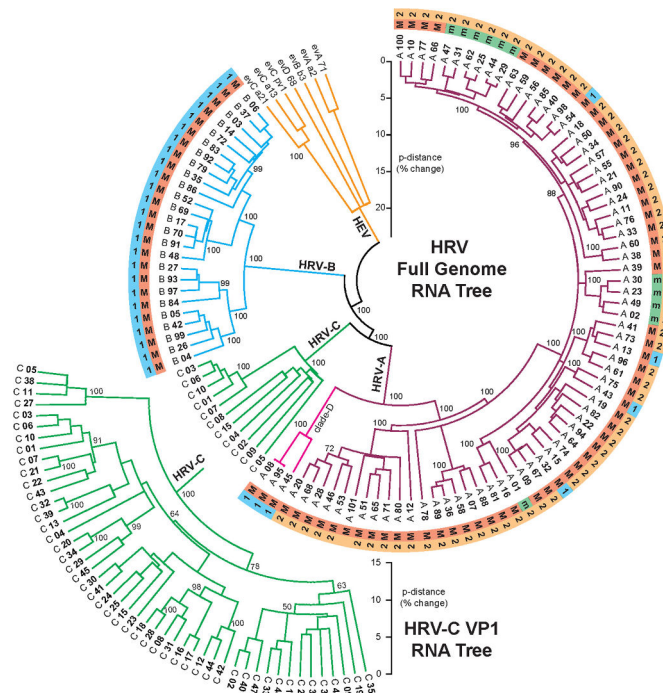


L'HRV est un virus à ARN positif monocaténaire de 7,2 kb avec un seul cadre de lecture ouvert relié à une région 5' non traduite et à une courte protéine d'amorçage virale (VPg). La protéine VP1 est transformée pour former la capside de l'HRV, et les protéines VP2 et VP3 sont transformées pour produire la VPg, la protéase et l'ARN polymérase ARN-dépendante. IRES= internal ribosomal entry subunit (sous-unité d'entrée interne du ribosome).



La capside possède contient 4 protéines appelées VP1 à VP4, arrangées en 60 unités protomériques répétées. Les différents sérotypes se distinguent principalement au niveau de leur région codant pour VP1 ou VP4/VP2. Cependant, la diversité génétique des HRV évolue en permanence, et la classification des HRV est régulièrement mise à jour (Figure 4).

Figure 4- Arbre phylogénétique des HRV- Selon Jacobs et al. (14)



L'arbre a été réalisé à l'aide de méthodes d'association de voisins à partir de séquences d'ARN du génome complet alignées et ancrées avec des données concernant les espèces d'HRV A, B et C. L'anneau extérieur ("1" ou "2") indique les types de groupes de médicaments anticapside, s'ils sont connus. L'anneau intérieur indique les membres des groupes de récepteurs majeurs ("M") (ICAM-1) et mineurs ("m") (LDLR).

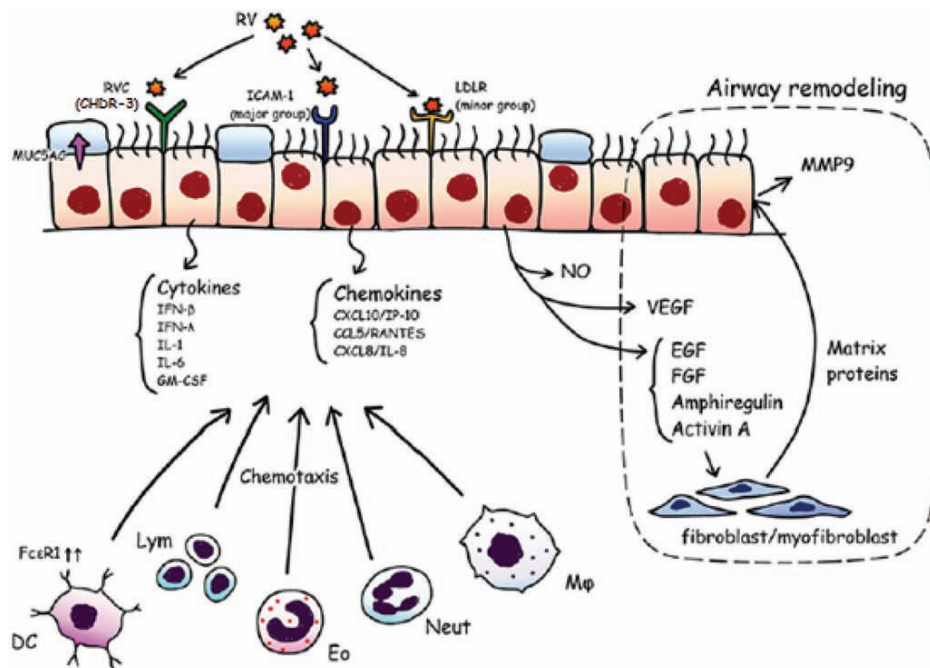
2. Cycle viral

L'HRV rentre dans la cellule par les voies respiratoires supérieures et se fixe à des récepteurs des cellules épithéliales respiratoires. HRV-A et HRV-B se lient au récepteur de la molécule d'adhésion intracellulaire 1 (ICAM-1) et au récepteur des LDL (low-density lipoprotein) ; HRV-C se lie à une protéine appelée CDHR-3 (cadherin-related family member 3) (Figure 5). Selon le type de récepteur, l'absorption du virus se fait par endocytose dépendante ou indépendante de la clathrine ou par macropinocytose.



Les virions subissent ensuite des changements de conformation qui donnent naissance à des particules subvirales hydrophobes. Ce processus est initié par l'ICAM-1 et/ou l'environnement à faible pH dans les endosomes. On pense que le génome à ARN traverse la membrane de l'endosome vers le cytosol à travers un pore formé par les protéines virales ou à la suite d'une rupture de la membrane. Une fois dans le cytosol, le ribosome de la cellule hôte traduit l'ARN simple brin à sens positif en une polyprotéine qui est ensuite transformée en ses différentes parties (15).

Figure 5- Pathogenèse de l'infection par HRV- Selon Saraya et al. (16)



3. Transmission

L'HRV se transmet d'une personne à l'autre par contact (direct ou indirect) ou par aérosol (petites ou grosses particules) (17). L'infection par l'HRV est déclenchée par inoculation intranasale et conjonctivale, mais pas par voie orale. Dans les études sur l'infection naturelle et expérimentale par l'HRV, le virus est régulièrement déposé sur les mains et introduit dans l'environnement. L'HRV est détecté dans 40 % des mains de volontaires naturellement infectés et dans 6 % des objets de la maison (18). Dans une étude portant sur 24 couples mariés avec un partenaire infecté expérimentalement, la transmission de l'infection par l'HRV s'est produite chez 9 couples pendant des périodes de contact allant de 3 à 60 jours (17). Dans des conditions expérimentales, l'HRV survit dans un environnement intérieur pendant des heures, voire des jours, à une température ambiante, et sur une peau intacte pendant 2 heures (17). La fréquence et la durée de l'excrétion de l'HRV dans les aérosols ne sont pas



bien comprises. Dans une étude, l'HRV a été transmis par aérosolisation à 56 % de 18 volontaires qui avaient joué aux cartes pendant 12 heures avec des sujets infectés expérimentalement (19).

4. Pathogénicité

Jusque récemment, l'HRV était rendu responsable d'IRA hautes, épargnant les voies respiratoires basses. Cependant, il a été montré que le virus pouvait mieux se répliquer dans les voies basses (20). Dans une cohorte réalisée en soins primaires d'adultes avec une toux aiguë, donc suspects d'ARI basse, l'HRV était retrouvé chez 26% des prélèvements de gorge (21). L'exposition aux souches de HRV commence précocement au cours de la vie et continue tout au long de la vie. L'HRV peut être responsable d'IRA hautes et basses (22), comme la rhinite aiguë, l'otite aiguë, mais également être à l'origine de bronchiolites chez les nourrissons, ou d'exacerbations d'asthme (23) : dans cette étude, les nourrissons positifs au HRV-C étaient plus vieux, et présentaient plus souvent des signes de détresse respiratoire et des sifflements que les nourrissons positifs à HRV-A ou HRV-B. Cette répartition de fréquence est également la même dans une étude ayant inclus des enfants de moins de 5 ans hospitalisés pour IRA (24). La fréquence estimée d'infection par l'HRV est de 2 à 3 fois par an chez l'adulte (25). L'HRV est connu pour être à l'origine de l'exacerbation de maladies respiratoires chroniques et augmente la mortalité chez les personnes âgées (26) (27) (28).

Alors que d'autres virus respiratoires, tels que le virus de la grippe et le virus respiratoire syncytial (VRS), provoquent une destruction des cellules épithéliales des voies respiratoires, l'HRV est rarement associé à une cytopathologie des voies respiratoires supérieures. En utilisant la microscopie électronique à balayage et à lumière d'échantillons de biopsies nasales prélevés sur des sujets souffrant de rhumes naturels, Winther et al. ont constaté que les cellules épithéliales étaient décollées; cependant, le revêtement et les bords des cellules épithéliales sont restés structurellement intacts (29). Une préservation similaire de la morphologie et de la composition des cellules a été observée pour l'épithélium nasal au cours d'études sur l'infection expérimentale par l'HRV, où l'importance de l'excrétion virale n'était pas en corrélation avec les résultats de l'étude de l'épithélium nasal avec la gravité des symptômes (30).

5. Épidémiologie

L'HRV provoque des maladies respiratoires dans le monde entier et tout au long de l'année. Depuis les années 1960, des études longitudinales sur l'épidémiologie et les caractéristiques cliniques de l'infection par l'HRV dans les climats tempérés font état d'un pic d'incidence au début de l'automne et d'un pic moins important au printemps (31). En général, l'HRV est la cause la plus fréquente de maladies virales respiratoires au printemps, en été et en automne, alors que le virus de la grippe et le VRS prédominent en hiver. L'HRV-C semble présenter un caractère saisonnier, avec des pics à l'automne ou en hiver dans la plupart des pays tempérés ou subtropicaux, mais un pic d'incidence



possible pendant la saison des pluies sous les tropiques. L'HRV-A et l'HRV-C peuvent présenter une saisonnalité similaire (32). Dans une étude de 2016 ayant surveillé l'épidémiologie des IRA chez des enfants pendant 29 mois, il a été trouvé que plus de 100 sérotypes d'HRV pouvaient circuler pendant une saison épidémique (33). Dans une étude parue en 2022 réalisée sur des nourrissons de moins de deux ans hospitalisés pour IRA, parmi les prélèvements positifs à HRV, 55% étaient du HRV-A, 15% du HRV-B et 30% du HRV-C (34). Cette répartition est à peu près la même que celle retrouvée chez des patients ambulatoires âgés de 7 à 95 ans présentant une IRA (35). Il existe donc une saisonnalité bien décrite des infections à rhinovirus (36) (12,37), mais elle diffère selon les études et leur localisation géographique, suggérant une variabilité en fonction de la température et l'humidité (38).

6. HRV et maladies chroniques respiratoires

Les maladies sifflantes de la petite enfance (bronchiolite, asthme du nourrisson) sont associées à une respiration sifflante récurrente et au développement de l'asthme au cours de l'enfance. Dans une étude de cohorte prospective portant sur 259 enfants suivis de la naissance à l'âge de 6 ans, les enfants souffrant d'une respiration sifflante associée à l'HRV en ambulatoire de la naissance à l'âge de 3 ans étaient 10 fois plus susceptibles de développer de l'asthme à l'âge de 6 ans (39). Près de 90 % des enfants dont la respiration sifflante était associée à l'HRV au cours de la troisième année souffraient d'asthme à l'âge de 6 ans. Les nourrissons hospitalisés pour une bronchiolite virale ont un risque d'asthme 2 à 3 fois plus élevé plus tard dans l'enfance. Ce risque semble être plus élevé avec l'HRV qu'avec le VRS, les PIV (parainfluenza virus) et les infections par le virus de la grippe (20). L'HRV est également associé aux exacerbations d'asthme. Les sujets asthmatiques n'ont pas plus de rhumes que les personnes non asthmatiques, et il n'y a pas de différences dans la gravité ou la durée des symptômes des voies respiratoires supérieures associés à l'HRV (40) ; cependant, ils présentent des symptômes des voies respiratoires inférieures plus fréquents et plus graves. En moyenne, environ deux tiers des exacerbations de l'asthme associées à un virus respiratoire sont dues à l'HRV. Dans une étude transversale portant sur des enfants hospitalisés pour des exacerbations d'asthme et des témoins hospitalisés pour des maladies respiratoires aiguës, l'HRV a été détecté dans 85 % des cas et 33 % des témoins (41). Il est à noter que le VRC-C était associé aux exacerbations de l'asthme, alors que les taux de détection du VRC-A et du VRC-B étaient similaires entre les groupes.

Plusieurs études longitudinales ont démontré une association significative entre les infections virales respiratoires et les exacerbations de la Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO), tant chez les patients hospitalisés que chez les patients ambulatoires. Dans une étude portant sur 62 patients atteints de BPCO et suivis pendant 26 mois en moyenne, 58 % des visites au cabinet et 6 % des visites aux urgences étaient associées à des infections virales respiratoires (42). Parmi les patients hospitalisés pour une exacerbation aiguë de la BPCO, des virus respiratoires ont été détectés chez 37 % d'entre eux, contre 12 % des sujets témoins atteints d'une BPCO stable et 12 % des fumeurs sans obstruction. L'HRV était l'infection virale respiratoire la plus courante, isolée chez 24 % des patients.



L'HRV a également été détecté chez 4 % des patients atteints de BPCO stable et chez zéro fumeur non obstrué. Par conséquent, par rapport aux patients atteints de BPCO stable, les patients souffrant d'exacerbations de la BPCO étaient 4,4 fois plus susceptibles d'avoir une infection virale respiratoire (43). Deux autres études prospectives portant sur des patients hospitalisés pour une exacerbation de BPCO ont révélé que les picornavirus étaient l'infection virale la plus courante détectée par RT-PCR dans le liquide de lavage nasal, l'écouvillon nasopharyngé ou les échantillons d'expectoration induite, dans 36 à 50 % des cas (44). En milieu ambulatoire, environ deux tiers des cas d'exacerbation de BPCO sont associés à des symptômes de rhume (augmentation de la congestion nasale et/ou de la rhinorrhée) dans les 18 jours précédant le début de l'exacerbation, et l'HRV reste un facteur de risque important.

B. Virus Respiratoire Syncytial (VRS)

Le Virus Respiratoire Syncytial humain (VRS) a été isolé pour la première fois dans une population de chimpanzés enrhumés par Morris et al. en 1956 ; ils le nomment alors CCA pour Chimpanzee Coryza Agent. Un an plus tard, Chanock et al. l'identifient chez un enfant atteint de pneumopathie (45). Il tire son nom des syncytia, larges cellules pluri-nuclées résultant de la fusion de plusieurs cellules qui se forment lors de l'infection de lignées cellulaires (45). Il s'agit d'un agent majeur et ubiquitaire des infections respiratoires, représentant un véritable enjeu de santé publique.

Dans les régions tempérées, il existe une saisonnalité très marquée entraînant des épidémies automno-hivernales. Avant 2 ans, presque 100% des enfants sont contaminés, car ce virus est extrêmement contagieux ; les réinfections sont très fréquentes tout au long de la vie, témoignant de la faible immunité qu'il induit chez l'hôte. Chez le nourrisson, il est responsable de la bronchiolite aiguë ; chez les personnes âgées, les immunodéprimés et les personnes souffrant de pathologies respiratoires chroniques, il est également source d'une morbi-mortalité importante. Environ 33 millions d'infections à VRS et 60 000 morts intra-hospitalières imputables au VRS sont rapportées chaque année, avec une large part dans les pays en voie de développement (46). Même s'il est peu pourvoyeur de mortalité dans les pays développés, il représente un fardeau important sur les systèmes de soins, de façon épidémique, durant les hivers (47) (48) (49). Le VRS est le deuxième virus retrouvé chez des enfants de moins de 18 ans hospitalisés pour IRA (50).

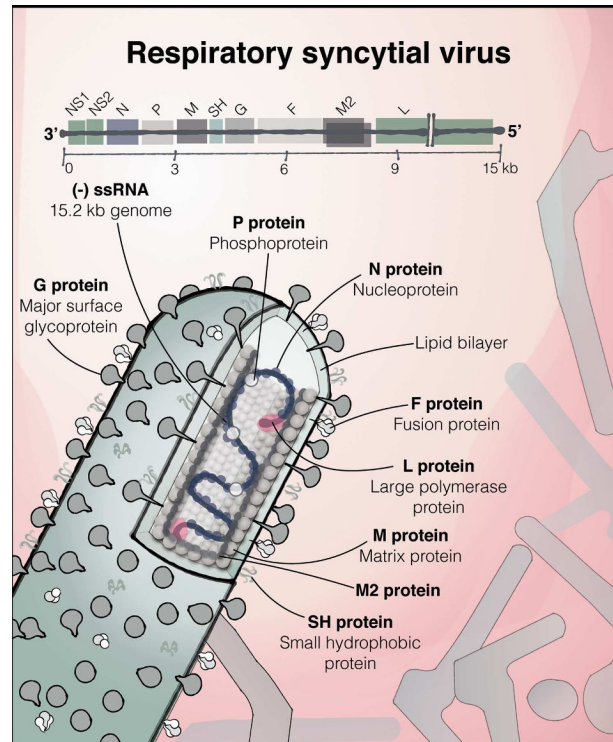
1. Classification et structure

Le VRS est un virus à acide ribonucléique (ARN) monocaténaire non fragmenté de polarité négative. Il appartient à l'ordre des Mononegavirales, la famille des Paramyxoviridae, la sous-famille des Pneumovirinae, du genre Orthopneumovirus (Figure 6). L'ARN génomique viral comprend à ses



extrémités des séquences promotrices assurant le recrutement de la polymérase virale et l'initiation de la réplication du génome et de l'antigénome (séquences leader et trailer, respectivement en 3' et 5').

Figure 6- Structure du VRS- Selon Lambert et al. (51)



Le génome du VRS, long de 15,2 kb de l'ARN, monocaténaire, de polarité négative, est composé de 10 gènes codant pour 11 protéines. Il s'agit ici d'une particule virale filamenteuse, l'une des formes prédominantes, qui bourgeonne à partir de la cellule infectée. L'enveloppe externe contient la glycoprotéine de surface G, fortement glycosylée, ainsi que les protéines de fusion (F) et SH. La protéine matricielle se trouve à l'intérieur de la membrane, entourant le complexe ribonucléoprotéique, composé du génome associé aux protéines N, P et à la grande protéine ARN polymérase (L) dépendante de l'ARN.

Le génome viral, constitué d'environ 15 000 nucléotides, comprend 10 cadres de lecture séparés par des régions intergéniques non codantes. Il comporte en 5' et 3' des séquences non codantes (trailer et leader) qui contiennent des signaux d'initiation et de terminaison de la transcription des gènes et de la réplication du génome.

Le VRS est un virus enveloppé, pleiomorphe, prenant une forme irrégulière de 100 à 350 nm de diamètre. La nucléocapside présente une symétrie hélicoïdale et mesure de 12 à 15 nm. Elle associe l'ARN à la nucléoprotéine N, et sert de matrice au complexe de réplication virale (52) (53). L'enveloppe lipidique est dérivée de la membrane plasmique de la cellule hôte. Elle présente 3 glycoprotéines virales transmembranaires : la glycoprotéine F de fusion, la glycoprotéine d'attachement G et une petite protéine hydrophobe SH, à la fonction mal définie, présente exclusivement lors de la réplication virale (54). Ces glycoprotéines s'organisent en homo-oligomères transmembranaires et forment des



projections courtes et resserrées à la surface de l'enveloppe virale. La protéine M, non glycosylée, forme une couche à la surface interne de l'enveloppe virale. Pendant la réplication, l'ARN viral est associé à 4 protéines pour former la nucléocapside : la nucléoprotéine N, la phosphoprotéine P, la protéine M2-1 et la grande sous-unité polymérase L (Figure 6). L est une « ARN polymérase ARN-dépendante » et présente des activités enzymatiques nécessaires à l'ajout et la méthylation de la coiffe des messagers viraux (55). M2-1 peut être considérée comme un facteur de transcription, et intervient dans la régulation du basculement entre les fonctions de réplication et de transcription de la polymérase L (56). M2-2 intervient dans la régulation des fonctions de réplication et de transcription de la polymérase L. L'enveloppe virale est composée de protéines : G permettant l'attachement à la membrane, F permettant l'attachement et la fusion avec la cellule, et SH dont le rôle est encore inconnu. La protéine M permet la maturation et le bourgeonnement du virion au niveau de la membrane plasmique de la cellule hôte. Les protéines NS1 et NS2 sont produites en abondance, et permettraient de limiter la réponse cellulaire à l'infection (57).

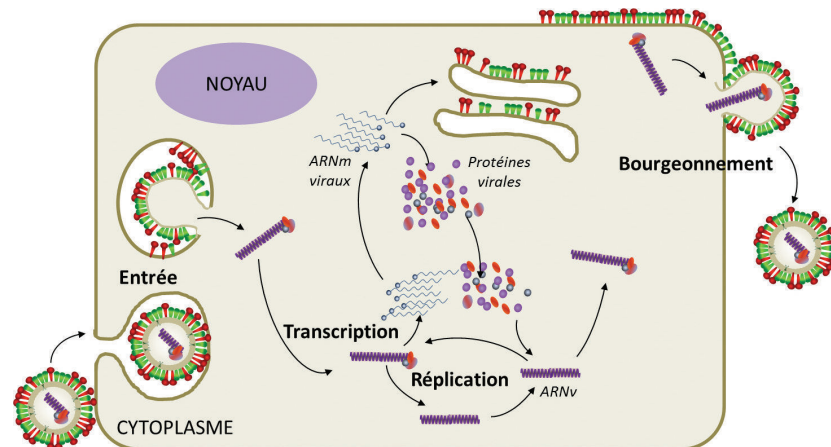
2. Cycle viral

Le cycle viral du VRS reste encore mal connu (Figure 7). On observe une différence entre l'in vivo et l'in vitro : en effet, le VRS infecte principalement les cellules ciliées de l'épithélium respiratoire, mais en laboratoire, son tropisme est plus étendu. Les protéines F et G permettent l'attachement du virus à la cellule hôte. La protéine G est indispensable à l'entrée du virus dans la cellule, probablement grâce à sa liaison avec le récepteur CXCR3 présent à la surface des cellules épithéliales (58). La pénétration du virus dans la cellule n'est pas encore établie avec certitude (endocytose ou macropinocytose). La fusion des enveloppes virales et cellulaire est possible grâce à la protéine F, qui change de conformation au cours de cette étape (59). Elle est aussi responsable de la fusion des membranes plasmiques des cellules infectées, entraînant la formation de syncytia (54).

La transcription et la réplication du génome viral ont lieu dans le cytoplasme de la cellule hôte dans des compartiments typiques de l'infection par le VRS : les corps d'inclusion (60). A partir de l'ARN génomique antisens encapsidé par la protéine N, le complexe polymérase viral transcrit d'abord les différents gènes viraux, séquentiellement à partir de l'extrémité 3', en initiant et terminant la transcription de chaque cadre ouvert de lecture sur les Gene Start et Gene End les encadrant. A partir de la même matrice, la polymérase assure également la réplication du génome viral en synthétisant un antigénome complet qui, à son tour, est répliqué, produisant des ARN génomiques. Le génome et l'antigénome sont encapsidés par la protéine N au fur et à mesure de leur réplication. Les nouveaux génomes produits et encapsidés s'associent aux protéines du complexe polymérase et à la protéine de matrice M, puis gagnent les sites de bourgeonnement où sont concentrées les glycoprotéines virales qui ont transité par la voie sécrétoire classique (61). Les virions bourgeonnent finalement à la membrane plasmique.



Figure 7- Schéma du cycle de réplication du VRS- Selon Rameix-Welti, 2017 (62)



3. Immunité

Les protéines F et G induisent la formation d'anticorps neutralisants. Les anti-G empêchent la fixation des virions sur les récepteurs cellulaires et les anti-F inhibent la fusion cellulaire due au VRS, la libération des virions et la diffusion tissulaire de l'infection. Des études sur le transfert d'anticorps monoclonaux anti-G ou anti-F chez l'animal ou l'utilisation de vaccins recombinants montrent que la protection est indépendante du type A ou B du VRS lorsqu'ils sont dirigés contre la protéine F, et très liée à celui-ci lorsqu'ils sont anti-G. En effet, c'est sur la protéine G que se trouvent les plus grandes différences antigéniques entre types A et B.

Immunité cellulaire

La production de lymphocytes T-cytotoxiques est induite par la protéine F. La protéine G est reconnue par des lymphocytes T CD4+ de type Th2 produisant des cytokines (IL-4, IL-5, IL-10). La protéine F est reconnue par des lymphocytes spécifiques CD4+ de type Th1 produisant de l'interféron (IFN). Une réponse immunitaire existe donc ; cependant elle protège mal des ré-infections. La résistance aux réinfections semble dépendre de l'activité des anticorps neutralisants sur les surfaces muqueuses. L'immunité humorale semble contribuer à la protection des voies respiratoires basses, mais pas des voies respiratoires hautes.

Immunité humorale

Lors d'une première infection, des immunoglobulines M (IgM) sont produites en 5 à 8 jours, et persistent de 20 à 60 jours (63). Des immunoglobulines G (IgG) sont produites 2 semaines après l'infection, atteignant leur taux maximal en 3 à 4 semaines. Durant les 6 mois suivants, le taux



d'anticorps sériques diminue progressivement jusqu'à devenir indétectable. Il existe une transmission transplacentaire des anticorps maternels aux nouveau-nés.

4. Pathogénicité

Le VRS est responsable d'infections respiratoires, surtout chez le nourrisson et le jeune enfant. Ces infections ont une gravité très variable, pouvant aller de la simple rhinite à une atteinte bronchiolaire importante avec détresse respiratoire sévère (64). Chez l'enfant plus âgé et l'adulte, l'infection par le VRS se présente généralement sous la forme d'un rhume banal. Enfin, chez la personne âgée qui est plus fragile, l'infection par le VRS peut être responsable de véritables infections respiratoires basses (65).

Le réservoir du VRS est uniquement humain, au sein du tractus respiratoire. La contamination se fait par voie nasale, après inhalation de gouttelettes provenant de voies aériennes supérieures (toux, éternuement, parole) d'un sujet infecté ou après contact avec des objets souillés par des sécrétions respiratoires infectées. Le virus a pour cible les cellules ciliées respiratoires, mais également les pneumocytes de type I et les macrophages alvéolaires. Ceci déclenche un afflux de cellules immunitaires, d'abord les lymphocytes NK et les granulocytes, puis des lymphocytes T4 et T8. In vivo, les destructions cellulaires sont rares, mais il existe une perturbation de la motilité ciliaire, une hypersécrétion de mucus, un œdème et un infiltrat inflammatoire péri-bronchiolaire (66).

La gravité de la pathologie varie avec l'âge et le statut immunitaire de l'hôte. Les parts respectives de la réplication virale et de la réponse immunitaire dans la genèse des lésions pulmonaires restent débattues. Il existerait un déséquilibre des réponses immunitaires, avec une forte réponse Th2 dans l'exacerbation de la pathologie secondairement à une immunisation par un vaccin inactivé chez la souris. Le nouveau-né développe préférentiellement une réponse immunitaire de type Th2. Ces constatations ont mené à suggérer que les symptômes d'infection par le VRS résulteraient de l'immaturité immunitaire du nouveau-né conduisant à des réponses inappropriées. Certains auteurs ont mis en évidence un lien entre la gravité des symptômes et la charge virale, en faveur d'un effet direct de la multiplication virale (67) (68). Un étude parue en 2022 a montré une augmentation des taux d'interférons de type I, II et III dans les prélèvements naso-pharyngés chez les enfants de plus de 6 mois, versus les enfants plus jeunes, suggérant une maturation de la réponse immunitaire chez ceux-ci (69) et donc une protection plus efficace contre une maladie sévère.

La morbidité et la mortalité s'observent surtout chez les très jeunes enfants, chez les anciens prématurés pouvant présenter des comorbidités respiratoires et/ou cardiaques, ainsi que les enfants immunodéprimés. Cliniquement, après une incubation de 3 à 6 jours débutent une rhinorrhée et une toux. La fièvre est présente dans 50% des cas. Dans environ 30% des cas, une anorexie et une dyspnée



apparaissent. Il existe un wheezing à l'auscultation, associé ou non à des crépitants. Chez le nourrisson très jeune, des apnées peuvent être observées. La guérison a lieu en quelques jours, mais les symptômes (toux) peuvent persister environ 2 semaines.

Chez les personnes âgées, l'impact du VRS est largement sous-estimé en termes de morbidité, de mortalité et d'utilisation des ressources médicales. Elles ont été récemment estimées par une revue de la littérature récente (70).

5. Variabilité génique et antigénique

Deux groupes distincts du VRS ont été identifiés grâce à l'étude des séquences géniques de la nucléoprotéine N, de la phosphoprotéine P, de la petite protéine hydrophobe SH et de la protéine d'attachement G : le groupe A et le groupe B. Il existe de nombreuses variantes au sein de ces deux génotypes, surtout au niveau de la protéine G. Au sein de ce gène mesurant environ 900 nucléotides, 2 régions sont hypervariables. De plus en plus de génotypes sont recensés, mais on ignore si le séquençage d'un court fragment de la glycoprotéine G est suffisant pour classer les souches avec précision.

6. Epidémiologie

Au cours d'une épidémie, la co-circulation du VRS-A et du VRS-B est fréquente, avec éventuellement une dominance de l'un ou de l'autre sous-groupe. Il est alors dit « dominant », et peut persister pendant plusieurs saisons consécutives. Les VRS-A seraient les plus prévalents (71). Aucune réelle différence de pouvoir pathogène n'a été mise en évidence (72) (73). La diffusion des différentes souches de VRS est mondiale, avec une diffusion simultanée des variants dans les différentes régions du globe. L'infection est endémique, et apparaît sous forme de pics épidémiques chaque hiver environ 4 mois, surtout en janvier et mars en France. Environ 50% des nourrissons susceptibles d'être contaminés sont victimes d'une primo-infection à chaque épidémie hivernale. A l'âge de 2 ans, presque 100% des enfants ont déjà été en contact avec le VRS (74). La réinfection est fréquente, mais dans un délai de quelques semaines au plus tôt. La plupart du temps, la réinfection se fait l'année suivante. Chez l'adulte, la réinfection est plus rare.

Le VRS serait responsable chaque année dans le monde de 33,8 millions d'infections respiratoires basses, 3,4 millions d'hospitalisations et d'au moins 66 000 morts chez les enfants de moins de 5 ans (75). La majeure partie des décès a lieu dans les pays en voie de développement. Aux États-Unis, le taux d'hospitalisations liées à l'infection par le VRS est estimé annuellement à 3 pour



1000 enfants de moins de 5 ans. Le coût total annuel des infections pédiatriques à VRS aux États-Unis est estimé de 652 millions à 1,7 milliards de dollars (49).

Chez l'adulte, l'épidémiologie est moins connue. Une étude de 2001 a montré que l'infection à VRS était plus fréquente que la grippe (76). Aujourd'hui, on connaît le poids de la morbi-mortalité du VRS chez les personnes âgées. Aux États-Unis, le virus serait responsable de 177 000 hospitalisations par an (77), avec un poids d'infection en ville probablement très élevé car le VRS a été détecté chez 18% des plus de 45 ans consultant en hiver pour symptômes respiratoires (78). L'impact du virus sur les exacerbations de broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) est important, en cause dans presque 9% des cas dans une méta-analyse parue en 2014 par Wu et al.(79). Dans une revue de la littérature récente (80), l'estimation du poids des infections à VRS chez les personnes de plus de 60 ans a été estimée dans les « pays riches ». Si l'on rapporte à la France, cela fait une estimation d'environ 280 000 cas, 25 000 hospitalisations et 1800 morts à l'hôpital par an. Il est difficile de mesurer le poids du VRS chez les séniors car il n'y a pas de système de surveillance systématique jusqu'à présent. Le diagnostic virologique est insuffisant (pas de recommandation, pas de prise en charge). De même cliniquement, il n'y a pas de définition de cas, en particulier car les signes respiratoires sont peu spécifiques, et les signes respiratoires sont souvent absents. Une étude parue en 2022 étudiant les résultats virologiques de patients adultes hospitalisés a montré que les patients positifs au VRS étaient plus âgés, que la durée d'hospitalisation était plus longue, le recours à l'oxygénothérapie plus fréquente, ainsi que le décès par rapport aux patients positifs à la grippe (70).

La question de la chronicité de l'infection à VRS chez ces patients reste débattue, et notamment sur sa responsabilité dans le déclin des fonctions respiratoires (81). Enfin, le VRS a une place importante dans les infections sévères pouvant être présentées par les patients immunodéprimés, avec une mortalité estimée à 80% en cas d'infection respiratoire basse.

7. Prévention et traitement

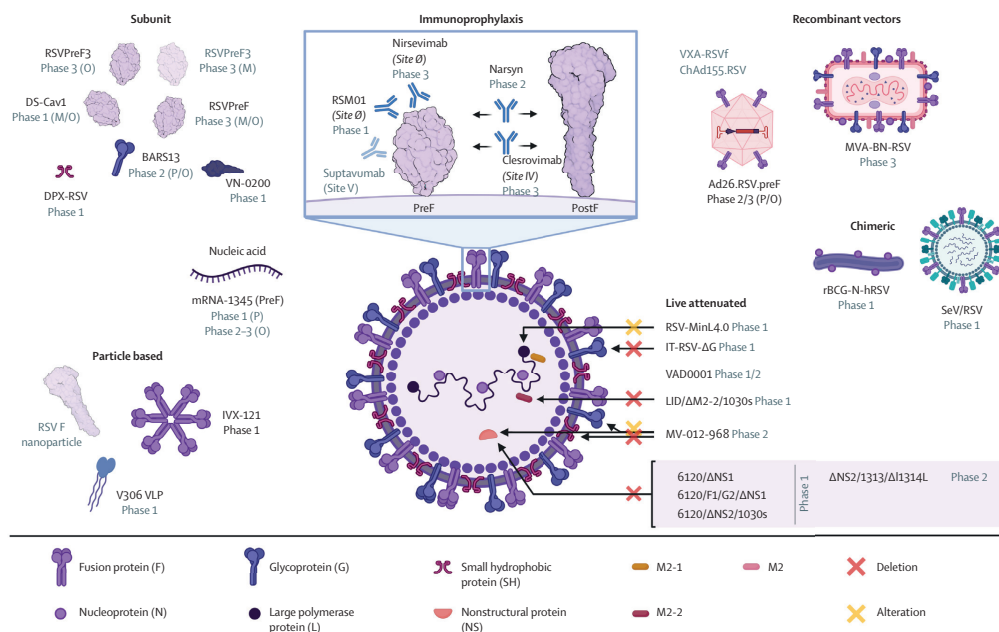
Depuis de nombreuses années, la prévention et le traitement de l'infection par le VRS reste un sujet très développé de la recherche, devant la morbidité et les coûts qu'il génère (Figure 8). De plus, il a été trouvé des liens entre infections respiratoires dans l'enfance et développement de broncho-pneumopathie obstructive chronique (BPCO) (82). Historiquement, dans les années 1960, un premier vaccin avait mis au point mais il a rapidement été retiré, car à l'origine du décès de deux nourrissons. Puis des décennies se sont déroulées avant que la recherche sur le VRS ne se réactive. Actuellement, quatre cibles distinctes sont sources de potentielles avancées : la vaccination de la femme enceinte, la vaccination du nourrisson, la vaccination de la personne âgée et l'immunoprophylaxie du nourrisson (à risque, ou non, de forme grave) (83). Chaque cible présente des avantages et des inconvénients (Figure 9). La vaccination de la femme enceinte entraîne une efficacité dès la naissance, mais celle-ci est



possible après 32 semaines d'aménorrhée, et écarte donc tous les nouveau-nés prématurés, à risque de développer une infection sévère à VRS. La vaccination du nourrisson implique un effet direct, et a une durée longue, mais il existe un délai de la réponse immunitaire à cause de l'immaturité du système immunitaire du fœtus. La vaccination des personnes âgées pose le souci d'une immunité plus difficile à stimuler. Cependant, récemment, plusieurs candidats sont proposés, dont un vaccin approuvé par la FDA (Food and Drug Administration) début mai 2023.

Enfin, l'immunoprophylaxie des nourrissons est autorisée actuellement (Synagis®, paviluzumab), et recommandée chez les nourrissons ex grands prématurés (nés au terme inférieur à 32 semaines d'aménorrhée ayant été oxygéné pendant plus de 28 jours en période néonatale), ou ceux présentant une cardiopathie congénitale hémodynamiquement significative (HAS 2017). Le schéma des injections résulte en une injection intramusculaire mensuelle (maximum cinq), d'octobre à mars selon la saison épidémique. Il s'agit d'un anticorps monoclonal, dont la cible est le site antigénique A de la glycoprotéine F du VRS. Plus récemment, le nirsevimab, développé par plusieurs laboratoires, est un anticorps monoclonal recombinant se liant à la protéine de fusion du VRS. Il a reçu le 16 septembre 2022 l'autorisation de l'Agence européenne des médicaments. Son principal avantage est qu'il ne nécessite qu'une seule injection en début de période épidémique pour être efficace (84). Sa dispensation, élargie à la population générale des nourrissons, devrait modifier le paysage viral des prochaines saisons hivernales.

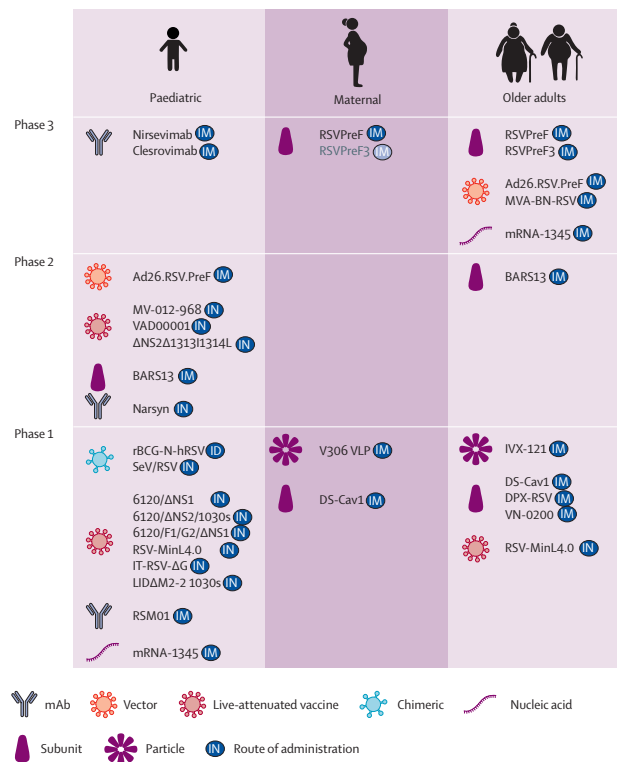
Figure 8- Overview des vaccins candidats selon la cible- Selon Mazur et al. (83)



Le gris clair indique que le développement du vaccin a été arrêté ou interrompu. PreF=protéine de pré-fusion ; PostF=protéine de post-fusion ; Ad=adénovirus ; MVA = virus de la vaccine Ankara modifié ; BCG=mycobacterium bovis ; SeV=virus Sendai.



Figure 9- Développement actuel des vaccins anti-VRS selon les populations cibles- Selon Mazur et al. (83)



Les vaccins candidats et les anticorps monoclonaux sont classés en trois catégories selon les populations cibles : pédiatriques, maternelles et adultes âgés (>60 ans) et en fonction de la phase clinique de développement (phases 1, 2 ou 3). Les différentes approches d'immunisation sont indiquées par la clé. Le texte en gris clair indique que le développement a été interrompu. IM=intramusculaire ; IN=intranasal ; ID=intradermique ; PreF=protéine de pré-fusion. PostF=protéine de post-fusion.

C. Coronavirus

Les Coronavirus font partie de la famille des Coronaviridae. Ils ont été découverts dans les années 1960 initialement chez le poulet, puis mis en évidence dans les cavités nasales de patients atteints de rhume. Appelés Coronavirus en raison de l'aspect des virions en microscopie électronique, ils présentent une frange de protubérances entourant l'enveloppe, ayant l'apparence d'une couronne.

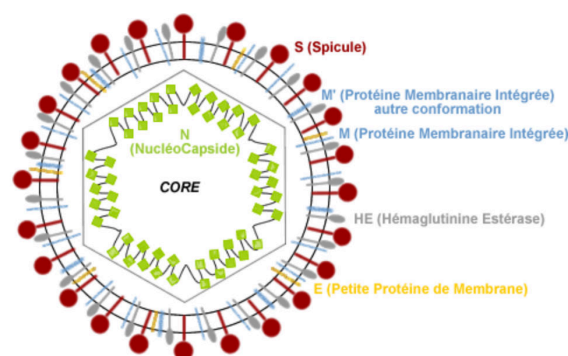
Les Coronavirus infectent l'homme de façon épidémique, en hiver et au printemps, et sont responsables d'une grande part des « rhumes » vus en ville par les médecins généralistes. Ils sont estimés à environ 8% des IRA hospitalisées chez les enfants de moins de 16 ans (85). Dans cette population, ils sont responsables à 83% d'IRA hautes.



Ce sont des virus enveloppés, de forme sphérique, ayant un ARN simple brin de sens positif et une capsid, mesurant entre 120 et 160 nm de diamètre (87), avec un cœur mesurant 65 nm et une nucléocapside en hélice de N-protéines. La caractéristique principale des Coronavirus est l'aspect de pointes recouvrant la surface du virion, en couronne, d'où leur nom. Les virions sont composés de grandes glycoprotéines S de surface, de protéines M de membrane, d'une petite protéine E de l'enveloppe et une protéine N de nucléocapside (Figure 11), qui sont toutes codées dans la région 3' du génome.

La protéine S, de grosse taille, comporte entre 1160 et 1452 acides aminés. Elle utilise un signal N-terminal lui permettant sa liaison au réticulum endoplasmique. Chez certains Coronavirus, elle est clivée en 2 sous-unités S1 et S2. S1 permet la liaison au récepteur, et S2 forme la tige des pointes. La protéine S permet donc l'attachement aux cellules, la fusion membranaire et l'induction de la neutralisation des anticorps. La protéine M comprend entre 225 et 260 acides aminés, et est la protéine la plus abondante des virions. Elle possède 3 domaines transmembranaires et donne au virion sa forme (88). Elle possède un petit domaine extra-membranaire glycosylé et un gros domaine intra-membranaire. La petite protéine E (entre 8 et 12 kDa) est présente en petite quantité dans la membrane. Elle facilite l'assemblage et la libération du virus, et a un rôle clé dans la pathogenèse du virus (89) via une activité canal ionique. La protéine N, mesurant entre 377 et 455 acides aminés, est la seule protéine constituant la nucléocapside. Elle est composée de 2 domaines distincts (domaine N-Terminal et domaine C-Terminal), tous deux capables de fixer l'ARN mais de façon différente. Elle est hautement phosphorylée (90), et cette phosphorylation déclenche un changement structural augmentant l'affinité du virus pour l'ARN non-viral. La protéine N se lie également à nsp3 (91), composant important du complexe de réplication, et à la protéine M. Il existe également, chez les Coronavirus bêta, une protéine HE ayant une fonction hémagglutinine-estérase, formant de petites projections de surface. Elle lie les acides sialiques aux glycoprotéines de surface, et possède une activité acétyl-estérase (92). Enfin, parmi les protéines non structurales, il existe la polymérase codée par le gène 1, représentant près de la moitié du génome du virus.

Figure 11- Représentation schématique d'une particule virale de Coronavirus- Selon Enjuanes et al. (93)



2. Organisation génomique

Le génome est constitué par un brin unique d'ARN à polarité positive. Celui-ci est long d'environ 30 kb (entre 27 et 31 kb). L'extrémité 5' possède une coiffe méthylée, puis il existe une séquence Leader de 65 à 98 nucléotides et une région non traduite d'environ 300 nucléotides. Il existe en 3' une séquence non traduite de 200 à 500 nucléotides, puis une queue polyadénylée en 3', ce qui lui permet de se fixer aux ribosomes au moment de la traduction. Cet ARN contient entre 7 et 10 gènes, dont 4 ou 5 codent pour les protéines structurales.

L'ordre des gènes sur l'ARN est toujours ainsi : 5'- leader- UTR-polymérase- (HE)-S-E-M-N-3'UTR-queue poly-A. Deux tiers de l'ARN code pour la polymérase. Le reste comprend les gènes codant pour les protéines structurales et les protéines non-structurales (nsp) (93).

3. Cycle viral

Attachement et entrée dans la cellule

L'attachement des Coronavirus aux protéines est initié par l'interaction entre la protéine S et un récepteur. Cette interaction est spécifique et détermine le tropisme des Coronavirus pour les cellules. SARS-CoV et CoV-NL63 utilisent par exemple l'enzyme de conversion de l'angiotensine 2 comme récepteur, alors que CoV-229E utilise l'aminopeptidase N. Une protéase permet ensuite le clivage de la protéine S, puis les membranes virale et cellulaire fusionnent. Le brin d'ARN viral est inséré dans la cellule, et la capsid est abandonnée.

Traduction

L'ARN viral, grâce à sa coiffe méthylée en 5' et à sa queue poly-adénylée en 3', se fixe aux ribosomes cellulaires. La première étape consiste en la traduction de l'ARN viral en polymérase. Il existe 2 cadres de lecture ouverts (ORF pour Open Reading Frame), rep1a et rep1b, qui codent pour 2 polyprotéines pp1a et pp1ab, qui vont être clivées en nsp. Ces nsp s'assemblent pour former le complexe réplacase-transcriptase, permettant la synthèse d'ARN, puis sa réplication et sa transcription.

Réplication et transcription

L'ARN génomique viral (brin positif) est transcrit en brin négatif, qui sert de matrice à la synthèse de l'ARN génomique et des ARNm viraux. Le mécanisme de synthèse et la fonction des ARN négatifs sub-génomiques et génomiques sont encore flous ; ils servent d'amorces pour la synthèse des ARN positifs subgénomiques. Il s'agit d'une transcription imbriquée. En 5'-terminal des ARNm subgénomiques, il existe une séquence Leader de 60-90 bases. Entre chaque ORF du génome, il existe une petite séquence de 6 à 18 nucléotides, appelée Core Sequence (CS), qui est incluse dans un plus grand domaine, permettant la régulation de la transcription (Transcription Regulatory Sequence ou TRS). Deux modèles pour la synthèse des ARNm des Coronavirus s'opposent : un modèle de



transcription Leader-primed, et un modèle de transcription discontinue. Les recherches sont toujours actuellement en cours. En revanche, la production de l'ARN génomique (brin entier positif), utilise des matrices négatives et aboutit à une réplication sans interruption.

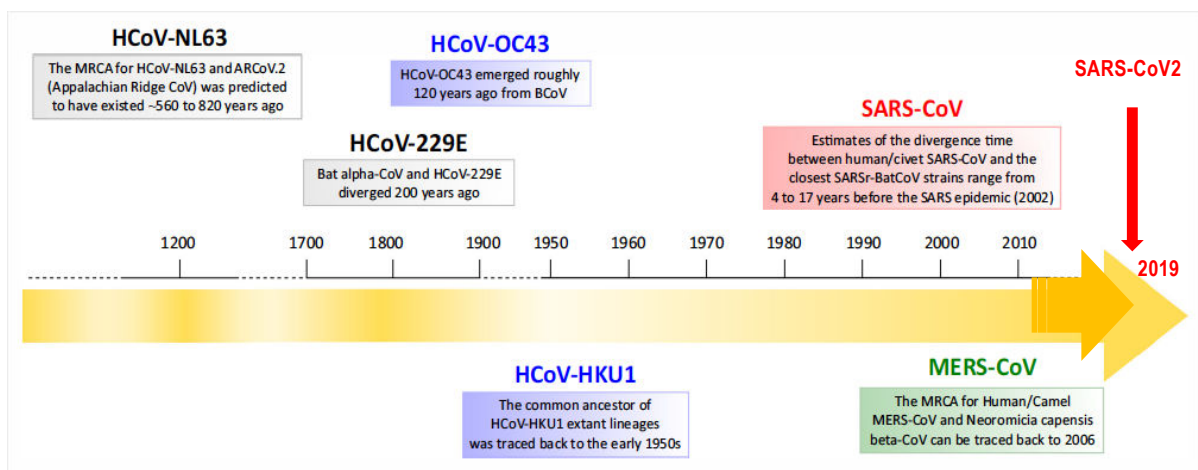
Assemblage et libération

Après la réplication et la synthèse d'ARN, les protéines structurales (S, E et M) sont insérées dans le réticulum endoplasmique, puis vont vers le Golgi. Là, les protéines N encapsident le génome viral dans la membrane du Golgi, avec les protéines structurales virales. Avec la liaison entre la capsidie et les protéines M, la membrane du réticulum endoplasmique s'invagine et bourgeonne. La capsidie assemblée se retrouve alors à l'intérieur du réticulum endoplasmique. Les protéines HE et S sont portées à l'extérieur de la membrane. Les virions matures sont formés. Ils sont alors apportés à la surface cellulaire dans des vésicules golgiennes et libérés par exocytose.

4. Pathogénicité

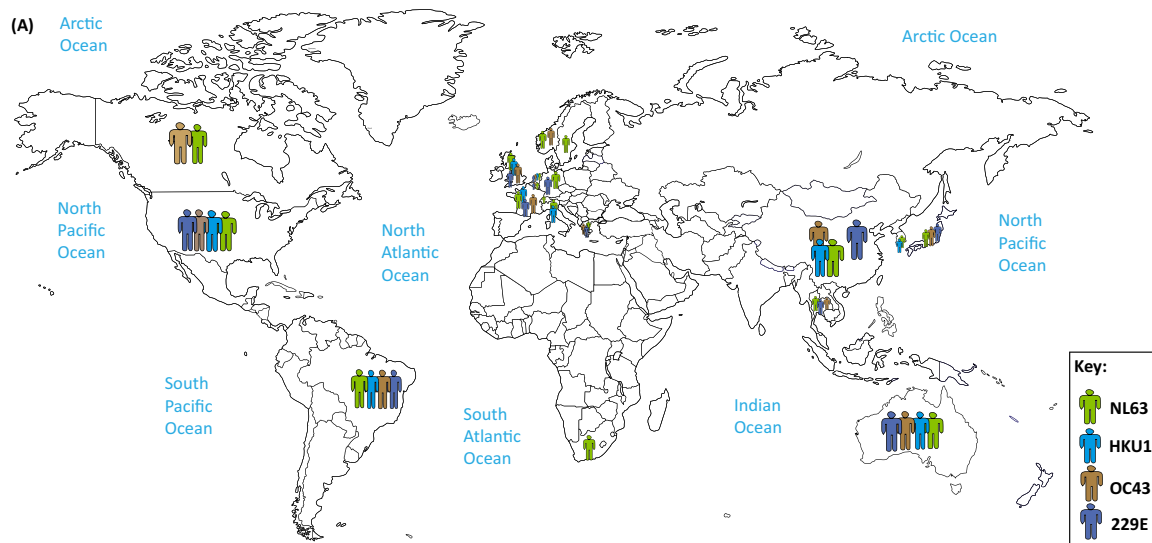
Chez les humains, les infections à Coronavirus se manifestent par des infections initialement respiratoires hautes et gastro-intestinales, et peuvent aller d'une sévérité faible (rhume « classique ») à des manifestations plus sévères comme des pneumopathies ou des bronchites. Actuellement, 7 Coronavirus sont connus pour infecter l'Homme (Figure 12): HCoV-229E (229E), HCoV-HKU1 (HKU1), HCoV-NL63 (NL63), HCoV-OC43 (OC43), severe acute respiratory syndrome coronavirus 1 et 2 (SARS-CoV1 et SARS-CoV2), et Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV).

Figure 12- Emergence des CoV humains- Selon Forni et al., 2016 (94)



CoV 2-29E et OC43 sont les coronavirus les plus fréquents, responsables d'environ 20% des rhumes « classiques » (1). CoV-229E, OC43 et NL63 sont responsables d'épidémies hivernales, alors que NL63 est prédominant en été (95). La distribution géographique des CoV dans le monde est représentée par la Figure 13.

Figure 13- Distribution géographique des CoV humains endémiques (hors SARS-CoV1, SARS-CoV2 et 2 et MERS-CoV)- Selon Su et al., 2016 (86)



CoV-229E

Découvert en 1966 (96), CoV-229E est à l'origine d'une altération de l'état général, de céphalées, d'une rhinite et d'une angine (97). 10 à 20% des patients présentent une fièvre et une toux. L'incubation est de 2 à 5 jours. Les symptômes durent entre 2 et 18 jours, et ne peuvent se distinguer des infections par les autres virus respiratoires. 229E est présent de façon ubiquitaire à travers le monde.

CoV-OC43

CoV-OC43 fut découvert en 1967 dans un prélèvement naso-pharyngé de patient présentant un rhume « classique ». Les symptômes présentés par les patients sont les mêmes que ceux décrits pour CoV-229E (96). Cependant, il n'existe pas d'immunité croisée entre 229E et OC43 (96). CoV-OC43 est également retrouvé de façon ubiquitaire à travers le monde.

CoV-NL63

CoV-NL63 a d'abord été retrouvé chez les jeunes enfants, les personnes âgées et les personnes immunodéprimées (98). Il a été identifié en 2004 aux Pays-Bas chez un nourrisson de 7 mois présentant toux, fièvre, conjonctivite et bronchiolite (99). Les infections à CoV-NL63 sont typiquement peu sévères : rhume « classique », toux, fièvre, rhinite, hypoxie. Elles se résolvent spontanément. On peut cependant



observer des laryngites sévères à CoV-NL63. CoV-NL63 est estimé responsable à 4,7% des infections respiratoires (98). Il est retrouvé de façon ubiquitaire à travers le monde.

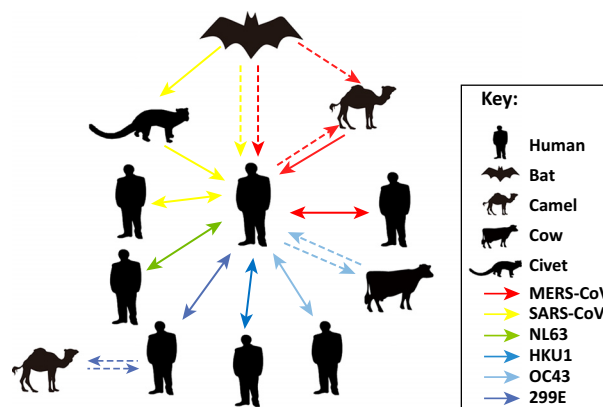
CoV-HKU1

Découvert en 2005 chez un patient de 71 ans (100) à Hong Kong, CoV-HKU1 est responsable de symptômes peu spécifiques (fièvre, rhinite et toux), mais peut également être à l'origine de pneumopathies et bronchites. Souvent peu sévère chez les enfants, il a été décrit des crises convulsives et des méningites à CoV-HKU1 (101).

5. Ecologie

Les CoV humains circulent librement dans la population humaine, s'étant adaptés à cette population et causant des infections respiratoires peu sévères chez les immunocompétents. Les hôtes idéaux des CoV sont les chauve-souris pour les Alpha et Bêta-CoV, et les oiseaux pour les Gamma et Delta-CoV Figure 14).

Figure 14- Transmission intra et inter-espèce des CoV- Selon Su et al., 2016 (86)



D. Méthodes de détection des virus respiratoires

1. Culture virale

La culture virale est la méthode de référence, mais elle est passée au second plan de nos jours. Elle consiste en l'inoculation de cellules en culture par un échantillon biologique potentiellement infecté par un virus. Le résultat est conditionné par la qualité du prélèvement initial. La culture peut être réalisée



sur différents types cellulaires, humains ou animaux. Les conditions de réalisation sont particulières, et la multiplication virale peut entraîner un effet cytopathogène. Il peut également être réalisé l'isolement viral, permettant le diagnostic des infections virales.

2. PCR Multiplex

Les PCR (*Polymerase Chain Reaction*) Multiplex sont des techniques de détection moléculaires permettant le diagnostic virologique des infections respiratoires. Elles permettent un diagnostic rapide, sous formes de kits proposant la détection d'un panel de 12 à 18 virus respiratoires, incluant parfois les bactéries intracellulaires. Depuis la pandémie, le SARS-CoV2 a été rajouté dans certaines trousse. Elles permettent la détection de la particule virale infectieuse, de la particule virale non infectieuse (défective), ainsi que du matériel génétique viral contenu dans la cellule infectée. Le résultat est rapide, et le temps technicien est limité. Elles sont plus performantes (meilleure sensibilité, meilleure spécificité) que les méthodes de culture virale (102). Elles représentent actuellement le gold standard du diagnostic virologique des IRA en soins hospitaliers.

3. Méthodes récentes

Des études ont essayé de connaître la sensibilité et la spécificité de nouveaux tests. Yahya et al. ont étudié la valeur des niveaux d'ARNm de certains potentiels biomarqueurs d'infections respiratoires chez des enfants dans les écouvillons nasaux (103), et les ont comparés aux résultats de PCR Multiplex dans les mêmes échantillons. Ils ont ainsi identifié trois marqueurs potentiels (des protéines régulées par des interférons) d'infection respiratoire virale symptomatique.

Les différents modes de prélèvement permettant d'identifier les virus respiratoires ont été comparés (104). Le prélèvement nasopharyngé par écouvillonnage a un meilleur taux de sensibilité que le prélèvement oropharyngé, mais celui-ci a un moins bon taux de sensibilité que le lavage nasopharyngé. Les auteurs recommandent donc l'utilisation des 3 méthodes afin de potentialiser au maximum le diagnostic virologique. Cependant, la comparaison du transcriptome issu de prélèvements nasaux et sanguins a montré une bonne efficacité du prélèvement naso-pharyngé dans le diagnostic des infections respiratoires virales (100), même si de grandes différences, notamment cellulaires (cellules épithéliales pour le prélèvement naso-pharyngé, leucocytes pour le prélèvement sanguin) existent.



4. Positivité des prélèvements respiratoires

La positivité des prélèvements respiratoires aux virus recherchés dépend des techniques utilisées (culture, biologie moléculaire, etc). Elle peut être très variable selon les études, la zone géographique, l'âge des patients, leur clinique (symptomatiques ou non, en soins primaires ou hospitalisés, aux urgences ou en réanimation, etc), les périodes de l'année (épidémies saisonnières, différentes selon les hémisphères).

La présence asymptomatique de virus dans le nasopharynx pourrait être expliquée par le fait que les PCR Multiplex pourraient détecter la présence du virus avant la phase symptomatique de l'infection. Par exemple, chez des enfants asymptomatiques, consultant leur MT sans symptôme d'ARI, il a été trouvé 28% de prélèvements positifs (105), surtout chez les nourrissons. Dans une étude de 2003, 20% de prélèvements réalisés chez des nourrissons asymptomatiques étaient positifs au rhinovirus (106). Dans une étude de 2011, 12% de nourrissons asymptomatiques étaient positifs à au moins 2 virus (105). Cependant, chez les enfants, il se pourrait également que les symptômes soient minorés, les jeunes enfants ne répondant pas directement eux-mêmes, mais par l'intermédiaire de leurs parents, aux questionnaires de renseignements cliniques. Dans une étude réalisée chez des enfants de moins de 18 ans se présentant aux urgences avec des symptômes d'IRA, 72% étaient positifs à au moins un virus (50).

E. Études en soins primaires

Peu d'études réalisées en soins primaires portent sur les IRA. En effet, la recherche est principalement tournée vers le secteur hospitalier, sur des patients aux âges extrêmes de la vie, ou atteints de comorbidités. Cependant, le recours aux soins primaires dû aux IRA est également plus important chez les jeunes enfants et les personnes âgées (5). Dans une revue de la littérature portant sur le lien entre coinfections virales et sévérité clinique, seulement 32% des études réalisées portaient sur des patients ambulatoires (107). De plus, lorsque ces études sont réalisées, il s'agit le plus souvent de patients adultes qui sont inclus.

Une étude multicentrique européenne réalisée entre 2007 et 2010 avait inclus des adultes présentant des ARI basses en soins primaires, et comparé les résultats à des contrôles (108). 59% des prélèvements réalisés étaient positifs à un pathogène respiratoire : 11% de bactéries seules, 38% de virus seuls, et 10% de codétections virus/bactéries. Les virus les plus souvent retrouvés étaient l'HRV (20%), puis la grippe (10%) et les CoV (7%). Le taux de positivité des PCR réalisées chez des adultes en soins primaires avec symptômes d'IRA en Europe était 46% (étude parue en 2020) (109). En 2019, chez des adultes suspects d'IRA basse se présentant chez leur médecin généraliste, un prélèvement de gorge était positif dans 54% des cas (21). Une étude publiée en 2020 ayant inclus 3070 patients



symptomatiques et 1677 asymptomatiques consultant leur médecin traitant dans 16 centres répartis dans 11 pays européens, le taux de prélèvements positifs à HRV était de 19% chez les symptomatiques et 4% chez les asymptomatiques, mais la population n'était constituée (110) que d'adultes. Dans une étude publiée en 2019 et issue des réseaux Sentinelle français, incluant des patients se présentant chez leur médecin généraliste ou pédiatre pour des symptômes de syndrome pseudo-grippal (111), et analysant les résultats virologiques de prélèvements naso-pharyngés, le VRS était associé à la dyspnée, et la rhinorrhée était associée au HRV.

Environ 60% des prélèvements réalisés chez des enfants se présentant chez leur médecin généraliste avec des symptômes d'ARI entre 2011 et 2013 en Angleterre étaient positifs pour un virus au moins (112). Le type de prélèvement en soins primaires pose également le souci de la reproductibilité, de la faisabilité, de la facilité de réalisation du geste. Le prélèvement oropharyngé est simple, accessible facilement, notamment chez l'enfant, et peu redouté par les praticiens de soins primaires (113). Le prélèvement naso-pharyngé, peu connu avant la pandémie à SARS-CoV2, était appréhendé par les acteurs des soins primaires.

Dans l'avenir, il sera sûrement possible de réaliser des tests rapides et faciles, au lit du malade, en soins primaires tout d'abord. Ces tests sont appelés POCT (pour point-of-care tests). Ils sont conçus pour pouvoir être réalisés par du personnel non professionnel (patient lui-même), ou paramédical (infirmier). La valeur de l'apport des POCT microbiologiques, notamment en terme d'économie d'antibiotiques, est actuellement évaluée (114).

F. Codétéctions virales

Plusieurs virus peuvent infecter de façon concomitante ou séquentielle les voies respiratoires. Les codétéctions virales sont définies par la détection de plusieurs virus sur un même prélèvement. Quand plusieurs pathogènes co-circulent, il peut y avoir une forme de coopération ou de compétition entre ces pathogènes (115). Cela est assez bien décrit entre la grippe et le pneumocoque (116) : l'infection virale entraîne une sensibilisation à une colonisation secondaire bactérienne. Le concept d'interférence virale a été décrit dès les années 1960. Il a été mis en évidence au niveau cellulaire, au niveau de l'hôte et au niveau des populations. Des mécanismes communs ont été décrits sur différents épithélias respiratoires, impliquant une réponse interféron-médiée. Une immunité transitoire non spécifique induite par une première infection virale est décrite: des gènes stimulés par la voie des interférons sont produits (117) (118) (119).

La fréquence des codétéctions virales chez des patients présentant des symptômes d'infection respiratoire aiguë est très variable selon les études, entre 25 à 70% (120) (121) (122) (123) (124) (34).



Selon une revue de la littérature de 2014 sur les études portant sur le lien entre coinfections virales et sévérité des ARI (107), 74% d'entre elles recrutaient des enfants de moins de 6 ans. Il y a donc peu de données de la littérature concernant la population adulte, et surtout, aucune étude regroupant l'ensemble de la population en soins primaires.

1. Interactions virus/virus

Les interactions virus/virus restent encore inconnues, et semblent différentes selon les différents virus respiratoires, expliquant les différences de fréquence des co-détections entre ces mêmes virus. Peu d'études tentent d'expliquer ces interactions. Le phénomène d'interférence entre les virus, dans lequel l'infection d'un virus altère la susceptibilité d'un hôte à un second virus, reste encore inexpliqué. L'infection par un premier virus peut augmenter ou réduire l'infection et la réplication d'un second virus, résultant en une interaction positive (additive ou synergique) ou négative (antagoniste). Des modèles expérimentaux ont tenté d'expliquer ces relations.

Différents mécanismes ont été proposés pour tenter d'expliquer cette interférence virale : blocage des récepteurs par le premier virus respiratoire présent, compétition virale pour les ressources de l'hôte, induction par les virus de la réponse immunitaire innée ou adaptative contre un ou plusieurs virus. DaPalma et al. ont décrit 15 sous-types différents d'interactions virus/virus (125).

D'autres études ont montré que les virus respiratoires, même en l'absence de symptômes, induisent une réponse des voies respiratoires, en activant des gènes stimulés par les interférons (ISGs) (118) (Figure 15). Cette réponse est initiée quand les particules virales sont reconnues par le système immunitaire inné et conduit à la production d'interférons de types I et III, et donc à la stimulation des ISGs (119). Cette réponse est connue pour être un mécanisme efficace de défense contre beaucoup de virus. L'induction des ISGs par un premier virus pourrait limiter l'infection et la réplication d'un second virus. Pour échapper au système immunitaire, les virus respiratoires ont développé des mécanismes qui empêchent l'induction et l'action antivirale des IFN. Des mécanismes d'interaction négative virus-virus ont été décrits au niveau cellulaire, notamment le blocage ou la réduction des récepteurs de surface et la compétition pour les ressources et les facteurs. D'autres mécanismes conduisant à la réduction ou l'augmentation de la réplication virale incluent l'inhibition ou la stimulation du gène promoteur d'un virus par un produit de gène d'un virus interférant, mais ces mécanismes n'ont pas encore été démontrés pour les virus respiratoires.



Figure 15- Mécanismes de reconnaissance des virus par les cellules- Selon Piret et al. (126)

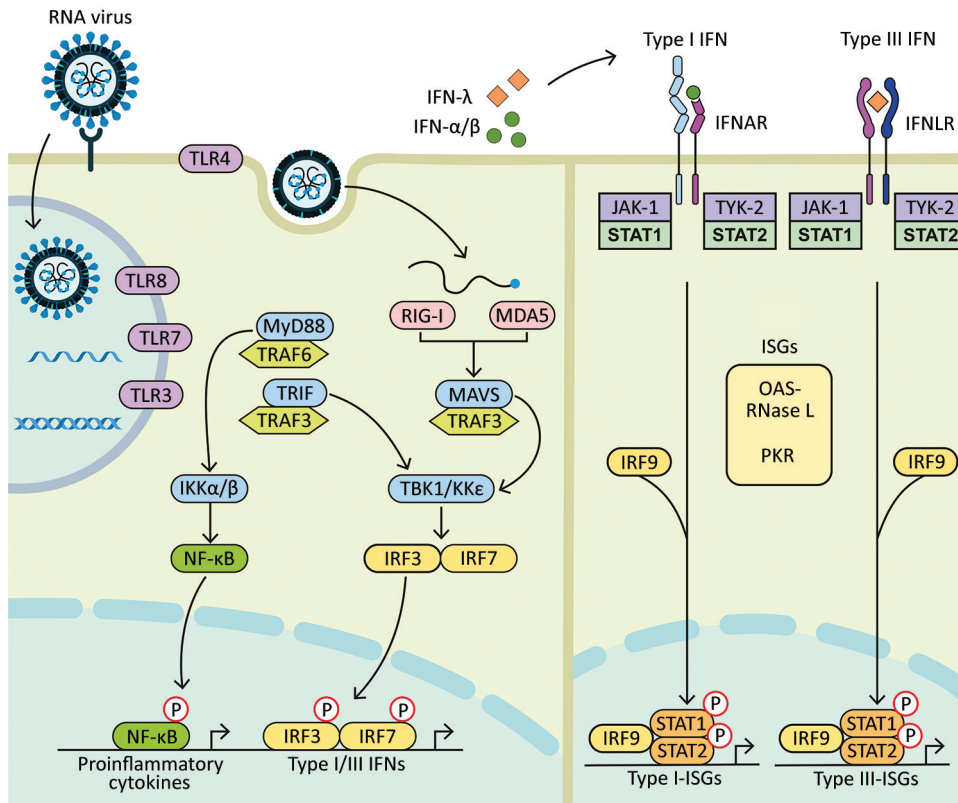


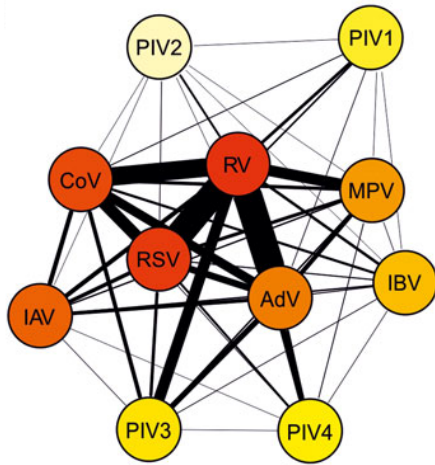
Diagramme montrant comment les composants des virus à ARN sont reconnus par les TLR situés à la membrane plasmique (TLR4, détection des glycoprotéines virales) et dans le compartiment endosomal (TLR3, détection de l'ARN double brin ; TLR7 et TLR8, détection de l'ARN simple brin). Les intermédiaires de réplication du virus et les génomes répliqués sont également reconnus par les capteurs d'ARN cytosoliques, RIG-I et MDA5. Les protéines adaptatrices en aval, MyD88 pour TLR4, TLR7 et TLR8, TRIF pour TLR3 et TLR4, et MAVS (pour MDA5 et RIG-I) sont activées. Ces activations déclenchent des cascades par l'intermédiaire de TRAF3 et TRAF6, TBK1 et IKK α , IKK β et IKK ϵ , ce qui conduit à une phosphorylation et la translocation nucléaire de NF- κ B, IRF3, et IRF7. Ces changements entraînent la production de cytokines pro-inflammatoires et d'IFN de type I et de type III. Les IFN- α/β sécrétés et les IFN- λ se lient à leurs récepteurs spécifiques (IFNAR et IFNLR) dans les cellules infectées et les cellules voisines. L'activation de JAK-1 et TYK-2 entraîne la phosphorylation de STAT1 et STAT2. Après translocation dans le noyau, STAT1 et STAT2 phosphorylés forment un complexe avec IRF9 pour induire l'expression des ISG, tels que OAS-RNase L et PKR, et l'établissement d'un programme antiviral. IFN, interféron ; IFNAR, récepteur IFN- α/β ; IFNLR, récepteur interféron- λ ; IKK, inhibiteur du facteur nucléaire- κ B kinase ; ISGs, gènes stimulés par l'IFN ; IRF, facteur de régulation de l'IFN ; JAK-1, Janus kinase 1 ; MAVS, protéine de signalisation antivirale mitochondriale ; MDA5, gène 5 associé à la différenciation du mélanome ; MyD88, facteur 88 de différenciation myéloïde ; NF- κ B, facteur nucléaire- κ B ; OAS, 2'-5' oligoadénylate synthétase ; P, protéine phosphorylée ; PKR, récepteur de protéine kinase ; RNase L, endoribonucléase latente ; RIG-I, gène I inducible par l'acide rétinoïque ; STAT, signal transducteur et activateur de la transcription ; TBK 1, TANK binding kinase 1 ; TLRs, Toll-like receptors ; TRAF, tumor necrosis factor receptor-associated factor ; TRIF, TIR-domain-containing adapter-inducing IFN- β ; TYK-2, tyrosine kinase 2.



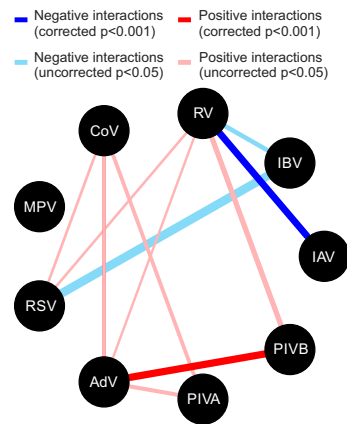
La codétection la plus fréquemment retrouvée est la coinfection du RSV et de l'HRV (50). En 2016, Visseaux et al. ont publié les résultats des PCR Multiplex d'enfants de moins de 15 ans admis dans deux hôpitaux français. Le taux de codétections virales global était de 9,2%, avec des taux plus importants chez les enfants âgés de 6 à 36 mois (127). Il est donc décrit de probables différences entre les différents âges. L'équipe de Nickbaksh a tenté de représenter de différentes façons les potentielles interférences entre les virus respiratoires dans différentes cohortes (Figures 16B et C), en identifiant les virus le plus souvent présents dans les coinfections : VRS, HRV, CoV et IAV (Figure 16A).

Figure 16- Interférences virales- Selon Nickbaksh (128) (115)

A. Virus les plus souvent impliqués dans les codétections virales



B. Interactions positives ou négatives entre les différents virus respiratoires



C. Interactions négatives et positives entre les virus grippaux et non grippaux à l'échelle de la population

- Negative adjusted correlation
- Positive adjusted correlation
- Negative unadjusted correlation
- + Positive unadjusted correlation

AdV																				
CoV																				
IAV			+																	
IBV			+	+																
MPV			+	+	+															
PIV1			-	-	-	-														
PIV2										+										
PIV3			+						+		-									
PIV4			-	-					-											
RSV			+	+	+	+			+											
RV			-	-	-	-														
	AdV	CoV	IAV	IBV	MPV	PIV1	PIV2	PIV3	PIV4	RSV	RV									

Les corrélations significatives non ajustées issues de l'analyse bivariée des corrélations croisées appliquant la méthode des rangs de Spearman aux prévalences mensuelles des infections virales sont indiquées en gris, les corrélations négatives et positives étant signalées par - et +, respectivement, et les paires de virus non corrélées étant indiquées en blanc. Les corrélations dérivées de l'analyse bayésienne de cartographie des maladies, qui tiennent compte des fluctuations de la fréquence des tests, de l'autocorrélation temporelle et d'autres facteurs de corrélation saisonnière, sont indiquées en bleu (négatif) et en rouge (positif), et confirment de manière significative les interactions virus-virus.



VRS et HRV

La codétection la plus souvent retrouvée est VRS/HRV tant chez des enfants en soins primaires que des enfants hospitalisés (129). Elle est estimée à environ 11% chez des enfants de moins de 2 ans hospitalisés pour fièvre et/ou symptômes respiratoires (34).

La détection de VRS est associée à une probabilité diminuée de co-infections à HRV, indiquant une interaction négative virus-virus (130). Cela suggère que durant ou au décours immédiat d'une infection à HRV, l'hôte pourrait être réfractaire aux autres virus. Dans une étude de cohorte prospective de 2016, Karppinen et al. ont montré qu'il existait une association négative entre le VRS et l'HRV chez des nourrissons de moins de 24 mois : le taux d'infections à HRV est plus faible chez des enfants qui ont eu une infection récente à VRS comparés aux enfants qui n'ont pas été infectés (8% versus 14%, $p < 0,05$) (131).

IAV et RSV

Une diminution de la fréquence de RSV a été observée durant les épidémies grippales en Norvège (132), suggérant une interférence virale. Dans une étude parue en 2022 (133), Haney et al. ont montré que la co-infection de cellules épithéliales bronchiques par la grippe et le VRS génère des protéines virales issues des deux virus se co-localisant à la surface apicale des cellules épithéliales. Il a également été démontré in vitro qu'en cas de co-infections, le virus de la grippe se répliquait de façon plus intense qu'en cas de simple infection, contrairement au VRS qui se répliquait moins en cas de co-infection.

IAV et HRV

Plusieurs études ont montré que l'HRV avait peut-être retardé la circulation de la grippe H1N1 en Europe en 2009 (134) (135). Les co-détections HRV/IAV sont significativement moins fréquentes qu'attendues dans les modèles expérimentaux, suggérant une interférence négative entre ces deux virus (117). L'infection par HRV induit l'expression de certains ISGs et le blocage des voies de signalisation IFN, restaurant la réplication du virus de la grippe (117). Suite à la pandémie de grippe en 2009, une étude a montré que l'infection des voies respiratoires par un virus pouvait bloquer une infection par un second virus (117). En effet, l'infection antérieure par le rhinovirus inhibe l'infection par la grippe A en activant les défenses antivirales dans les tissus cibles de ces virus, l'épithélium respiratoire. Ceci expliquerait comment la pandémie grippale de 2009 a été stoppée par l'arrivée de l'épidémie saisonnière automnale de rhinovirus.

2. Codétections virales et données cliniques

La prévalence des prélèvements positifs à plusieurs virus étant importante, une des questions qui se pose est celle d'une corrélation entre la clinique et les symptômes présentés par les patients et les codétections virales. En effet, des études décrivent des prévalences différentes entre groupes de



population d'âges différents, mais également entre patients de sévérité différente. La principale question posée est : y a-t-il une association entre codétectons virales et sévérité des pathologies présentées par les patients ?

En premier lieu, la prévalence des codétectons semble être liée à l'âge des patients présentant des IRA. Les études incluant des enfants de moins de 5 ans reportent des fréquences de codétectons virales plus importantes que celles incluant des adolescents et des jeunes adultes. Une étude de 2016 (128) analysant les prélèvements respiratoires de 44230 infections respiratoires entre 2005 et 2013 a montré que les codétectons virales étaient beaucoup plus fréquentes chez les patients de moins d'un an. Chez des enfants hospitalisés pour IRA et positifs à CoV, l'âge était significativement plus jeune en cas de codétecton avec un autre virus (85).

Il n'est pas clairement établi que les codétectons virales sont associés à des infections plus sévères (107). Certaines études ont rapporté une sévérité plus importante chez les enfants avec codétectons (136), alors que d'autres ne l'ont pas retrouvée (137) (138) (139) (140). Le taux de coinfections semble être plus important dans les cohortes de patients hospitalisés versus des patients en soins ambulatoires (124)(141)(142). Notre équipe avait montré qu'il existait une sévérité plus importante de l'infection respiratoire chez les nourrissons hospitalisés pour bronchiolite infectés par le VRS seul comparés à ceux infectés à HRV seul (143). Il n'avait pas été démontré de sévérité supérieure chez les nourrissons présentant une coinfection VRS/HRV. Selon une revue de la littérature portant sur l'association possible entre coinfections virales et sévérité des ARI, dans 5 études sur 8, la coinfection virale augmentait le risque d'hospitalisation en hospitalisation conventionnelle. Certaines retrouvaient un risque augmenté de passage en soins continus, d'autres non. Il n'y avait pas de réelle preuve d'association entre les codétectons virales et le risque de bronchiolite ou de pneumopathie. Une étude réalisée en soins primaires chez des enfants a montré un lien entre la détection de virus respiratoires et le pronostic des patients inclus (112) : les détections du VRS, d'Influenza A ou B étaient associées à un score de sévérité supérieur ; la détection de l'HRV était associée au contraire à un score de sévérité plus bas. Cette étude a également montré que la positivité des prélèvements était associée à un âge plus jeune et que le délai de consultation était plus court. Dans une étude rétrospective menée entre 2017 et 2019 sur des nourrissons hospitalisés pour ARI basse à VRS, la co-infection à VRS/PIV3 était associée un risque augmenté de maladie sévère (144). La durée moyenne des symptômes de nourrissons avec ARI était plus élevée en cas de codétectons VRS/HRV qu'en cas de mono-infection par ces virus (131). La durée de séjour a été décrite comme plus importante en cas de coinfections VRS/HRV qu'en cas de mono-infection chez des nourrissons hospitalisés pour bronchiolite (145). Une étude publiée en 2022 (34) a retrouvé chez des enfants de moins de 2 ans hospitalisés que les enfants coinfectés à HRV étaient plus susceptibles de présenter des sifflements, une cyanose, une détresse respiratoire et une radiographie thoracique anormale, ainsi qu'un recours à l'oxygénothérapie. Il n'a pas été trouvé de différence d'hospitalisation, de recours aux soins intensifs, de durée de séjour ou de recours à l'oxygénothérapie entre des enfants hospitalisés pour ARI et positifs pour HRV seul ou HRV



en codétection (50). Il a été montré un risque augmenté d'hospitalisation en cas de coinfection VRS/BoV chez les enfants de moins de 3 ans (146) et Grippe A/CoV chez des patients de tous âges (147). Pourtant, certaines études ont retrouvé un risque réduit d'hospitalisation en cas de coinfection à VRS/ADV (123) et VRS/HRV (148). Les résultats des études sont donc hétérogènes, et beaucoup portent sur des cohortes pédiatriques hospitalières.

G. Charges virales respiratoires

1. Définitions

Actuellement, bien que des résultats qualitatifs fassent partie du diagnostic virologique quotidien hospitalier, il n'existe pas de protocole ou de méthode pour la détermination des charges virales respiratoires. En effet, aucun protocole n'est établi, quel que soit le virus respiratoire étudié. Les études sont hétérogènes concernant son calcul, et donc ses valeurs. En effet, la plupart études utilisent la valeur de seuil cycle (Ct pour *Cycle threshold*) pour estimer la charge virale, se basant sur le fait que plus le Ct est bas, plus la charge virale est élevée. Dans une étude parue en 2022 (149) portant le lien entre charges virales de VRS et clinique, les auteurs proposent de classer les charges virales de prélèvements naso-pharyngés en 3 niveaux : élevées si le Ct est inférieur à 25, intermédiaires si le Ct est compris entre 25 et 35, et basses si le Ct est supérieur à 35. En cas de codétection virale, certaines études définissent l'infection « primaire » par l'agent dont la charge virale est la plus élevée retrouvée (150).

Pour obtenir une valeur quantitative exacte, il faut utiliser la PCR en temps réel ou PCR quantitative. Celle-ci mesure le nombre d'amplicons (portions d'ADN définies par un couple d'amorces). Le Ct est alors la base servant à calculer la quantité d'ADN de façon absolue. Pour cela, on effectue une PCR en temps réel sur des échantillons de dilution croissante pour obtenir une courbe étalon qui correspond au couple d'amorces utilisé.

2. Charges virales et données cliniques

Doser les charges virales respiratoires fait partie de la recherche médicale, et son intérêt est encore discuté. La question de l'association entre charges virales respiratoires et sévérité des IRA est soulevée. En effet, les études se limitent la plupart du temps à une population cible (enfants, personnes âgées), dans un contexte particulier (soins intensifs, soins primaires, etc), et portent sur un virus respiratoire. Elles sont donc peu comparables les unes aux autres, rendant les résultats difficilement extrapolables. La plupart des études portent sur les charges virales à HRV et VRS. Dans une étude



parue en 2011, les enfants symptomatiques avaient des charges virales VRS et HRV plus élevées que les asymptomatiques dans les mêmes classes d'âge (0-1 an, 1-2 ans et 2-6 ans) (105).

Concernant le VRS, due à la prévalence importante de celui-ci dans les ARI du nourrisson, beaucoup d'études incluent des jeunes patients. Dans une étude parue en 2010 avec de charges virales VRS dosées sur des aspirations naso-pharyngées, il a été mis en évidence une association entre charge virale et sévérité chez des nourrissons lors d'une première ARI (150). Des enfants de moins d'un an avaient une charge virale à VRS plus élevée que ceux plus âgés en soins primaires (129). En revanche, chez les enfants de plus de 2 ans, les charges virales étaient significativement plus élevées chez les enfants hospitalisés que les enfants en soins primaires de la même classe d'âge (129). Cependant dans cette étude, les charges virales respiratoires de VRS n'étaient pas normalisées. Cela suggère que la charge virale serait associée à la pathogénicité et à la sévérité de l'infection respiratoire plus chez les grands enfants que chez les plus jeunes. Zhou et al (151), et Hasegawa et al (152) ont montré qu'une charge virale à VRS plus importante était associée à une sévérité plus importante de la maladie, ainsi qu'à la durée de séjour et aux symptômes. Cependant, Martin et al (153) n'ont pas retrouvé cette corrélation entre charge virale à VRS et sévérité. Chez des enfants de moins de 2 ans hospitalisés, une charge virale à VRS importante était associée à une durée de séjour plus longue (154). Chez des enfants de moins de 5 ans hospitalisés, une charge virale à VRS plus importante était associée à un recours plus important à l'oxygène (149).

Concernant l'HRV, et due à sa prévalence à tous âges de la vie, les études incluent le plus souvent des adultes. La plupart des études ne montrent pas de lien entre charges virales à HRV et sévérité de l'ARI. Une étude 2017 a comparé les charges virales de patients ambulatoires versus des patients en soins intensifs (155) : les charges virales HRV n'étaient pas significativement différentes entre ces deux populations de patients, sous-entendant que la sévérité de l'IRA n'est pas corrélée à la charge virale respiratoire pour ce virus. Les charges virales étaient similaires selon les classes d'âge (toutes les classes d'âge étaient représentées). Une étude réalisée en 2012 en soins primaires a montré qu'il n'y avait pas de différence de charge virale HRV entre des patients hospitalisés et des patients ambulatoires (156). Dans les études incluant les enfants, les charges virales HRV semblent liées à la sévérité de l'ARI : une étude incluant 694 nourrissons présentant une bronchiolite à HRV a montré qu'il n'y avait pas d'association entre la charge virale et la durée de séjour hospitalier (27). Une étude japonaise a montré qu'il existait chez les enfants entre 11 mois et 3 ans, une association entre charge virale et sévérité de l'ARI (157). Celle-ci n'était plus observée après l'âge de 4 ans, ni avant l'âge de 11 mois. Chez des enfants (<21ans) hospitalisés ou non avec des symptômes d'ARI, la charge virale à HRV était significativement supérieure lorsque HRV était monodétecté versus codétecté. Chez des patients ambulatoires âgés de 7 à 95 ans, les charges virales respiratoires HRV élevées étaient associées à des symptômes respiratoires plus graves (35). Les études distinguent également les charges virales HRV-A, HRV-B et HRV-C, tentant de déterminer quel type est le plus pathogène. Dans une étude réalisée



chez des adultes en soins primaires, le HRV-A était associé à un risque augmenté d'IRA basse comparé à HRV-B et HRV-C (110). Chez des patients ambulatoires âgés de 7 à 95 ans avec une IRA, les charges virales étaient plus élevées dans les prélèvements positifs à HRV-C comparés à HRV-A et HRV-B (35). Dans une étude de 2020 (110) réalisée chez des adultes en soins primaires, la charge virale à HRV-A était plus importante que celle de HRV-B. En outre, les résultats des études individuelles sont difficiles à interpréter en raison des différences entre les méthodes de PCR en temps réel et les techniques d'échantillonnage, et ils peuvent donc ne pas être généralisables à d'autres populations de patients et contextes cliniques.

Enfin, les charges virales de prélèvements naso-pharyngées à HRV ont été rapportées à la présence ou non d'une virémie concomitante chez des enfants hospitalisés (1 mois-14 ans) pour ARI (158) : la présence d'une virémie à HRV est associée à une charge virale plus importante, ainsi qu'à une maladie plus sévère. La prévalence estimée d'une virémie à HRV chez des enfants hospitalisés est d'environ 11% chez des patients avec prélèvements naso-pharyngés positifs (159). Dans une étude de 2011 incluant des enfants hospitalisés pour ARI sévère, il a été montré une différence de fréquence de virémie entre HRV-C (plus élevée) et HRV-A et HRV-B, suggérant une pathogénicité différente entre ces espèces (160).



Objectifs du travail

Comprendre et traiter les infections virales respiratoires sont des enjeux majeurs pour la santé respiratoire de l'enfant, et en conséquence, pour celle de l'adulte, avec pour objectif de préserver le capital respiratoire. Il est maintenant acquis que les infections virales sont responsables d'une importante morbidité respiratoire : bronchiolite aiguë, asthme du nourrisson, crises d'asthme aigu, et des conséquences à long terme avec des bronchopneumopathies chroniques obstructives (BPCO) précoces. A l'orée de nouvelles thérapeutiques antivirales, les questions qui se posent au clinicien peuvent être classées en trois catégories principales: 1°) le rôle du terrain et de l'immunité innée du patient, 2°) les facteurs de risques extrinsèques, et 3°) les facteurs de risque liés au virus lui-même, notamment à son niveau de réplication sur le site de l'infection: la charge virale respiratoire (exprimée en nombre de particules infectieuses ou de copies du génome viral par ml de prélèvement).

Les techniques moléculaires multiplex permettant la détection simultanée des principaux virus responsables d'infections respiratoires (panel viral respiratoire) constituent actuellement les tests de référence pour le diagnostic virologique des infections respiratoires en médecine humaine. Ce diagnostic respiratoire est essentiellement réalisé en milieu hospitalier, sur un prélèvement respiratoire haut (écouvillon naso-pharyngé, aspiration nasale) et n'est le plus souvent pas quantitatif (résultat de type présence / absence).

Parmi les virus respiratoires, le VRS reste le plus fréquent et le plus agressif chez l'enfant de moins de 3 ans. Il faut noter que la majorité des données disponibles proviennent de patients hospitalisés et donc que la réalité en milieu communautaire est mal connue. En routine hospitalière, une codétection virale (détection de plusieurs espèces virales) est retrouvée dans 20 à 30% des échantillons respiratoires prélevés. La signification de ces codétections n'est pas établie et, à l'heure actuelle il n'est pas possible de différencier en routine une véritable co-infection, de la survenue d'infections séquentielles. Pourtant, leur caractérisation précise aurait un intérêt majeur dans le cadre de la mise à disposition prochaine de traitements antiviraux spécifiques (molécules antivirales ou anticorps monoclonaux), et de la connaissance du statut de l'infection (risque de transmission en milieu de soins).

L'hypothèse de la première partie de cette thèse était que la charge virale respiratoire pourrait constituer un marqueur individuel pronostique de l'infection à un temps donné. En effet, la charge virale est variable et permet de distinguer une infection répliquative à haut niveau (phase aiguë) ou à bas niveau (phase de clairance). L'accès à la dynamique de la réplication virale permettrait une prise en charge plus ciblée et plus efficace du patient. Pour avoir du matériel sur lequel pouvoir développer notre



hypothèse, nous avons repris une première biothèque issue de la cohorte Guérande, qui rassemblait 719 prélèvements respiratoires réalisés dans plusieurs urgences pédiatriques françaises chez des enfants de moins de 12 mois présentant un premier épisode de bronchiolite aiguë.

Nous avons créé le projet « ECOVIR » (Etude des CO-détections VIRales dans les prélèvements respiratoires), qui est une étude prospective, multicentrique, en lien avec le réseau des médecins généralistes de ville hauts et bas-normands (36 médecins investigateurs au total). Nous avons inclus 685 patients entre le 21 janvier 2019 et le 11 avril 2019, puis du 04 octobre 2019 au 14 mars 2020, âgés de 2 mois à 94 ans, qui présentaient des symptômes de virose respiratoire. Ces prélèvements, recueillis chaque semaine dans les 8 centres investigateurs, ont été aliquotés, extraits et analysés en PCR-Multiplex afin de caractériser l'infection virale responsable des symptômes des patients inclus. Chaque médecin généraliste remplissait des critères cliniques lors de l'inclusion du malade, et ce dernier était contacté pour nos soins à J7 afin de répondre à des questions d'ordre sociodémographique, d'ordre écologique, mais également sur l'évolution des symptômes de virose.

Parallèlement, nous avons mis au point des techniques de PCR quantitative des Rhinovirus, grâce notamment à la mise au point d'un plasmide multivalent. Nous avons également réalisé le géotypage de tous les prélèvements positifs à Rhinovirus issus de l'étude ECOVIR ainsi que de la cohorte GUERANDE, afin de faire une étude phylogénique. Nous avons également mis au point des méthodes de PCR quantitatives des VRS (A/B). Le but était de développer et valider analytiquement une technique de quantification et de valider analytiquement une technique de quantification de charges virales respiratoires, et de déterminer leur apport diagnostique en cas de codétection virale dans les prélèvements respiratoires hauts.



Protocoles, matériels et méthodes

A. Etude ECOVIR

1. Mise en place

L'étude ECOVIR (pour Etude des COdétections Virales dans les prélèvements Respiratoires) était une étude prospective, observationnelle, multicentrique, qui a débuté le lundi 21 janvier 2019.

Il s'agit d'une étude qui a été réalisée en lien étroit avec le Département de Médecine Générale (DMG) de Rouen, contacté dès mai 2018. Au total, 11 réunions de mise en place de l'étude ont eu lieu avec le DMG Rouennais (Annexe 1 avec compte-rendu de réunions). Cinq internes de médecine générale rouennais ont été recrutés début septembre 2018. Leur participation active au cours des deux saisons épidémiques était requise. Il s'agissait donc d'internes en 3^{ème} semestre d'internat de médecine générale. Leur thèse d'exercice a découlé de ce projet clinico-biologique. Pour cela, nous avons donc intégré les questions utiles à l'écriture de leur thèse dans les questionnaires de recueil de données d'ECOVIR.

Une fois le protocole rédigé, le dossier de demande au CPP a été écrit en septembre 2018, avec l'aide du Pr Astrid Vabret, du Pr Christophe Marguet, du Dr Meriadeg Le Gouil, de Fabien Chaillot (Chargé des affaires réglementaires, CHU Caen) et de Rémy Morello (Praticien Hospitalier- Responsable de l'unité- Unité de Biostatistique et de Recherche Clinique- CHU Caen). Il a été envoyé le 26 septembre 2018, est passé en Commission le 19 novembre 2018 au sein du CPP Est II. Au décours un avis favorable a été dressé, avec demandes de modifications mineures. Celles-ci ont été faites, et le dossier a été renvoyé le 14 décembre 2018. L'accord définitif a été émis le 07/01/2019.

2. Appel d'offre Innov'Eclair

Pour renforcer l'accompagnement déployé par l'établissement en faveur de la recherche, et en complément de l'Appel à Projet Innovation coordonné par le Groupe d'Appui Pertinence Innovation (GAPI) et de l'Appel à Projets Interne de Recherche (APRI), la direction générale du CHU de CAEN Normandie et le pôle Recherche, via la Délégation à la Recherche Clinique et à l'Innovation et sa cellule Innovation mettait en place un Appel à Projet interne dédié à l'Innovation « INNOV'ECLAIR » dans le but de favoriser la détection, l'émergence, et la mise en œuvre rapide de projets d'innovation dans l'établissement.

Dans ce contexte, nous avons répondu à cet appel d'offre. Nous avons rencontré la Délégation à la Recherche Clinique (DRCI) et la Cellule Innovation Diagnostique Thérapeutique (CIDT) courant décembre 2019, après leur avoir envoyé notre projet (Annexe 2). Nous avons demandé 6000 euros pour la première saison : 1000 euros pour financer les déplacements liés au rapatriement des échantillons au laboratoire de Virologie de Caen, 3000 euros pour l'échantillonnage et 2000 euros pour



la mise en collection au Centre de Ressources Biologiques (CRB) InnovaBio. Notre dossier a été étudié, et nous avons reçu les 6000 euros demandés pour l'année 2018.

3. Première saison

a. Rencontre avec les médecins généralistes des maisons médicales normandes

Les responsables des DMG de Rouen et de Caen ont pris le premier contact avec les médecins susceptibles d'être intéressés par ECOVIR dans des maisons de santé réparties sur l'ensemble du territoire normand (Haute et Basse Normandie). Nous avons alors pris rendez-vous avec les potentiels médecins investigateurs au décours de ce premier contact, si l'accueil du projet avait été positif. Nous avons rencontré les médecins généralistes des maisons médicales entre le 8 et 29 janvier 2019. Les réunions de présentation avaient lieu dans les différentes maisons médicales normandes, sur le temps du déjeuner la plupart du temps. Une présentation de l'étude était réalisée, d'une durée d'environ 20 minutes (Annexe 3). Puis les médecins généralistes intéressés par le projet étaient recrutés, et formés au prélèvement naso-pharyngé. Trente et un médecins généralistes investigateurs (MGI) ont été ainsi recrutés (Annexe 4). Une classe d'âge était attribuée à chacun, en fonction de leur patientèle. En effet, nous avons séparé les patients inclus en 6 classes d'âge : moins de 24 mois (« nourrissons »), 2-5 ans (« jeunes enfants »), 6-17 ans (« enfants »), 18-64 ans (« adultes »), 65-74 ans (« jeunes séniors ») et plus de 75 ans (« séniors »).

L'objectif donné aux MGI était d'inclure 3 patients par semaine pendant la période d'inclusion. Il n'était pas imposé de moments d'inclusion. Ils pouvaient réaliser les inclusions quand ils le souhaitaient pendant les jours d'inclusion. Nous leur remettions ensuite le matériel nécessaire à l'inclusion. Le matériel mis à disposition de chacun était une boîte en carton contenant 30 sachets. Chaque sachet contenait le document d'information à remettre au patient après l'avoir signé, un écouvillon floqué et un tube de milieu de transport virologique. Chaque carton contenait donc du matériel pour réaliser 30 inclusions (photos en Annexe 5).

b. Premier contact par mails pour les médecins intéressés par ECOVIR au décours de la réunion de présentation

Une fois les médecins recrutés, un premier mail leur était envoyé avec un questionnaire sur leurs caractéristiques de démographie médicale (Annexe 6). Ce questionnaire, le seul non anonyme, était disponible via le logiciel d'enquête statistique Lime Survey. Un second mail était ensuite envoyé afin de leur communiquer leur identifiant à rappeler lors de l'inclusion, et le lien vers le questionnaire d'inclusion.

c. Caractéristiques démographiques des MGI

Les réponses des médecins généralistes investigateurs sont reportées dans le tableau 1. Concernant l'activité des MGI, 44% des médecins investigateurs étaient des femmes (versus 36% de femmes sur l'ensemble des généralistes normands selon le Conseil de l'Ordre) et âgés en moyenne de 44 ans (versus 53 ans sur l'ensemble des généralistes normands selon le Conseil de l'Ordre). Ils



travaillaient en moyenne 7,5 demi-journées par semaine et 68% d'entre eux étaient maîtres de stage d'internes du DES de médecine générale.

Tableau 1- Caractéristiques démographiques des MGI

Questions	Résultats
Sexe	56% hommes, 44% femmes
Age	Médiane : 38,5 ans [36 ; 52]
Depuis quand le médecin exerce-t-il ?	Médiane : 14 ans [7 ; 21]
Le médecin est-il maître de stage des DES de médecine générale ?	68% « oui », 32% « non »
Combien de demi-journées hebdomadaires travaille le médecin ?	Médiane : 7 [6 ; 8]

d. Début des inclusions

Les inclusions ont débuté le lundi 21 janvier 2019 pour la première saison. Aucun incident n'a été rapporté concernant les questionnaires. Aucune modification n'a été apportée aux questionnaires à partir du 21 janvier.

e. Déroulement des inclusions

Les critères d'inclusion étaient :

- Patient enfant ou adulte consultant leur médecin traitant spontanément
- Symptômes permettant le diagnostic d'infection respiratoire aiguë haute ou basse (rhinite, angine, pharyngite, laryngite, bronchite, bronchiolite, pneumopathie, syndrome pseudo-grippal, exacerbation d'asthme, exacerbation de BPCO) établi par le médecin généraliste
- Francophone

Les critères de non-inclusion étaient :

- Refus de participation à l'étude
- Refus de réalisation du prélèvement naso-pharyngé
- Patients incapables majeurs sous tutelle ou curatelle
- Patients difficilement joignables par téléphone
- Patients présentant une difficulté de compréhension de la langue française
- Patients hémophiles
- Patients présentant des épistaxis à répétition

Lors de l'inclusion, le médecin « préleveur » informait le patient de la réalisation de l'étude. ECOVIR étant considérée comme une étude non-interventionnelle, des documents d'information étaient remis aux patients, sans nécessité de signature du patient pour participer. Il s'agissait d'une non-opposition. Selon les recommandations du CPP, nous avons écrit 3 documents d'information différents selon l'âge



d'inclusion des patients. En effet, si le patient était âgé de moins de 11 ans, c'étaient ses parents qui devaient donner leur non-opposition (Annexe 8). Si le patient avait entre 11 et 18 ans, c'était à lui de prendre la décision (sous réserve de l'accord de ses parents) (Annexe 9). Enfin, pour les patients majeurs, le document d'information leur était adressé directement (Annexe 10). Il nous a été demandé par le CPP d'écrire en plus un document spécifique pour les enfants de moins de 6 ans, que le médecin investigateur devait lire à l'enfant. ECOVIR était alors présentée de façon ludique, simple à comprendre, avec des dessins et des pictogrammes (Annexe 7).

Le médecin investigateur réalisait ensuite l'anonymisation du patient inclus en lui attribuant un numéro d'identification anonyme, qui était constitué par le numéro d'identification du médecin « préleveur », suivi par la première lettre de son nom, suivie par la première lettre de son prénom, suivie par les 2 derniers chiffres de son année de naissance. En effet, chaque médecin préleveur avait un numéro d'identification constitué de 2 chiffres. Par exemple, pour DUPONT Martine née en 1945 incluse par le médecin n°11, le numéro d'anonymisation était 11DM45.

Le médecin recueillait des données sociodémographiques et cliniques à l'issue de son interrogatoire et de son examen clinique, puis les collectait en ligne sur le logiciel Lime Survey®. Il réalisait ensuite un prélèvement naso-pharyngé qui était conservé dans un tube contenant du milieu de conservation virologique, puis placé au réfrigérateur à 4°C. Le prélèvement naso-pharyngé était réalisé avec un écouvillon floqué qui est introduit dans la narine du patient, jusqu'au nasopharynx, puis un mouvement de rotation est réalisé, d'environ 3 secondes, avant d'être retiré. Il s'agit du même geste que celui réalisé lors de la recherche de l'infection par SARS-CoV2.

Un poster accroché dans la salle d'attente de chaque médecin avait été imprimé afin que les patients puissent prendre connaissance de l'existence de l'étude avant que le MGI ne leur en parle. Ce poster a été élaboré pour augmenter l'adhésion du patient, et gagner du temps lors de l'information du patient en consultation. En effet, nous avons évalué la « perte de temps » lors d'une consultation à 6 minutes pour chaque inclusion ECOVIR.

Pendant la période d'inclusion, tous les jeudis, les prélèvements du début de semaine étaient acheminés de façon réfrigérée au laboratoire de Virologie du CHU CAEN NORMANDIE. Des étiquettes étaient créées. Puis les prélèvements étaient divisés en cinq fractions aliquotes. Une fraction aliquote était utilisée afin d'en extraire les acides nucléiques, puis était analysée par détection moléculaire Multiplex afin de déterminer le ou les virus présents dans les prélèvements. Les autres fractions aliquotes étaient ensuite congelées et conservées à -80°C jusqu'aux analyses ultérieures, et leur mise en collection éventuelle au Centre de Ressources Biologiques caennais « Innovabio ».

f. Rappel à J7

A J7 de l'inclusion, chaque patient inclus était rappelé par un interne de médecine générale participant à l'étude. Le patient avait donné son accord pour le rappel lors de l'inclusion. Dans le cas



contraire, le patient n'était pas inclus. Chaque patient était contacté 3 fois par jour à J7, J8 et J9 jusqu'à ce qu'il décroche. Si le patient ne répondait pas, l'interne laissait un message sur la messagerie, expliquant au patient qu'il allait le rappeler régulièrement :

« *Bonjour Monsieur/Madame,*

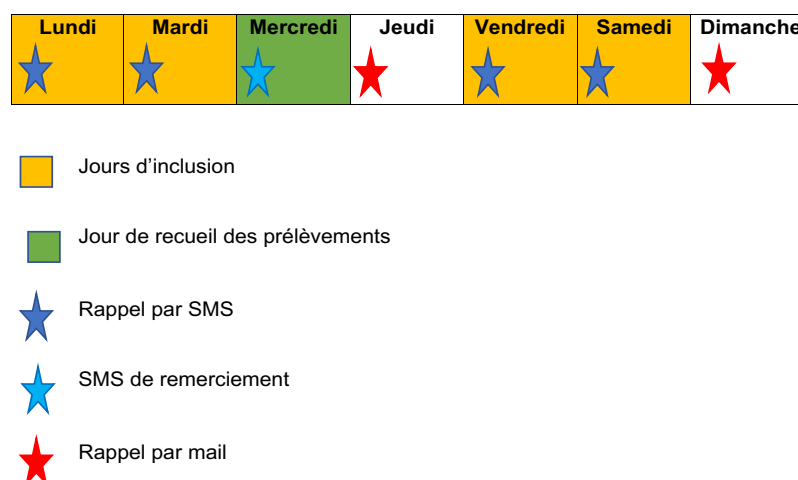
Je suis un médecin chercheur de la faculté de médecine de Rouen. Je vous appelle comme convenu concernant l'étude ECOVIR à laquelle vous avez accepté de participer la semaine dernière. Je dois vous poser quelques questions. Je n'en ai que pour quelques minutes. Je vais vous rappeler en numéro masqué à plusieurs reprises, ne vous inquiétez pas. J'espère vous avoir au prochain appel. A plus tard! »

Si le patient ne répondait à aucun appel (9 au total), il était considéré comme perdu de vue. Les questions posées par les internes étaient des questions d'ordre sociodémographique en premier lieu : mode de vie, entourage, catégorie socio-professionnelle, environnement, tabagisme, etc. Quelques questions cliniques étaient posées en fin d'interview, notamment sur l'évolution depuis la consultation à J0, et s'il y avait eu à nouveau un contact avec un professionnel de santé. Chaque interne avait un code anonyme d'identification qu'il devait renseigner avant de remplir les questionnaires.

g. Bilans réguliers

Chaque vendredi, un texto était envoyé aux médecins généralistes afin de faire le bilan de la semaine : décompte du nombre de patients inclus pendant la semaine, et décompte du nombre de patients inclus depuis le début de la saison. Chaque dimanche, un mail de « relance » était envoyé à chaque médecin généraliste avec ses identifiants ECOVIR, ainsi que le lien avec le questionnaire lui correspondant (Figure 17).

Figure 17- Planning de rappel hebdomadaire aux MGI



h. Arrivée des échantillons au laboratoire de virologie

Chaque jeudi, tous les prélèvements étaient acheminés au laboratoire de virologie. Chaque échantillon était aliquoté en 5 aliquots : 1 pour analyse immédiate, et 4 congelés à -80°C. Des étiquettes étaient créées grâce au logiciel Barcode.exe. Le premier aliquot était utilisé pour réaliser une extraction Complex 200 sur Qiasymphony. Puis une RT-PCR était réalisée (technique Luminex, logiciel Magpix), permettant de détecter 18 virus et 3 bactéries intracellulaires respiratoires. Nous avons donc un résultat qualitatif chaque semaine d'inclusion.

i. Ajout de 2 médecins investigateurs en mars 2019

Devant une inclusion en deçà des prévisions, 2 médecins supplémentaires de la maison médicale de Neufchâtel-en-Bray ont été recrutés le 19.03.2019 (Dr Claire Houlé et Dr Olivier Wermester).

j. Fin des inclusions

Devant la diminution de la prévalence des épisodes viraux (cf ci-dessous), les inclusions ont été arrêtées le 10 avril 2019, soit après 12 semaines d'inclusion pour la première saison épidémique.

k. Réunions de bilan au décours de la première saison

Au cours des mois de mai et juin 2019, nous sommes allés rencontrer les MGI dans les maisons médicales afin de récupérer le matériel restant et faire le bilan de cette première saison. Au décours de cette réunion, un mail était envoyé à chaque médecin investigateur avec en lien un questionnaire « satisfaction » permettant de recueillir les remarques, les difficultés rencontrées, mais également de savoir si les médecins souhaitaient participer à la deuxième saison du protocole.

4. Deuxième saison

a. Rencontre avec les médecins généralistes des maisons médicales normandes

Avant le début de la deuxième saison, au cours du mois de septembre 2019, nous nous sommes rendus dans les maisons médicales des médecins investigateurs afin de leur distribuer le matériel nécessaire pour la saison 2, et leur rappeler les différentes modalités d'inclusion. Trois nouveaux médecins investigateurs ont rejoint les effectifs. Ils ont été formés, comme leurs collègues, au prélèvement naso-pharyngé.

b. Modifications par rapport à la première saison

Les inclusions de la deuxième saison ont débuté le vendredi 4 octobre 2019.

Après avoir évalué l'activité des médecins généralistes suivant les jours de la semaine (44% des médecins investigateurs ECOVIR ne travaillaient pas le mercredi), nous avons décidé de changer les jours d'inclusion. En effet, pour la deuxième saison, chaque semaine d'inclusion débutait le vendredi, puis samedi, lundi et mardi. Le recueil des prélèvements au laboratoire de Virologie du CHU de Caen avait lieu chaque mercredi.



c. Interruption des inclusions due à la pandémie de SARS-CoV2

Face à la pandémie de SARS-CoV2 et au manque de matériel adéquat pour réaliser les prélèvements dans les conditions de sécurité sanitaire recommandées, nous avons décidé d'interrompre les inclusions ECOVIR à partir du samedi 14 mars 2020.

d. Décision d'arrêt définitif des inclusions

AU vu des événements de la pandémie au SARS-CoV2, il nous a été demandé par la Cellule de la Promotion de la Recherche Clinique du CHU de Caen de stopper les inclusions ECOVIR le 8 avril 2020. Nous n'avons pas rouvert l'étude car les épidémies virales hivernales étaient ensuite terminées.

5. Bilan du nombre de patients inclus par les médecins généralistes investigateurs

685 patients ont été inclus durant les 2 saisons (191 la première saison, 494 la deuxième) (Figure 18). Lors de la première saison, la moyenne d'inclusion était de 6 patients par médecin investigateur sur les 12 semaines ; 7 médecins investigateurs sur 33 n'avaient inclus aucun patient. Au cours de la deuxième saison, les médecins ont inclus en moyenne 13 patients chacun au cours des 21 semaines ; 5 médecins n'avaient inclus aucun patient. Sur les deux saisons, la moyenne d'inclusion était de 19 patients par médecin investigateur, la médiane était de 16 patients par médecin [4,75 ; 27] (cf Figure 19). 75% des médecins investigateurs ont avoué qu'ils auraient pu inclure plus de patients car ils ont « oublié » de le faire, malgré les rappels quotidiens. 10 médecins ont eu besoin de matériel de prélèvement supplémentaire.

Figure 18- Suivi du nombre d'inclusions hebdomadaires au cours des deux saisons ECOVIR

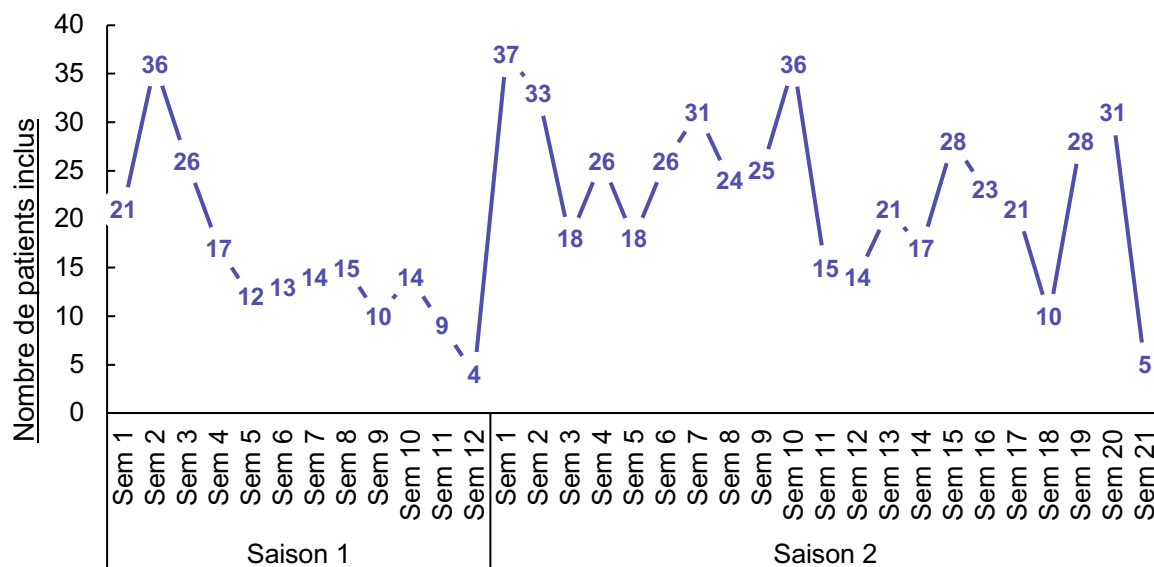
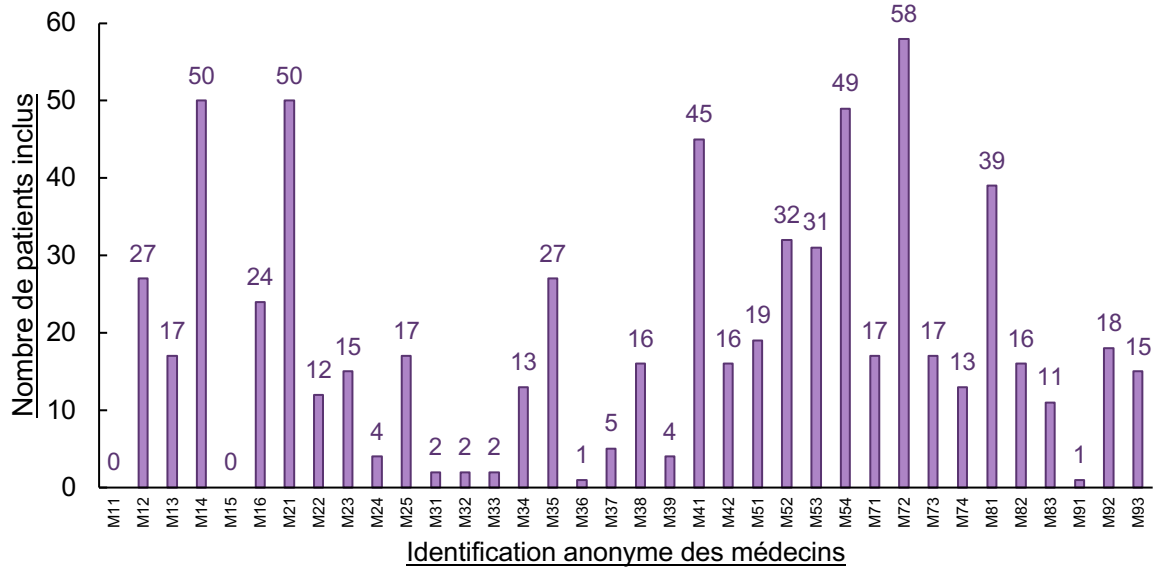


Figure 19- Nombre de patients inclus par les différentes MGI au cours des 2 saisons d'ECOVIR



B. Première publication : protocole de la cohorte ECOVIR

Nous avons publié, en 2022, dans la revue Methods and Protocols le protocole de la cohorte ECOVIR.

Résumé :




Les infections respiratoires aiguës (IRA) doivent être mieux comprises et traitées, car elles sont essentielles pour la santé publique, en particulier lors de crises sanitaires telles que la pandémie à SARS-CoV2. Il s'agit des infections les plus fréquentes dans la population générale et elles sont principalement traitées par les médecins généralistes dans le cadre des soins de santé primaires. De nombreux virus différents sont impliqués, selon les variations épidémiques. Les co-détections virales représentent une proportion importante des IRA dans les cohortes hospitalières. L'objectif de la cohorte ECOVIR était d'étudier les co-détections virales en constituant une biobanque d'échantillons de voies respiratoires de patients consultant leur médecin généraliste pour des symptômes d'IRA. Nous rapportons ici le déroulement de l'étude : la conception, le déroulement et les difficultés rencontrées. ECOVIR (Étude des CO-détections Virales dans les prélèvements Respiratoires) était une cohorte prospective et multicentrique menée en France pendant deux saisons épidémiques (2018-2019 et 2019-2020). Nous avons recruté des médecins généralistes. Chaque médecin généraliste investigateur (MGI) voyait les patients chaque semaine pour l'examen, la collecte de données cliniques et l'écouvillonnage nasopharyngé. Chaque échantillon était envoyé au service de virologie pour la mise en banque et l'analyse moléculaire. Les données cliniques et sociodémographiques ont été recueillies 7 jours après l'inclusion. ECOVIR comprenait 36 MGI. Les patients présentant des symptômes d'IRA ont été inclus (n = 685). Le nombre médian d'inclusions était de 16 patients par MGI au cours des deux saisons (IC25-75% [4,75 ; 27]). Les patients âgés de 18 à 64 ans étaient les plus nombreux (57 %), suivis des enfants (30 %) et des personnes âgées (13 % de plus de 65 ans). Cette répartition par âge met l'accent sur la population des jeunes adultes et des personnes d'âge moyen. Les internes ont participé au projet et ont appelé les patients le 7ème jour pour obtenir des données cliniques et sociodémographiques. Notre étude a suscité la création d'un réseau original, qui prévoit d'établir un lien fonctionnel entre la recherche et les soins de santé primaires. Les soins primaires sont malheureusement peu représentés dans les protocoles de recherche, en particulier dans les infections respiratoires, alors qu'ils sont la pierre angulaire de notre système de santé français, comme il l'est montré chaque jour en cette période de crise.





Protocol

The Design and Implementation of the ECOVIR Project: A Primary Health Care Surveillance System to Strengthen Co-Detection of Respiratory Viruses in Normandy

Hortense Petat ^{1,2,3,*} , Matthieu Schuers ^{4,5}, Sandrine Corbet ^{2,3}, Xavier Humbert ⁶ , François Le Bas ⁶, Christophe Marguet ^{1,3}, Lucille Pellerin ⁴, Andry Rabiaza ⁶, Astrid Vabret ^{1,2} and Meriadeg Ar Gouilh ^{1,2} 

¹ INSERM, UMR1311-DYNAMICURE—Institut de Biologie Clinique, CHU, F-7600 Rouen, France

² Laboratoire de Virologie, Centre Hospitalo-Universitaire, F-14033 Caen, France

³ Centre Hospitalier Universitaire de Rouen, Département de Pédiatrie Médicale, EA2656 Université de Normandie, UNIRouen, F-7600 Rouen, France

⁴ Département de Médecine Générale, Normandie Université, UFR Santé Rouen, F-7600 Rouen, France

⁵ INSERM, U1142, Laboratoire d'Informatique Médicale et d'Ingénierie des Connaissances en e-Santé, LIMICS, Sorbonne Université, F-75006 Paris, France

⁶ Département de Médecine Générale, Normandie University, UNICAEN, UFR Santé, F-14000 Caen, France

* Correspondence: hortense.petat@univ-rouen.fr

Abstract: Acute respiratory infections (ARIs) need to be better understood and treated, as they are critical to public health, especially during crises such as the SARS-CoV2 pandemic. These are the most abundant infections in the general population and are seen primarily in primary care by general practitioners (GPs). Many different viruses are involved, according to epidemic variations. Viral co-detections account for a significant proportion of ARIs in hospital cohorts. The objective of the ECOVIR cohort was to study viral co-detections by setting up a biobank of respiratory tract samples from patients consulting their general practitioner for ARI symptoms. We report here on the course of the study: the design, the conduct, and the difficulties encountered. ECOVIR (Etude des CO-detections Virales dans les prélèvements Respiratoires) was a prospective, multicenter cohort conducted in France during two epidemic seasons (2018–2019 and 2019–2020). We recruited GPs. Each GP investigator (GPI) saw patients weekly for examination, clinical data collection, and nasopharyngeal swabbing. Each sample was sent to the virology unit for biobanking and molecular analysis. Clinical and sociodemographic data were collected 7 days after inclusion. ECOVIR involved 36 GPs. Patients with symptoms of an ARI were included ($n = 685$). The median number of inclusions was 16 patients per GPI over both seasons (IC_{25–75%} [4.75; 27]). Patients aged 18 to 64 years were the most numerous (57%), followed by children (30%), and the elderly (13% over 65 years). This age distribution emphasizes the young adult and middle-aged population. Residents participated in the project and called patients on day 7 to obtain clinical and sociodemographic data. Our study triggered the creation of an original network, which plans to establish a functional link between research and primary health care. Primary care is unfortunately poorly represented in research protocols, particularly in respiratory infections, even though it is a cornerstone of our French health care system, as demonstrated every day in this period of crisis.

Keywords: primary care /hospital coordination; acute respiratory infections; biobank



Citation: Petat, H.; Schuers, M.; Corbet, S.; Humbert, X.; Le Bas, F.; Marguet, C.; Pellerin, L.; Rabiaza, A.; Vabret, A.; Ar Gouilh, M. The Design and Implementation of the ECOVIR Project: A Primary Health Care Surveillance System to Strengthen Co-Detection of Respiratory Viruses in Normandy. *Methods Protoc.* **2022**, *5*, 98. <https://doi.org/10.3390/mps5060098>

Academic Editor: Fernando Albericio

Received: 24 October 2022

Accepted: 9 December 2022

Published: 13 December 2022

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



Copyright: © 2022 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/>).



also be caused by bacteria such as other bacteria and *Mycoplasma* species [3]. ARIs are mostly community-acquired infections and are managed by general practitioners (GPs). The social and economic costs and morbidity caused by these diseases are considerable: absenteeism, inappropriate and abusive administration of antibiotics, hospitalizations of high-risk populations, and deaths [3]. These detrimental factors have also been highlighted during the current SARS-CoV2 pandemic.

Respiratory viral infections are the primary trigger for exacerbation of chronic respiratory diseases in adults or children, such as COPD (chronic obstruction pulmonary disease) [4,5], asthma, or other diseases [6,7]. They are also at the origin of hospital transmissions in places of collective life, i.e., nurseries or retirement homes. Recurrent exacerbation episodes are well known to alter respiratory trajectories from childhood and to generate a high rate of hospital admissions. However, studies on the etiologies and short-term course of these common respiratory infections in a real-world setting are very limited, and almost all of them have been conducted in emergency departments or during hospital stays.

We therefore conducted a study of viral co-detections in respiratory samples in general practitioners' offices (project ECOVIR for Etude des CO-detections VIrales dans les prélèvements Respiratoires). Necessary clinical data were collected and nasopharyngeal swabbing was performed to detect any concomitant viral infection. Samples were stored in a virus biobank. Because the implementation of such primary care studies during epidemic seasons is rarely reported, we proposed to describe the successive steps of design, implementation, necessary adaptation to general practitioners' practices, and difficulties encountered. The clinical and virological data will be the support of other articles.

2. Methods and Design

2.1. Study Design

2.1.1. Project Team and Infrastructure

The ECOVIR project began in May 2018 during the first meeting between GRAM 2.0 (Groupe de Recherche sur l'Adaptation Microbienne) and the heads of the DUMGs (Départements Universitaires de Médecine Générale) of the Universities of Rouen and Caen in Normandy, France. Eleven meetings were held between May 2018 and the start of testing in January 2019. In September 2018, five general practice residents were recruited to participate in the project as part of their medical thesis. At the same time, we selected eight "investigator centers" from among the care centers throughout Normandy (Figure 1). Each center brought together general practitioners.



Figure 1. Repartition of the eight investigator centers in Normandy, France.



Our team visited medical centers in September and October 2018 to meet general practitioners (GPs), to introduce them to the ECOVIR project, and to recruit future ECOVIR general practitioner investigators (GPIs). Sampling materials were provided and brought to each GPI. The kit included flocked swabs (COPAN®) with a small flexible shaft, a virologic transport holder, and patient handouts. Every GPI received enough material to test 30 patients.

2.1.2. Study Design

ECOVIR was a cross-sectional study. Patients were included during a visit to the GP. Inclusion criteria were: French-speaking patients, children or adults, and spontaneously consulting their GP for symptoms of acute upper or lower respiratory infection at the beginning of the week (Monday or Tuesday or Wednesday). The criteria for non-inclusion were: non-French speakers (because of the phone call and data collection on Day 7), people who could not be contacted by telephone, or people with a history of epistaxis. Patients were divided into 6 age groups: 0–23 months old, 2–5 years old, 6–17 years old, 18–64 years old, 65–74 years old, and more than 75 years old. Each GPI was assigned an age class based on their patients' profile. GPIs were responsible for performing research-related actions (Figure 2): giving information to the patient, taking the patient's consent to participate in the study, and handing over the information document. The GPIs then collected clinical data, and performed the nasopharyngeal swab and stored it at 4 °C. Samples were collected weekly by our team and brought to the virology laboratory of the Caen hospital, according to a predetermined schedule. This schedule was discussed with the GPIs, according to their absences and unavailability. At the moment of inclusion, patients were informed of a call on day 7 after inclusion, conducted by five residents on our team. Throughout the call, which lasted approximately 5 to 7 min, additional data was collected: personal medical history, environment, and evolution of symptoms. Residents tried to reach patients several times if the first call was unsuccessful. Patients were considered lost to follow-up after nine unsuccessful calls and messages.

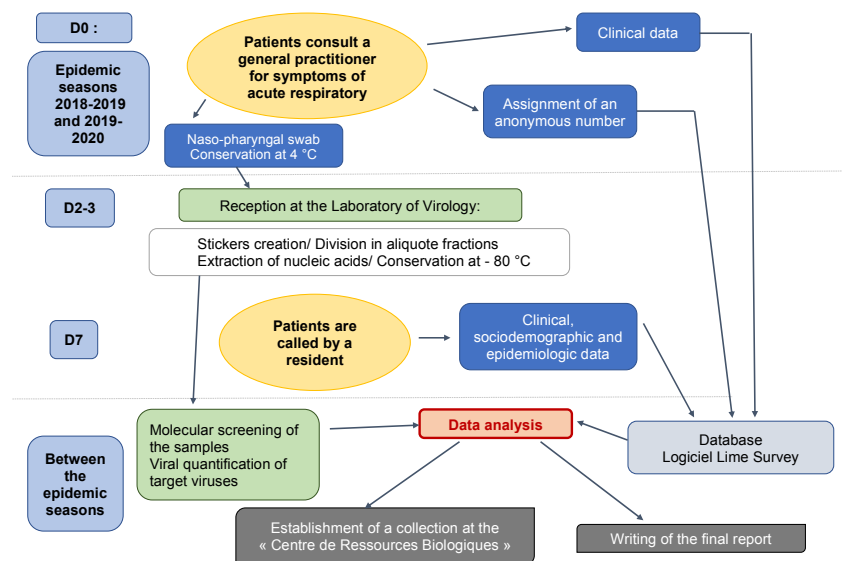


Figure 2. ECOVIR's workflow.

Each week was scheduled as follows: inclusions on Mondays, Tuesdays, and Wednesdays; transport of samples to the virology laboratory by our team on Thursdays; and analyses on Fridays (Figures 2 and 3).



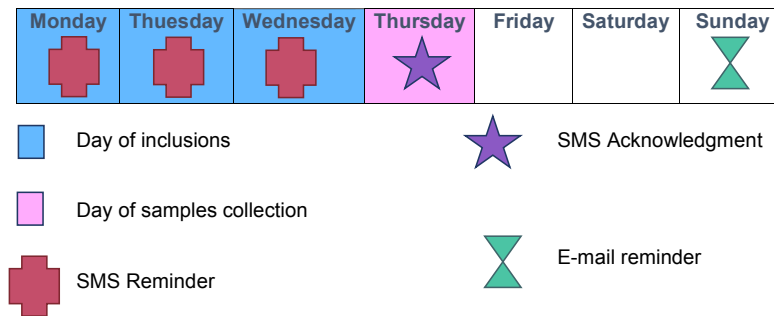


Figure 3. Typical inclusion week during ECOVIR's project.

2.2. Measures and Data Collection

2.2.1. Measure Collection

At inclusion, GPIs briefly collected clinical data via Lime's Survey^R software (<https://www.limesurvey.org/>, accessed on 1 September 2018). The questions asked about the patients' clinical status at inclusion, the diagnosis made, and detailed the treatments prescribed. Seven days after inclusion, patients were called by the residents to obtain an accurate medical history of the patients, their environment, and disease progression since the consultation.

Samples were received at the virology unit of the University Hospital of Caen once a week and divided into aliquots. One aliquot was examined by a Multiplex PCR test (NxTag RPP Luminex kit[®], Austin, TX, USA) after nucleic acid extraction performed on "QIASymphony" (Qiagen, Hilden, Germany). The viruses searched for were the following: Respiratory Syncytial Virus A and B; Enterovirus/ Human Rhinovirus; Adenovirus; Metapneumovirus; Bocavirus; Coronaviruses OC43, NL63, 229E, and HKU1; Influenza A H1 and H3; Influenza B; and Parainfluenza 1,2,3, and 4. Other aliquots were preserved at -80°C .

2.2.2. Outcome Measure

Clinical data were available for ongoing analysis via Lime Survey^R software.

Virological data were reported each week of inclusion and it was not possible for the GPIs to know the virological results.

2.3. Intervention

2.3.1. GPI Training for Nasopharyngeal Swab Collection

Each GPI was trained in nasopharyngeal swabbing. The training consisted of a video presentation followed by practice supervised by our experts.

2.3.2. Measures Implemented to Ensure the Feasibility of the Study

For each GPI, the goal was to include 3 patients per week during the inclusion periods. To reduce information time and promote patient adherence, explanatory posters were available in the GPI waiting rooms. The online questionnaire was designed to be completed in approximately 2 to 3 min by the GPI after the physical examination at inclusion.

A daily "pacing schedule" for the GPI was established, with text messages throughout the inclusion period (Figure 3). Each Thursday, an e-mail and a text message were sent to the GPIs to thank them for their participation in the study and to inform them in real-time of the number of completed inclusions. A permanent team was available to answer questions from the GPIs regarding research, technical, or logistical issues.

2.3.3. Assessment at the End of the First Season

To better understand the insufficient number of inclusions or disparities observed in the first epidemic season, we organized meetings with the GPIs during the summer



between the two epidemic seasons. We met with each GPI and an anonymous questionnaire was sent to each GPI.

2.4. Ethics

After four meetings in the summer of 2018 between the GRAM team and the DUMG, for scenario adjustment, the final protocol was submitted to the “East II” Protection Committee (study reference 18/10/10/63004) on 10 October 2018. The protocol package was forwarded to the commission on 19 November 2018. A favorable opinion was given with minor modifications. A second packet was forwarded to the commission on 12 December 2018, which responded positively on 7 January 2019.

An information document was given to each included patient who participated in the study (a no objection document). The document was adapted according to the age of the included patient. For children under 6 years old, an information document was adapted with drawings and pictograms. It was read and given to children by the GPI.

3. Results

3.1. GPIs

ECOVIR was conducted over two epidemic seasons: the first from 21 January to 10 April 2019 (12 weeks) and the second from 4 October 2019 to 13 March 2020 (21 weeks). The second season ended earlier due to the lockdown of the SARS-CoV2 pandemic in France. Eight investigating centers participated in the study. Thirty-three IPGs were involved in the first season and 36 in the second.

Each GPI from the first season confirmed their participation to the second season. Residents’ supervisors represented 74% of the GPIs involved. The median age of the GPIs was 44 years and women represented 42% of the workforce. They worked an average of seven half-days per week for 14.6 years.

3.2. Patients Included

A total of 685 patients were included in both seasons (191 and 494 in the first and second seasons, respectively—Figure 4 and Table 1. Three patients declined to participate in the study (e.g., parents cited the potential pain of nasopharyngeal swabbing on their child). Several patients were included multiple times in both seasons. Over the two seasons, the median inclusion was 16 patients per GPI ($IC_{25-75\%}$ [4.75; 27]) (Figure 5). During the 12 weeks of inclusion in the first season, 24 GPIs (out of 33 enrolled) included patients (six patients over the 12 weeks on average). During the 21 weeks of the second season, 31 (of 36) GPIs included patients. A total of 10 GPIs required additional specimen collection kits, while 75% of GPIs attributed the lack of inclusions to oversight. Nevertheless, the frequency of reminders (SMS and e-mails) was judged “adequate” by 100% of the GPIs. IPMs assessed the ease of collection for each patient included: 8.7% of collections were described as “not easy” during their practice.

Table 1. Characteristics of the patients.

	n (%)	
Age groups	0–24 months	76 (11)
	2–5 years	58 (8)
	6–17 years	72 (11)
	18–64 years	388 (57)
	65–74 years	61 (9)
	>75 years	30 (4)
Female sex	405 (59)	
Patients lost to follow-up	53 (8)	
Analyzed samples	672 (98)	
Samples positives in Multiplex PCR test	447 (67)	



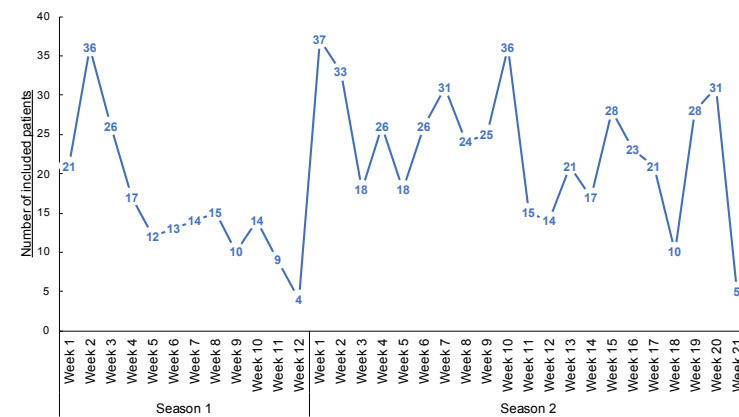


Figure 4. Number of inclusions during the weeks of inclusions.

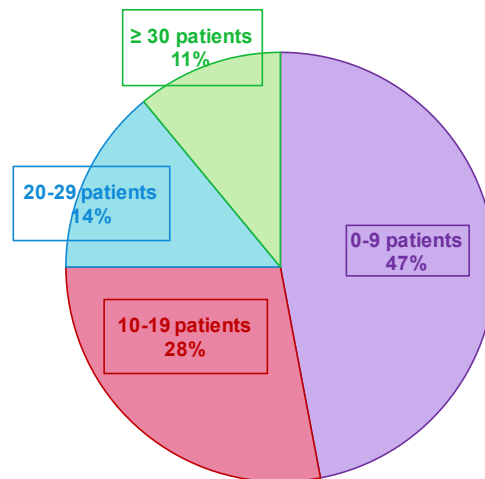


Figure 5. Number of included patients by the GPI during the two epidemic seasons.

Patients aged 18–64 years were the most numerous (57%), followed by children (30%) and the elderly (13% were over 65 years). This age distribution emphasizes the young adult and middle-aged population that are not typically seen in hospitals.

3.3. Virologic Analysis

A total of 672 samples (98% of inclusions) were collected at the laboratory. We noted some logistical problems in getting the samples to the laboratory, mainly due to unforeseen absences of GPIs. An amount of 627 specimens were described “with ease” by the IPMs who performed them (91%). Of the total samples brought to the laboratory, 447 (67%) were positive for at least one respiratory virus targeted by the Multiplex PCR test.

3.4. Phone Call on Day 7

Regarding the call on day 7, 631 (92%) patients responded. We noted an increase in the number of people lost to follow-up during school vacations (Christmas and February of each season), as well as a decrease in inclusions during the same periods. Each patient called had been informed of the call by the GPIs. No patient refused to answer the telephone questionnaire.



3.5. Intercurrent Events

We recorded five calls from the GPIs to our team. The first concerned an Internet problem; the second, a question about an inclusion criterion; two mentioned a patient included for the second time; and in the last one, the GPI asked if we could give the patient the virological result on day 7.

4. Discussion

Our work is an original study involving the implementation of a coordination between hospital, primary health care, and practitioners of many specialties. Through the DUMG, our team included 685 ambulatory patients distributed all over Normandy and analyzed the nasopharyngeal swabs over two epidemic seasons.

We have created an ambulatory/hospital network around a non-interventional research project. Nevertheless, the swabbing act was sometimes considered potentially invasive and was not easily accepted before the SARS-CoV2 pandemic. Despite this relative acceptance, we noted an excellent inclusion level with only three patients who refused to be included in the study.

The GPIs were younger than the regional mean age of the GPs (44 versus 54 years old), more often female (42% versus 36%), and worked for the majority in part-time work (7 half-days per week) versus 11% in France according to the DREES (Direction de la Recherche, des Etudes, de l'Évaluation et des Statistiques, Direction of Research, Studies, Evaluation and Statistics). Thanks to new communication technologies (SMS and emails), we could exchange continuously and very easily with the GPIs and we could immediately attend to their difficulties or their requests. The median age of the GPIs, mostly belonging to so-called "generation Y", likely explains the effectiveness of emails and SMS exchanges as well as online questionnaires.

It was difficult to compare our methodology with other cohorts, French or international, because primary health care is not often represented in virological clinic published studies. We focused on the experiences and successes of the GROG network to organize this new research network. Between 1984 and 2014, during 30 winter epidemic seasons, some GPs participated in the "GROG" (Groupes Régionaux d'Observation de la Grippe, Flu Regional Observation Groups), forming a flu-monitoring network in primary health care, a symbol of the GPs' participation to French Public Health. The GROG were present in 21 out of 22 French regions and followed actively, every winter, the progress of flu epidemics, including patients with ARIs and consulting their GP. The GROG network was an epidemiological monitoring network and was more dedicated toward surveillance than research. Health systems are different in every country and not easily comparable. For example, American cohorts of ambulatory patients with acute respiratory infections [8–10] included patients who went to emergency departments. This is a very different recruitment compared to studies carried out in primary health care as defined in ECOVIR or more broadly in France. In 2018, a study focusing on the etiology of lower respiratory infections took place at the European scale, but no methodology describing the implementation of the study was available and the 294 GPs included only about 10 patients each over a period of 3 years [11].

The implementation of such a research program and network is not usual. The concertation with GPs, the practical feasibility of the study, and the necessary adaptation to GPs' activity are key factors to anticipate and discuss. In our ECOVIR project, the initial objective was to include three patients per week and per GPI, but only 69% of the expected number of included patients was effectively included. We also observed an unforeseen heterogeneity of inclusion rate among the 84% of GPIs that included patients (vs. 73% for the GROG in 2014). A strong heterogeneity in the numbers of inclusions among GPs in the GROG network was found as well. During the last year (2014), they described 1/3 of "small samplers", 1/3 of "intermediate samplers", and 1/3 of "big samplers". In our study, we rather observed 75% of "small samplers", 14% of "intermediate samplers", and 11% of "big samplers". In the GROG study, the GPIs had to include the first eligible patient of the week, every week. We first planned to do the same, but the DUMG preferred not to impose



the inclusion schedule to the GPs and to choose the right moment in the day to make a “better rate inclusion”. The lack of inclusions by the GPs cannot be explained by the lack of eligible patients because according to the OMG (Observatoire de Médecine Générale, General Medicine Observatory), the reasons, “febrile condition” and “common cold” (that stand for main ECOVIR’s inclusion criteria), represent 17 and 12%, respectively, of the reasons to consult the general practitioners. A proportion of 75% of the GPs confessed to have forgotten the study, whereas there was an eligible patient at their consultation. The loss of time is a frequent reason not to include patients during a consultation. The median duration of a consultation in general medicine in France is 17 min. We estimated that about 6 min is the necessary time to include a patient in ECOVIR. This had an impact in the progress of a journey. Moreover, we noted that the general practitioners that participated in the GROG could know the virologic results of the patient they had sampled, unlike our GPs who had no personalized result, ever. This reflects an important willingness from the GPs to participate in clinical and virological research.

Involvement of young researchers, including PhD students, residents of general medicine, and the multidisciplinary team, were key to the development and the implementation of the project.

We noted a significant reluctance to the practice of nasopharyngeal swab collection among the GPs. This was a limit to the inclusions, particularly for young children. Nevertheless, only 8.7% of the samples were described as “not easy” during their practice. Training in the nasopharyngeal swabbing procedure allowed GPs to include and collect samples in a comfortable manner. We found that the more patients GPs included, the easier they found the nasopharyngeal swabbing procedure. This virtuous circle did not exist for all GPs because some of them remained on their first apprehension of the procedure. This apprehension was still present during the initial swabs for all GPs, but most GPs eventually concluded that performing the swab was simple and quick. It is interesting to note that in France and before the pandemic, this nasopharyngeal swab procedure was only performed in hospitals and never in primary care.

The relatively low number of inclusions could also be explained by the limitation of inclusions to 3 days per week due to the IPG schedule and sample storage issues. Indeed, a significant portion of GPs worked part-time, with approximately 50% of IPMs not working on Wednesdays. Other disruptive events should also be noted, such as vacations, time off for training, and periods of overactivity. The SMS reminder mode was deemed “effective” and “adequate” by the GPs, but other more interactive modes of communication, promoting a bottom-up approach with active IPG input, would be very beneficial. Social networking tools could be an interesting alternative to SMS by allowing any active participant to interact with the group.

We tried to anticipate the difficulties and put measures in place to facilitate the feasibility of the study. However, the analysis of this first implementation highlighted the need to refine the feasibility criteria according to the GPs’ mode of practice, in order to specify the evaluation of the study’s limits.

Our study is the first in France to look at the frequency of viruses in primary care patients: 67% of samples were positive for one or more viruses in the Multiplex PCR test for the viruses studied. However, this rate of viral detection is known in the hospital through the analysis of nasopharyngeal swabs. In addition, most studies have focused on patients with conditions requiring hospitalization. As in the hospital cohorts, the rate of negative samples is significantly higher in adults (40% in the 18–64 age group) than in children (8% in the 2–5 age group) (EPIC study) [8,9]. However, in this multicenter study, the control group consisted of patients without symptoms, raising the question of asymptomatic viral infections. In our study, there was no asymptomatic patient because of the inclusion criteria. In the Tennessee Children’s Respiratory Initiative (TRCI) study [10], 26% of the samples, which came from patients with high ARIs, were negative, but the cohort was limited to infants less than 12 months old.



The strength of this project was to demonstrate the feasibility of a study with samples from the upper airway, in a large cohort, with less than 8% of patients lost to follow-up at day 7. This study allowed us to obtain an initial cohort of patients in primary care. The creation of this network allowed us to communicate during the pandemic, which disrupted our study. We hoped to continue inclusions, but at the early stage of the pandemic, we felt that the GPs could not safely perform the nasopharyngeal swab, although they requested it. In the future, we will know how to better communicate with primary care, sending regular reminders. We think that nasopharyngeal swabbing has become a daily care since the beginning of the pandemic.

5. Conclusions

Our project, ECOVIR, is unique and included 685 patients of all ages with acute respiratory infection in primary care. This has created a strong collaboration between the hospital, 36 investigating general practitioners, spread throughout Normandy, France, and our research team (GRAM2.0). It has created a new network to link research to primary care, which is a central part of the French health system and is poorly represented in research protocols.

Author Contributions: H.P., M.A.G., C.M. and A.V. established the protocol, send it to the ethical committee and wrote the article. M.S., L.P., F.L.B., A.R. and X.H. included patients. They read and approved the manuscript. S.C. and H.P. were at the virology lab for analyzing samples. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Institutional Review Board of to the “East II” Protection Committee (study reference 18/10/10/63004) on 10 October 2018.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all patients involved in the study.

Data Availability Statement: Data is kept by the “Direction de la Recherche” of the Caen’s CHU, France.

Acknowledgments: The authors acknowledge, with gratitude, the contribution of all the GPs, the hospital centers, the Délégation à la Recherche Clinique et à l’Innovation from Caen’s CHU, Sandrine Corbet, Anne Petat, and the GRAM2.0. The GPs and health care centers: Maison de santé Saint Eloi, Rouen, France: Aude Le Floch, Stéphane Le Fric, Marianne Laine, Lucille Pellerin, Marie Rigal-Lashkar, and Barbara Vatin. Maison de santé du Pays Neufchâtelois, Neufchatel En Bray, France: Florence Calero, Hélène Comont, Christophe Guillerm, Claire Houle, Vincent Lemarie, Sophie Ozanne, Anne-Sophie Pimont, Matthieu Schuers, and Olivier Wermester. Maison Médicale Armstrong, Grand Quevilly, France: Caroline Jouen, Jean-Yves Maunoury, Elisabeth Mauviard, Yveline Sevrin, and Charlotte Vianney. Pôle de santé du Port, Granville, France: François Le Bas and Alexis Plunet. Pôle de santé de Villedieu, Villedieu-Les-Poeles, France: Olivier Bataille, Nicolas Boyer, Philippe Sabathier, and Thomas Trenier. Cabinet médical Colombelles, Colombelles, France: Elise Barbe-Delrue, Philippe Grujard, Jeanne Le Bas, and Stéphane Vallayes. Pôle santé de Vaucelles, Caen, France: Xavier Humbert, Grégory Daireaux, and Charlotte Milcent. Maison médicale Deauville Côte Fleurie, Deauville, France: Andry Rabiaza, Nicolas Sainmont, and Laurent Simon.

Conflicts of Interest: The authors declared no potential conflict of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Ethics Approval: The ethics approval document is uploaded. An information document was given to each included patient who participated in the study (no objection document). The document was adapted according to the age of the included patient: one document for adults, a different document for parents of children under 11 years of age, and one document for children between 11 and 18 years of age. For children under 6 years of age, an information document was adapted, with drawings and pictograms. It was read and given to the children by the GP.



Study Status: The final protocol was submitted to the “East II” Protection Committee (study reference 18/10/10/63004) on 10 October 2018. The protocol package was transmitted to the committee on 19 November 2018. A favorable opinion was given with a request for minor modifications. A second submission was sent to the commission on 12 December 2018, which responded positively on 7 January 2019. The first inclusion took place on 21 January 2019.

Abbreviations

ARI	acute respiratory infections
COPD	chronic obstructive pulmonary disease
ECOVIR	Etude des CO-détections Virales dans les prélèvements Respiratoires—Study of viral co-detections in respiratory samples)
DUMG	Départements Universitaires de Médecine Générale, General Medicine University Departments)
DREES	Direction de la Recherche, des Etudes, de l’Evaluation et des Statistiques, Direction of Research, Studies, Evaluation and Statistics
GP	general practitioner
GPI	general practitioner investigator
GRAM	Groupe de Recherche sur l’Adaptation Microbienne, Microbial Adaptation Research Group
GROG	Groupes Régionaux d’Observation de la Grippe, Flu Regional Observation Groups
OMG	Observatoire de Médecine Générale, General Medicine Observatory
PCR	polymerase chain reaction

References

- Moriyama, M.; Hugentobler, W.J.; Iwasaki, A. Seasonality of Respiratory Viral Infections. *Annu. Rev. Virol.* **2020**, *7*, 83–101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Monto, A.S.; Malosh, R.E.; Petrie, J.G.; Thompson, M.G.; Ohmit, S.E. Frequency of Acute Respiratory Illnesses and Circulation of Respiratory Viruses in Households With Children Over 3 Surveillance Seasons. *J. Infect. Dis.* **2014**, *210*, 1792–1799. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- GBD 2016 Lower Respiratory Infections Collaborators. Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory infections in 195 countries, 1990–2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Infect. Dis.* **2018**, *18*, 1191–1210. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Delmas, M.-C.; Guignon, N.; Leynaert, B.; Moisy, M.; Marguet, C.; Fuhrman, C. Augmentation de la prévalence de l’asthme chez le jeune enfant en France. *Rev. Des Mal. Respir.* **2017**, *34*, 525–534. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- De Blic, J.; Brouard, J.; Vabret, A.; Deschildre, A. Interactions micro-organismes et voies aériennes distales: Spécificités pédiatriques. *Rev. Des Mal. Respir.* **2017**, *34*, 134–146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Chan, J.Y.C.; Stern, D.A.; Guerra, S.; Wright, A.L.; Morgan, W.J.; Martinez, F.D. Pneumonia in Childhood and Impaired Lung Function in Adults: A Longitudinal Study. *Pediatrics* **2015**, *135*, 607–616. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Backman, K.; Piippo-Savolainen, E.; Ollikainen, H.; Koskela, H.; Korppi, M. Irreversible airway obstruction in adulthood after bronchiolitis in infancy: Evidence from a 30-year follow-up study. *Respir. Med.* **2014**, *108*, 218–223. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Jain, S.; Williams, D.J.; Arnold, S.R.; Ampofo, K.; Bramley, A.M.; Reed, C.; Stockmann, C.; Anderson, E.J.; Grijalva, C.G.; Self, W.H.; et al. Community-acquired pneumonia requiring hospitalization among U.S. children. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *372*, 835–845. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Jain, S.; Self, W.H.; Wunderink, R.G.; Fakhran, S.; Balk, R.; Bramley, A.M.; Reed, C.; Grijalva, C.G.; Anderson, E.J.; Courtney, D.M.; et al. Community-Acquired Pneumonia Requiring Hospitalization among U.S. Adults. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *373*, 415–427. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Hartert, T.V.; Carroll, K.; Gebretsadik, T.; Woodward, K.; Minton, P.; Vanderbilt Center for Asthma and Environmental Health Research Investigators and Collaborators. The Tennessee Children’s Respiratory Initiative: Objectives, design and recruitment results of a prospective cohort study investigating infant viral respiratory illness and the development of asthma and allergic diseases. *Respirology* **2010**, *15*, 691–699. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ieven, M.; Coenen, S.; Loens, K.; Lammens, C.; Coenjaerts, F.; Vanderstraeten, A.; Henriques-Normark, B.; Crook, D.; Huygen, K.; Butler, C.C.; et al. Aetiology of lower respiratory tract infection in adults in primary care: A prospective study in 11 European countries. *Clin. Microbiol. Infect.* **2018**, *24*, 1158–1163. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



C. Deuxième publication : Méthodes et difficultés rencontrées à la mise en place d'une cohorte en Soins Primaires

Nous avons publié, en février 2022, dans la Revue des Maladies Respiratoires l'article suivant.

Revue des Maladies Respiratoires 39 (2022) 334–343



Disponible en ligne sur

ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

EM|consulte
www.em-consulte.com



PROTOCOLE EN COURS

ECOVIR : mise en place d'une cohorte en soins primaires, un exemple de coopération pluri-professionnelle ville-hôpital



ECOVIR: Study of a primary care cohort in of patients with Acute Respiratory Infections in Normandy, an example of pluri-professional hospital-primary care coordination

H. Petat^{a,*,b,c}, M. Schuers^{d,e}, A. Rabiaza^f,
C. Marguet^{a,c}, L. Pellerin^d, F. Le Bas^f, X. Humbert^f,
S. Corbet^{b,c}, B. Deseille^d, L. Gosse^d, P.-A. Lambert^d,
T. Poupon^d, E. Vervisch^d, R. Morello^g, F. Chaillot^h,
M. Ecovirⁱ, A. Vabret^{a,b}, M. Le Guil^{a,b}

^a Groupe de recherche sur l'adaptation microbienne (GRAM 2.0), Normandie université, UNICAEN, UNIROUEN, EA2656, 14033 Caen, France

^b Laboratoire de virologie, centre hospitalo-universitaire, 14033 Caen, France

^c Département de pédiatrie médicale, centre hospitalier universitaire de Rouen, EA2656 université de Normandie, UNIROUEN, 76000 Rouen, France

^d Normandie université, UFR Santé Rouen, département de médecine générale, 76000 Rouen, France

^e Inserm, U1142, laboratoire d'informatique médicale et d'ingénierie des connaissances en e-Santé, LIMICS, Sorbonne université, Paris, France

^f Normandie université, UNICAEN, UFR Santé, département de médecine générale, 14000 Caen, France

^g CHU de Caen Normandie, Normandie université, UNICAEN, unité de biostatistique et recherche clinique, 14000 Caen, France

^h CHU de Caen Normandie, unité de recherche clinique, 14000 Caen, France

ⁱ Normandie université, UFR Santé Rouen, département de médecine générale, 76000 Rouen, France

Reçu le 2 juillet 2021 ; accepté le 9 février 2022
Disponible sur Internet le 3 mars 2022

MOTS CLÉS

Soins primaires ;

Résumé Comprendre et traiter les infections respiratoires aiguës (IRA) sont un enjeu majeur de santé publique, particulièrement en cette période de pandémie à SARS-CoV2. ECOVIR (Étude des co-détections virales dans les prélèvements respiratoires), est une étude prospective,

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : hortense.petat@univ-rouen.fr (H. Petat).

<https://doi.org/10.1016/j.rmr.2022.02.060>

0761-8425/© 2022 SPLF. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.



Coordination
ville-hôpital ;
Virologie respiratoire

multicentrique, en Normandie, sur deux saisons hivernales (2018–2019 et 2019–2020). L'objectif de ce projet était de créer une biothèque de prélèvements respiratoires à partir d'une cohorte de patients consultant leur médecin traitant pour des symptômes d'IRA, permettant d'étudier les co-détectations virales. Trente-six médecins généralistes investigateurs (MGI), dans 8 maisons de santé normandes, ont participé à l'étude. Au total, 685 patients ont été inclus, présentant des symptômes d'IRA, et ont bénéficié d'un prélèvement nasopharyngé au cabinet médical par les MGI pour analyse virologique. Trente et un MGI/36 ont inclus des patients. La médiane d'inclusion était de 16 patients par MGI sur les 2 saisons (IC25–75 % [4,75 ; 27]). De plus, 92 % des patients ont répondu à l'appel à j7, recueillant des données cliniques, environnementales, et sociodémographiques. Nous avons donc créé un vrai réseau, original, permettant d'assurer un lien entre la recherche et les soins primaires, peu représentés dans les protocoles de recherche mais qui sont la pierre angulaire de notre système de santé en France, comme nous le constatons actuellement avec la crise sanitaire.

© 2022 SPLF. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

KEYWORDS

Primary care;
Hospital
coordination;
Respiratory virology

Summary Acute Respiratory Infections (ARI) need be better understood and more effectively treated, especially insofar as they are of pivotal importance in public health, particularly during a crisis such as the SARS-CoV2 pandemic. The prospective, multicentric cohort study of viral codetections in respiratory samples study known as ECOVIR was conducted in Normandy, France during two winters (2018–2019, 2019–2020). The objective of the project was to create a biobank of respiratory tract samples from patients consulting their general practitioner (GP) for ARI symptoms. ECOVIR involved 36 GP investigators (GPI), from 8 health care centers throughout Normandy. Six hundred and eighty-five patients with ARI symptoms were included; naso-pharyngeal samples were taken by the GPIs and subsequently analyzed in virology laboratories for the purposes of viral codetection. The median of inclusions was 16 patients for each of the 31 actively participating GPIs over the two winters (CI25–75% [4.75; 27]). By D7, 92% of the patients contacted had responded to our call for participation, enabling us to obtain clinical, environmental and socio-demographic data. Through this study, we created an original functional network, thereby establishing a viable link between research and primary care, which is generally underrepresented in research protocols, even though it constitutes the cornerstone of the French health care system, especially during this prolonged period of sanitary crisis.

© 2022 SPLF. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Introduction

Les infections respiratoires aiguës (IRA) représentent les infections les plus fréquentes en population générale (0 à 6 IRA par individu par saison épidémique) [1]. Leur prévalence reste difficilement estimable (environ 25 millions de cas de rhinopharyngites par an, ainsi que 10 millions de cas de bronchites selon Santé Publique France). Elles sont presque exclusivement traitées en ville : 97 % des IRA basses sont prises en charge par les médecins généralistes selon la Société de pathologie infectieuse de langue française. La morbidité et les coûts sociaux qu'elles induisent sont considérables : absentéisme, prescription inappropriée d'antibiotiques, recours aux hospitalisations pour les populations à risque. Elles sont source de transmission nosocomiale au sein des centres de soins ou de centres de vie communautaires tels que les crèches et maisons de retraite. Ces IRA sont très majoritairement d'origine virale [1]. La pandémie à SARS-CoV2 a touché plus de 177 millions de personnes

à travers le monde, et entraîné de plus de 3,84 millions de décès au 1^{er} juin 2021, et rappelle que l'enjeu social et économique est quotidiennement soulevé par les IRA.

Comprendre et traiter les infections virales respiratoires sont un enjeu majeur pour la santé de l'enfant avec pour objectif de préserver le capital respiratoire à l'âge adulte [2,3]. Elles sont responsables d'une importante morbidité respiratoire : bronchiolite aiguë, asthme du nourrisson, exacerbations des maladies respiratoires chroniques (asthme, bronchopneumopathies chroniques obstructives [BPCO]) [4,5]. Les virus responsables appartiennent à une quinzaine d'espèces différentes avec un tropisme préférentiel pour l'arbre respiratoire. Cependant, la majorité des données sont hospitalières. Le diagnostic respiratoire virologique est effectué en effet exclusivement en milieu hospitalier du fait de son coût élevé et du mode de prélèvement par écouvillonnage. Une des conséquences est la connaissance limitée de ces virus en médecine ambulatoire.



La communication entre la médecine de ville et l'hôpital est essentielle au bon fonctionnement de notre système de santé. Dès la promulgation de la loi hospitalière de 1970, un cadre légal évolutif est établi pour permettre la coordination entre les soins hospitaliers et les soins ambulatoires, plaçant le médecin généraliste au cœur du système de soins. En 2009, la loi Hôpital Patient Santé Territoire (HPST) stipule que le médecin traitant doit « orienter ses patients dans le système de soins et le secteur médicosocial, s'assurer de la coordination des soins nécessaires à ses patients ». La filière de soins primaires, ainsi définie, requiert une recherche médicale pour évoluer.

De 1984 à 2014, durant 30 saisons épidémiques hivernales, des médecins généralistes ont participé aux groupes régionaux d'observation de la grippe (GROG) en formant un réseau de surveillance de la grippe en soins primaires, symbole de la participation des médecins libéraux à la Santé Publique. Ces GROG étaient présents dans 21 régions françaises sur 22 (hors Corse) et permettaient de suivre activement, en temps réel chaque hiver, le déroulement des épidémies grippales, en incluant des patients atteints d'infections respiratoires aiguës venus consulter leur médecin généraliste. Parallèlement, depuis 1984, le réseau Sentinelles, sous la double tutelle de l'Inserm et de Sorbonne université, permet de suivre et de prévoir l'évolution temporo-spatiale d'indicateurs de santé en soins primaires (médecine générale et pédiatrie), et de détecter précocement la survenue d'épidémies nationales et régionales.

Nous rapportons, dans ce contexte de recherche en virologie respiratoire, la mise en place du projet ECOVIR (Étude des co-détectations virales dans les prélèvements respiratoires) développé avec les médecins généralistes de la région Normandie.

L'objectif de ce projet était de créer une biothèque de prélèvements des voies aériennes supérieures à partir d'une cohorte de patients consultant leur médecin traitant pour des symptômes d'IRA, nous permettant d'étudier les co-détectations virales de virus d'intérêt (Virus Respiratoire Syncytial, Rhinovirus et Coronavirus « classiques »). Pour cela, nous avons créé un véritable réseau pluri-professionnel ville-hôpital, qui a été en lien étroit et continu durant tout le projet, permettant ainsi de développer une communication durable, à l'origine d'autres études coopératives.

Matériels et méthodes

Projet

Le projet ECOVIR a débuté en mai 2018 lors de la rencontre entre l'équipe de recherche du GRAM 2.0 (Groupe de recherche sur l'adaptation microbienne) et les responsables des départements universitaires de médecine générale (DUMG) des UFR santé de Rouen et Caen de l'université normande. Onze réunions au total ont eu lieu entre mai 2018 et le début des inclusions en janvier 2019. Parmi les membres du GRAM participant au projet, on notait la présence d'une pédiatre en doctorat dans le laboratoire de virologie, des virologues universitaires, une technicienne de laboratoire. En septembre 2018, cinq internes du DES de médecine générale ont été recrutés pour participer au projet, leur offrant ainsi la possibilité d'un travail de thèse



Figure 1. Répartition des huit centres investigateurs sur la région normande.

d'exercice. Dès leur recrutement, les internes ont pris part à toutes les réunions entre le GRAM 2.0 et les DUMG. Parallèlement, nous avons sélectionné huit maisons médicales ou centres de santé répartis sur l'ensemble du territoire normand (ex-Haute et Basse Normandie) comme « centres investigateurs » (Fig. 1). Tous ces centres avaient la particularité de regrouper des médecins actifs au sein des DUMG et d'encadrer des internes. Notre équipe est allée sur place en septembre et octobre 2018 pour rencontrer les médecins généralistes, leur présenter le projet ECOVIR et recruter les futurs médecins généralistes investigateurs (MGI) d'ECOVIR. Chaque MGI était alors formé au geste du prélèvement nasopharyngé par écouvillonnage lors d'une rencontre sur le temps du midi (temps libre des médecins généralistes). Les supports utilisés étaient une vidéo de présentation, puis la pratique en réel encadré par nos experts. Le matériel de prélèvement nasopharyngé était fourni et apporté à chaque MGI. Le kit était constitué d'écouvillons floqués à tige souple, sécable, de petit diamètre, de milieu de transport virologique et des documents d'information à remettre aux patients (Fig. 2). Chaque médecin avait le matériel pour inclure 30 patients.

Éthique

Au décours de 4 réunions sur l'été 2018 entre l'équipe du GRAM et les DUMG, permettant l'ajustement de l'écriture du protocole, celui-ci a été soumis au Comité de protection des personnes (CPP) Est II (référence étude 18/10/10/63004) le 10 octobre 2018. Notre étude était une étude descriptive en population générale, multicentrique, prospective, non interventionnelle (Annexe 1).

Le dossier est passé en commission le 19 novembre 2018. Un avis favorable sous réserve de modifications mineures a été émis. Une nouvelle soumission a été envoyée le 12 décembre 2018 au CPP Est II qui a rendu sa réponse définitive favorable le 7 janvier 2019.

Il était remis à chaque patient inclus un document d'information concernant sa participation à l'étude (document de non-opposition). Le document était adapté en





Figure 2. Matériel distribué à tous les médecins généralistes investigateurs.

fonction de son âge : un document pour les patients majeurs, un document pour les enfants de moins de 11 ans, destiné aux parents, et un document pour les mineurs âgés entre 11 et 18 ans, destiné au patient lui-même, et non ses parents (Annexe 1). Pour les enfants de moins de 6 ans, un document d'information adapté, avec des dessins et des pictogrammes, était lu et remis par le MGI (Annexe 1).

Protocole

Les patients étaient inclus lors d'une visite chez leur médecin généraliste. Les critères d'inclusions de l'étude étaient : patients francophones, enfants ou adultes, consultant leur médecin généraliste spontanément et présentant des symptômes permettant le diagnostic d'infection respiratoire aiguë haute ou basse, en début de semaine (lundi-mardi-mercredi). Les diagnostics d'infection respiratoire aiguë étaient : rhinite, pharyngite, angine, otite moyenne aiguë, sinusite, laryngite, pneumopathie, bronchiolite, bronchite, exacerbation d'asthme, exacerbation de broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO). Les critères de non-inclusion étaient : des patients non francophones, non joignables par téléphone, ou ayant des antécédents d'épistaxis.

Les patients étaient répartis en 6 classes d'âge : 0–24 mois, 2–5 ans, 6–17 ans, 18–64 ans, 65–74 ans et plus de 75 ans. Chaque MGI avait une classe d'âge cible, choisie selon le profil de sa patientèle.

Lorsqu'un patient présentait les critères d'inclusion, le MGI avait la charge d'effectuer les mesures liées à la

recherche (Fig. 3) : information du patient, recueil de sa non-opposition pour sa participation à une étude non interventionnelle et remise d'un document d'information.

Le MGI recueillait alors des données cliniques présentées par le patient, ainsi que la prise en charge proposée. Le recueil des données s'effectuait en ligne par le MGI via le logiciel de sondage Lime Survey.

Le MGI réalisait alors le prélèvement nasopharyngé, puis le conservait à 4°C (réfrigérateur). Les prélèvements ainsi stockés étaient collectés chaque semaine et acheminés au laboratoire de Virologie du CHU de Caen par notre équipe selon un planning prédéterminé avec les MGI et tenant compte de leurs absences et indisponibilités.

Lors de l'inclusion, les patients étaient informés d'un rappel téléphonique à j7 de l'inclusion, réalisé par les cinq internes de médecine générale. Lors de cet échange (d'une durée de 5 à 7 minutes), des données complémentaires étaient recueillies : antécédents, environnement du patient, évolution de ses symptômes. Les internes contactaient les patients à plusieurs reprises s'ils ne répondaient pas. Les patients étaient considérés comme perdus de vue après 9 tentatives d'appel et messages.

Chaque semaine d'inclusion était donc organisée comme suit : inclusions les lundis, mardis et mercredis, rapatriement des prélèvements au laboratoire de virologie du CHU de Caen par notre équipe le jeudi, analyses au laboratoire le vendredi (Fig. 3 et 4).

Mesures mises en place pour la faisabilité de la recherche

Pour chaque MGI, l'objectif fixé était d'inclure 3 patients par semaine chaque semaine d'inclusion.

Afin de diminuer le temps d'information et favoriser l'adhésion du patient, des posters explicatifs étaient accrochés dans les salles d'attente des MGI (Fig. 5). Si des écrans étaient disponibles dans les salles d'attente, un présentation Power Point était diffusée pour présenter ECOVIR.

Le questionnaire en ligne a été conçu pour être rempli en 2 à 3 minutes par le MGI au décours de son examen clinique lors de l'inclusion. En tout, nous avons estimé à 6 minutes au total le temps dédié par le MGI à l'inclusion d'un patient.

Un « programme de relance » quotidien auprès des MGI avait été établi par SMS durant toute la période d'inclusion (Fig. 4). Chaque jeudi, un mail et un texto de remerciements étaient envoyés aux MGI, indiquant en temps réel le nombre d'inclusions réalisées.

Une permanence de l'équipe porteuse du projet était disponible pour répondre aux questions de recherche, techniques ou logistiques des MGI.

Questionnaires de satisfaction des MGI au décours de la première saison

Des questionnaires de satisfaction ont été adressés aux MGI au décours de la chaque saison ECOVIR, afin de recueillir leurs impressions, et accueillir leurs remarques. Dans le questionnaire de « bilan » de la première saison, il leur était également demandé s'ils souhaitaient participer à la deuxième saison. Suite aux questionnaires, nous nous sommes rendus chez les MGI afin de les rencontrer et de



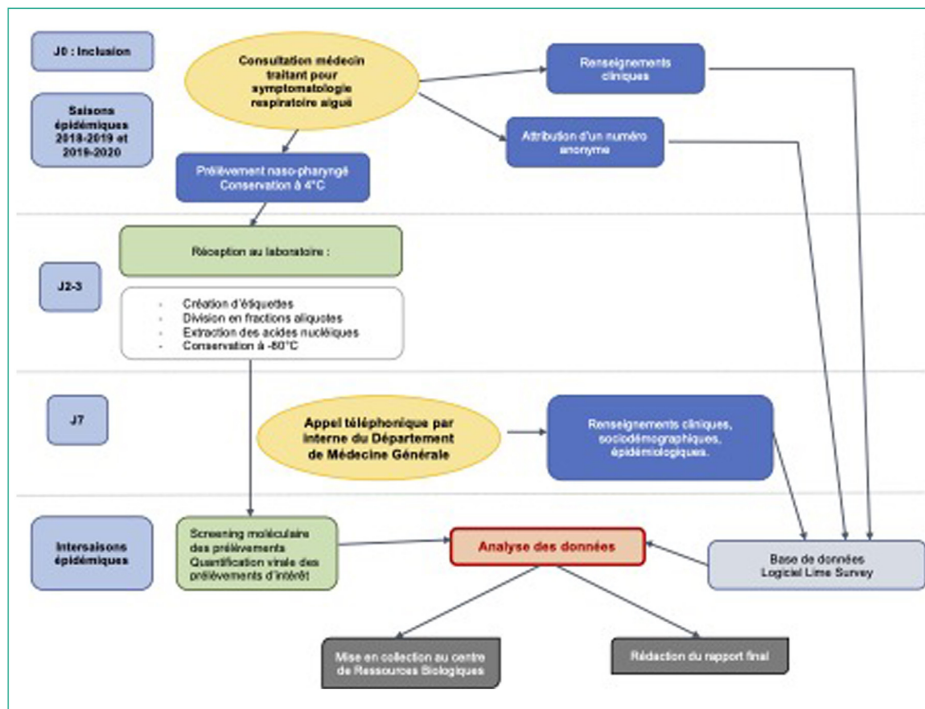


Figure 3. Workflow du déroulement de l'étude ECOVIR.

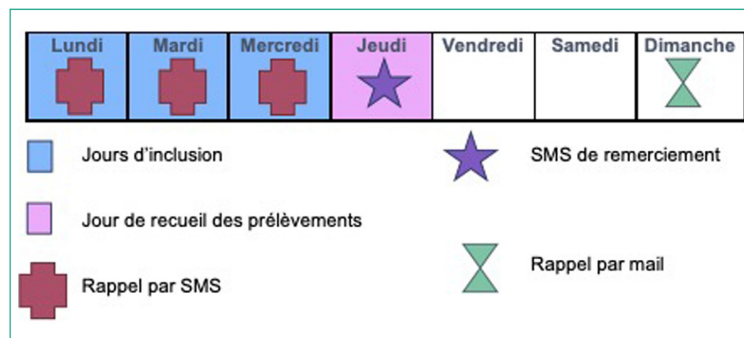


Figure 4. Semaine type d'inclusion ECOVIR.

pouvoir échanger avec eux directement sur le déroulement de l'étude.

Résultats

L'étude s'est déroulée sur deux saisons hivernales : la première du 21 janvier au 10 avril 2019 (12 semaines) et la deuxième du 4 octobre 2019 au 13 mars 2020 (21 semaines). La deuxième saison s'est terminée prématurément lors du

passage en phase 3 de l'épidémie de SARS-CoV2 (premier confinement). Trois centres investigateurs haut-normands et 5 centres bas-normands ont participé à l'étude. Trente-trois MGI ont participé à la première saison, 36 à la deuxième saison. Parmi les 33 MGI de la première saison, tous ont souhaité participer à la deuxième saison. Les médecins investigateurs (42 % de femmes) étaient pour 74 % maîtres de stage d'internes du DES de médecine générale avec une moyenne d'âge de 44 ans, exerçant en moyenne 7 demi-journées par semaine depuis 14,6 ans (Tableau 1).



CHU **Caen** **CHU** **Rouen Normandie**

Votre médecin participe à la recherche

Qui sommes-nous?
Nous sommes des scientifiques chercheurs en virologie des CHU normands et des Universités de Caen et de Rouen.

Quel est notre objectif?
Notre étude est appelée ECOVR (pour Etude des Co-détecteurs Viraux dans les Prélèvements Respiratoires). Elle étudie les virus responsables des infections respiratoires telles que la bronchite, la bronchiolite, la rhume, l'otite, la conjonctivite.

Comment votre médecin participe-t-il à la recherche?
Votre médecin participe activement à cette étude, en prélevant les sécrétions nasales de certains de ses patients présentant une infection respiratoire, et en recueillant des données cliniques. Si vous faites partie de la classe d'âge cible, votre médecin peut vous demander de participer à l'étude.

Comment pouvez-vous nous aider?
Si vous acceptez, votre médecin vous remettra une lettre d'information, et vous demandera votre accord pour participer. Pour les enfants de moins de 11 ans, ce sont les parents qui donnent leur autorisation. Puis votre médecin remplira un court questionnaire, vous examinera comme il le fait habituellement, et réalisera un prélèvement. Dans 7 jours, un médecin de notre équipe vous contactera afin de recueillir des informations (sur vos habitudes de vie, votre enrôlement) et également connaître l'évolution de vos symptômes.

En quoi consiste le prélèvement?
Le prélèvement est réalisé grâce à un écouvillon foyé qui ressemble à un long coton-tige. Le médecin introduit cet écouvillon dans une narine, fait quelques mouvements de rotation et le ressort. Cela n'est pas douloureux.

Qu'arrive-t-il au prélèvement?
Celui-ci est placé immédiatement au réfrigérateur à 4°C. Il sera ensuite acheminé au laboratoire de virologie pour faire les analyses.

Les données sont-elles anonymes?
Bien sûr. Tout ce qui vous sera demandé restera anonyme. Vous êtes protégés par le secret de la recherche.

Vous avez des questions?
Contactez nous! horlemse.petat@univ-rouen.fr

Figure 5. Poster affiché dans les salles d'attente des médecins investigateurs.

	Pourcentage ou années
Âge, ans	44
Sexe féminin, %	42
Exercice en ville, %	47
Exercice en groupe, %	100
Maître de stage, %	74
Expérience professionnelle, ans	14,6
Exercice à temps partiel, %	92

Six cent quatre-vingt-cinq patients ont été inclus durant les 2 saisons (191 lors de la première saison, 494 lors de la deuxième) (Fig. 6 et Tableau 2). Trois patients ont refusé de participer à l'étude. Il s'agissait de parents refusant le prélèvement nasopharyngé sur leur enfant par « peur que le geste soit douloureux ». Des patients ont également été inclus plusieurs fois au cours des deux saisons. Les MGI ont qualifié de « facile » la réalisation des prélèvements nasopharyngés sur 91 % des patients. Sur les deux saisons, la médiane d'inclusion était de 16 patients par médecin investigateur (IC25–75 % [4,75 ; 27]) (Fig. 7). Lors des 12 semaines d'inclusion de la première saison, 24/33 MGI



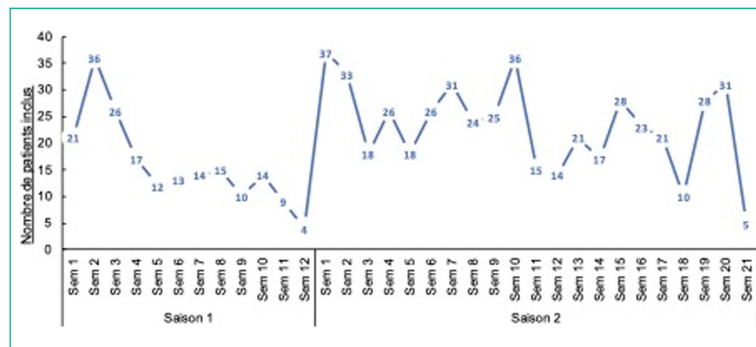


Figure 6. Nombre d'inclusions ECOVIR durant les semaines des deux saisons.

Tableau 2 Caractéristiques des patients inclus.

	n (%)
Classes d'âge	
0–24 mois	76 (11)
2–5 ans	58 (8)
6–17 ans	72 (11)
18–64 ans	388 (57)
65–74 ans	61 (9)
>75ans	30 (4)
Sexe féminin	405 (59)
Perdus de vue	54 (8)
Prélèvements analysés	672 (98)
Prélèvements positifs en PCR multiplex	447 (67)

(73 %) ont inclus, avec une moyenne de 6 patients sur les 12 semaines. Au cours des 21 semaines de la deuxième saison, 31/36 MGI (86 %) ont inclus avec une moyenne de 13 patients. Le nombre d'inclusions par MGI est rapporté sur la Fig. 7. Dix MGI ont eu besoin de matériel de prélèvement supplémentaire. 75 % des MGI ont attribué le manque d'inclusions à un oubli. Cependant, concernant les rappels (SMS, mails), 100 % des MGI ont jugé cette fréquence « suffisante ».

Six cent soixante-douze échantillons (98 % des inclusions) ont été collectés. On peut noter quelques problèmes logistiques de rapatriement de prélèvements, notamment en raison de formations ou de congés. Six cent vingt-cinq prélèvements ont été jugés comme « réalisés avec facilité » par le médecin investigateur ayant fait le geste (91 %). Sur les prélèvements acheminés au laboratoire de virologie, 447 (67 %) ont été positifs à au moins un virus respiratoire recherché par PCR multiplex (Tableau 2).

Concernant le rappel à j7, 631 (92 %) patients ont répondu (Tableau 2). On note une augmentation des perdus de vue pendant les vacances scolaires (Noël et février de chaque saison), tout comme une chute des inclusions lors de ces mêmes périodes. Tous les patients rappelés avaient été informés du rappel par le MGI. Aucun patient recontacté à j7 n'a refusé de répondre au questionnaire.

Le planning de relance a été respecté scrupuleusement. On note cinq appels de médecins à notre équipe. Pour l'un il s'agissait d'un problème de réseau internet ; pour l'un il s'agissait d'un doute concernant un critère d'inclusion ; pour deux il s'agissait de savoir s'il était possible d'inclure deux fois le même patient au cours de deux consultations différentes ; et le dernier pour savoir si l'on pouvait certifier au patient de lui donner le résultat virologique par téléphone lors de l'appel à j7.

Discussion

Notre travail est une étude originale de mise en place d'une coordination ville/hôpital entre médecins de spécialités différentes, la recherche et les soins primaires. Par l'intermédiaire des DUMG, notre équipe de recherche a

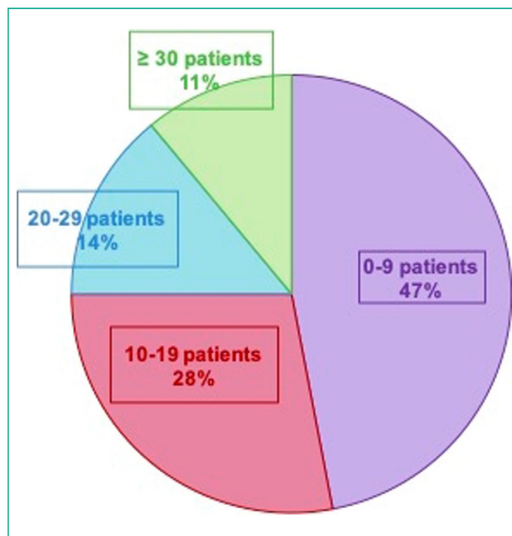


Figure 7. Nombre de patients inclus par les médecins généralistes investigateurs lors de la deuxième saison.



inclus 685 patients de ville répartis sur l'ensemble du territoire normand et analysé leurs prélèvements nasopharyngés sur deux saisons épidémiques hivernales.

Nous avons pu créer un nouveau réseau ville/hôpital régional autour d'un projet de recherche non interventionnelle, mais comprenant un acte d'écouvillonnage. Malgré cela, on note un excellent taux d'inclusion avec seulement 3 refus de participer à l'étude de la part de parents devant l'appréhension du prélèvement chez leur enfant. Depuis, la pandémie à SARS-CoV2 a largement vulgarisé ce geste, qui fait partie de notre quotidien.

Concernant les MGI, leur population était plus jeune que la moyenne régionale (44 ans versus 54 ans), un peu plus féminine (42 % versus 36 %) et majoritairement à temps partiel (7 demi-journées en moyenne) contre 11 % au niveau de la France (selon la Direction de la recherche, des études, de l'évaluation et des statistiques [DREES]). Grâce aux nouvelles technologies (SMS, mails), nous avons pu communiquer en permanence et très facilement avec les médecins investigateurs, et réagir en temps réel à leurs difficultés ou leurs demandes. Ceux-ci étaient plutôt jeunes, et donc à l'aise avec l'utilisation des mails, SMS et également des questionnaires en ligne.

Il nous a été difficile de comparer notre méthodologie à d'autres cohortes, tant françaises qu'internationales, car les soins primaires sont peu, voire pas, représentés dans les études virologiques cliniques publiées. Nous nous sommes appuyés sur l'expérience et le succès du réseau GROG. Cependant, celui-ci était un réseau de surveillance épidémiologique, et non de recherche. Les systèmes de santé de chaque pays sont peu comparables, car très différents. Les cohortes américaines affichant des patients ambulatoires atteints d'infections respiratoires aiguës [6–8] incluent des patients se présentant aux urgences et ne sont pas des études de soins primaires comme ils sont définis en France. En 2018, une étude européenne étudiant l'étiologie des infections respiratoires basses en soins primaires a été réalisée à l'échelle européenne, mais aucune méthodologie de travail concernant la mise en place de l'étude n'est précisée, et les 294 médecins généralistes avaient inclus en moyenne 10 patients chacun sur 3 ans [9].

La difficulté de mettre en place un tel travail de recherche est de s'assurer en concertation avec les médecins généralistes de la faisabilité de celle-ci et de l'adapter au mode d'activité. L'objectif initial était d'inclure 3 patients par semaine et par MGI. Seuls 685 patients ont été inclus sur les 1500 attendus. Au total, 84 % des MGI ont inclus au moins un patient au cours de l'étude, versus 73 % des médecins participant au GROG en 2014. Il était retrouvé également une hétérogénéité dans les inclusions selon les MGI dans le réseau GROG : 1/3 étaient de « gros préleveurs », 1/3 de « moyens préleveurs », et 1/3 de « petits préleveurs » (2014), versus respectivement 11 %, 14 % et 75 % pour ECOVIR. En écrivant le protocole, nous avons pensé agir comme les GROG, en demandant aux MGI d'inclure les premiers patients de chaque semaine éligible à une inclusion. Cependant, les DUMG ont demandé à pouvoir « choisir le bon moment dans leur journée de consultation », afin de pouvoir s'organiser.

Une autre piste du manque d'inclusions était le manque de patients éligibles à l'inclusion. Celle-ci est peu crédible car selon l'Observatoire de médecine générale, les motifs « état fébrile » et « rhume », critères d'inclusion des patients ECOVIR, représentent respectivement 17 % et 12 % des motifs de consultation en médecine générale. Trois MGI sur quatre ont exprimé l'oubli lors de la présence d'un patient éligible. La perte de temps pendant la consultation était une raison avancée fréquemment lors des questionnaires de satisfaction. La moyenne d'une consultation en médecine générale est de 17 minutes. Nous avons estimé à 6 minutes (+35 %) le temps pour réaliser une inclusion ECOVIR, ayant un impact sur le déroulement d'une consultation. Cela avait été présenté aux futurs MGI lors de nos premières rencontres.

Il est également probable qu'une réticence à la pratique du prélèvement nasopharyngé a été une limite aux inclusions, surtout sur les jeunes enfants. Cependant, 8,7 % seulement des prélèvements ont été décrits comme « non faciles » lors de leur réalisation. Le fait de prendre le temps de former les médecins, en présentiel, en s'appuyant sur des vidéos pédagogiques, puis la pratique du geste en réel encadrée par des experts de notre équipe, a permis aux MGI de maîtriser le geste avant toute inclusion. Plus les médecins incluait, plus ils trouvaient le geste facile, et plus ils réalisaient d'inclusions. Ce cycle « vertueux » n'a pas été observé chez tous les médecins, certains étant restés sur l'appréhension initiale du geste. Celle-ci était constante sur les premiers prélèvements mais les MGI ont conclu que leur réalisation était simple et rapide. De plus, avant la pandémie, ce geste n'était réalisé qu'à l'hôpital, et non en soins primaires par les laboratoires de ville, donc peu connu par le grand public. Nous pouvons penser que si ECOVIR avait été réalisée actuellement, le nombre de patients inclus aurait été beaucoup plus grand, car le prélèvement n'aurait pas été un frein pour les inclusions, tant du point de vue des MGI que des patients.

Une des autres explications au faible nombre de patients inclus est la limitation des inclusions à 3 jours par semaine, pour des raisons techniques et de conservation des échantillons (analyse possible pour des prélèvements datant de moins de 5 jours). En effet, une part importante des MGI avaient une activité à temps partiel, avec presque 50 % qui ne travaillaient pas le mercredi, jour d'inclusion. D'autres événements sont à prendre en compte : les congés, les absences pour formation et les périodes de suractivité. Le mode de rappel par SMS a été jugé efficace et suffisant en fréquence, mais il conviendrait peut-être de réfléchir à un mode de relance plus interactif, et non juste un système de SMS, où la participation des MGI est passive (lecture seule). Nous avons essayé d'anticiper les difficultés en mettant en place des mesures pour faciliter la faisabilité de cette étude. Mais l'analyse de cette première mise en place a mis en évidence la nécessité d'affiner encore les critères de faisabilité au plus près du mode d'exercice des médecins généralistes et de préciser l'évaluation des barrières rencontrées.

Concernant les résultats, notre étude apporte pour la première fois en France une fréquence des virus chez des patients relevant de soins primaires : 67 % des



prélèvements étaient positifs à au moins un virus en PCR Multiplex pour les virus respiratoires recherchés. En effet, ces résultats sont habituellement hospitaliers à cause de l'écouvillonnage. De plus, les études portent sur des patients présentant des pathologies nécessitant une hospitalisation. Tout comme dans les cohortes hospitalières, les prélèvements négatifs sont plus nombreux chez les adultes (40 % chez les 18–64 ans) comparés aux enfants (8 % chez les 2–5 ans) (EPIC study) [6,7]. Cependant, dans cette étude multicentrique, les témoins étaient des patients non symptomatiques. Dans l'étude Tennessee Children's Respiratory Initiative (TRCI) [8], 26 % des prélèvements des patients avec infection respiratoire haute étaient négatifs, mais la cohorte était limitée à des nourrissons de moins de 12 mois. Dans le réseau GROG, les médecins avaient les résultats virologiques des patients inclus dans la journée. Pour ECOVIR, les MGI n'avaient aucun résultat des prélèvements qu'ils réalisaient. Cela traduit une volonté importante de leur part à participer à la recherche clinico-virologique, représentant une force pour développer notre réseau unique ville/hôpital.

Un point important de notre projet, soutenu par une équipe pluridisciplinaire, est l'investissement de chercheurs « juniors », tant au niveau de la partie « élaboration du projet » que dans sa réalisation, avec l'implication de doctorants scientifiques, mais également des internes de médecine générale, qui ont pu découvrir le monde de la recherche, et au final soutenir chacun leur thèse d'exercice au décours de ce projet.

La force de ce projet est de démontrer qu'il est possible de réaliser une étude avec des prélèvements des sécrétions des voies aériennes supérieures, dans une cohorte de taille significative avec moins de 8 % de perdus de vue à j7. Cette étude a ainsi permis d'obtenir une première cohorte de patients suivis en soins primaires. La création de ce réseau nous a également permis de communiquer pendant la pandémie de SARS-CoV2 qui a interrompu l'étude. Nous avons espéré pouvoir reprendre les inclusions mais les MGI normands n'ont pas été équipés de façon adéquate pour permettre la réalisation du prélèvement nasopharyngé dans les mesures de sécurité sanitaire recommandées malgré la demande de nos médecins investigateurs.

Conclusion

Notre étude ECOVIR, inédite, permettant d'inclure 685 patients ambulatoires de tous âges présentant une infection respiratoire aiguë haute ou basse, a permis une étroite collaboration entre l'hôpital, 36 MGI répartis sur l'ensemble du territoire normand, et notre unité de recherche GRAM 2.0. Cela nous a permis de créer un vrai réseau, de faire le lien entre la recherche et les soins primaires, qui représentent une part importante de notre système de santé et qui sont peu représentés dans les protocoles de recherche.

Remerciements

L'ensemble de auteurs remercie les centres hospitaliers, tous les médecins généralistes investigateurs (liste

ci-dessous), la Délégation à la recherche clinique et à l'innovation du CHU de Caen, S. Corbet, A. Petat, le GRAM 2.0.

Liste des MGI ECOVIR :

- maison de santé Saint-Éloi, Rouen, France : Dr A. Le Floch, Dr S. Le Friec, Dr M. Laine, Dr L. Pellerin, Dr M. Rigal-Lashkar, Dr Barbara Vatin ;
- maison de santé du pays neufchâtelois, Neufchatel-en-Bray, France : Dr F. Calero, Dr Hélène Comont, Dr C. Guillermin, Dr Claire Houle, Dr Vincent Lemarie, Dr S. Ozanne, Dr Anne-Sophie Pimont, Dr Matthieu Schuurs, Dr O. Wermester ;
- maison médicale Armstrong, Grand Quevilly, France : Dr C. Jouen, Dr J.-Y. Maunoury, Dr E. Mauviard, Dr Y. Sevrin, Dr C. Vianney ;
- pôle de santé du port, Granville, France : Pr F. Le Bas, Dr A. Plunet ;
- pôle de santé de Villedieu, Villedieu-Les-Poeles, France : Dr O. Bataille, Dr N. Boyer, Dr P. Sabathier, Dr T. Trenier ;
- cabinet médical Colombelles, Colombelles, France : Dr E. Barbe-Delrue, Dr P. Grujard, Dr J. Le Bas, Dr S. Vallayes ;
- pôle santé de Vaucelles, Caen, France : Dr X. Humbert, Dr G. Daireaux, Dr C. Milcent ;
- maison médicale Deauville Côte Fleurie, Deauville, France : Dr A. Rabiaza, Dr N. Sainmont, Dr L. Simon.

Déclaration de liens d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

Annexe 1. Matériel complémentaire

Le matériel complémentaire (Annexe 1) accompagnant la version en ligne de cet article est disponible sur <http://www.sciencedirect.com> et <https://doi.org/10.1016/j.rmr.2022.02.060>.

Références

- [1] Monto AS, Malosh RE, Petrie JG, et al. Frequency of acute respiratory illnesses and circulation of respiratory viruses in households with children over 3 surveillance seasons. *J Infect Dis* 2014;210:1792–9.
- [2] Chan JYC, Stern DA, Guerra S, et al. Pneumonia in childhood and impaired lung function in adults: a longitudinal study. *Pediatrics* 2015;135:607–16.
- [3] Backman K, Piippo-Savolainen E, Ollikainen H, et al. Irreversible airway obstruction in adulthood after bronchiolitis in infancy: evidence from a 30-year follow-up study. *Respir Med* 2014;108:218–23.
- [4] Delmas M-C, Guignon N, Leynaert B, et al. Augmentation de la prévalence de l'asthme chez le jeune enfant en France. *Rev Mal Respir* 2017;34:525–34.
- [5] de Blic J, Brouard J, Vabret A, et al. Interactions micro-organismes et voies aériennes distales : spécificités pédiatriques. *Rev Mal Respir* 2017;34:134–46.
- [6] Jain S, Williams DJ, Arnold SR, et al. Community-acquired pneumonia requiring hospitalization among U.S. children. *N Engl J Med* 2015;372:835–45.



- [7] Jain S, Self WH, Wunderink RG, et al. Community-acquired pneumonia requiring hospitalization among U.S. adults. *N Engl J Med* 2015;373:415–27.
- [8] Hartert TV, Carroll K, Gebretsadik T, et al. The Tennessee children's respiratory initiative: objectives, design and recruitment results of a prospective cohort study investigating infant viral respiratory illness and the development of asthma and allergic diseases. *Respirol Carlton Vic* 2010;15:691–9.
- [9] Ieven M, Coenen S, Loens K, et al. Aetiology of lower respiratory tract infection in adults in primary care: a prospective study in 11 European countries. *Clin Microbiol Infect* 2018;24:1158–63.

D. Etude Guérande

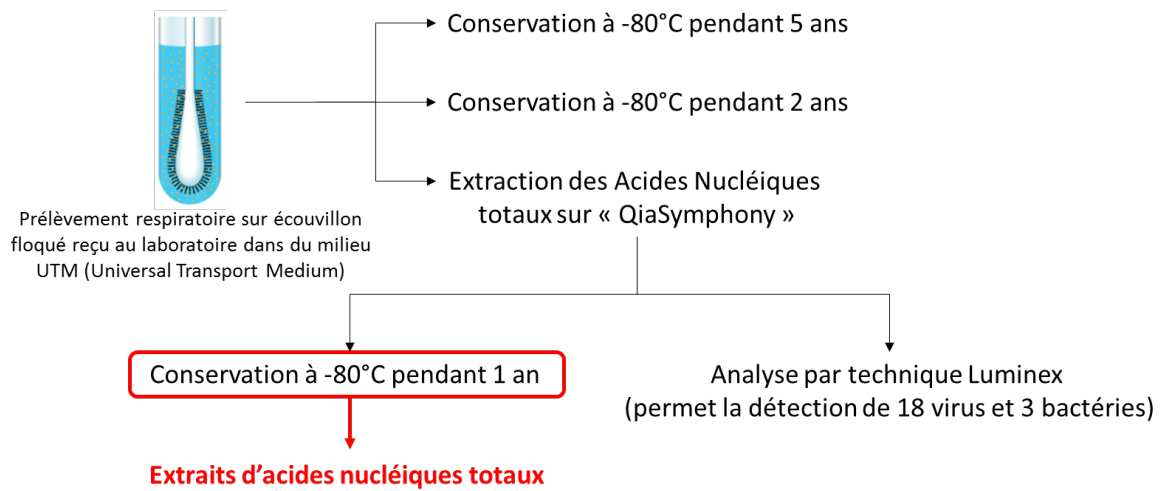
La cohorte appelée Guérande était une étude prospective multicentrique nationale qui a été réalisée entre 2012 et 2014. Elle avait pour but d'évaluer l'efficacité des nébulisations de sérum salé hypertonique dispensées aux urgences pédiatriques à des nourrissons s'y présentant pour une première bronchiolite. Les résultats cliniques ont été publiés auparavant (161). Au cours de leur inclusion, les nourrissons avaient bénéficié de prélèvements naso-pharyngés, qui ont été rapatriés au laboratoire de virologie du CHU de Caen. Ces nourrissons devaient être âgés entre 6 semaines et 12 mois, et ne devaient pas avoir d'antécédent de bronchiolite.

E. Matériels et Méthodes

Tous les prélèvements des deux cohortes (ECOVIR et Guérande) ont été acheminés au Laboratoire de Virologie du CHU de Caen. Ils ont ensuite été extraits (**Acides Nucléiques (AN)** totaux) sur « QIASymphony », (Qiagen, Hilden, Allemagne) et analysés par technique Luminex (Figure 20).



Figure 20- Démarche de prise en charge des prélèvements respiratoires au laboratoire



1. Conservation des extraits d'acides nucléiques

Pour limiter la dégradation des extraits d'ARN par de trop nombreux cycles de congélation/décongélation, les extraits ont été aliquotés par 8 µL dans des barrettes de 8 microtubes à la première décongélation. Puis ils étaient soit utilisés directement, soit recongelés jusqu'à leur utilisation, limitant ainsi les cycles de congélation/décongélation à 2.

2. Transcription Inverse PCR (RT-PCR) sur les extraits d'acides nucléiques

Afin de produire une séquence génétique à partir des extraits d'acides nucléiques provenant des prélèvements respiratoires, ces derniers ont été soumis à une « Reverse Transcription » afin d'obtenir des produits d'amplification sous forme d'ADN.

Le mix PCR a été préparé de la façon suivante :

- 10 µL de 2 X Reaction Mix (dNTPs + MgSO₄)
- 0,2 µL de RNase inhibitor
- 0,8 µL de Superscript™ III RT/Platinum™ Taq Mix
- 0,15 µL d'amorce sens
- 0,15 µL d'amorce anti-sens

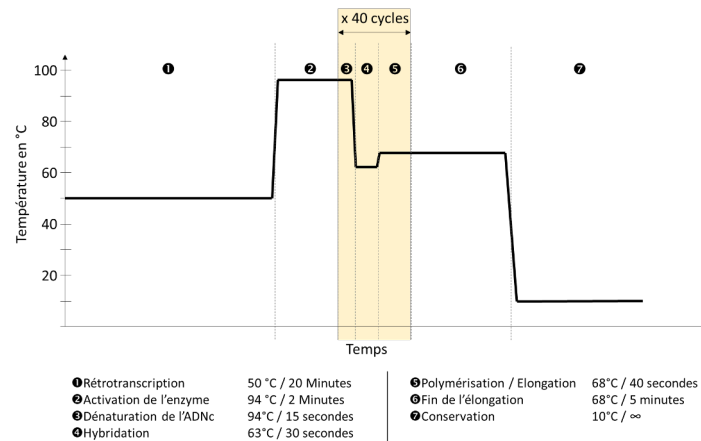
8µL d'extraits d'AN ont été ajoutés à ces 12 µL de mix pour obtenir un volume de réaction final de 20µL. Les amorces utilisées (Tableau 2) proviennent d'une méthode décrite en 2002 (162). Cette méthode permet d'amplifier un fragment d'ADN de 549 pb à partir d'ARN (via la synthèse d'ADNc durant la transcription inverse), allant de la partie 5'UTR du génome jusqu'au début de la VP2. Le protocole de PCR utilisé est décrit en Figure 21.



Tableau 2: Amorces utilisées pour la RT-PCR de typage

Nom de l'amorce	Concentration initiale	Concentration de travail	Séquence (5' → 3')	Taille en pdb	Position sur le gène
Sens : 9895F	100 µM	10 µM	GGG ACC AAC TAC TTT GGG TGT CCG TGT	27	534-560
Anti-sens : 9565R	100 µM	10 µM	GCA TCI GGY ARY TTC CAC CAC CAN CC	26	1083-1058

Figure 21 : Programme de RT-PCR



3. Méthode de séquençage des rhinovirus

Nous avons sélectionné les prélèvements positifs à Rhino/enterovirus, pour pouvoir ainsi les séquencer.

a. Electrophorèse sur gel d'agarose

Cette étape a servi à identifier les extraits ayant été amplifiés durant la PCR, et qui correspondaient donc à des Rhinovirus. Le gel d'agarose était préparé avec 1,8 g d'agarose pour 120 mL de **TBE** (Tris Borate EDTA) 1X, soit un gel à 1,5%, auquel on ajoutait 10µL de GelRed™ Nucleic Acid Gel stain au 1/10^{ème}. Le GelRed est un fluorophore intercalant de l'ADN, dont la longueur d'onde d'excitation est de 300nm, pour une longueur d'onde d'émission de 600nm. La migration s'effectuait durant 30 minutes à 100V. Les extraits étaient visualisés grâce à l'appareil « Molecular Imager® GelDoc™ XR+ Imaging System », (BioRad, Hercules, Californie, Etats-unis) et traités grâce au logiciel « ImageLab ».

b. Séquençage des amplicons provenant des extraits d'acides nucléiques

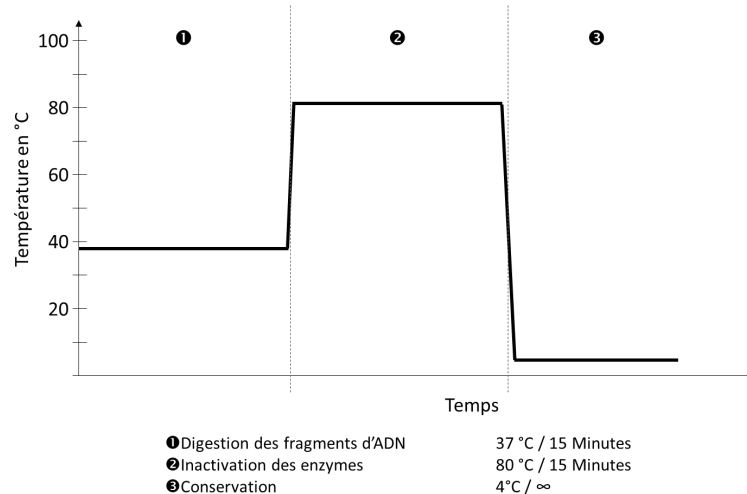
Les amplicons provenant des extraits positifs en RT-PCR étaient conservés à 4°C puis préparés (digestion, réaction de séquençage et purification) pour être séquencés.

Digestion des amplicons d'ADN



Cette digestion (ou Clean-up) était réalisée par traitement avec l'ExoSAP-IP (ThermoFischer, Waltham, Massachusetts, Etats-unis) composé d'une exonucléase et d'une phosphatase visant à digérer les amorces. Deux microlitres d'enzymes et cinq microlitres d'amplicons étaient placés dans des tubes et incubés dans un thermocycleur, suivant le programme décrit en Figure 22.

Figure 22 : Programme de digestion des amplicons



Réaction de séquençage

La réaction de séquençage était réalisée à l'aide du kit « BigDye Terminator version 1.1 cycle sequencing kits » (Applied Biosystems, Foster City, Californie, Etats-unis). Des dNTP marqués par des molécules fluorescentes étaient introduits lors de l'amplification des fragments que l'on souhaitait séquencer. Les amorces utilisées étaient les mêmes que pour la RT-PCR (1 par réaction).

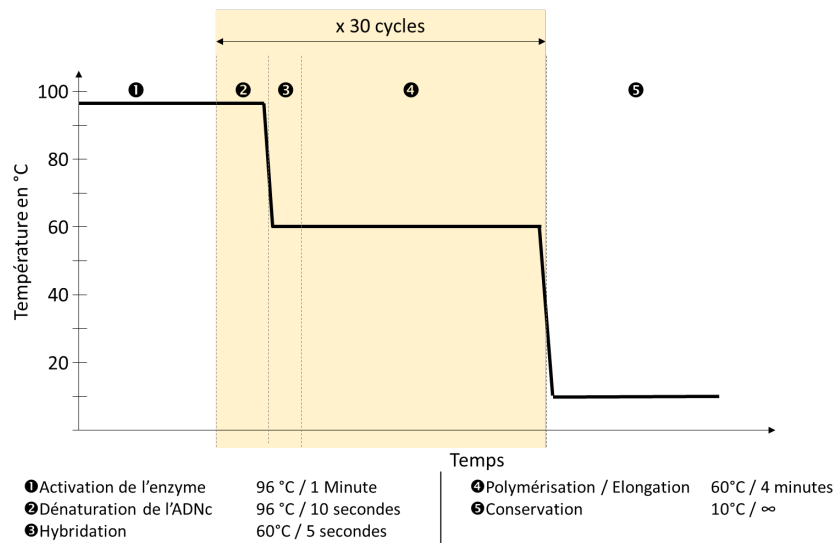
Le mix est préparé de la façon suivante, pour un volume final de 20 µL :

- 2 µL de Ready reaction mix
- 3 µL de 5X sequencing buffer
- 1 µL d'amorce sens ou anti-sens
- 1 µL d'amplicon
- 13 µL d'eau

Le protocole utilisé est décrit en Figure 23.



Figure 23- Programme PCR de réaction de séquençage



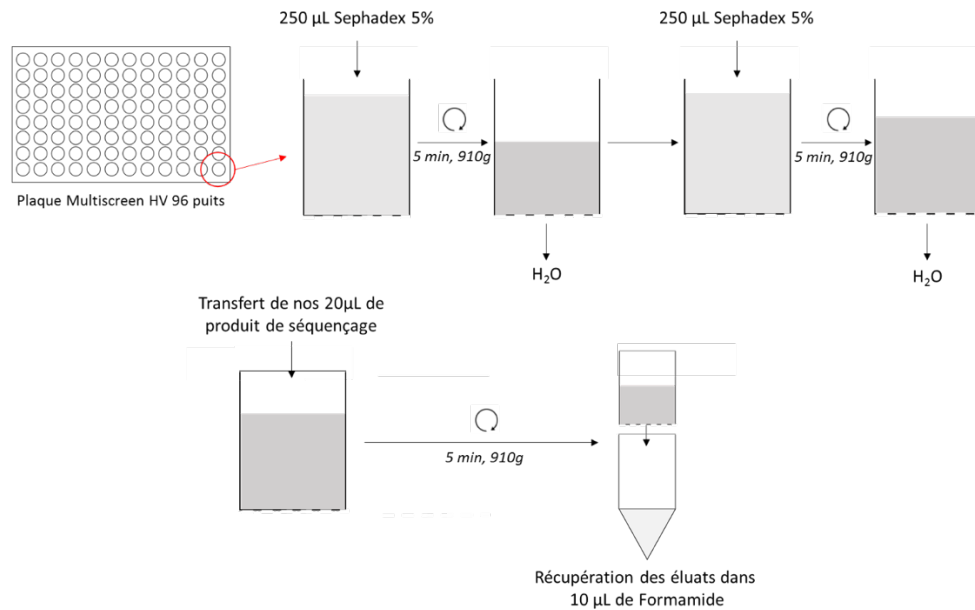
Purification par filtration sur colonne de gel Sephadex

Cette étape avait pour but de purifier par gel-filtration les produits de réaction de séquence. Pour se faire, de la résine « Séphadex ® G50 » (Sigma, Saint-Louis, Missouri, Etats-unis) était utilisée. Cette résine permettait de dé-saler les produits de séquençage, d'éliminer les nucléotides non incorporés, mais également les enzymes et les amorces. Une plaque 96 puits « Multiscreen HV » (puits à filtres) servait de support inerte pour la résine G50. Cette plaque était préparée comme indiqué dans la Figure 24.

La plaque de filtration est ensuite placée sur une plaque 96 puits collectant les éluats. La filtration est effectuée suivant la description de la figure 12. Les produits de séquençage sont prêts à être déposés sur le séquenceur.



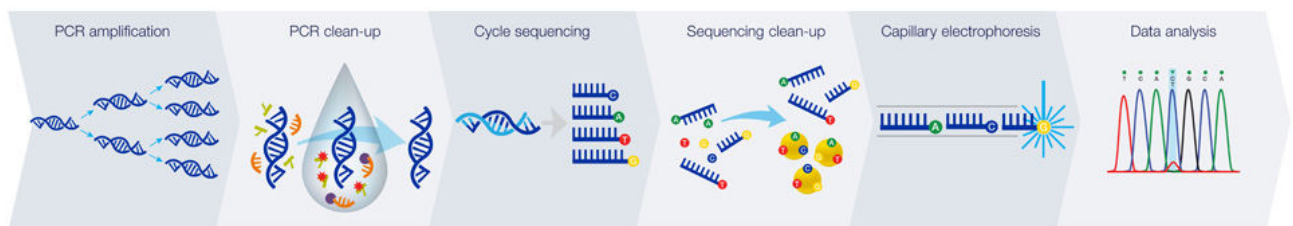
Figure 24- Préparation de la plaque de filtration sur colonne de Sephadex et filtration des produits de séquençage



Envoi en séquençage

Le séquençage était réalisé par méthode de Sanger (Figure 25) (163) (164) sur séquenceur « Applied 3500 Genetic Analyzer » (Applied Biosystems, Foster City, Californie, Etats-unis). Le séquençage était effectué dans le service de génétique du CHU, et les résultats sont reçus en moyenne en 24 à 48h.

Figure 25- Principe de la réaction de séquençage par méthode de Sanger



c. Analyse bioinformatique- Traitement des séquences

Après réception des chromatogrammes, l'analyse était effectuée sur le logiciel « CLC Main WorkBench 8 » (CLC BioQiagen®, Hilden, Allemagne).

Les séquences étaient exploitées de la manière suivante :

- **Nettoyage de la séquence (Trim)** : une fonction du logiciel permet d'éliminer les parties non exploitables des séquences, pour obtenir une séquence fiable en fonction des scores de qualité du chromatogramme. Après ce premier nettoyage, les sites de fixation de nos amorces étaient



recherchés, et les sites en amont de l'amorce sens et en aval de l'amorce anti-sens étaient retirés (amorces comprises).

- **Construction des contigs** : les séquences sens et anti-sens étaient assemblées (alignées) en une séquence consensus sur la base des scores de qualité du chromatogramme. Les séquences consensus étaient utilisées pour la suite des analyses.
- **Alignement** : une fois les séquences consensus construites pour tous les produits de séquençage à analyser, des alignements étaient réalisés afin de créer des matrices de séquences.

Une partie des travaux de design des amorces étaient effectués par comparaison de ces matrices

- **Construction d'un arbre phylogénétique** : les séquences consensus étaient utilisées pour établir une représentation graphique des distances génétiques entre les séquences via la construction d'un arbre phylogénétique. La méthode de construction phylogénétique choisie était la méthode de vraisemblance, elle consistait à établir un arbre de départ par un algorithme dérivé de Neighbor Joining (bioNJ). L'analyse en maximum de vraisemblance était ensuite réalisée par phyML (implémenté dans le logiciel SeaView (165) (166)) suivant le modèle d'évolution **General Time Reversible (GTR)**. L'arbre était ensuite amélioré par des méthodes de « **Switching, Pruning et Ratcheting (SPR)** ». La robustesse des nœuds était effectuée au moyen d'un **Likelihood RatioTest (LRT)**. Ensuite les arbres étaient visualisés et mis en forme grâce au logiciel FigTree 1.4.4 (167).

Les séquences étaient ensuite « blastées » c'est-à-dire qu'elles étaient comparées (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) à la base de données du NCBI.

4. Construction des systèmes de RT-PCR en temps réel

a. Design des amorces et sondes pour la RT-PCR en temps réel

Une fois l'analyse « BLAST » terminée, les séquences correspondantes à chaque espèce de Rhinovirus étaient alignées pour pouvoir créer des matrices par espèce. On obtenait ainsi une matrice de séquence pour les Rhinovirus A (Matrice A), une seconde pour les Rhinovirus B (Matrice B) et une troisième pour les Rhinovirus C (Matrice C). Ces matrices étaient complétées par les séquences génomiques de toutes les espèces de Rhinovirus disponibles sur le « NCBI » avant d'être ré-alignées. Cette étape permettait d'étendre les zones de design à l'extérieur du fragment séquencé. En parallèle à ces matrices, des alignements réunissant 2 espèces de chaque Rhinovirus étaient créés, nous obtenons donc une matrice mêlant les Rhinovirus A et B (Matrice AB), une matrice pour les Rhinovirus A et C (Matrice AC) et une matrice pour les Rhinovirus B et C (Matrice BC).

Ces nouvelles matrices combinant 2 espèces de Rhinovirus étaient comparées à la matrice mono-espèce complémentaire (Tableau 3) dans le but d'identifier des zones spécifiques de groupes ou des zones conservées au sein de plusieurs groupes. Chaque zone de conservation était repérée et



annotée manuellement. Cette démarche était également effectuée sur une matrice réunissant la totalité des séquences de Rhinovirus (Matrice ABC ou PanRhino), pour pouvoir développer un système capable de quantifier toutes les espèces de Rhinovirus. Après sélection de toutes les amorces et sondes candidates, les systèmes retenus étaient étudiés, comprenant une amorce sens, une sonde (à hydrolyse) et une amorce anti-sens. Ces systèmes devaient permettre la détection de l'amplification en temps réel.

Tableau 3- Comparaison des matrices pour la construction des systèmes

	Matrice BC	Matrice AC	Matrice AB
Matrice A	✓	✗	✗
Matrice B	✗	✓	✗
Matrice C	✗	✗	✓

Lors de l'étape d'identification de zones conservées, 5 systèmes avaient été établis pour les Rhinovirus A, 6 systèmes pour les Rhinovirus B, 5 systèmes pour les Rhinovirus C et 3 systèmes pour les 3 espèces de Rhinovirus confondus (PanRhinovirus). Sur ces systèmes, une première sélection avait été faite (Tableau 4A). Pour chaque système, les séquences des amorces ont été étudiées et affinées afin de réduire au maximum le taux de dégénérescence des amorces et sondes, tout en gardant la spécificité des systèmes pour chaque espèce de Rhinovirus. Ainsi, pour certains systèmes il était possible d'avoir par exemple jusqu'à 4 amorces (sens ou antisens) et sonde, de séquences différentes, pour une même zone de manière à couvrir la diversité du groupe.

Un système candidat spécifique de chaque espèce de Rhinovirus a été sélectionné ainsi qu'un système capable de détecter toutes les espèces de Rhinovirus (PanRhinovirus). Ces candidats ont dans un premier temps été testés sur un nombre réduit d'extraits. Le système de quantification cellulaire retenu est un système ciblant le gène de la GAPDH (système provenant d'un protocole du CNR grippe). La GAPDH est un gène de ménage dont une copie est présente par cellule. Le rapport entre la quantité de virus et la quantité de GAPDH détectée permet d'obtenir une valeur normalisée de la quantification virale.

La sélection des systèmes est faite via plusieurs critères, tels que : une longueur maximale d'amplicon de 300 pb, le taux de dégénérescence des amorces et sondes qui ne doit pas être au-dessus de 100, et le taux de GC% qui doit être proche de 50%, une différence de température de fusion de moins de 5 °C entre les amorces sens et anti-sens, une température d'hybridation proche de 55°C, et une différence d'au moins 10°C entre les températures d'hybridation entre les amorces et les sondes.



Suite au design, les systèmes (Tableau 4B) sont commandés sur le site : <https://www.sigmaaldrich.com/france.html>. Lors de la préparation de la commande, de derniers ajustements sont réalisés : l'ajout de groupement **LNA (Locked Nucleic Acid)** sur certaines bases des sondes pour augmenter leur « melting temperature » et le choix des fluorophores utilisés et couplés aux sondes (Figure 26).

Figure 26- Fluorophores sélectionnés pour les systèmes de détection construits

Xenon lamp (430–630)							
Excitation filters	440	465	498	533		618	
Emission filters	488	510	580	610	640	660	
Dye	LightCycler® Cyan 500	SYBR ResoLight	Fluorescein FAM	HEX (VIC)	LightCycler® Red 610	LightCycler® Red 640	Cy5
Detection formats	Melting Curve						
	HRM		•				
	SimpleProbe probes			•			
	HybProbe probes				(•)	•	•
	Hydrolysis probes 1–3 colors			•	•		•
Hydrolysis probes 4 colors	•				•	•	

• FRET Donor

↓

Systèmes :
Rhinovirus C
panRhinovirus

↓

Systèmes :
Rhinovirus B
GAPDH

↓

Système :
Rhinovirus A

Tableau 4 A : Totalité des systèmes candidats établis B : Systèmes commandés

A					B				
Nom du système	Nombre d'amorces sens	Nombre de sondes	Nombre d'amorces anti-sens	Longueur du système en pdb	Nom du système	Nombre d'amorces sens	Nombre de sondes	Nombre d'amorces anti-sens	Longueur du système en pdb
Rhinovirus A									
Système 1	4	1	1	126	Système 5	1	1	1	136
Système 2	1	1	1	126	Rhinovirus B				
Système 3	1	1	1	97	Système 1	1	1	1	143
Système 4	1	3	1	115	Système 2	1	3	2	171
Système 5	3	1	3	136	Système 3	3	2	2	240
Rhinovirus B									
Système 1	1	1	1	143	Système 4	2	2	2	117
Système 2	1	3	2	171	Système 5	1	1	1	240
Système 3	3	2	2	240	Système 6	1	1	1	207
Système 4	2	2	2	117	Rhinovirus C				
Système 5	1	1	1	240	Système 1	1	1	1	72
Système 6	1	1	1	207	Système 2	1	1	1	73
Rhinovirus C									
Système 1	1	1	1	72	Système 3	1	1	1	74
Système 2	1	1	1	73	Système 4	1	1	1	109
Système 3	1	1	1	74	Système 5	1	1	1	135
Système 4	1	1	1	109	Système 6	4	3	3	160
Système 5	1	1	1	135	Système 7	4	3	3	223
Système 6	4	3	3	160	Rhinovirus tous types (PanRhinovirus)				
Système 7	4	3	3	223	Système 1.1	2	4	1	311
Rhinovirus tous types (PanRhinovirus)									
Système 1.1	2	4	1	311	Système 1.2	2	3	1	311
Système 1.2	2	3	1	311	Système 2.1	4	1	1	157
Système 2.1	4	1	1	157	Système 2.2	3	1	1	208
Système 2.2	3	1	1	208	Système 3	1	1	1	197
Système 3	1	1	1	197	Total	44	38	32	
Total	44	38	32		Systèmes éliminés à la première sélection				
Systèmes éliminés à la première sélection									
Systèmes conservés et optimisés à la première sélection									



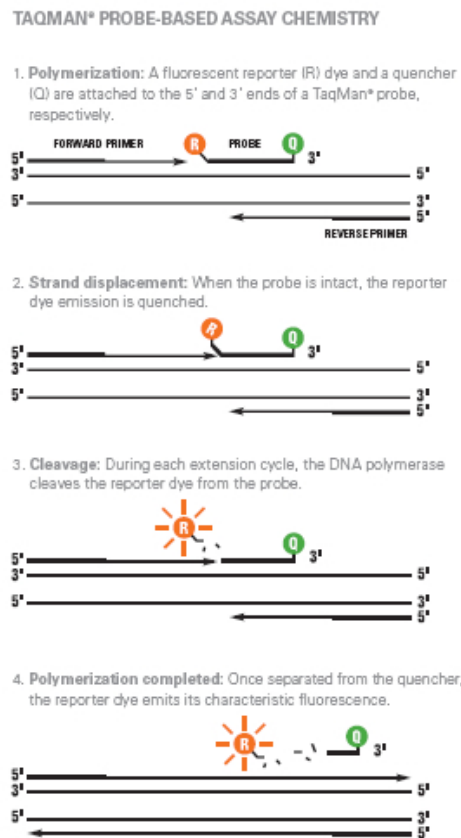
b. RT-PCR quantitative (qRT-PCR)

Tests des systèmes d'amplification sur un nombre réduit d'extraits

Cette étape consistait à valider les systèmes d'amplification sur 2 échantillons positifs pour chaque espèce de Rhinovirus. Elle avait été réalisée dans le cadre d'un projet de Master 2 (E.Leperchois). Nous avons également réalisé selon la même méthodologie les tests pour mettre au point les RT-PCR quantitatives des VRS-A, VRS-B et CoV.

L'appareil utilisé pour effectuer la qRT-PCR était le « LightCycler 480 II » (Roche, Bâle, Suisse) et les résultats étaient visualisés grâce au logiciel « LightCycler® 480 SV 1.5.1 ». Le principe de la détection en qPCR par sonde à hydrolyse est rappelé en Figure 27.

Figure 27- Rappel du principe de la PCR en temps réel



Le mix pour la qRT-PCR était préparé de la façon suivante pour chaque système à tester :

- 10 µL de 2X Reaction mix
- 0,4 µL de RNase out
- 0,4 µL de SuperScript III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR System
- 0,4µL d'amorce anti-sens à 50µM (à multiplier par le nombre d'amorces du système)



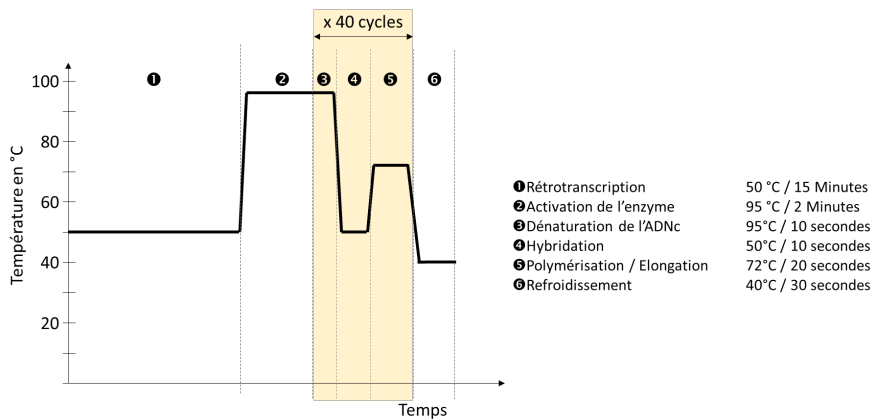
- 0,4 µL d'amorce sens à 50µM (à multiplier par le nombre d'amorces du système)
- 1 µL de sonde à 50µM (à multiplier par le nombre de sondes du système)
- X µL d'H₂O (qsp 16 µL)

Il fallait ensuite ajouter 4 µL d'extrait d'ARN à ces 16 µL de mix.

Le protocole de qRT-PCR utilisé est décrit en Figure 28. Ce protocole servait de base, que l'on modifiait à chaque nouvelle PCR selon les adaptations que l'on souhaitait faire en température ou en temps lors des mises-au-point.

Les 5 systèmes ont été soumis à 3 qRT-PCR, une première avec une température d'hybridation à 50°C, la suivante à 45°C et la dernière à 40°C. Les produits de ces systèmes ont été soumis à migration sur gel pour vérifier s'il y avait amplification, et donc tester l'efficacité des amorces ou des sondes.

Figure 28- Programme de qRT-PCR utilisé lors des tests



Préparation de la gamme de standards

Dans le but de réaliser une quantification absolue des copies de virus dans les prélèvements, une gamme de standards était passée en parallèle des échantillons expérimentaux. La gamme standard était obtenue en effectuant la dilution de raison 10 d'un produit PCR ayant été amplifié grâce au système à valider. La quantité d'ADN de l'amplicon (solution mère de la gamme) en µg/µL était mesurée grâce à un appareil, le « Qubit™ 4 Fluorometer » (Invitrogen, Carlsbad, Californie, Etats-unis) et permettait de calculer le nombre de copies dans chaque standard de la gamme, connaissant la taille de l'amplicon et sa masse moléculaire grâce à la formule suivante :

$$\text{Nombre de copies}/\mu\text{L} = \frac{\text{Concentration massique en } \mu\text{g}/\mu\text{L} \times \text{Nombre d'Avogadro}}{\text{Longueur de l'amplicon} \times \text{Masse moyenne d'une pdb} \times 10^6 \mu\text{g/g}}$$

Test GAPDH et PanRhinovirus sur la collection complète

Les systèmes retenus à l'étape précédente étaient appliqués à la totalité de notre collection d'extraits d'acides nucléique, analysés en parallèle des gammes standard, dans le but de déterminer le nombre



de copies GAPDH et virales dans les prélèvements. Les mixes, le programme de la qRT-PCR, et la visualisation des résultats suivaient le même protocole que lors de la phase de tests des systèmes d'amplification sur un nombre réduit d'extraits (II.2.b). La quantification était réalisée en mode « absolute quantification » du logiciel LightCycler® 480 SV 1.5.1. Une régression linéaire était effectuée sur les valeurs de la gamme standard et permettait de calculer le nombre de copies dans les échantillons. L'analyse des résultats et la représentation graphique étaient ensuite réalisées grâce au logiciel R.





Résultats

Chapitre 1 : Fréquence élevée des codétectations virales chez les enfants atteints de bronchiolite aiguë

Nous avons publié, en 2021, dans la revue Viruses (IF 5.518, rang C), les résultats virologiques de la cohorte Guérande.

Résumé en français :




Durant deux ans (2012-2014), 719 échantillons nasopharyngés ont été prélevés chez des nourrissons de 6 semaines à 12 mois se présentant aux urgences avec une bronchiolite aiguë modérée à sévère. Des tests virologiques ont été effectués et nous avons constaté que 98 % des échantillons étaient positifs, dont 90 % pour le virus respiratoire syncytial (VRS), 34 % pour le rhinovirus (HRV) et 55 % étaient positifs à plusieurs virus, avec une prédominance des co-infections VRS/HRV (30 %). Il est intéressant de noter que le risque d'être infecté par le HRV est plus élevé en l'absence de VRS, ce qui suggère des interférences ou des mécanismes d'exclusion entre ces deux virus. Inversement, l'infection par le coronavirus n'a pas eu d'impact sur la probabilité de co-infection par le HRV et le VRS. La bronchiolite est la principale cause d'hospitalisation chez les nourrissons avant l'âge de 12 mois, et de nombreuses questions se posent quant à son rôle dans les maladies respiratoires chroniques ultérieures (asthme et bronchopneumopathie chronique obstructive). Le rôle de la détection des virus et le poids des détections virales doivent être étudiés plus avant, afin de comprendre la physiopathologie des maladies respiratoires chroniques, qui constituent un problème majeur de santé publique.





Brief Report

High Frequency of Viral Co-Detections in Acute Bronchiolitis

Hortense Petat ^{1,2,3,*} , Vincent Gajdos ⁴, François Angoulvant ^{5,6}, Pierre-Olivier Vidalain ^{7,8} , Sandrine Corbet ^{1,2}, Christophe Marguet ^{1,3}, Jacques Brouard ^{1,9}, Astrid Vabret ^{1,2} and Meriadeg Ar Gouilh ^{1,2} 

- ¹ Groupe de Recherche sur l'Adaptation Microbienne (GRAM 2.0), Normandie University, UNICAEN, UNIROUEN, EA2656, F-14033 Caen, France; corbet-s@chu-caen.fr (S.C.); christophe.marguet@chu-rouen.fr (C.M.); Brouard-j@chu-caen.fr (J.B.); vabret-a@chu-caen.fr (A.V.); meriadeg.legouil@normandie-univ.fr (M.A.G.)
 - ² Laboratoire de Virologie, Centre Hospitalo-Universitaire, F-14033 Caen, France
 - ³ Département de Pédiatrie Médicale, Centre Hospitalier Universitaire de Rouen, EA2656 Université de Normandie, UNIROUEN, F-7600 Rouen, France
 - ⁴ Antoine Bécère University Hospital, APHP, 92140 Clamart, France; vincent.gajdos@aphp.fr
 - ⁵ Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paediatric Emergency Department, Necker-Enfants Malades University Hospital, Université de Paris, 75015 Paris, France; francois.angoulvant@aphp.fr
 - ⁶ INSERM, Centre de Recherche des Cordeliers, UMRS 1138, Sorbonne Université, Université de Paris, 75006 Paris, France
 - ⁷ Equipe Chimie et Biologie, Modélisation et Immunologie Pour la Thérapie (CBMIT), Université Paris Descartes, CNRS UMR 8601, 75006 Paris, France; pierre-olivier.vidalain@inserm.fr
 - ⁸ Equipe VIRIMI-Infections Virales, Métabolisme et Immunité, Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI), INSERM U1111, CNRS UMR5308, Université Lyon 1, ENS de Lyon, CEDEX 07, 69364 Lyon, France
 - ⁹ Service de Pédiatrie Médicale, CHU Caen, 14000 Caen, France
- * Correspondence: hortense.petat@univ-rouen.fr



Citation: Petat, H.; Gajdos, V.; Angoulvant, F.; Vidalain, P.-O.; Corbet, S.; Marguet, C.; Brouard, J.; Vabret, A.; Gouilh, M.A. High Frequency of Viral Co-Detections in Acute Bronchiolitis. *Viruses* **2021**, *13*, 990. <https://doi.org/10.3390/v13060990>

Academic Editor: Oliver Schildgen

Received: 20 January 2021

Accepted: 21 May 2021

Published: 26 May 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: Over two years (2012–2014), 719 nasopharyngeal samples were collected from 6-week to 12-month-old infants presenting at the emergency department with moderate to severe acute bronchiolitis. Viral testing was performed, and we found that 98% of samples were positive, including 90% for respiratory syncytial virus, 34% for human rhino virus, and 55% for viral co-detections, with a predominance of RSV/HRV co-infections (30%). Interestingly, we found that the risk of being infected by HRV is higher in the absence of RSV, suggesting interferences or exclusion mechanisms between these two viruses. Conversely, coronavirus infection had no impact on the likelihood of co-infection involving HRV and RSV. Bronchiolitis is the leading cause of hospitalizations in infants before 12 months of age, and many questions about its role in later chronic respiratory diseases (asthma and chronic obstructive pulmonary disease) exist. The role of virus detection and the burden of viral codetections need to be further explored, in order to understand the physiopathology of chronic respiratory diseases, a major public health issue.

Keywords: respiratory syncytial virus; molecular diagnostic; respiratory viruses; coronavirus; bronchiolitis

1. Introduction

Acute bronchiolitis is the most common respiratory disease in infants under 12 months of age, and the leading cause of hospitalization in infants [1]. Respiratory syncytial virus (RSV) is the most frequently identified virus in bronchiolitis, detected in 41 to 83% of patients [2,3]. RSV is responsible for 34 million new cases of lower respiratory tract infections, and 2.4 million hospitalizations of infants all over the world, with 199,000 deaths per year, mostly in developing countries [4]. Many other viruses are found in bronchiolitis, including human rhinoviruses (HRV), *Metapneumovirus* (hMPV), coronaviruses (CoV), bocaviruses (BoV), influenza viruses, adenoviruses (ADV) and parainfluenza viruses (PIF) [2,5]. In few years, PCR methods and multivalent techniques in particular have



become instrumental in detecting viruses associated with acute respiratory infections. Many studies evaluated the virus-dependent risk of outcomes, and the impact of viral etiology on severity and length of stay has been established [2,3,5,6]. Viral co-infections remain poorly investigated and available studies are scarce [2,7]. The aim of this study was to evaluate the burden of viral co-detections in infants with acute bronchiolitis.

2. Methods

2.1. Study Design, Patient Population, Sampling and Statistical Analysis

In a prospective, multicenter, double-blinded, randomized prospective study called GUERANDE, which aimed to test the efficacy of 3% hypertonic saline nebulization in acute viral bronchiolitis, respiratory samples were collected from 719 patients [8]. Twenty-four French hospital centers included patients between 15 October 2012 and 15 April 2014. Infants from 6 weeks to 12 months of age who were taken to emergency departments (ED) for a first episode of moderate to severe bronchiolitis were included. Nasopharyngeal swab samples were obtained for viral testing, and sent to the virology laboratory of the University Hospital Center of Caen (Normandy, France). The results from the two PCR techniques were compared using Kappa's coefficient, and the risk of co-infection was calculated with Fisher's test. Written informed consent was obtained from the parents of the patients. The Saint-Germain-en-Laye Ethics' Committee approved the study (reference 12020).

2.2. Sample Processing and PCR Assay

Swab material was resuspended into 3 mL viral transport medium, divided into aliquots and stored at -80°C until it was processed. Total nucleic acids were extracted from 300 μL of sample and eluted in 100 μL of TAE buffer using the QiaSymphony apparatus. The first aliquot was analyzed by real-time duplex RT-qPCR with Taqman hydrolysis probes in order to type RSV-A and RSV-B. The second aliquot was analyzed by multiplex RT-qPCR (Luminex NxTAG RPP) targeting 18 viruses: RSV-A and B, hMPV, influenza virus A (H1v/H3) and B, rhinovirus/enterovirus (HRV), PIF 1-4, CoV 229E, NL63, OC43, HKU1, ADV and BoV), and 3 intracellular bacteria (*Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydiae pneumoniae* and *Legionella pneumophila*).

3. Results

Patients' median age was 3 months (IQR 2-5), and 719 samples were collected in the study. According to the duplex real-time RT-PCR targeting RSV, 88% ($n = 633$) of samples were positive. RSV-A- and RSV-B-positive samples account for 52% ($n = 374$) and 34% ($n = 244$), respectively. Co-detections (RSV-A and RSV-B) account for 2% ($n = 12$).

In comparison, the multiplex RT-PCR found that only 2% of samples ($n = 12$) were virus-negative (Figure 1), while 90% ($n = 647$) were RSV-positive, and 34% ($n = 246$) were HRV-positive. Co-detections (2 or more viruses) were found in 55% ($n = 396$) of samples. The most abundant co-detection was RSV-HRV (30%, $n = 218$), with or without another virus. The RSV-HRV co-detection rate without another virus was 21% ($n = 149$).

Concerning the multiplex technique, we reported 49% ($n = 352$) and 29% ($n = 206$) RSV-A-positive and RSV-B-positive samples, respectively (Figure 2). Twelve percent ($n = 89$) of samples were positive for both RSV-A and B. Among the RSV-A-positive samples, 37% were mono-infected, 20% were co-infected with HRV, 10% were co-infected with RSV-B, 12% were co-infected with another virus, 14% were co-infected with two other viruses, and 2% were co-infected with three other viruses. Among the RSV-B-positive samples, 37% were mono-infected, 13% were co-infected with HRV, 11% were co-infected with another virus, 11% were co-infected with two other viruses, and 5% were co-infected with three other viruses (Figure 2). Among the RSV-A- and B-positive samples, 52% were co-infected with another virus.



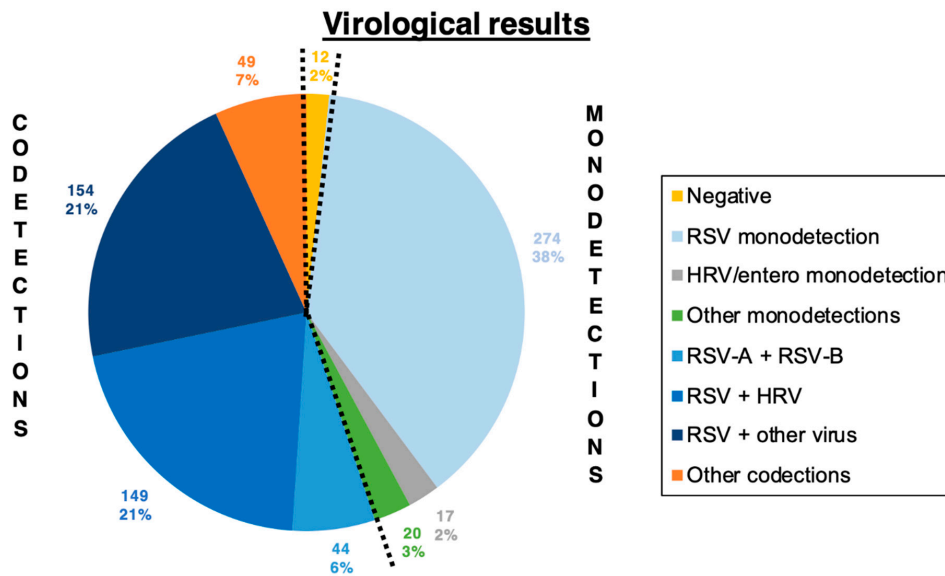


Figure 1. Virological results.

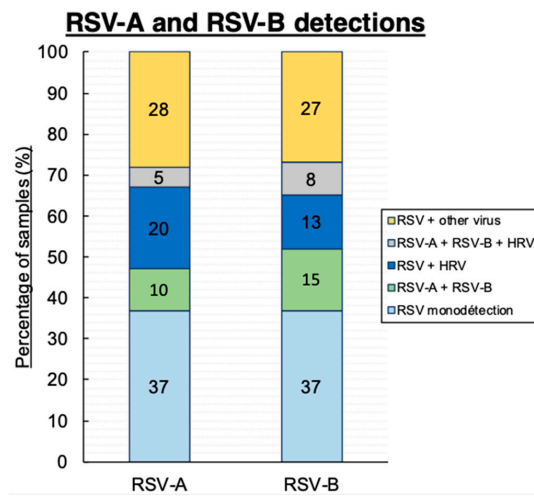


Figure 2. RSV-A and RSV-B detections.

Forty-four (6.1%) discrepancies between the two PCR techniques used were found (Figure 3). On the one hand, duplex PCR found more positives than the multiplex technique, with 10 positive for RSV-A and 6 for RSV-B. On the other hand, the multiplexed technique reported more positives than the duplex, with 20 positive for RSV-A, 5 for RSV-B, and 3 for RSV A + B. Kappa's tests between the two PCR techniques show a moderate accordance for RSV-A (0.47) and a good accordance for RSV-B (0.66).



Discrepancies between the two PCR-technics

		Multiplex		
			+	-
Duplex RSV-A/B	RSV-A	+	match	10
		-	23*	match
	RSV-B	+	match	6
		-	8*	match

* included 3 samples RSV-A and RSV-B positive in Multiplex and negative in Duplex

Figure 3. Discrepancies between the two PCR-technics.

We compared the proportion of co-detections of HRV/RSV with the proportion of mono-detections of HRV: the risk of being infected by HRV is significantly higher in the absence of RSV detection ($p < 0.001$, odds ratio = 0.09, $IC_{95\%}$ 0.0537; 0.1457). The risk of being co-infected by a coronavirus and HRV or RSV is not significantly different than not being co-infected by these viruses.

4. Discussion

Our study enrolled 719 infants aged 6 weeks to 12 months and presenting an acute moderate to severe first episode of bronchiolitis at the emergency departments in 24 different hospitals across France. Nasopharyngeal swabs were collected and virus detection was realized by RT-qPCR.

One limitation of the study consists of the selection of the cohort's participants and the resulting homogeneity of the cohort. Indeed, all patients were less than one year old, without bronchiolitis or wheezing history and their inclusion took place at the ED, where the most serious cases are usually observed. Moreover, there was no control group in which we could estimate the rate of asymptomatic viral infections. In 2016, Self et al. found a virus detection of 24% among asymptomatic children [9], but these controls were hospitalized for a programmed ear, nose and throat (ENT) intervention, and we know that this population is characterized by frequent infections and may not be fully representative of the general population.

We found only 2% of the samples were negative when analyzed by multiplex PCR, consistently with the literature. Mansbach et al. estimated this rate at 6% in 2012 in hospitalized patients with severe bronchiolitis in USA [5]. A low level of negative samples in children cohort is commonly seen, especially in symptomatic infants.

A high rate of viral co-detections is found in our cohort (55%), which stands between the 34% in the US EPIC study [6], which studied viral detection in children with pneumonia under 5 years of age, and 61% according to the ORAACLE Study Group (which was a Norwegian clinical cohort studying length of stay of hospitalized patients with bronchiolitis according to viruses found in PCR) [10]. These differences could be explained by the accuracy of the new molecular detection methods used here. Nevertheless, we still ignore the consequences of these co-detections, and whether this impacts the development of illnesses, particularly for future asthma or chronic obstructive pulmonary disease (COPD). HRV, which is found in 34% of cases in our cohort, is known to be associated with later asthma development [11], but no study has investigated the potential role of co-infections in the development of respiratory chronic respiratory diseases.

Several new antiviral molecules are under development [12], and their potential remains unclear, because it is not known when they should be used, and how (indications, prophylaxis). Few studies focusing on the burden of viral load exist and investigate if the viral load could be a marker to follow infections and to evaluate antiviral efficacy [13]. The severity of bronchiolitis is associated with a high RSV viral load [10], resulting in a longer length of stay and an increased frequency of oxygen and ventilation support. In the same way, severe ADV pneumonia has also been associated with a persistently high viral load [14]. This suggests that severe illnesses exhibit a high viral replication, whereas



a decline of the viral load has been observed in healing patients. We need to follow up the viral load over acute clinical infections in order to provide more data. Multiplex PCR is a qualitative but not quantitative method, and viral load cannot be calculated. Studies often rely on semi-quantitative PCR methods based on the number of cycle thresholds (CT), which are sometimes correlated with the viral load in copies/mL. However, these methods are not always reproducible between different commercial machines or kits, and between different centers.

Twenty-one percent of cases are RSV/HRV co-detections, representing 38% of total co-detections. We still ignore the sequence of events leading to these co-detections. The potential exclusion or facilitating effects need to be further explored. For example, we do not know whether RSV infection may promote HRV infection, and whether co-infections occur sequentially or simultaneously. Interestingly, we found that the risk of being infected by HRV is higher in the absence of RSV, suggesting exclusion mechanisms between these two viruses. Conversely, coronavirus infection had no impact on the likelihood of co-infection involving HRV and RSV. To better characterize these potential interactions, it would be interesting to include mild bronchiolitis, which is treated by the general practitioners and represents the majority of bronchiolitis cases, and to precisely focus on the onset to sampling delay. We also propose collecting several samples for each patient, in order to study the longitudinal history of natural infections. It would be interesting to determine the viral loads in co-detections, to know which viruses are currently active and responsible for the symptoms of our patients.

Author Contributions: Conceptualization, A.V. and M.A.G.; Methodology, H.P. and M.A.G.; Formal analysis, H.P., P.-O.V. and M.A.G.; Investigation, H.P. and S.C.; Resources/Collection, F.A., V.G., C.M., J.B.; Original Draft Preparation, H.P.; Writing-Review and Editing, V.G., F.A., P.-O.V., C.M., J.B., A.V., M.A.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The funders had no role in the design of the study. The Guérande study has been funded by a grant from the French Health Ministry (P110143/IDRCB2012-A00228-35). Molecular diagnostics were supported by the University Hospital of Caen. The first author's thesis fellowship was supported by GenMark Diagnostics, Inc.

Institutional Review Board Statement: The Saint-Germain-en-Laye Ethics' Committee approved the study (reference 12020).

Informed Consent Statement: Written informed consent was obtained from the parents of the patients.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available within this article and from the GUERANDE study.

Acknowledgments: The authors wish to acknowledge the hospital centers and all staff involved in the Guérande project, the Virology unit and all contributors to the study from the University Hospital of Caen.

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

References

1. Florin, T.A.; Plint, A.C.; Zorc, J.J. Viral bronchiolitis. *Lancet* **2017**, *389*, 211–224. [[CrossRef](#)]
2. Marguet, C.; Lubrano, M.; Gueudin, M.; Le Roux, P.; Deschildre, A.; Forget, C. In Very Young Infants Severity of Acute Bronchiolitis Depends on Carried Viruses. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e4596. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Miller, E.K.; Gebretsadik, T.; Carroll, K.N.; Dupont, W.D.; Mohamed, Y.A.; Morin, L.-L.; Heil, L.; Minton, P.A.; Woodward, K.; Liu, Z.; et al. Viral Etiologies of Infant Bronchiolitis, Croup and Upper Respiratory Illness During 4 Consecutive Years. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **2013**, *32*, 950–955. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Nair, H.; Simões, E.A.; Rudan, I.; Gessner, B.D.; Azziz-Baumgartner, E.; Zhang, J.S.F.; Feikin, D.R.; Mackenzie, G.A.; Moïsi, J.C.; Roca, A.; et al. Global and regional burden of hospital admissions for severe acute lower respiratory infections in young children in 2010: A systematic analysis. *Lancet* **2013**, *381*, 1380–1390. [[CrossRef](#)]
5. Piedra, P.A.; Mansbach, J.M.; Teach, S.J.; Sullivan, A.F.; Forgey, T.; Clark, S.; Espinola, J.A.; Camargo, C.A. Prospective Multicenter Study of Viral Etiology and Hospital Length of Stay in Children with Severe Bronchiolitis. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* **2012**, *166*, 700–706. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



6. Jain, S.; Williams, D.J.; Arnold, S.R.; Ampofo, K.; Bramley, A.M.; Reed, C.; Stockmann, C.; Anderson, E.J.; Grijalva, C.G.; Self, W.; et al. Community-Acquired Pneumonia Requiring Hospitalization among U.S. Children. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *372*, 835–845. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Petrarca, L.; Nenna, R.; Frassanito, A.; Pierangeli, A.; Leonardi, S.; Scagnolari, C. Acute bronchiolitis: Influence of viral co-infection in infants hospitalized over 12 consecutive epidemic seasons. *J. Med. Virol.* **2018**, *90*, 631–638. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Angoulvant, F.; Bellétre, X.; Milcent, K.; Teglas, J.P.; Claudet, I.; Le Guen, C.G. Effect of Nebulized Hypertonic Saline Treatment in Emergency Departments on the Hospitalization Rate for Acute Bronchiolitis: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Pediatr.* **2017**, *171*, e171333. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Self, W.H.; Williams, D.J.; Zhu, Y.; Ampofo, K.; Pavia, A.T.; Chappell, J.D. Respiratory Viral Detection in Children and Adults: Comparing Asymptomatic Controls and Patients with Community-Acquired Pneumonia. *J. Infect. Dis.* **2016**, *213*, 584–591. [[CrossRef](#)]
10. Skjerven, H.O.; Megremis, S.; Papadopoulos, N.G.; Mowinckel, P.; Carlsen, K.H.; Lødrup Carlsen, K.C. Virus Type and Genomic Load in Acute Bronchiolitis: Severity and Treatment Response with Inhaled Adrenaline. *J. Infect. Dis.* **2016**, *213*, 915–921. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Jartti, T.; Kuusipalo, H.; Vuorinen, T.; Söderlund-Venermo, M.; Allander, T.; Waris, M. Allergic sensitization is associated with rhinovirus-, but not other virus-, induced wheezing in children. *Pediatr. Allergy Immunol.* **2010**, *21*, 1008–1014. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Tripp, R.A.; Power, U.F.; Openshaw, P.J.M.; Kauvar, L.M. Respiratory Syncytial Virus: Targeting the G Protein Provides a New Approach for an Old Problem. *J. Virol.* **2018**, *92*, e01302-17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Scagnolari, C.; Midulla, F.; Selvaggi, C.; Monteleone, K.; Bonci, E.; Papoff, P. Evaluation of viral load in infants hospitalized with bronchiolitis caused by respiratory syncytial virus. *Med. Microbiol. Immunol.* **2012**, *201*, 311–317. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Gu, L.; Qu, J.; Sun, B.; Yu, X.; Li, H.; Cao, B. Sustained Viremia and High Viral Load in Respiratory Tract Secretions Are Predictors for Death in Immunocompetent Adults with Adenovirus Pneumonia. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0160777. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



Chapitre 2 : Interférences virales dans les infections respiratoires aiguës en soins primaires

Nous avons soumis, en avril 2023, dans la revue *Clinical Infectious Disease* (IF 20.999, rang A), l'article intitulé "*Viral interferences in patients with acute respiratory tract infections in primary care: the ECOVIR study*".

Résumé en français:

Introduction

Les infections respiratoires aiguës (IRA) sont les infections les plus courantes rapportées, d'après les données recueillies principalement dans les hôpitaux. Néanmoins, la plupart des IRA sont diagnostiquées en soins primaires, où il est difficile d'effectuer des tests virologiques moléculaires.

Méthodes utilisées

Nous avons mené une étude appelée ECOVIR en soins primaires. Pendant deux saisons épidémiques (2018-2019 et 2019-2020), 36 médecins généralistes, dans 8 centres de soins français, ont inclus des patients de tous âges présentant des symptômes d'IRA (n=685). Des écouvillons nasopharyngés ont été réalisés et analysés par des tests PCR Multiplex.

Résultats

Trente-trois pourcents des échantillons étaient négatifs en PCR Multiplex. Les bocavirus (BoV), les adénovirus (ADV) et le rhinovirus (HRV) sont apparus plus significativement chez les jeunes patients que les autres virus ($p < 0,05$), contrairement au virus respiratoire syncytial (VRS) qui était présent à tous les âges. Les codétectations de virales représentaient 8 % des échantillons et étaient associées au VRS, à l'HRV, au BoV, au métapneumovirus humain (hMPV), à l'ADV et non associées à la grippe et aux coronavirus (CoV). Les échantillons négatifs étaient associés à un délai d'échantillonnage (durée des symptômes) supérieur à 3 jours ($p < 0,001$). Tous les virus étaient positivement ou négativement liés à des mois spécifiques. L'HRV et la grippe étaient négativement associés à tous les virus, à l'exception de l'ADV et du BoV. Les seules associations positives trouvées étaient entre ADV et BoV, et la grippe et le BoV.

Discussion/Conclusion

Dans l'ensemble, ces données originales issues des soins primaires mettent en évidence l'étiologie et la circulation virale dans la population générale souffrant d'IRA, et décrivent les



interférences entre les virus respiratoires. Notre étude fournit des informations supplémentaires sur les relations entre les virus respiratoires, qui restent toutefois limitées dans les soins primaires.

Ci-dessous le pdf de l'article soumis, en cours de relecture (« under review »).



Clinical Infectious Diseases

Viral interferences in patients with acute respiratory tract infections in primary care: the ECOVIR study --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Viral interferences in patients with acute respiratory tract infections in primary care: the ECOVIR study
Article Type:	Major Article
Corresponding Author:	Hortense PETAT CHU CAEN CAEN, FRANCE
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	CHU CAEN
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Hortense PETAT
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Hortense PETAT Matthieu Schuers Christophe Marguet Xavier Humbert François Le Bas Andry Rabiaza Sandrine Corbet Bryce Leterrier Astrid Vabret Meriadeg Ar Gouilh
Order of Authors Secondary Information:	
Manuscript Region of Origin:	FRANCE
Abstract:	<p>Introduction Acute respiratory infections (ARIs) are the most common viral infections diagnosed, and cared in primary care settings. The identification of causal viruses is still not available in routine practice. Although new strategies of prevention will happen, the knowledge on interferences between respiratory viruses remain limited.</p> <p>Methods ECOVIR is a multicentric prospective study conducted in primary care, during two consecutive pre-pandemic seasons (2018-2019 and 2019-2020). The patients attending their General practitioner (GP) with ARIs were included, without selecting age or conditions. Viruses were detected on nasal swabs samples by a multiplex Polymerase Chain Reaction test including 11 viruses.</p> <p>Results Among the 670 analyzed samples, 60.1% were positive for at least one virus, of which 7.6% were viral codetection. The viral detection was negatively associated with aging and sample delay according to the onset of symptoms. Bocaviruses (BoV), adenoviruses (ADV) and Human Rhinovirus (HRV) occurred more significantly in younger patients than that did the other viruses ($p < 0.05$). All of the viruses were positively or negatively depended on specific months. Codetections were significantly</p>



	<p>associated with RSV, HRV, BoV, human Pneumovirus (hMPV) and ADV, and not associated with flu, Coronaviruses (CoV) and parainfluenzae viruses (PIVs). HRV and flu were negatively associated with all the viruses, contrary to ADV and BoV. Conversely, a positive association was found between ADV and BoV, and between PIVs and BoV.</p> <p>Discussion/Conclusion Our study provides additional information on the interferences between respiratory viruses, which however remained limited in primary care.</p>
Suggested Reviewers:	<p>Shirley Masse masse_s@univ-corse.fr Virologist who published about respiratory infections in primary care in 2022</p>
	<p>Hannah Thornton hannah.thornton@bristol.ac.uk Published articles about respiratory infections in primary care</p>
	<p>Pablo Murcia Pablo.Murcia@Glasgow.ac.uk Published about viral interferences in respiratory infections</p>
	<p>Greet Ieven greet.ieven@uza.be Published about viral respiratory infections in primary care</p>
Opposed Reviewers:	



1
2
3
4 1 Viral interferences in patients with acute respiratory tract
5
6
7 2 infections in primary care: the ECOVIR study
8
9
10 3

11
12 4 **Hortense Petat¹, Matthieu Schuers², Christophe Marguet¹, Xavier Humbert⁴,**
13
14 5 **François Le bas⁴, Andry Rabiaza⁴, Sandrine Corbet³, Bryce Leterrier³, Astrid**
15
16 6 **Vabret³, Meriadeg Ar Gouilh³**
17
18
19 7

20
21
22 8 **Affiliations**

23
24 9 ¹ Univ Rouen Normandie, Dynamicure INSERM UMR 1311, CHU Rouen, Department
25
26 10 of paediatrics and adolescent medicine F-76000 Rouen, France.

27
28
29 11 ²Univ Rouen Normandie, INSERM U1142, CHU Rouen, Department of General
30
31 12 Practice, F-76000 Rouen, France.

32
33
34 13 ³Univ Caen Normandie, INSERM Dynamicure UMR 1311, CHU Caen, department of
35
36 14 virology, F-14000 Caen, France

37
38
39 15 ⁴ Univ Caen Normandie santé, Department of General Practice, F-14000 Caen,
40
41 16 France
42
43
44
45
46 17

47
48 18 **Corresponding author:**

49
50 19 Hortense Petat, hortense.petat@univ-rouen.fr
51
52
53 20
54
55 21
56
57 22
58
59
60



23 **Abstract**

24 **Introduction**

25 Acute respiratory infections (ARIs) are the most common viral infections diagnosed,
26 and cared in primary care settings. The identification of causal viruses is still not
27 available in routine practice. Although new strategies of prevention will happen, the
28 knowledge on interferences between respiratory viruses remain limited.

29 **Methods**

30 ECOVIR is a multicentric prospective study conducted in primary care, during two
31 consecutive pre-pandemic seasons (2018-2019 and 2019-2020). The patients
32 attending their General practitioner (GP) with ARIs were included, without selecting
33 age or conditions. Viruses were detected on nasal swabs samples by a multiplex
34 Polymerase Chain Reaction test including 11 viruses.

35 **Results**

36 Among the 670 analyzed samples, 60.1% were positive for at least one virus, of
37 which 7.6% were viral codetection. The viral detection was negatively associated with
38 aging and sample delay according to the onset of symptoms. Bocaviruses (BoV),
39 adenoviruses (ADV) and Human Rhinovirus (HRV) occurred more significantly in
40 younger patients than that did the other viruses ($p < 0.05$). All of the viruses were
41 positively or negatively depended on specific months. Codetections were significantly
42 associated with RSV, HRV, BoV, human Pneumovirus (hMPV) and ADV, and not
43 associated with flu, Coronaviruses (CoV) and parainfluenzae viruses (PIVs). HRV
44 and flu were negatively associated with all the viruses, contrary to ADV and BoV.
45 Conversely, a positive association was found between ADV and BoV, and between
46 PIVs and BoV.

47 **Discussion/Conclusion**

2



48 Our study provides additional information on the interferences between respiratory
49 viruses, which however remained limited in primary care.

50

51 **Keywords**

52 Respiratory Viruses – acute respiratory infections- primary care- Viral codetections-
53 respiratory syncytial virus- rhinovirus

54

55 **Abbreviations**

56 ADV: adenovirus

57 ARI: acute respiratory infections

58 BoV: bocavirus

59 CoV: coronavirus

60 Flu: influenza

61 GP: general practitioner

62 GPI: general practitioner investigator

63 hMPV: human metapneumovirus

64 HRV: human rhinovirus

65 LRTI: low respiratory tract infections

66 NA: not applicable

67 PCR: polymerase chain reaction

68 RSV: respiratory syncytial virus

69 SD: sample delay according to the onset of symptoms

70 URTI: upper respiratory tract infection

71

72 **Introduction**

3



73

74 Acute Respiratory Infections (ARIs) are mostly associated to viruses and are the
75 most frequent infections with 0 to 6 ARI per person per epidemic season in tempered
76 regions (1). They may occur at all ages with childhood and elderly communities being
77 both the most vulnerable and the most studied age classes, for example concerning
78 the Respiratory Syncytial Virus (RSV) (1,2). These populations are particularly
79 sensitive to RSV and Influenza, two viruses known to be major causes of health
80 recourses, hospitalizations and death (3). This may explain why surveillance
81 programs focusing on respiratory infections were restricted to these viruses for a long
82 time, particularly before the pandemic. Nevertheless, other viruses can generate ARI
83 (8). Human Rhinovirus (HRV) is the second major cause for ARI, and is known to
84 trigger chronic respiratory diseases in children with bronchiolitis and COPD (Chronic
85 Obstructive Pulmonary Disease) exacerbations in adults (4–7).

86 However, all respiratory viruses are highly contagious independently of the clinical
87 features, that range from asymptomatic to severe acute respiratory infections and
88 facilitate the occurrence of bacterial superinfections or bacterial community acquired-
89 pneumonia. Lastly, the understanding of viral infections is limited by the ability to
90 detect co-infections, and the difficulty to interpret the effect of viral loads or virulence
91 factors on the severity and on the expand of epidemics (4–9). Most of the knowledge
92 about viral respiratory tract infections has been provided by patients admitted either
93 to hospital or to the emergency units. This reflected a selected population, and
94 included the most severe diseases and the most vulnerable populations. In contrast,
95 most care is provided in the primary care settings, without identification of the viruses
96 (10,11). Most studies either focus on a specific virus (12,13) and use home-made
97 PCR tests (14), or aim at the inadequate prescription of antibiotics (15).



98 Development of molecular diagnosis and multiplex Polymerase Chain Reaction
99 (PCR) tests has greatly increased the number of viruses identified. These techniques
100 most often do not quantify virus loads from a nasopharyngeal swab. Codetection of
101 several viruses are not rare (ranging from 25 % to 55%) (4,6–9,16) and their
102 significance remain unclear (16).

103 We propose here a real-life study conducted in primary care settings with the aim to
104 highlight on the contribution of single or codetected viruses in acute respiratory
105 infections in the general population, and to analyze the interference between them.

106

107

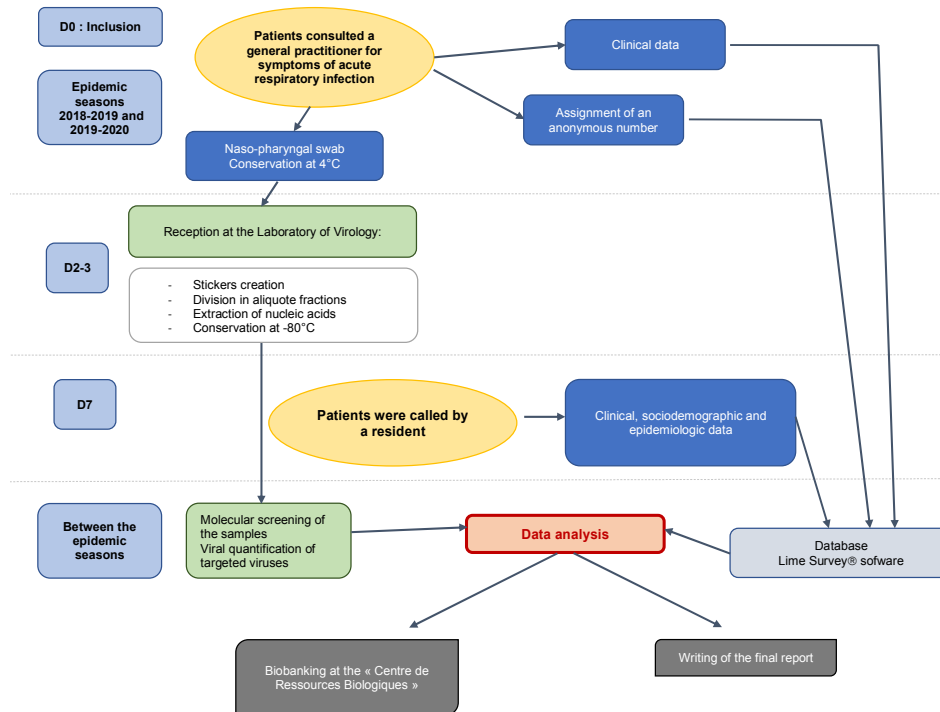
108 **Patients and methods**

109 *Protocol*

110 ECOVIR project was a prospective, multicentric, non-interventional study developed
111 in Normandy, France, conducted during two viral epidemic seasons (January -April
112 2019,12 weeks; October-March 2020, 21 weeks). The design was previously detailed
113 (17). Thirty-six General Practitioners Investigators (GPIs), in eight different health
114 care centers, included patients during a medical visit. Inclusion criteria were: patients
115 of any age, consulting their general practitioner with symptoms of acute respiratory
116 infection. Exclusion criteria were: epistaxis, coagulopathy. Each patient was
117 informed, then examined, and a nasopharyngeal swab was performed and stored at
118 4°C (Figure 1). The patients were called on day 7 to collect environmental and
119 clinical data, by the Lime Survey® software.



Figure 1- Workflow of ECOVIR



120

121 *Adapted from Petat et al (17)*

122

123 The sampling delay (SD) was defined as the number of days between the first
 124 symptoms and the day of swabbing.

125

126 *Ethics*

127 We obtained the “East II protection committee” approval (study reference
 128 18/10/10/63004). Each patient, adult or parents, were informed and provided their
 129 consent. When the age allowed it, an additional specific information was given and
 130 consent was obtained.

6



131

132 **Methods**

133 Samples were kept at four degrees, aliquoted and processed at the virology
134 laboratory. Nucleic acid extraction was performed on “QIA Symphony” (Qiagen®,
135 Hilden, Germany) following manufacturer’s instructions and then analyzed by NxTag
136 RPP Luminex kit for virological identification. Fifteen viruses (Respiratory Syncytial
137 Virus-A (RSV-A), Respiratory Syncytial Virus-B (RSV-B), Rhinovirus/Enterovirus
138 (HRV), human Metapneumovirus (hMPV), Adenovirus (ADV), Coronaviruses (CoV)
139 HKU1, NL63, 229E, OC43, Influenza AH1, AH3, B, Para-Influenza (PIV) 1, 2, 3, 4,
140 Bocavirus(BoV)) and 3 intra-cellular bacteria (*Chlamydomphila pneumoniae*, *Legionella*
141 *pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae*) were targeted. Samples were also tested
142 retrospectively for the presence of SARS-CoV2 nucleic acid using the C-gene
143 Eurobio kit.

144

145 **Statistical analysis**

146 Quantitative tests were performed by using non parametric Student-t or Mann-
147 Whitney test according to the normally distribution. Qualitative tests were realized by
148 using Chi2 and Fisher exact test as needed. The statistical significance was of p
149 <0.05. Multivariate analyses were performed by logistic regression, the models
150 comprised of age and sample delay as continuous variable, and virology results,
151 seasons as dichotomic variables. The analyses were realized with RStudio®
152 software (version 1.1.456). The results were expressed as median [IQ_{25-75%}], or
153 number (n) and percentages (%).

154

155 **Results**

7



156 Six hundred and eighty-five patients were included (191 during the first season, 494
 157 during the second season), and 670 were analyzed (Table 1).
 158 The median age of the patients and sample delay were 32 y (IQ₂₅₋₇₅ [12;54]) years
 159 and 3 (IQ₂₅₋₇₅ [2-6]) days, respectively. Upper ARIs were the most frequent diagnosis
 160 with a comparable distribution in each age group conversely to Flu-like syndrome
 161 which was low at both extremities of the life.

162 **Table 1- Characteristics of the population**

163

Age groups	All (n=670)	0-1 Y (n=56)	2-5Y (n=67)	6-17Y (n=75)	18-29Y (n=106)	30-44Y (n=122)	45-64Y (n=146)	65-75Y (n=60)	75-94Y (n=36)
Female	409(59)	28(50)	34(50.7)	42(56)	67(63.2)	85(69.7)	89(69.9)	36(60)	24(63.1)
Symptoms									
Rhinitis	565(84.3)	49(87.5)	63(94.0)	67(89.3)	92(86.8)	101(82.8)	113(79.4)	48(80)	32(84.2)
Fever	279(41.6)	22(39.3)	42(62.7)	38(50.7)	44(41.5)	46(37.7)	61(41.7)	15(25)	11(28.9)
Cough	533(79.6)	45(80.4)	49(73.1)	61(81.3)	83(78.3)	95(77.9)	116(79.4)	60(90)	30(78.9)
Dyspnea	63(9.4)	14(25)	12(17.9)	3(4)	8(7.5)	9(7.4)	22(15.1)	8(13.3)	5(13.2)
Headache (n=548)	208(37.8)	NE	NE	23(30.7)	46(43.3)	52(42.6)	60(41.1)	21(35)	4(10.5)
Diagnosis									
Upper ARIs	433(64.6)	39 (69.6)	49 (73.1)	45 (60.0)	78 (63.6)	86 (70.5)	83 (56.9)	29 (48.3)	24(63.2)
Lower ARIs	143(21.3)	16(28.6)	17 (25.4)	10 (13.3)	11 (10.4)	14 (13.5)	38 (26.0)	24 (40.0)	13(34.2)
Flu-like syndrome	94(14.1)	1 (1.8)	1 (1.5)	20 (26.7)	17 (16.0)	22 (18.0)	25 (17.1)	7 (11.7)	1 (2.6)
Viruses									
Negative	227(33.9)	6(10.7)	7(10.4)	18(24)	34(32.1)	53(43.4)	64(43.9)	27(45)	18(47.4)
HRV	203(30.3)	30(53.6)	36(53.7)	23(30.7)	32(30.2)	32(26.2)	35(23.0)	10(16.7)	5(13.1)
Flu	95(14.2)	2(3.6)	14(20.9)	19(25.3)	16(15.1)	15(12.3)	16(10.9)	9(15)	4(10.5)
CoV	60(9.0)	5(8.9)	3(4.5)	7(9.3)	12(11.3)	13(10.7)	13(8.9)	2(3.3)	5(13.1)
PIV	42(6.3)	6(10.7)	5(7.4)	6(8.0)	8(7.5)	4(3.2)	8(5.4)	5(8.3)	0
RSV	39(5.8)	9(16.1)	2(3.0)	2(2.7)	6(5.7)	2(1.6)	11(7.5)	2(3.3)	5(13.1)
HMPV	34(5.1)	5(8.9)	4(6.0)	7(9.3)	2(1.9)	7(5.8)	3(2.0)	5(8.3)	1(2.6)
ADV	18(2.7)	6(10.7)	10(14.9)	1(1.3)	0	0	1(0.7)	0	0
BoV	12(1.8)	6(10.7)	4(6.0)	0	0	1(0.8)	1(0.68)	0	0
Codetection	53(7.9)	16(28.6)	15(22.4)	8(10.7)	4(3.8)	4(3.3)	6(4.1)	0	0
Upper ARIs included: rhinitis, sinusitis, pharyngitis, angina, laryngitis and otitis. Lower ARIs included: asthma, bronchitis, community acquired pneumonia. NE : not evaluable.									

164

165

166 **Multiplex PCR tests results:** 670 samples (97.8% patients) were tested; 442 (66%)
 167 were positive for at least one virus (Table 2). The median [IQ₂₅₋₇₅] age and sample

8



168 delay of patients with negative or positive samples were respectively 45 [1-92] years
 169 and 27 [0.3-94] years ($p < 0.0001$), and 3 [2-5] days and 2 [2-8] days. The multivariate
 170 analysis confirmed that negative samples were independently associated with age by
 171 year ($p < 0.00001$) and with the sample delay (SD) by day ($p < 0.00001$) according to
 172 the onset of symptoms.

173 **Table 2- Viral codetections according to the viruses**

Viruses	Codetections n (%)	Univariate analysis		Multivariate analysis	
		OR [IC _{95%}]	p	OR [IC _{95%}]	p
HRV (n=203)	37 (18)	3,1 [1.7; 5.9]	0.002	3.4 [1.9; 5.8]	<0.001
Flu (n=95)	13 (14)	1,2 [0.6; 2.4]	NS		NS
CoV (n=60)	9 (15)	1.4 [0.6; 2.9]	NS		NS
PIV (n=42)	9 (22)	2.2 [1; 4.9]	0.04		NS
RSV (n=39)	10 (26)	2.9 [1.3; 6.3]	0.005	4.0 [2.1; 7.7]	<0.001
hMPV (n=34)	13 (38)	5.7 [2.6; 12.2]	< 0.001	6.1 [3.1; 11.8]	<0.001
AdV (n=18)	12 (67)	18.7 [6.7; 51.4]	< 0.001	6.5 [3.0; 14.3]	<0.001
BoV (n=12)	12 (100)	NC	-		NC
Age (years)	-	-	-	0.11 [0.03;0.37]	

174 *NS= not significant, NC= Not Calculable. The model of logistic regression included the*
 175 *viruses, age, sample delay and seasons.*

176

177 Among the positive samples, the prevalence of each virus was as follows: 46% HRV
 178 (n=203), 21% Influenza viruses (n=95), 14% CoV (n=60), 10% PIV (n=42), 9% RSV
 179 (n=39), 8% hMPV (n=34), 4% ADV (n=18) and 3% BoV (n=12). The distribution of
 180 the viruses differed according to the age of patients ($p=0.0001$). The median [I_Q₂₅₋₇₅]
 181 ages were as follows: 43 [27-61] years for negative samples; 22 [3-44] years for
 182 HRV; 28 [11-53] years for Flu; 34 [17.5-54] years for CoV; 20 [5-51] years for PIVs;
 183 30 [2-60] years for RSV; 24.5 [4-52] years for hMPV; 2 [0.8-3] years for ADV and 1.9
 184 [1.4-3.5] years for BoV. Only Flu sample delay differed by a shorter time than that
 185 was observed with the other viruses ($p < 0.0001$). RSV (OR=3.1, IC_{95%} [1.6;6.0],
 186 $p=0.0005$) and BoV (OR=3.8, IC_{95%}[1.2;12.0], $p=0.015$) were associated with lower
 9



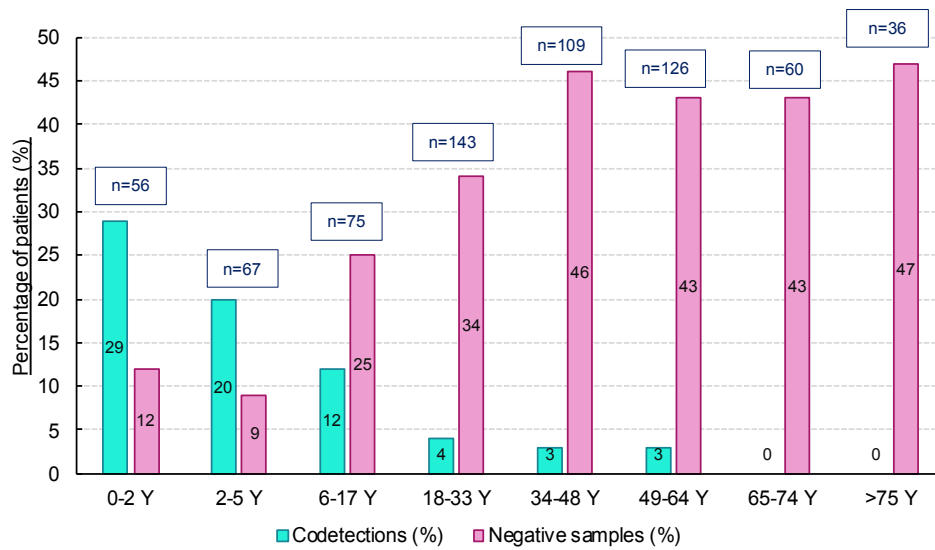
187 ARIs. Flu and HRV were positively ($p<0.0001$) and negatively ($p<0.0001$) associated
188 with flu-like syndrome, respectively.

189

190 **Viral codetections and interference between the viruses:** 53 samples (7.9%)
191 were positive for at least two viruses. The median age of patients with viral
192 codetection was of 3 [1.4-19] years compared with the age of 29 [9-54] years for
193 patients infected without codetection ($p<0.0001$; Figure 2). Viral codetections were
194 found at 2% ($n=1$) in October, 15% ($n=8$) in November, 7% ($n=4$) in December, 32%
195 ($n=17$) in January, 11% ($n=6$) in February, 24% ($n=13$) in March and 7% ($n=4$) in
196 April ($p=0.003$). The risk of viral codetection was significantly related to the viruses
197 (Table 2): it was significantly high for HRV, RSV, hMPV and ADV, and 100% for BoV.
198 Codetections were also independently related with age but not seasons. The
199 interferences between the viruses are displayed in the Table 3. HRV and Flu
200 negatively interfered with other viruses but AdV and BoV. The multivariate analyses
201 highlighted variation in the interferences between the viruses according the age and
202 the seasons and sample delay (Table supplemental material): HRV negatively
203 interfered with Flu, PIV and CoV, Flu negatively interfered with HRV and CoV, and
204 BoV positively interfered with PIV. Flu remained the only one negatively associated
205 with the length of sample delay.

206 **Figure 2- Codetections, negative samples and age groups**





207
208
209

210 **Table 3- Interferences between the viruses and risk of viral coinfection**

	RSV	Flu	HMPV	PIV	ADV	Cov	BoV	HRV
RSV n=39	-							
Flu n=95	1 0.09 [0.01-0.64] p=0.006	-						
HMPV n= 34	2 NS	2 0.21 [0.05-0.90] p=0.02	-					
PIV n=42	0*	1 p=0.0005	0	-				
ADV n=18	0	2 NS	1 NS	1 NS	-			
CoV n=60	1 NS	2 0.11 [0.03-0.45] p<0.0001	2 NS	0*	1	-		
BoV n=12	0	1 NS	2 NS	3 NS	3 9.22 [2.26-37.5] p=0.009	1 NS	-	
HRV n=203	7 0.23 [0.1-0.53] p=0.0002	6 0.05 [0.02-0.12] p<0.0001	7 0.28 [0.12-0.66] p=0.0014	6 0.17 [0.07-0.42] p<0.0001	9 NS	4 0.06 [0.02-0.18] p<0.0001	6 NS	-

211 The results displayed the number of samples, Odds ratio (OR and 95% IC) and probability (p).



212

213

214

215 Discussion

216 This study reported data on the respiratory viruses encountered in patients attending
217 GPs, which remained seldom studied. The aim was to focus on the viral co-
218 detections. The cohort comprised mainly adults aged from 18 to 64 years, a few
219 elderly (14%) and 28% of children. All attended for ARIs, mainly upper infections, and
220 none were addressed to hospital. Thus, this cohort represented the daily activity of
221 GPs. Negative samples were found in one to three patients. Their rates increased
222 independently with age, and the sample delay in relation to the onset of symptoms. In
223 children aged between 2 and 6 years, the rate of negative samples was 11%. This
224 was 5 times higher than that we reported earlier in infants with bronchiolitis at
225 emergency departments (Guérande study (6)). Few primary care studies included
226 comparable profile of children with mainly upper ARTIs. They reported higher rates of
227 undetected viruses than we did, both at a primary care level (26-28%) (18) (1), and in
228 outpatients (28% to 42%) (5). From 6 years, the rate of negative samples doubled,
229 quadrupled from the age of 40 years and then remained stable around 40-45%. This
230 is comparable with those reported in a household (1), and LRTIs cohorts studies (11)
231 (19), but was higher than in a “coughing” population (20). The rates of undetected
232 viruses appeared more dependent on the selection of the children than that was in
233 adults. In three primary care (21) (22) (23) and one outpatient (24) studies, the
234 children were selected with acute cough and acute lower respiratory symptoms. The
235 rates of negative samples varied from 36% to 45%. An observed rate of 14% was
236 conversely found in children less than 6 years old in a recent study (24), contrasting

12



237 with a very high rate of 64% in those older than 6 years old. In children with
238 influenza-like illness, the rates of negative samples were conversely the highest in
239 the youngest age class 0-4 years old (31%), and then decreased by half to 5% in the
240 elderly (25).

241

242 One patient out of three were infected with HRV, which is the most encountered virus
243 in other primary care studies. This was independent of the selection of the population
244 except for infants cohorts (26) (25) (10,19,22). The other viruses were by decreasing
245 frequency: Influenza, CoV, PIV, RSV, hMPV, ADV and BoV. In this study, the chance
246 to detect HRV, PIV and AdV decreased with aging. As this was previously reported
247 for HRV, this was however not constantly observed for PIV and AdV (5,24,25).
248 Interestingly, RSV was not associated with the age of the patient. This might be
249 dependent on the part of infants in the studied population (5,25). However, in primary
250 care, this meant that RSV concerned all the patients attending their GPs, which is
251 underestimated. Influenza was the only virus dependent on the SD, suggesting a
252 short delay for consulting regarding the symptoms. Flu, RSV and AdV were strongly
253 associated with the winter season, as others viruses were less dependent on the
254 season.

255

256 Viral codetections represented 8% of samples, which is slightly higher than the
257 reported range of 4-7% (25,27), but less than the 16% to 55% observed in
258 hospitalized patients (6) (28). In this population, we found a decrease of the rate of
259 coinfections with age (25)(28), which corroborated with the lack of viral immunity in
260 the elderly (29). Co-detections also depended on the interference between viruses
261 while seasons did not. HRV represented two thirds of coinfections. Whether a high



262 prevalence of HRV has previously been reported through co-infections (11,25), CoV
263 (11), ADV (1,5) influenza (25,30) were also reported as the most frequent associated
264 viruses with codetections. HRV and Influenza were negatively associated with all the
265 viruses, but AdV and BoV. In fact, the only positive associations were between AdV
266 and BoV, and flu and BoV. This suggests these viral infections would be facilitated by
267 a viral co-infection. In addition, RSV and flu were significantly not codetected with
268 coronaviruses. Nevertheless, when the analyses took into account the months of
269 detection, HRV is no longer associated with RSV, nor with HPM, as is influenza,
270 which is also no longer associated with PIV. A positive relationship appears between
271 BoV and PIV, whereas this association is no longer significant with AdV. These
272 results confirm a temporal variability of viral interference. Two previous studies
273 reported comparable negative association between the respiratory viruses (28,30)
274 but with slight differences. This might be explained by the variations in epidemic
275 peaks from year to year (31), by the selected population (kind of illness, age), the site
276 of the care (hospital, outpatients or primary care) and the countries in question,
277 where viruses differed in their duration of circulation (32). Despite the high rates of
278 co-infections between HRV and RSV in infants (6), the negative interference between
279 these two viruses has been documented by temporality study during the pandemic
280 (33) or in infants protected by palizivumab (34). A comparable relationship was
281 reported with influenza and HRV or RSV (35). Therefore, viral co-detections are still
282 difficult to interpret. They might be either infections occurring within a short period of
283 time with active viral replication for both viruses, or they are sequential infections with
284 the persistence of one of the two viruses whose virulence is attenuated
285 corresponding to a possible interference between them. Nevertheless, two recent
286 studies provided contradictory data by involving the interferon pathways. Wu et al



287 demonstrated that HRV attenuated the virulence of influenza A in accordance with
288 previous clinical observation. Eissaidi et al found that RSV and influenza decreased
289 RV replication, while RV had no effect on RSV and influenza replication, regardless
290 of the timing of co-infection (36).

291

292 Because of the pandemic, the study was stopped and the expected number of 1000
293 included patients was not achieved. In addition, only viruses were researched and we
294 could not withdraw possible interactions of bacteria in the association between
295 viruses. The strength of this study is to show the acceptability and feasibility of nasal
296 swabs, with little failure, in a prospective study in primary care.

297

298 **Conclusion**

299 During the pandemic, there were two main feedbacks on viral infections. The first
300 was the increased circulation of other viruses except RSV and influenza in temperate
301 countries, followed by shifts in epidemic peaks. The second was autumn-winter 2022
302 epidemics that overwhelmed the health systems. At a time when new antiviral drugs
303 or vaccines will be at the disposal of the patient, the further imbalance in viral ecology
304 cannot eliminate more frequent or severe infections with other viruses. Our study
305 provides additional information on the relationships between respiratory viruses,
306 which however remained limited in primary care.

307

308 **Author contributions**

309 HP, MAG, CM and AV established the protocol, send it to the ethical committee and
310 wrote the article.

311 MS, LP, FL, AR and XH included patients.

15



312 SC, MAG, BL and HP performed virological analyses.

313 All authors read and approved the manuscript.

314

315 **Conflicts of Interest:** None declared.

316 **Funding Statement:** This research did not receive any specific grant from funding
317 agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

318 **Acknowledgments:** The authors acknowledge for their contribution GPs and Health
319 care centers, the team of the CHU Caen Virology Unit and Hospital Research and
320 Innovation directory (DRCI, Anne PETAT and all the patients and their family. We
321 thank to Mrs Naomi Stone for the reviewing of English writing.

322 *GPI and health care centers :*

323 - Maison de santé Saint Eloi, ROUEN, FRANCE : Dr Aude LE FLOCH, Dr
324 Stéphane LE FRIEC, Dr Marianne LAINE, Dr Lucille PELLERIN, Dr Marie
325 RIGAL-LASHKAR, Dr Barbara VATIN.

326 - Maison de santé du Pays Neufchâtelois, NEUFCHATEL EN BRAY, FRANCE :
327 Dr Florence CALERO, Dr Hélène COMONT, Dr Christophe GUILLERM, Dr
328 Claire HOULE, Dr Vincent LEMARIE, Dr Sophie OZANNE, Dr Anne-Sophie
329 PIMONT, Pr Matthieu SCHUERS, Dr Olivier WERMESTER.

330 - Maison Médicale Amstrong, GRAND QUEVILLY, FRANCE : Dr Caroline
331 JOUEN, Dr Jean-Yves MAUNOURY, Dr Elisabeth MAUVIARD, Dr Yveline
332 SEVRIN, Dr Charlotte VIANNEY.

333 - Pôle de santé du Port, GRANVILLE, FRANCE : Pr François LE BAS, Dr Alexis
334 PLUNET



- 335 - Pôle de santé de Villedieu, VILLEDIEU-LES-POELES, FRANCE : Dr Olivier
 336 BATAILLE, Dr Nicolas BOYER, Dr Philippe SABATHIER, Dr Thomas
 337 TRENIER.
- 338 - Cabinet médical Colombelles, COLOMBELLES, FRANCE :Dr Elise BARBE-
 339 DELRUE, Dr Philippe GRUJARD, Dr Jeanne LE BAS, Dr Stéphane
 340 VALLAYES.
- 341 - Pôle santé de Vaucelles, CAEN, FRANCE : Dr Xavier HUMBERT, Dr Grégory
 342 DAIREAUX, Dr Charlotte MILCENT.
- 343 - Maison médicale Deauville Côte Fleurie, DEAUVILLE, FRANCE : Dr Andry
 344 RABIAZA, Dr Nicolas SAINMONT, Dr Laurent SIMON

345

346 **References**

347

- 348 1. Monto AS, Malosh RE, Petrie JG, Thompson MG, Ohmit SE. Frequency of
 349 Acute Respiratory Illnesses and Circulation of Respiratory Viruses in Households
 350 With Children Over 3 Surveillance Seasons. *J Infect Dis.* 2014 Dec 1;210(11):1792–
 351 9.
- 352 2. Monto AS. Occurrence of respiratory virus: time, place and person. *The*
 353 *Pediatric Infectious Disease Journal.* 2004 Jan;23(1):S58.
- 354 3. Jartti T, Söderlund-Venermo M, Hedman K, Ruuskanen O, Mäkelä MJ. New
 355 molecular virus detection methods and their clinical value in lower respiratory tract
 356 infections in children. *Paediatric Respiratory Reviews.* 2013 Mar 1;14(1):38–45.
- 357 4. Peng D, Zhao D, Liu J, Wang X, Yang K, Xicheng H, et al. Multipathogen
 358 infections in hospitalized children with acute respiratory infections. *Virology.* 2009
 359 Dec;6(1):1–7.
- 360 5. Ambrosioni J, Bridevaux PO, Wagner G, Mamin A, Kaiser L. Epidemiology of
 361 viral respiratory infections in a tertiary care centre in the era of molecular diagnosis,
 362 Geneva, Switzerland, 2011–2012. *Clinical Microbiology and Infection.* 2014 Sep
 363 1;20(9):O578–84.
- 364 6. Petat H, Gajdos V, Angoulvant F, Vidalain PO, Corbet S, Marguet C, et al.
 365 High Frequency of Viral Co-Detections in Acute Bronchiolitis. *Viruses.* 2021 May
 17



- 366 26;13(6):990.
- 367 7. Lim FJ, Wake ZV, Levy A, Tempone S, Moore HC, Richmond PC, et al. Viral
368 Etiology and the Impact of Codetection in Young Children Presenting With Influenza-
369 Like Illness. *J Pediatric Infect Dis Soc.* 2017 Sep;6(3):260–6.
- 370 8. Kouni S, Karakitsos P, Chranioti A, Theodoridou M, Chrousos G, Michos A.
371 Evaluation of viral co-infections in hospitalized and non-hospitalized children with
372 respiratory infections using microarrays. *Clinical Microbiology and Infection.* 2013
373 Aug 1;19(8):772–7.
- 374 9. Martin ET, Kuypers J, Wald A, Englund JA. Multiple versus single virus
375 respiratory infections: viral load and clinical disease severity in hospitalized children.
376 *Influenza and Other Respiratory Viruses.* 2012 Jan 1;6(1):71–7.
- 377 10. Thornton HV, Hay AD, Redmond NM, Turnbull SL, Christensen H, Peters TJ,
378 et al. Throat swabs in children with respiratory tract infection: associations with
379 clinical presentation and potential targets for point-of-care testing. *Fam Pract.* 2017
380 Aug 1;34(4):407–15.
- 381 11. Vos LM, Bruyndonckx R, Zuithoff NPA, Little P, Oosterheert JJ, Broekhuizen
382 BDL, et al. Lower respiratory tract infection in the community: associations between
383 viral aetiology and illness course. *Clin Microbiol Infect.* 2021 Jan;27(1):96–104.
- 384 12. Zlateva KT, van Rijn AL, Simmonds P, Coenjaerts FEJ, van Loon AM, Verheij
385 TJM, et al. Molecular epidemiology and clinical impact of rhinovirus infections in
386 adults during three epidemic seasons in 11 European countries (2007–2010).
387 *Thorax.* 2020 Oct;75(10):882–90.
- 388 13. Hara M, Takao S, Fukuda S, Shimazu Y, Miyazaki K. Human
389 metapneumovirus infection in febrile children with lower respiratory diseases in
390 primary care settings in Hiroshima, Japan. *Jpn J Infect Dis.* 2008 Nov;61(6):500–2.
- 391 14. Hong CY, Lin RT, Tan ES, Chong PN, Tan YS, Lew YJ, et al. Acute
392 respiratory symptoms in adults in general practice. *Fam Pract.* 2004 Jun;21(3):317–
393 23.
- 394 15. Bruce CS, Hoare C, Mukherjee A, Paul SP. Managing acute respiratory tract
395 infections in children. *Br J Nurs.* 2017 Jun 8;26(11):602–9.
- 396 16. Aberle JH, Aberle SW, Pracher E, Hutter HP, Kundi M, Popow-Kraupp T.
397 Single versus dual respiratory virus infections in hospitalized infants: impact on
398 clinical course of disease and interferon-gamma response. *Pediatr Infect Dis J.* 2005
399 Jul;24(7):605–10.
- 400 17. Petat H, Schuers M, Corbet S, Humbert X, Le Bas F, Marguet C, et al. The
401 Design and Implementation of the ECOVIR Project: A Primary Health Care
402 Surveillance System to Strengthen Co-Detection of Respiratory Viruses in Normandy.



- 403 Methods and Protocols. 2022 Dec;5(6):98.
- 404 18. Kamikawa J, Granato CFH, Bellei N. Viral aetiology of common colds of
405 outpatient children at primary care level and the use of antibiotics. Mem Inst Oswaldo
406 Cruz. 2015 Nov;110(7):884–9.
- 407 19. Ieven M, Coenen S, Loens K, Lammens C, Coenjaerts F, Vanderstraeten A, et
408 al. Aetiology of lower respiratory tract infection in adults in primary care: a
409 prospective study in 11 European countries. Clin Microbiol Infect. 2018
410 Nov;24(11):1158–63.
- 411 20. Ordóñez-Mena JM, Fanshawe TR, Butler CC, Mant D, Longhurst D, Muir P, et
412 al. Relationship between microbiology of throat swab and clinical course among
413 primary care patients with acute cough: a prospective cohort study. Fam Pract. 2020
414 Jul 23;37(3):332–9.
- 415 21. Thornton AJ, Morley CJ, Hewson PH, Cole TJ, Fowler MA, Tunnacliffe JM.
416 Symptoms in 298 infants under 6 months old, seen at home. Arch Dis Child. 1990
417 Mar;65(3):280–5.
- 418 22. McGeoch LJ, Thornton HV, Blair PS, Christensen H, Turner NL, Muir P, et al.
419 Prognostic value of upper respiratory tract microbes in children presenting to primary
420 care with respiratory infections: A prospective cohort study. PLOS ONE. 2022 May
421 12;17(5):e0268131.
- 422 23. Bruyndonckx R, Coenen S, Butler C, Verheij T, Little P, Hens N, et al.
423 Respiratory syncytial virus and influenza virus infection in adult primary care patients:
424 Association of age with prevalence, diagnostic features and illness course. Int J Infect
425 Dis. 2020 Jun;95:384–90.
- 426 24. Wetzke M, Funken D, Lange M, Bejo L, Haid S, Monteiro JGT, et al. IRIS:
427 Infection with Respiratory Syncytial Virus in infants—a prospective observational
428 cohort study. BMC Pulm Med. 2022 Mar 15;22(1):88.
- 429 25. Souty C, Masse S, Valette M, Behillil S, Bonmarin I, Pino C, et al. Baseline
430 characteristics and clinical symptoms related to respiratory viruses identified among
431 patients presenting with influenza-like illness in primary care. Clin Microbiol Infect.
432 2019 Sep;25(9):1147–53.
- 433 26. Monto AS. Occurrence of respiratory virus: time, place and person. The
434 Pediatric Infectious Disease Journal. 2004 Jan;23(1):S58.
- 435 27. Price OH, Sullivan SG, Sutterby C, Druce J, Carville KS. Using routine testing
436 data to understand circulation patterns of influenza A, respiratory syncytial virus and
437 other respiratory viruses in Victoria, Australia. Epidemiol Infect. 2019 Jan;147:e221.
- 438 28. Greer RM, McErlean P, Arden KE, Faux CE, Nitsche A, Lambert SB, et al. Do
439 rhinoviruses reduce the probability of viral co-detection during acute respiratory tract
- 19



- 440 infections? *Journal of Clinical Virology*. 2009 May 1;45(1):10–5.
- 441 29. Schildgen O. The lack of protective immunity against RSV in the elderly.
442 *Epidemiol Infect*. 2009 Dec;137(12):1687–90.
- 443 30. Price RHM, Graham C, Ramalingam S. Association between viral seasonality
444 and meteorological factors. *Sci Rep*. 2019 Jan 30;9(1):929.
- 445 31. Zheng P, Huang C, Leng D, Sun B, Zhang XD. Transcriptome analysis of
446 peripheral whole blood identifies crucial lncRNAs implicated in childhood asthma.
447 *BMC Med Genomics*. 2020 Sep 18;13:136.
- 448 32. Li Y, Reeves RM, Wang X, Bassat Q, Brooks WA, Cohen C, et al. Global
449 patterns in monthly activity of influenza virus, respiratory syncytial virus,
450 parainfluenza virus, and metapneumovirus: a systematic analysis. *Lancet Glob
451 Health*. 2019 Aug;7(8):e1031–45.
- 452 33. Engels G, Sack J, Weissbrich B, Hartmann K, Knies K, Härtel C, et al. Very
453 Low Incidence of SARS-CoV-2, Influenza and RSV but High Incidence of Rhino-,
454 Adeno- and Endemic Coronaviruses in Children With Acute Respiratory Infection in
455 Primary Care Pediatric Practices During the Second and Third Wave of the SARS-
456 CoV-2 Pandemic. *Pediatr Infect Dis J*. 2022 Apr;41(4):e146–8.
- 457 34. Achten NB, Wu P, Bont L, Blanken MO, Gebretsadik T, Chappell JD, et al.
458 Interference Between Respiratory Syncytial Virus and Human Rhinovirus Infection in
459 Infancy. *J Infect Dis*. 2017 Apr 1;215(7):1102–6.
- 460 35. Wu A, Mihaylova VT, Landry ML, Foxman EF. Interference between rhinovirus
461 and influenza A virus: a clinical data analysis and experimental infection study.
462 *Lancet Microbe*. 2020 Oct;1(6):e254–62.
- 463 36. Essaidi-Laziosi M, Geiser J, Huang S, Constant S, Kaiser L, Tapparel C.
464 Interferon-Dependent and Respiratory Virus-Specific Interference in Dual Infections
465 of Airway Epithelia. *Sci Rep*. 2020 Jun 24;10(1):10246.
- 466



Supplementary material Table S1- Multivariate analyses of the probability to be infected with each virus. The model included age, sampling delay, viruses, and months of study . Results are expressed as Coefficient [IC95%].

	HRV	Flu	CoV	PIV	RSV	ADV	BoV
Age(y)	-0.02*** [-0.03; -0.01]					-0.09** [-0.2; -0.4]	-0.06** [-0.11; -0.01]
SD (days)		-0.22*** [-0.10; -0.00]					
Viruses							
HRV		-1.01*** [-1.44;-0.57]	-1.05*** [-1.58-0.52]	-0.68** [-0.23;-1.14]			
Flu	-1.13*** [-1.57;-0.69]		-1.22** [-1.97; -0.53]				1.05* [0.20-1.90]
CoV	-1.11*** [-1.65;-0.58]	-1.23** [-1.95;-0.50]					
PIV	-0.86*** [-1.32;-0.4]						
RSV							
ADV							
BoV				1.28** [0.48;2.07]			
Months							
Oct			-1.70* [-2.95; -0.45]	1.32*** [0.65;1.99]			
Nov		1.51* [0.23;2.78]		0.84* [0.10; 1.57]	5.58*** [3.90;7.25]	8.11*** [6.6; 9.6]	-2.27* [-4.51;-0.04]
Dec					6.59*** [5.01;8.17]		-16.0*** [-23.1; -8.8]
Jan		3.77*** [3.09; 4.50]	0.61* 0.13;1.32]	-1.11 * [-1.14; -2.22]	6.72*** [5.23;8.20]	7.47*** [6.0;8.9]	3.44*** [1.87;4.87]]
Feb	-0.63** [-1.11; -0.14]	3.91*** [3.23; 4.60]	0.73* [0.13; 1.32]		5.63*** [4.0;7.25]	8.37*** [7.1; 9.6]	
March			0.67*** [0.01;1;31]				

*SD: sample delay: *p<0.05; **p<0.005; *** p<0.0001 ; For the months, April is the reference.*

hMPV was not associated with age, seasons and sampling delay.





Chapitre 3 : Quantification virale respiratoire et codétectons virales

Nous allons soumettre dans les jours qui viennent, dans la revue *Plos Pathogens* (IF 7.4, rang A), l'article intitulé " *Viral acute respiratory infections: respiratory viral loads indicate that health conditions, virus, age and coinfections do matter*".

Résumé en français:

Introduction

Les infections respiratoires aiguës (IRA) sont les infections les plus courantes dans la population générale et sont principalement causées par des virus respiratoires. La détection de plusieurs virus dans un échantillon respiratoire donné est courante, mais l'interprétation de ces codétectons virales reste difficile. Afin de mieux comprendre ces codétectons virales et les interférences potentielles, nous avons développé des PCR quantitatives (Polymerase Chain Reaction) pour les virus les plus répandus dans les coinfections : le rhinovirus humain (HRV) et le virus respiratoire syncytial (VRS).

Matériels et méthodes

Des échantillons provenant de deux cohortes différentes ont été analysés : l'une comprenait des nourrissons hospitalisés âgés de moins de 12 mois atteints de bronchiolite aiguë (n=719), et l'autre des patients issus des soins primaires, de tout âge, présentant des symptômes d'IRA (n=685). Nous avons effectué une PCR multiplex sur les écouvillons nasopharyngés et une PCR quantitative sur les échantillons positifs pour l'HRV ou/et le VRS afin de déterminer les charges virales (CV). L'abondance cellulaire (AC) a été mesurée pour estimer la lyse cellulaire. Le génotypage a été effectué soit directement à partir du panel moléculaire de première ligne, soit par PCR et séquençage pour l'HRV.

Résultats

Le risque de codétection était 4.1 et 93.9 plus élevé chez les nourrissons hospitalisés que chez les patient issus des soins primaires pour le VRS et l'HRV respectivement ($p < 0.001$). Nous avons constaté une corrélation positive entre l'AC et la CV pour les deux virus. L'AC était plus élevée dans les échantillons positifs pour plusieurs virus que dans les échantillons mono-infectés ou négatifs ($p < 0.001$), et plus élevé dans les échantillons positifs pour le VRS ($p < 0.001$) et l'HRV ($p < 0.001$) que dans les échantillons négatifs. Les CV d'HRV étaient plus élevées chez les enfants que chez les personnes âgées ($p < 0.05$), mais pas les CV de VRS. La CV de l'HRV était plus élevée lorsqu'il était détecté seul par rapport aux échantillons coinfectés par le VRS-A ou le VRS-B. Il y avait une augmentation significative de la CV du



VRS-A en cas de codétection avec l'HRV ($p=0.001$) et également en cas de codétection avec le VRS-B+HRV par rapport au VRS-A+VRS-B ($p=0.02$).

Conclusion : De nombreux paramètres influencent l'histoire naturelle des infections virales respiratoires, et la quantification des charges virales respiratoires peut grandement l'expliquer.



1 **Viral acute respiratory infections: respiratory viral**
2 **loads indicate that health conditions, virus, age and**
3 **coinfections do matter**

4 **Short title:**

5 **Quantifying respiratory viral loads helps in viral**
6 **codetections**

7 **Authors**

8 Hortense Petat^{1,2}, Sandrine Corbet², Bryce Leterrier², Astrid Vabret², Meriadeg Ar
9 Gouilh²

10

11 **Affiliations**

12

13 ¹Univ Rouen Normandie, Dynamicure INSERM UMR 1311, CHU Rouen, Department
14 of paediatrics and adolescent medicine F-76000 Rouen, France.

15 ²Univ Caen Normandie, INSERM Dynamicure UMR 1311, CHU Caen, department of
16 virology, F-14000 Caen, France

17

18 **Corresponding author:**

19 Hortense Petat, hortense.petat@univ-rouen.fr

20

21 **Authors contribution:**

22 HP, AV, MAR designed the study.



23 HP collected the samples.
24 SC and HP made the biological analyses.
25 HP, MAR and BL analyzed the results.
26 HP wrote the first manuscript.
27 All authors commented and approved the final manuscript.

28 **Abstract**

29 Introduction: Acute respiratory infections (ARI) are the most common infections in the
30 general population, and are mainly caused by respiratory viruses. Detecting several
31 viruses in a given respiratory sample is common, while the interpretation of these viral
32 codetections remains challenging. In order to better understand these viral
33 codetections and potential interferences, we developed quantitative PCR (Polymerase
34 Chain Reaction) for most prevalent viruses found in coinfections: human rhinovirus
35 (HRV) and respiratory syncytial virus (RSV), and compared the viral loads in two
36 different populations suffering from ARI.

37 Material and methods: Samples from two different cohorts were analyzed: one
38 included hospitalized infants aged less than 12 months with acute bronchiolitis (n=719)
39 and the second one of primary care patients of all ages with symptoms of ARI (n=685).
40 We performed Multiplex PCR on nasopharyngeal swabs, and quantitative PCR on
41 samples positive for HRV or/and RSV to determine viral loads (VL). Cellular
42 abundance (CA) was also measured. Genotyping was made either directly from first
43 line molecular panel or by PCR and sequencing for HRV.

44 Results: The risks of viral codetection were 4.1 and 93.9 higher in infants hospitalized
45 for bronchiolitis than in primary care for RSV and HRV respectively ($p<0.001$). We
46 found positive correlation between CA and VL for both viruses. CA was higher in
47 samples positive for several viruses compared to mono-infected or negative samples



48 ($p < 0.001$), and higher in samples positive to RSV ($p < 0.001$) and HRV ($p < 0.001$)
49 compared to negative samples. HRV VL were higher in children compared to the
50 elderly ($p < 0.05$), but not RSV VL. HRV VL was higher when detected alone compared
51 to samples found coinfecting with RSV-A and with RSV-B. There was a significant
52 increase of RSV-A VL in codetection with HRV ($p = 0.001$) and also when co-detected
53 with RSV-B+HRV compared to RSV-A+ RSV-B ($p = 0.02$).

54 Conclusion: Many parameters influence the natural history of respiratory viral
55 infections, and quantifying respiratory viral loads can greatly explain this.

56

57 **Author summary**

58 Acute respiratory infections (ARI), such as the common cold, angina, flu-like syndrome,
59 are mainly caused by respiratory viruses. Recent development of molecular diagnosis
60 techniques greatly enhance the viral etiology elucidation of respiratory viruses in
61 hospital care. Nevertheless, several viruses may be often detected and are commonly
62 referred to as viral codetections. Unfortunately, until now, in the case of codetections,
63 it is not possible to know which virus is responsible for the patient's symptoms. In our
64 model, we chose to focus on two viruses often found in respiratory samples from acute
65 respiratory infections patients: HRV (human rhinovirus) and RSV (respiratory syncytial
66 virus). We developed molecular techniques to quantify the viral load in samples in
67 order to explore its possible correlation with the severity of acute respiratory infections
68 and to detect eventual interferences between viruses found in codetection. We found
69 that the age of patients, the fact of being hospitalized or not, the type of virus or the
70 presence of several viruses are important in the genesis of a respiratory viral infection.

71

72



73 **Introduction**

74

75 Acute Respiratory Infections (ARI) are mostly caused by viruses circulating in
76 the general population (1). Their impacts are different according to the populations'
77 profiles (age, geographic areas, industrialization, comorbidity, etc) (2). About 0 to 6
78 episodes of ARI per person are estimated every epidemic season in industrialized
79 countries (1), before the SARS-CoV2 pandemic. Since then, the virological landscape
80 could have changed and evolved, imposing us to adjust every national health system
81 (3).

82

83 Multiple viruses can infect either concurrently or sequentially respiratory tracts.
84 Viral codetections are defined as the detection of multiple viruses in the same patient
85 sample at a given time. When several pathogens co-circulate in a patient, a
86 cooperation or a competition between these pathogens can be established (4).
87 Frequency of these viral codetections in patients with ARIs' symptoms vary greatly,
88 depending on studies, between 25 and 70% (5) (3) (6) (7) (8) (9). According to a review
89 of articles published in 2014 including studies about association between viral
90 coinfections and ARIs' severity (10), 74% of patients were under the age of 6 years
91 old. So there is little literary data concerning older children and adults, and even less
92 that has gathered the entire general population in primary care settings.

93

94 In hospital care, the two main viruses found in viral codetections are the
95 Respiratory Syncytial Virus (RSV) and the Human Rhinovirus (HRV) (9): HRV/RSV
96 codetections account for 11% of infants less than 2 years old hospitalized for fever or
97 respiratory symptoms (11). RSV detection seems to be associated with a decreased



98 probability for HRV coinfection, suggesting a negative virus-virus interference (12).
99 During a RSV infection, host could be refractory to other respiratory viruses. In a
100 prospective cohort published in 2016, Karpinen et al. showed a negative association
101 between HRV and RSV : HRV infection rates were lower in children who presented a
102 recent VRS infection compared to children who did not (8% versus 14%, $p < 0,05$) (13).
103 Also, HRV is known to infect adults about 2 to 3 times every epidemic season (14),
104 and to cause exacerbations of chronic respiratory diseases and increase mortality in
105 the elderly (15) (16) (17). RSV is known to generate ARIs in infants, being the main
106 cause of acute bronchiolitis, and even if RSV is not responsible for a high mortality rate
107 in developed countries, it still represents an important burden on health systems,
108 during winter epidemics (18) (19) (20). Viral loads of these viruses are not quantified
109 in routine practice yet, and no technique is protocolized. Studies explored associations
110 between severity of symptoms presented by the patients and the level of the
111 respiratory viral loads (21) (22). Results are inconsistent between the studies, because
112 of the heterogeneity of the patients (age, symptoms), the difference between primary
113 or hospital care populations, the particularity of each respiratory virus, and the
114 quantitation techniques.

115 While other respiratory viruses, such as influenza virus and RSV, cause
116 destruction of airway epithelial cells, HRV is rarely associated with upper airway
117 cytopathology. Using scanning and light electron microscopy of nasal biopsy samples
118 from subjects with natural colds, Winther et al. found that the epithelial cells were
119 detached; however, the epithelial cell lining and edges remained structurally intact (23).
120 Similar preservation of cell morphology and composition has been observed for the
121 nasal epithelium in studies of experimental HRV infection, where the extent of viral
122 shedding did not correlate with the number of cells in the epithelium (24). These



123 respiratory damages could be estimated with the measure of cellular abundances in
124 the respiratory samples.

125

126 In this context, we analyzed the respiratory samples of patients suffering from
127 acute respiratory infections enrolled in two French cohorts (Guérande and ECOVIR).
128 We performed the virological characterization and developed quantitative RT-PCR of
129 RSV and HRV to determine viral loads (VL) and to test correlations between VL and
130 demographic data, coinfections, cellular abundance and viral genotypes of these
131 respiratory viruses.

132

133 **Material and methods**

134 Our analyses were based on two cohorts: Guérande and ECOVIR, in which
135 nasopharyngeal swabs of patients suffering from acute respiratory infection were
136 collected (Fig 1). In addition, results obtained from these cohorts were compared,
137 whenever possible, to retrospective data obtained from the routine molecular
138 diagnostic activity of the virology department of the hospital of Caen.

139

140

141

142

143

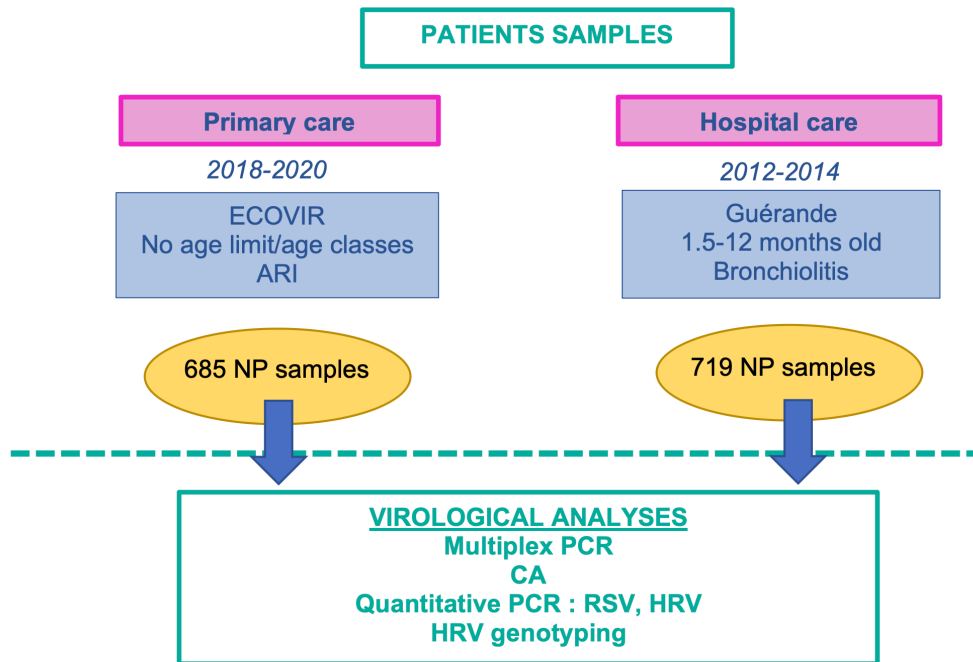
144

145

146

147



148 **Fig 1- Workflow of the methodology of the article**

ARI : acute respiratory infection- CA : cellular abundance- HRV : human rhinovirus
NP : nasopharyngeal swab- RSV : respiratory syncytial virus

149

150

151 **Cohort Guérande**

152 Project Guérande was a prospective, double-blinded, multicentric study developed in
153 France to test the efficacy of 3% hypertonic saline nebulization in acute viral
154 bronchiolitis (9) (25). Briefly, 24 French hospital centers included patients between
155 October 15, 2012 and April 15, 2014. Infants from 6 weeks to 12 months old who came
156 to pediatric emergencies for a first episode of moderate to severe bronchiolitis were
157 included and nasopharyngeal swabs were collected.

158

159

160



161 **Cohort ECOVIR**

162 Details on study design, laboratory methods, and bioinformatics were previously
163 published (26). In short, project ECOVIR was a prospective, multicentric, non-
164 interventional study developed in Normandy, France. ECOVIR was performed during
165 two epidemic seasons (2018-2019, 12 weeks and 2019-2020, 21 weeks). For safety
166 reasons and uncertainty regarding the early phase of COVID-19 emergence, the
167 second season was abridged in March 2020 and it was not possible to relaunch it
168 because of the lockdown of SARS-CoV2 pandemic. Patients were included by
169 General Practitioner Investigators (GPI) during medical visits. Inclusion criteria were:
170 French speaking people, whatever their age, consulting their general practitioner with
171 symptoms of ARI. Each patient was informed, then examined, and a nasopharyngeal
172 swab was performed. Data was collected by the GPI.

173

174 **Biobank of hospitalized patients**

175 During the 2016-2018 period, the virology department of the hospital center of Caen
176 (CHU Caen) received 216 nasopharyngeal swabs from hospitalized patients. These
177 samples were processed according to routine virological molecular analyses, and HRV
178 genotyping was performed.

179

180 **Ethics**

181 For Guérande, written informed consent was obtained from the patients' parents. The
182 Saint-Germain-en-Laye Ethics Committee approved the study (reference 12020). For
183 ECOVIR, we obtained the agreement of the "Est II" protection committee (study
184 reference 18/10/10/63004) in January 2019. An information document was given to



185 each patient included (non-opposition document). For the hospital care samples, we
186 obtained a non-opposition consent for the result to be used for research, because the
187 sample was part of routine patient care.

188

189 **Molecular virologic techniques**

190 Every sample was achieved in Virology Laboratory of CHU Caen. Then nucleic
191 acid (NA) were extracted with « QIA Symphony », (Qiagen, Hilden, Germany) and
192 analyzed with Luminex® technique. To limit the number of thawing and therefore
193 preserve the sample quality, we aliquoted NA extracts in 8µL microtubes.

194 **Reverse transcription PCR (RT-PCR) on NA**

195 RT-PCR were performed on NA. The PCR mix was as follow: 10 µL of 2 X Reaction
196 Mix (dNTPs + MgSO₄), 0,8 µL of Superscript™ III RT/Platinum™ Taq Mix, 0,2 µL of
197 RNase inhibitor, 0,15 µL of each forward (5' GGG ACC TAC TTT GGG TGT CGG TGT
198 3') and reverse (5' GCA TCI GGY ARY CAC CAC CAN CC 3') primers. Eight µL of NA
199 were then added and mixed thoroughly. Retro-transcription was performed at 50°C for
200 20 minutes, then activation of the polymerase enzyme was achieved by heating at 95°
201 for 2 minutes. Then 35 cycles of PCR were composed of the three following steps:
202 denaturation at 94°C for 15 seconds, hybridation at 63°C for 30 seconds, and
203 polymerization at 68°C for 40 seconds. Additionally, NA were submitted to NxTag RPP
204 Luminex® kit for virologic identification and following manufacturer's
205 recommendations. Fifteen viruses (RSV-A, RSV-B, Rhinovirus/Enterovirus,
206 Metapneumovirus, Adenovirus, CoV-HKU1, CoV-NL63, CoV-229E, CoV-OC43,
207 Influenza, Para-Influenza 1, 2, 3, 4, Bocavirus) and 3 intra-cellular bacteria
208 (*Chlamydophila pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae*)
209 were screened.



210 **Rhinovirus sequencing**

211 We performed an agarose gel electrophoresis on samples positive to rhinovirus VP
212 region PCR. Agarose gel was prepared with 1.8g of agarose with 120mL of TBE (Tris
213 Borate EDTA) 1X, and 10 μ L of GelRed™ Nucleic Acid Gel stain. Migration was
214 performed for 30 minutes at 100V. Extracts were visualized with « Molecular Imager®
215 GelDoc™ XR+ Imaging System », (BioRad, Hercules, California, USA) and treated
216 with ImageLab® software. Amplicons (5 μ L) were digested (lean-up) with 2 μ L of
217 ExoSAP-IP (ThermoFischer, Waltham, Massachusetts, USA), during 15 minutes at
218 37°C followed by inactivation of enzymes at 80°C for 15 minutes in a thermocycler.
219 fragments at 37°C for 15 minutes and inactivation of enzymes at 80°C for 15 minutes.
220 Sequencing reaction was performed with the kit « BigDye Terminator version 1.1 cycle
221 sequencing kits » following manufacturer's recommendations (Applied Biosystems,
222 Foster City, California, USA). Then samples were purified by sephadex gel column
223 filtration, « Séphadex ® G50 », following manufacturer's procedure (Sigma, Saint-
224 Louis, Missouri, USA). Sequencing was then performed with Sanger's method on
225 « Applied 3500 Genetic Analyzer » (Applied Biosystems, Foster City, California, USA).
226 A bioinformatic analysis was handled with the « CLC Main WorkBench 8 » software
227 (CLC BioQiagen®, Hilden, Germany). Then the sequences were submitted to blast
228 analysis (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) and phylogenetics reconstruction
229 methods.

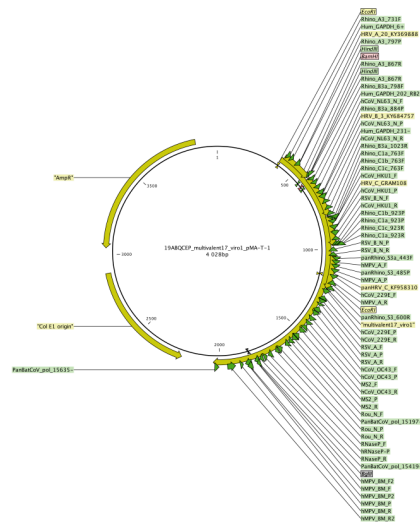
230 **Development of Real time RT-PCR**

231 We created an aligned matrix comparing sequences of virus species (Rhinovirus A or
232 B or C), forward and reverse primers, specific to each species, and "pan-rhino" primers
233 matching all species. Primers were ordered dry and desalted at Sigmaaldrich company



234 (<https://www.sigmaaldrich.com/france.html>). In order to validate the PCR reaction, we
 235 designed a synthetic positive control multivalent plasmid ordered at Invitrogen Geneart
 236 (Thermo Fisher Scientific, France). The rhinovirus primers, along with other primers
 237 used to detect respiratory viruses commonly used in our molecular diagnostic
 238 laboratory, were inserted in the control plasmid design, at a distance producing an
 239 amplicon size comparable to the one of the gene target in the natural virus (Figure 2).

240 Fig 2- Plasmid map



241

242

243 Amplification systems were validated on both the synthetic control plasmid and a
 244 reduced number of samples,. We used the same methodology to develop qRT-PCR
 245 of VRS-A and VRS-B. We performed qRT-PCR on « LightCycler 480 II » (Roche, Bâle,
 246 Switzerland) and used the « LightCycler® 480 SV 1.5.1 » software. The PCR mix
 247 was as following: 10 µL of 2X Reaction mix, 0,4 µL of RNase out, 0,4 µL of SuperScript
 248 III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR System, 0,4 µL of each forward and
 249 reverse primers 50µM, 1 µL of probe 50µM. We used 16 µL of this mix with 4 µL of
 250 extract. The PCR program was as following: retrotranscription at 50°C for 15 minutes,



251 enzyme activation at 95°C for 2 minutes and then 35 cycles of denaturation at 95°C
252 for 10 seconds, hybridation at 50°C for 10 seconds, polymerization at 72°C for 20
253 seconds.

254 Development of range of standards- Range of standards was obtained by performing
255 dilution of quantified PCR products amplified by the systems. Quantities of DNA
256 amplicons were measured by the « Qubit™ 4 Fluorometer » (Invitrogen, Carlsbad,
257 California, USA), and allowed us to calculate the number of copies of amplicons.

258 Quantitation thresholds- We determined quantitation thresholds of the viruses with the
259 multivalent plasmid : HRV, RSV-A, RSV-B. Following thresholds were determined : 20
260 copies/μL for RSV-A, 4,5 copies/μL for RSV-B, 10 copies for HRV.

261 GAPDH and Panrhinovirus tests on the complete collections- Once the systems had
262 been validated, we performed qRT-PCR on every sample of the collection.
263 Quantitation was computed with the software LightCycler® 480 SV 1.5.1. Lineary
264 regression was performed with the values of the range of standards and allowed us to
265 calculate number of copies in samples. Analyses and graphical representation were
266 performed with the R® software.

267 Cellular abundance- To measure cellular abundance, we quantified a cellular gene in
268 every sample (GAPDH).

269

270 **Statistical analysis**

271 Statistical analyses were performed with standard methods using RStudio software
272 (version 1.1.456). Univariate, descriptive statistics and graphs were prepared using
273 Excel© (Microsoft) and RStudio© softwares. All significance tests were 2-tailed (0.05).
274 For normally distributed data, Student's *t* test was used. To compare means of different
275 groups, Anova test was implemented with RStudio software. For non-normally



276 distributed data, Kruskal-Wallis test was used to highlight a group effect on measured
277 viral loads among infection groups (mono or coinfection). If a group effect was found,
278 then Dunn's post-tests were performed to identify which groups significantly distinguish
279 from another. Due to multiple tests, p-value were adjusted using the Benjamini-
280 Hochberg method.

281

282 **Study limitations**

283 Unfortunately, concerning ECOVIR, we had to stop inclusions of patients during the
284 second season of ECOVIR, for safety reasons and uncertainty regarding the early
285 phase of COVID-19 emergence. It was not possible to relaunch it because of the
286 lockdown of SARS-CoV2 pandemic.

287

288 **Results**

289 Seven hundred and nineteen samples came from project Guérande, 685 patients were
290 included in project ECOVIR (191 during the first season, 494 during the second
291 season).

292

293 **1. Virological results: global description of respiratory viruses**

294

295 Qualitative results of Multiplex PCR very different for both cohorts (Guérande,
296 ECOVIR, Table 1A). In ECOVIR, negative samples were less frequent in younger
297 ages, but represent almost 50% of samples in the elderly (>65 years old). Thirteen
298 percent of samples were positive to RSV in infants and in the elderly in primary care,
299 versus 90% in infants in hospital. RSV was co-detected in 56% of cases in infants in



300 hospital, but only in 24% of cases in primary care. HRV was co-detected in about 30%
 301 of cases in both cohorts.

302

303 **Table 1- Virological results**

304 **A. Multiplex PCR**

Viruses	Guérande- n (%)	ECOVIR- n (%)
RSV-A	441 (61)	27 (4)
RSV-B	297 (41)	11 (1.6)
HRV	246 (34)	193 (29)
CoV-229E	5 (0.6)	12 (1.8)
CoV-OC43	19 (3)	15 (2.2)
CoV-HKU1	4 (0.5)	17 (2.5)
CoV-NL63	10 (1)	17 (2.5)
Flu	4 (0.5)	98 (14.5)
PIV	59 (8)	34 (5)
BoV	49 (7)	7 (1)
hMPV	41 (6)	32 (4.7)
ADV	55 (8)	10 (1.5)
Negative	12 (2)	221 (32.7)

305

306 **B. Viral codetections**

Detected virus	Guérande n (%)	ECOVIR n (%)	p	OR IC _{95%}
RSV	263 (56)	9 (24)	<0.001	4.1[1.8 ; 10.0]
HRV	229 (93)	27 (14)	<0.001	93.9 [48.7 ; 190.7]
CoV	34 (92)	7 (12)	<0.001	75.6 [17.7 ; 482.5]
Flu	4 (100)	5 (6)	<0.001	NA

307 *RSV : respiratory syncytial virus ; HRV : human rhinovirus ; CoV : coronavirus ; Flu : influenza ; PIV :*

308 *parainfluenza ; BoV : bocavirus*

309

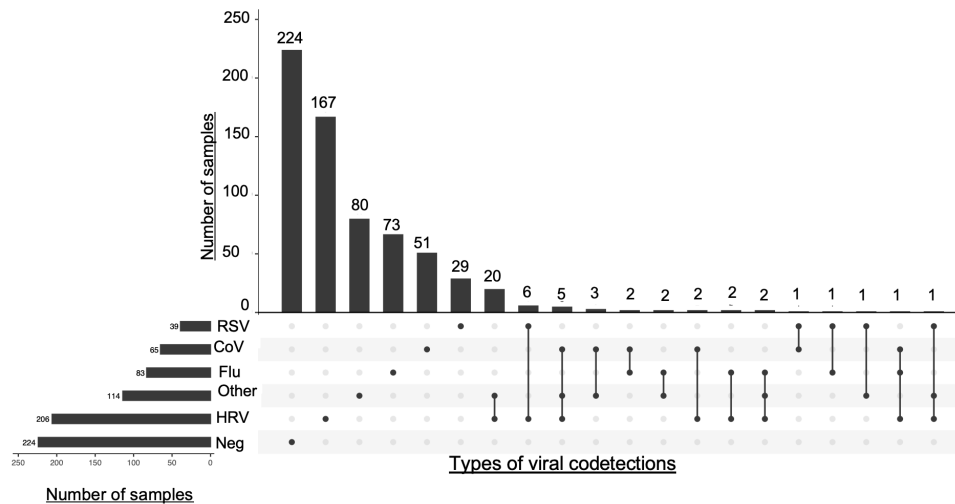
310 Viral codetections rates were 55% and 7.6% in Guérande and ECOVIR respectively
 311 (Table 1B). The risks of codetection were 4.1 and 93.9 higher in hospitalized infants
 312 than in primary care for RSV and HRV respectively ($p < 0.001$). Repartition of viral



313 codetections in primary care was highly variable (Fig 3). The most abundant
 314 codetection was HRV-RSV-A. No codetection was observed in samples positive to
 315 RSV-B. Flu was detected with another virus in only 6% of total Flu positive samples.

316

317 Fig 3- Upset plot of viral codetection in samples from cohort ECOVIR



318

319 *The number samples of each viruses is represented on the left side. At the top of the figure are represented the*
 320 *numbers of codetections described under.*

321

322 Cellular abundance (CA) in samples with viral monodetection was significantly higher
 323 than in negative samples ($p < 0.001$), and significantly lower than samples with viral
 324 codetections ($p < 0.001$) (Fig 4A). CA were significantly higher in younger patients under
 325 6 years old compared to the adults aged between 18 and 65 years ($p < 0.01$, Fig 4B).
 326 Compared to the negative samples, CA were significantly higher in samples positive
 327 to RSV ($p < 0.001$), HRV ($p < 0.001$), or CoV ($p < 0.05$) (Fig 4C).

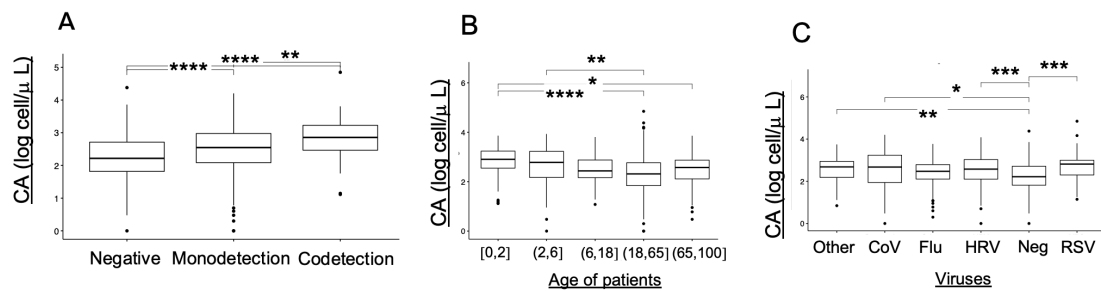
328

329

330



331 **Figure 4- Cellular abundance in ECOVIR samples**



A: Cellular abundance and viral codetections; B: Cellular abundance according to the age of patients;

C: Cellular abundance according to the viruses found in samples

332

333

334 **2. Respiratory viral loads (VL) and variables**

335 **A. Viral loads and age classes in ECOVIR**

336 Results from ECOVIR were used to compare the viruses' viral loads between all ages

337 of population (Fig 5A). HRV represents almost a half of samples in children under 6

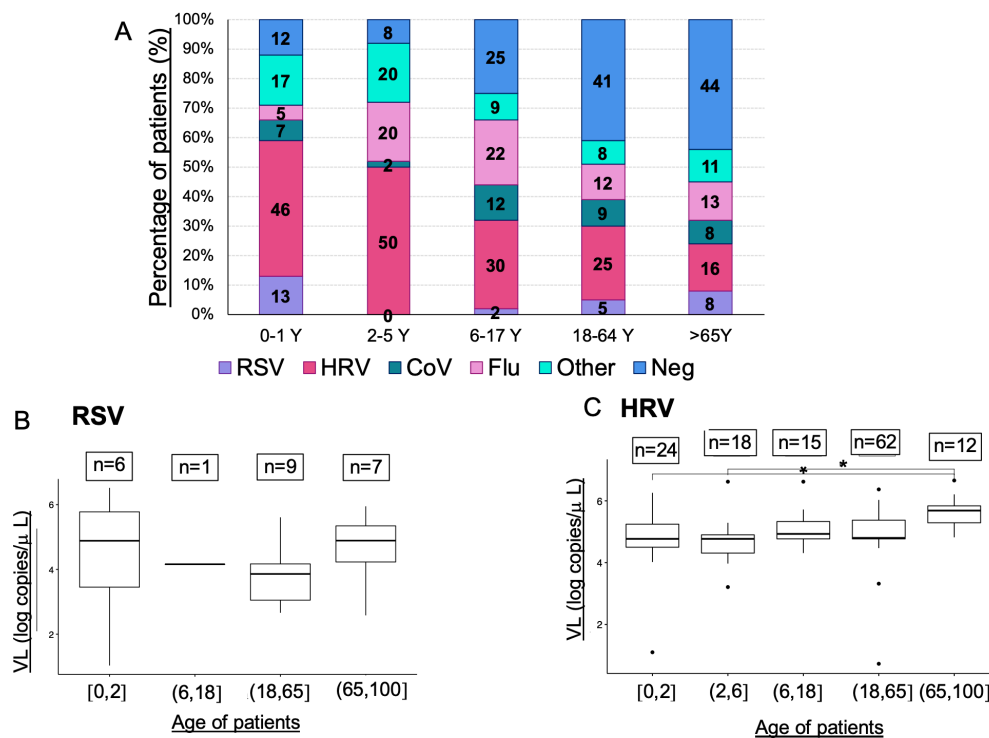
338 years old, and only 23% in adults (more than 18 years old). RSV was absent in children

339 between 2 and 18 years old, and represents only 5% of samples in adults from 18 to

340 65 years old. In the elderly, the rate was about 8%.

341



342 **Fig 5- Viruses, VL and age classes**

A: Viruses and age classes (cohort ECOVIR); B: RSV VL and age of patients; C: HRV VL and age of patients

343

344 We compared respiratory VL in samples from ECOVIR cohort, because all ages were
 345 represented. There was no difference between age classes concerning RSV VL, but
 346 the number of samples was low (Fig 5B). We could note that there is a tendency of a
 347 higher RSV VL in infants and the elderly compared to the adult population. HRV VL in
 348 age classes 0-2 and 2-6 years were significantly lower compared with VL in age class
 349 >65 years old ($p=0.04$ and 0.02 respectively) (Fig 5C). We compared VL in Guérande
 350 and in infants from ECOVIR (same age population): RSV-A VL was higher in
 351 hospitalized infants ($p=0.05$), HRV VL was higher in infants in primary care ($p=0.005$),
 352 and there was no difference concerning RSV-B VL.

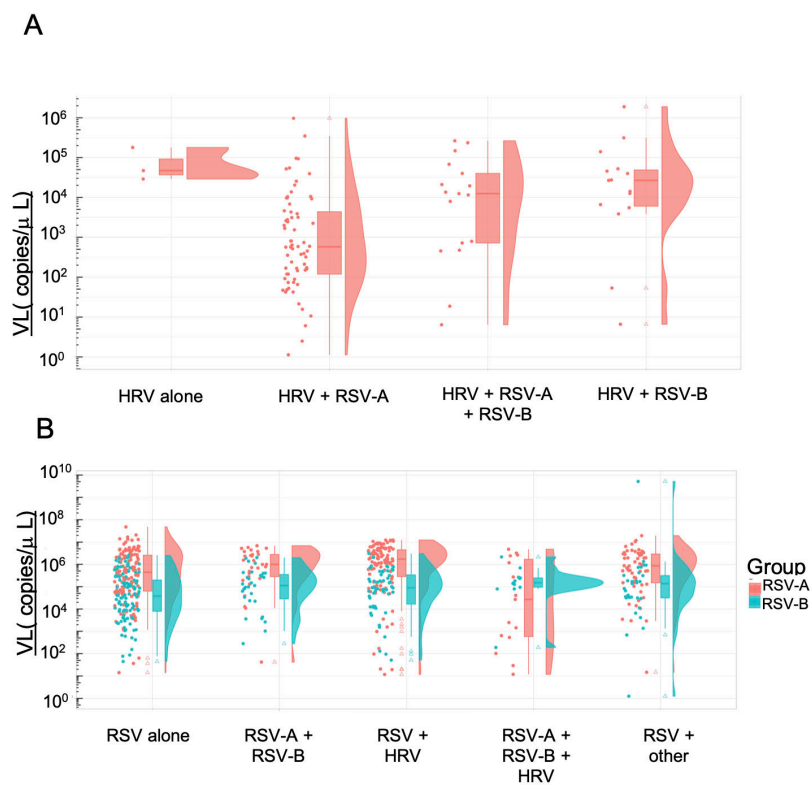
353



354 **B. Viral loads and mono or co-detections**

355 We compared HRV and RSV VL according to the codetections found, in the
 356 Guérande's cohort, because of the high rate of viral codetections, and of the
 357 heterogeneity of the cohort. HRV VL is higher when detected alone compared with
 358 samples co-detected with RSV-A, with RSV-B and with RSV-A and RSV-B, but not
 359 significantly (Fig 6A). We can note that RSV-A replicates more than RSV-B. Concerning
 360 RSV-A (Fig 6B), we found a significant increase of VL in codetection with HRV
 361 ($p=0.001$) and a significant increase in VL with RSV-A+ RSV-B+HRV compared to
 362 RSV-A+RSV-B ($p=0.02$). We found no difference of VL concerning RSV-B and
 363 codetections.

364 **Fig 6- Rainplots of VL and codetections**



A : HRV, B : RSV-A and RSV-B

365

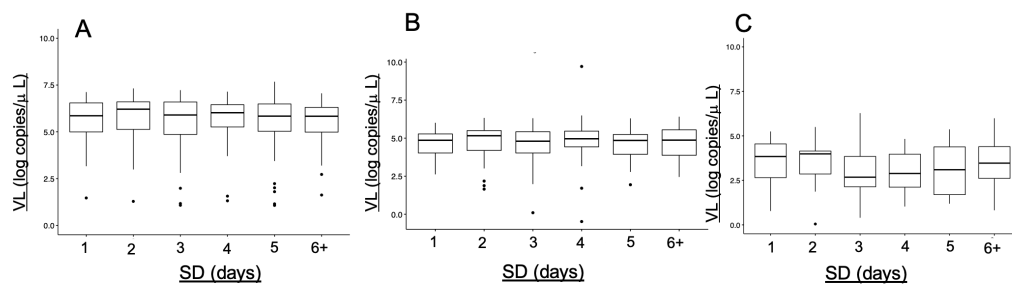


366 **C. Viral loads and sample delays**

367 Sample delay was defined as the number of days between the onset of symptom and
 368 the nasopharyngeal swabbing. To propose a comparison with least biases possible,
 369 VL of samples from a unique cohort (Guérande, accounting for most homogeneous
 370 samples with a better quality of sample delay estimation). There was no significant
 371 differences between VL according to the samples delays for HRV and RSV (Fig 7). For
 372 HRV, we can notice a tendency of a higher HRV VL during the first two days of
 373 symptoms.

374

375 **Fig 7- Viral loads and sample delays**



A : RSV-A (n=348), B : RSV-B (n=230), C : HRV (n=101)

376

377

378

379 **D. Viral loads and cellular abundance**

380 We showed positive correlations between cellular abundances and viral loads, at different
 381 levels, in both cohorts (Figure 7).

382

383

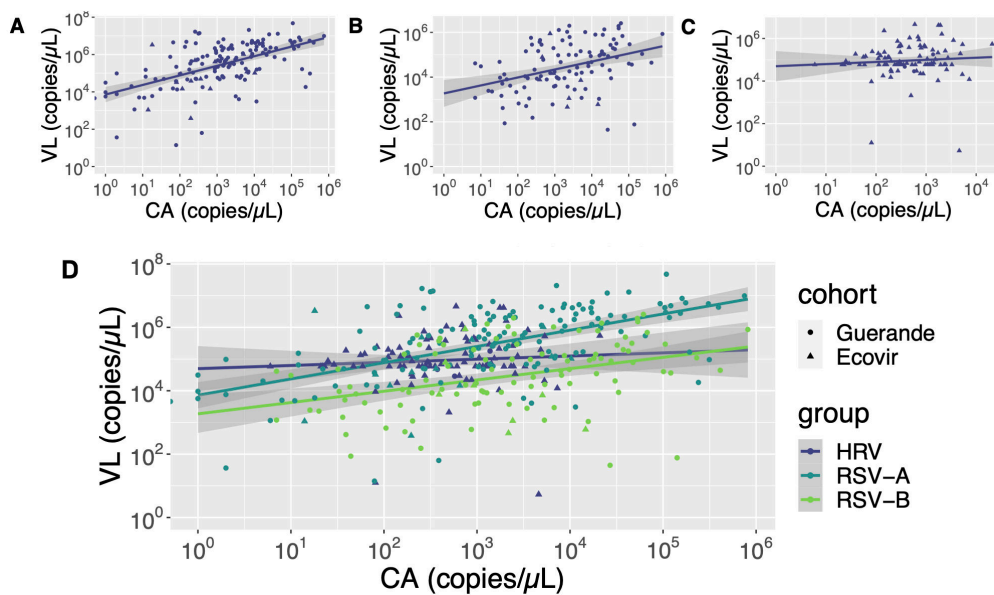
384

385

386



387 **Figure 7- Correlation between CA and VL according to viruses**



388

389 *A: HRV VL and CA; B: RSV-A VL and CA; C: RSV-B VL and CA; D: HRV, RSV-A and RSV-B VL and*

390 *CA*

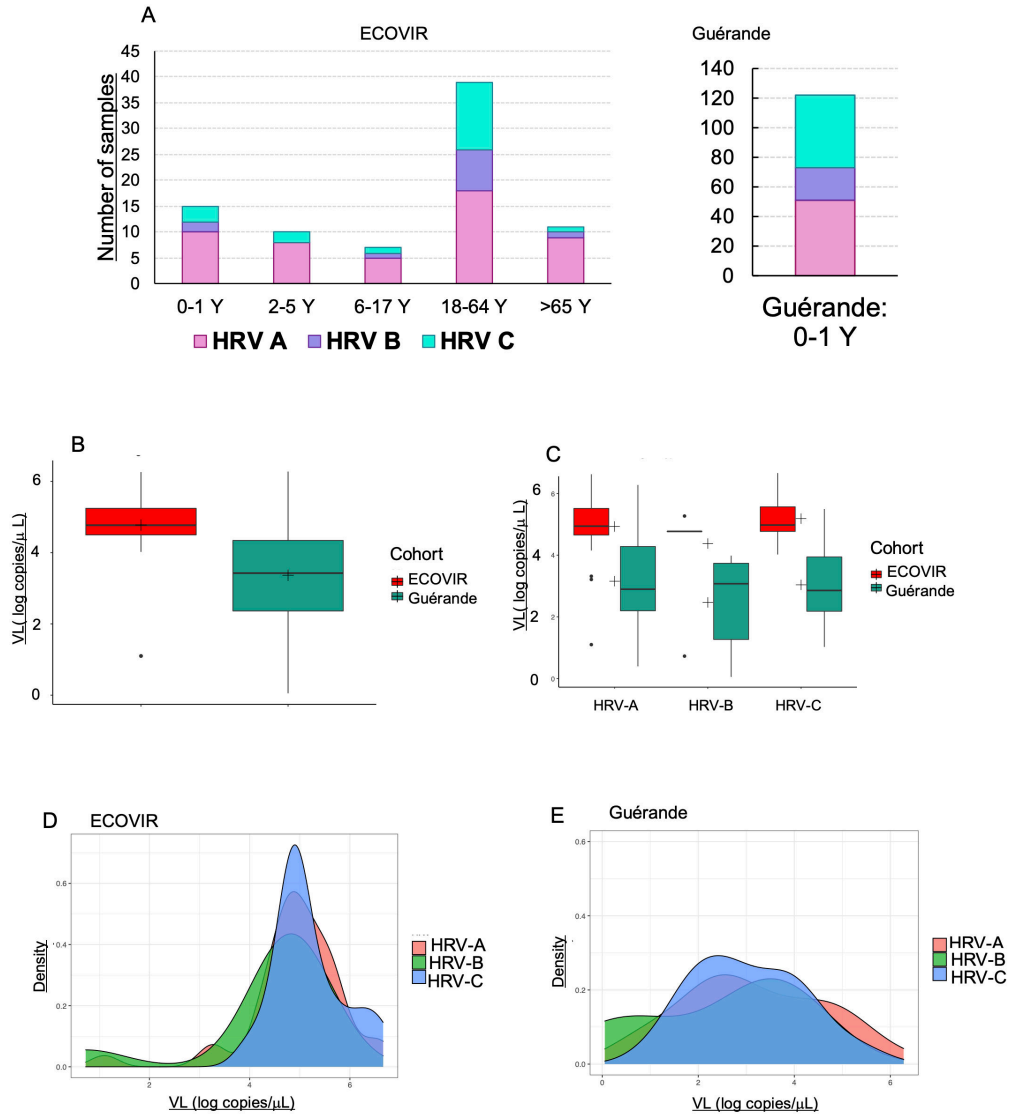
391 **3. HRV genotyping**

392 PCR Multiplex tests found 246 (34%) and 193 (29%) samples positive to
 393 HRV/enterovirus respectively in Guérande and ECOVIR. HRV genotyping was
 394 performed on positive samples: we found respectively 61, 15 and 24% in ECOVIR
 395 (n=82) and 42, 18, and 40 % in Guérande (n=122) of HRV-A, HRV-B and HRV-C (Fig
 396 8A). We performed measures of VL on 220 and 131 samples for Guérande and
 397 ECOVIR respectively. HRV VL was significantly higher in infants from primary care
 398 compared to hospitalized infants (Fig 8B). All HRV VL were significantly higher in
 399 primary care compared to hospitalized patients (respectively $p=0.04$, 0.008 and 0.03
 400 for HRV-A, HRV-B and HRV-C) (Fig 8C). We found no significant difference between
 401 VL according HRV serotypes in both cohorts. With the density plots (Figure 8D and E),



402 we can see that HRV VL are more variable in Guérande compared with ECOVIR
 403 cohort.

404 **Figure 8- HRV**



A : Number of samples of HRV-A, HRV-B and HRV-C according to the age of the patients ; B : HRV VL in infants in ECOVIR and in Guérande ; C : HRV-A, B and C VL in ECOVIR and Guérande ; D : densityplot of HRV-A, B and C VL in ECOVIR ; E : densityplot of HRV-A, B and C VL in Guérande

405

406

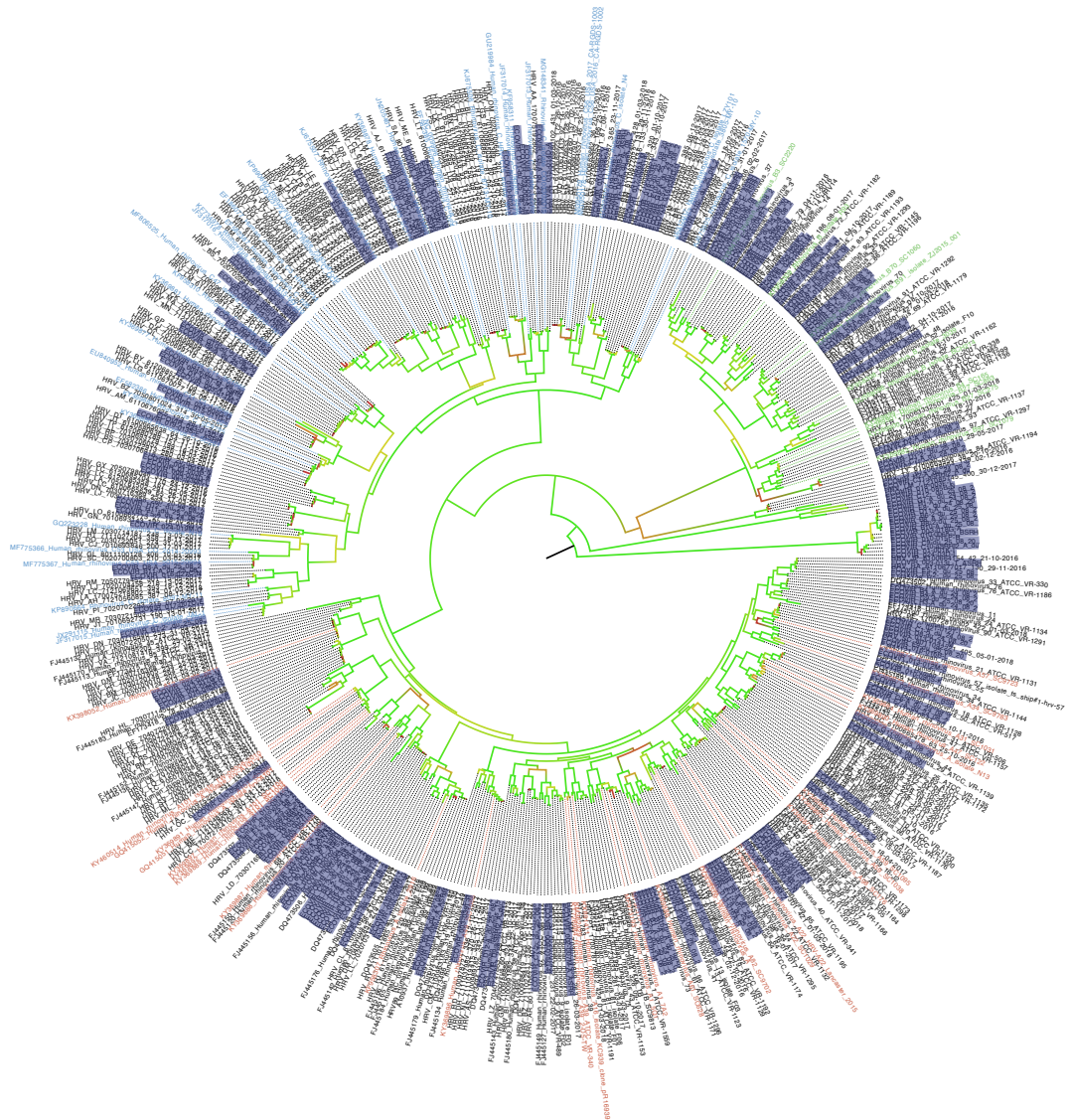
407



408 We performed the phylogenetic tree of the HRV found in the samples from our cohorts (Figure
 409 8). ECOVIR detected a good diversity of each genotype.

410

411 **Figure 8- Phylogenetic tree of HRV in samples**



412

413 *Samples in violet come from ECOVIR and Guérande; samples in red come from hospital*
 414 *routine's patients; samples in black are the references Genbank*

415

416



417 **Discussion**

418

419 Within this work, viral codetections in ARI were explored by quantifying
420 respiratory VL of viruses mostly detected (RSV and HRV) in nasopharyngeal swabs.
421 These samples came from two distinct and different cohorts: one performed in hospital
422 in infants with bronchiolitis (Guérande), and the other one in primary care in patients
423 of all ages (ECOVIR).

424

425 First, we found that the prevalence of codetections is related to the age of
426 patients with ARI. Studies including children under 5 years of age reported higher
427 frequencies of viral codetections than those including adolescents and young adults.
428 A study published in 2016 analyzing respiratory specimens from 44230 respiratory
429 infections between 2005 and 2013 showed that viral codetections were significantly
430 more common in patients younger than one year (27). In our article, RSV was co-
431 detected in 56% of hospitalized infants presenting bronchiolitis, but only in 30% in the
432 same group in primary care. That is what is found in literature: the rate of viral
433 coinfections appears to be greater in inpatient versus outpatient cohorts (8) (28) (29).
434 This suggests that viral codetection could be associated with clinical severity of
435 patients. Our team previously reported that there was a greater severity of respiratory
436 infection in infants hospitalized for bronchiolitis infected with RSV alone compared to
437 those infected with HRV alone (30). HRV is the respiratory virus the most frequently
438 found, in all ages, in all populations. We know thanks to studies performed in general
439 population that adults are infected by HRV several times yearly (1). In a previous study,
440 we found that, in infants, the risk of being infected by HRV is higher in the absence of
441 RSV, suggesting interferences or exclusion mechanisms between these two viruses



442 (9). We found the first codetection in primary care was HRV/RSV-A, and that RSV-B
443 was never co-detected, but the number of RSV-B positive samples was low (n=11).
444 This is different from data we found before in the Guérande's cohort (9), where RSV-
445 B was co-detected in 63% of cases. HRV/RSV codetection is the most frequent
446 described codetection in literature. However, RSV detection is associated with a
447 decreased probability of HRV coinfections, indicating a negative virus-virus interaction
448 (12). This suggests that during or in the immediate aftermath of RSV infection, the host
449 may be refractory to other viruses, maybe because of the local innate immunity
450 activation in response to infection. In a 2016 prospective cohort study, Karppinen *et al.*
451 showed a negative association between RSV and HRV in infants younger than 24
452 months: the rate of HRV infections was lower in children who had a recent RSV
453 infection compared to children who were not infected (8% versus 14%, $p < 0.05$) (13).

454

455 We performed measure of CA in samples. A higher CA was found in samples
456 with codetections than in samples with monodetection, and a higher CA in samples
457 with monodetection than in negative samples. CA may reflect a combination of
458 desquaming cells, airway macrophages and other innate immunity recruited cells and
459 lysed cells directly resulting from the activity of viral viruses in the respiratory tract (31).
460 This suggests that local inflammation (or "respiratory inflammation") level could
461 correlate with the number of viruses responsible for the ARI. We noted that CA was
462 higher in children under the age of six. So cell lysis could be more intense in infants
463 with ARI. This can suggest too that inflammatory response could be more important in
464 children compared to adults, especially in the infants (less than two years old).
465 Samples positive to RSV, HRV and CoV presented also a higher CA than negative
466 samples, contrary to samples positive to Flu. We found that VL and CA are correlated



467 for several viruses. This effect may be related to the direct lysis or to an increased cell
468 recruitment in response to inflammation in ARI. Therefore it is inadequate to normalize
469 the VL by the CA. A most in depth study of the cells found in the nasopharyngeal swabs
470 may allow to better characterize inflammation profiles according to viruses,
471 codetections, and age of patients. The study of inflammation markers, such as
472 cytokines, would also provide insights on the pathways activated by different viral
473 infections.

474 We performed HRV and RSV VL quantitation. In the elderly, HRV VL was higher
475 than in the other age classes. A study published in 2015 (32) including adults
476 hospitalized for RSV infection found a strong association between the level of RSV VL
477 and the severity of ARI, but the median age of patients was 78 years old. This could
478 suggest a decrease of immunity defenses in the elderly, which is described in the
479 literature (33). Concerning the RSV, we compared VL in hospitalized infants
480 (Guérande) and infants in primary care (ECOVIR): RSV-A VL were higher in
481 hospitalized infants, and RSV-B VL were not different in both cohorts. HRV VL were
482 higher in infants seen in primary care. In our hospital cohort, HRV was co-detected in
483 93%. We could explain this lower HRV VL in hospitalized infants because of the
484 negative interference between HRV and RSV. When co-detected with RSV, HRV VL
485 is lower. In case of codetection with RSV, the severity of symptoms could probably be
486 imputed to the other virus than HRV.

487 Most studies do not show an association between HRV viral loads and ARI
488 severity. One study published in 2017 compared viral loads in ambulatory patients
489 versus intensive care patients: the HRV viral loads were not significantly different
490 between these two patient populations, implying that the severity of ARF is not
491 correlated with the respiratory viral load for this virus (34). In this study, viral loads were



492 similar across age groups (all age groups were represented). This is not what we found
493 in our cohorts: HRV VL were higher for the three serotypes (HRV-A, HRV-B and HRV-
494 C) in primary care compared to hospitalized infants. However, in studies including
495 children, in literature, HRV viral loads seem to be related to the severity of ARI: one
496 study including 694 infants with HRV bronchiolitis showed that there was no
497 association between viral load and length of hospital stay (16). A Japanese study
498 showed that in children between 11 months and 3 years of age, there was an
499 association between viral load and ARI severity (35). This was no longer observed
500 after the age of 4 years, nor before the age of 11 months. In children (<21 years)
501 hospitalized or not with symptoms of ARI, the HRV viral load was significantly higher
502 when HRV was found alone versus in codetection.

503 In a study published in 2022 on infants under two years of age hospitalized for
504 ARF, 55% of the HRV-positive samples were HRV-A, 15% HRV-B and 30% HRV-C
505 (11). This distribution is approximately the same as that found in ambulatory patients
506 aged 7 to 95 years with ARI (36). These are similar results to those we found. Studies
507 also distinguish between HRV-A, HRV-B, and HRV-C viral loads, attempting to
508 determine which type is more pathogenic. In a study of adults in primary care, HRV-A
509 was associated with an increased risk of low ARI compared with HRV-B and HRV-C
510 (37), and HRV-A viral load was greater than HRV-B. In ambulatory patients aged 7-95
511 years with ARI, viral loads were higher in HRV-C positive specimens compared to
512 HRV-A and HRV-B (36). We found a significant increase of HRV-A, B or C VL in
513 primary care compared with hospital cohort.

514 In an attempt to characterize the viral load temporal dynamics, HRV and RSV
515 were compared according to the delay between the first symptoms presented by the
516 patients. We found no difference for both viruses. Personal differences in susceptibility



517 and perception could explain these results. These results were not obtained from VL
518 repeatedly obtained from a single patient during the course of infection but instead
519 from a pool of patients sampled one time each and this represents a severe bias
520 against accurate viral load dynamics estimation. A follow-up of single patients with
521 repeated VL measurement during a viral ARI would be the best way to establish a
522 “natural history” of the viral ARIs but represents a challenge in term of acceptation and
523 ethics.

524

525 **Conclusion**

526 Quantifying respiratory viral loads of the most abundant viruses found in codetection
527 in ARI (HRV and RSV) let us to know that health conditions, type of virus, age of
528 patients and presence or not of viral coinfections matter. This article highlights the
529 relationship between HRV and RSV, and suggests in many different cases that when
530 in competition with RSV, HRV replicates at a lower level, confirming a negative
531 interference between these two viruses.

532

533

534

535 **Acknowledgements:**

536 The authors acknowledge for their contribution GPs and Health care centers, the team
537 of the CHU Caen Virology Unit and Hospital Research and Innovation directory (DRCI,
538 Anne PETAT and all the patients and their family. We also thank Mrs Naomi Stone for
539 the reviewing of English writing.

540 *GPI and health care centers :*



- 541 - Maison de santé Saint Eloi, ROUEN, FRANCE : Dr Aude LE FLOCH, Dr
542 Stéphane LE FRIEC, Dr Marianne LAINE, Dr Lucille PELLERIN, Dr Marie
543 RIGAL-LASHKAR, Dr Barbara VATIN.
- 544 - Maison de santé du Pays Neufchâtelois, NEUFCHATEL EN BRAY, FRANCE :
545 Dr Florence CALERO, Dr Hélène COMONT, Dr Christophe GUILLERM, Dr
546 Claire HOULE, Dr Vincent LEMARIE, Dr Sophie OZANNE, Dr Anne-Sophie
547 PIMONT, Pr Matthieu SCHUERS, Dr Olivier WERMESTER.
- 548 - Maison Médicale Amstrong, GRAND QUEVILLY, FRANCE : Dr Caroline
549 JOUEN, Dr Jean-Yves MAUNOURY, Dr Elisabeth MAUVIARD, Dr Yveline
550 SEVRIN, Dr Charlotte VIANNEY.
- 551 - Pôle de santé du Port, GRANVILLE, FRANCE : Pr François LE BAS, Dr Alexis
552 PLUNET
- 553 - Pôle de santé de Villedieu, VILLEDIEU-LES-POELES, FRANCE : Dr Olivier
554 BATAILLE, Dr Nicolas BOYER, Dr Philippe SABATHIER, Dr Thomas
555 TRENIER.
- 556 - Cabinet médical Colombelles, COLOMBELLES, FRANCE :Dr Elise BARBE-
557 DELRUE, Dr Philippe GRUJARD, Dr Jeanne LE BAS, Dr Stéphane VALLAYES.
- 558 - Pôle santé de Vaucelles, CAEN, FRANCE : Dr Xavier HUMBERT, Dr Grégory
559 DAIREAUX, Dr Charlotte MILCENT.
- 560 - Maison médicale Deauville Côte Fleurie, DEAUVILLE, FRANCE : Dr Andry
561 RABIAZA, Dr Nicolas SAINMONT, Dr Laurent SIMON

562

563 **Abbreviations**

564

565 ADV: adenovirus



566 CA: cellular abundance
 567 cDNA: complementary deoxyribonucleic acid
 568 CoV: Coronavirus
 569 GPI: general practitioner investigator
 570 HRV: Human RhinoVirus
 571 LRTI: low respiratory tract infection
 572 NVL: normalized viral load
 573 RSV: Respiratory Syncytial Virus
 574 RTI: respiratory tract infections

575

576

577

578 **References**

579

- 580 1. Monto AS, Malosh RE, Petrie JG, Thompson MG, Ohmit SE. Frequency of Acute
 581 Respiratory Illnesses and Circulation of Respiratory Viruses in Households With Children
 582 Over 3 Surveillance Seasons. *J Infect Dis.* 2014 Dec 1;210(11):1792–9.
 583 2. O’Grady KF, Grimwood K, Sloots TP, Whiley DM, Acworth JP, Phillips N, et al.
 584 Prevalence, codetection and seasonal distribution of upper airway viruses and bacteria in
 585 children with acute respiratory illnesses with cough as a symptom. *Clin Microbiol Infect.*
 586 2016 Jun;22(6):527–34.
 587 3. Liu P, Xu M, Cao L, Su L, Lu L, Dong N, et al. Impact of COVID-19 pandemic on the
 588 prevalence of respiratory viruses in children with lower respiratory tract infections in China.
 589 *Virology.* 2021 Aug 3;18:159.
 590 4. Nickbakhsh S, Mair C, Matthews L, Reeve R, Johnson PCD, Thorburn F, et al. Virus-
 591 virus interactions impact the population dynamics of influenza and the common cold. *Proc*
 592 *Natl Acad Sci U S A.* 2019 Dec 26;116(52):27142–50.
 593 5. Lim FJ, Wake ZV, Levy A, Tempone S, Moore HC, Richmond PC, et al. Viral
 594 Etiology and the Impact of Codetection in Young Children Presenting With Influenza-Like
 595 Illness. *J Pediatric Infect Dis Soc.* 2017 Sep;6(3):260–6.
 596 6. Kouni S, Karakitsos P, Chranioti A, Theodoridou M, Chrousos G, Michos A.
 597 Evaluation of viral co-infections in hospitalized and non-hospitalized children with
 598 respiratory infections using microarrays. *Clinical Microbiology and Infection.* 2013 Aug
 599 1;19(8):772–7.
 600 7. Martin ET, Kuypers J, Wald A, Englund JA. Multiple versus single virus respiratory
 601 infections: viral load and clinical disease severity in hospitalized children. *Influenza and*
 602 *Other Respiratory Viruses.* 2012 Jan 1;6(1):71–7.



- 603 8. Aberle JH, Aberle SW, Pracher E, Hutter HP, Kundi M, Popow-Kraupp T. Single
604 versus dual respiratory virus infections in hospitalized infants: impact on clinical course of
605 disease and interferon-gamma response. *Pediatr Infect Dis J*. 2005 Jul;24(7):605–10.
- 606 9. Petat H, Gajdos V, Angoulvant F, Vidalain PO, Corbet S, Marguet C, et al. High
607 Frequency of Viral Co-Detections in Acute Bronchiolitis. *Viruses*. 2021 May 26;13(6):990.
- 608 10. Goka EA, Valley PJ, Mutton KJ, Klapper PE. Single and multiple respiratory virus
609 infections and severity of respiratory disease: a systematic review. *Paediatr Respir Rev*. 2014
610 Dec;15(4):363–70.
- 611 11. Talj R, Amarin JZ, Rankin DA, Bloos SM, Shawareb Y, Rahman H, et al. Clinical
612 characteristics, outcomes, and seasonality of acute respiratory infection associated with single
613 and codetected rhinovirus species among hospitalized children in Amman, Jordan. *J Med
614 Virol*. 2022 Dec;94(12):5904–15.
- 615 12. Greer RM, McErlean P, Arden KE, Faux CE, Nitsche A, Lambert SB, et al. Do
616 rhinoviruses reduce the probability of viral co-detection during acute respiratory tract
617 infections? *Journal of Clinical Virology*. 2009 May 1;45(1):10–5.
- 618 13. Karppinen S, Toivonen L, Schuez-Havupalo L, Waris M, Peltola V. Interference
619 between respiratory syncytial virus and rhinovirus in respiratory tract infections in children.
620 *Clinical Microbiology and Infection*. 2016 Feb 1;22(2):208.e1-208.e6.
- 621 14. Sansone M, Andersson M, Brittain-Long R, Andersson LM, Olofsson S, Westin J, et
622 al. Rhinovirus infections in western Sweden: a four-year molecular epidemiology study
623 comparing local and globally appearing types. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2013
624 Jul;32(7):947–54.
- 625 15. Gerna G, Campanini G, Rognoni V, Marchi A, Rovida F, Piralla A, et al. Correlation
626 of viral load as determined by real-time RT-PCR and clinical characteristics of respiratory
627 syncytial virus lower respiratory tract infections in early infancy. *Journal of Clinical Virology*.
628 2008 Jan 1;41(1):45–8.
- 629 16. Jartti T, Hasegawa K, Mansbach JM, Piedra PA, Camargo CA. Rhinovirus-induced
630 bronchiolitis: Lack of association between virus genomic load and short-term outcomes. *J
631 Allergy Clin Immunol*. 2015 Aug;136(2):509-512.e11.
- 632 17. Longtin J, Marchand-Austin A, Winter AL, Patel S, Eshaghi A, Jamieson F, et al.
633 Rhinovirus outbreaks in long-term care facilities, Ontario, Canada. *Emerg Infect Dis*. 2010
634 Sep;16(9):1463–5.
- 635 18. Moore HC, Lim FJ, Fathima P, Barnes R, Smith DW, de Klerk N, et al. Assessing the
636 Burden of Laboratory-Confirmed Respiratory Syncytial Virus Infection in a Population
637 Cohort of Australian Children Through Record Linkage. *J Infect Dis*. 2020 Jun 16;222(1):92–
638 101.
- 639 19. Demont C, Petrica N, Bardoulat I, Duret S, Watier L, Chosidow A, et al. Economic
640 and disease burden of RSV-associated hospitalizations in young children in France, from
641 2010 through 2018. *BMC Infect Dis*. 2021 Dec;21(1):1–10.
- 642 20. Young M, Smitherman L. Socioeconomic Impact of RSV Hospitalization. *Infect Dis
643 Ther*. 2021 Mar;10(Suppl 1):35–45.
- 644 21. Jansen RR, Wieringa J, Koekkoek SM, Visser CE, Pajkrt D, Molenkamp R, et al.
645 Frequent detection of respiratory viruses without symptoms: toward defining clinically
646 relevant cutoff values. *J Clin Microbiol*. 2011 Jul;49(7):2631–6.
- 647 22. Hartmann K, Liese JG, Kemmling D, Prifert C, Weißbrich B, Thilakarathne P, et al.
648 Clinical Burden of Respiratory Syncytial Virus in Hospitalized Children Aged ≤5 Years
649 (INSPIRE Study). *J Infect Dis*. 2022 Aug 26;226(3):386–95.
- 650 23. Winther B, Brofeldt S, Grønberg H, Mygind N, Pedersen M, Vejlsgaard R. Study of
651 bacteria in the nasal cavity and nasopharynx during naturally acquired common colds. *Acta
652 Otolaryngol*. 1984;98(3–4):315–20.



- 653 24. Winther B, Gwaltney JM, Mygind N, Turner RB, Hendley JO. Sites of rhinovirus
654 recovery after point inoculation of the upper airway. *JAMA*. 1986 Oct 3;256(13):1763–7.
- 655 25. Angoulvant F, Bellêtre X, Milcent K, Teglas JP, Claudet I, Guen CGL, et al. Effect of
656 Nebulized Hypertonic Saline Treatment in Emergency Departments on the Hospitalization
657 Rate for Acute Bronchiolitis: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Pediatr*. 2017 Aug
658 1;171(8):e171333–e171333.
- 659 26. Petat H, Schuers M, Corbet S, Humbert X, Le Bas F, Marguet C, et al. The Design and
660 Implementation of the ECOVIR Project: A Primary Health Care Surveillance System to
661 Strengthen Co-Detection of Respiratory Viruses in Normandy. *Methods and Protocols*. 2022
662 Dec;5(6):98.
- 663 27. Nickbakhsh S, Thorburn F, Wissmann BV, McMENAMIN J, Gunson RN, Murcia PR.
664 Extensive multiplex PCR diagnostics reveal new insights into the epidemiology of viral
665 respiratory infections. *Epidemiology & Infection*. 2016 Jul;144(10):2064–76.
- 666 28. Calvo C, García-García ML, Blanco C, Vázquez MC, Frías ME, Pérez-Breña P, et al.
667 Multiple simultaneous viral infections in infants with acute respiratory tract infections in
668 Spain. *J Clin Virol*. 2008 Jul;42(3):268–72.
- 669 29. Libster R, Coviello S, Cavalieri ML, Morosi A, Alabart N, Alvarez L, et al. Pediatric
670 hospitalizations due to influenza in 2010 in Argentina. *N Engl J Med*. 2010 Dec
671 16;363(25):2472–3.
- 672 30. Marguet C, Lubrano M, Gueudin M, Roux PL, Deschildre A, Forget C, et al. In Very
673 Young Infants Severity of Acute Bronchiolitis Depends On Carried Viruses. *PLOS ONE*.
674 2009 Feb 25;4(2):e4596.
- 675 31. Barreto-Duran E, Szczepański A, Gałuszka-Bulaga A, Surmiak M, Siedlar M, Sanak
676 M, et al. The interplay between the airway epithelium and tissue macrophages during the
677 SARS-CoV-2 infection. *Front Immunol*. 2022 Oct 6;13:991991.
- 678 32. Lee N, Chan MCW, Lui GCY, Li R, Wong RYK, Yung IMH, et al. High Viral Load
679 and Respiratory Failure in Adults Hospitalized for Respiratory Syncytial Virus Infections. *J
680 Infect Dis*. 2015 Oct 15;212(8):1237–40.
- 681 33. Cunha BA. Pneumonia in the elderly. *Clin Microbiol Infect*. 2001 Nov;7(11):581–8.
- 682 34. Granados A, Peci A, McGeer A, Gubbay JB. Influenza and rhinovirus viral load and
683 disease severity in upper respiratory tract infections. *J Clin Virol*. 2017 Jan;86:14–9.
- 684 35. Takeyama A, Hashimoto K, Sato M, Sato T, Kanno S, Takano K, et al. Rhinovirus
685 load and disease severity in children with lower respiratory tract infections. *Journal of
686 Medical Virology*. 2012 Jul 1;84(7):1135–42.
- 687 36. Ng KT, Oong XY, Lim SH, Chook JB, Takebe Y, Chan YF, et al. Viral load and
688 sequence analysis reveal the symptom severity, diversity and transmission clusters of
689 rhinovirus infections. *Clin Infect Dis [Internet]*. [cited 2018 Feb 19]; Available from:
690 <https://academic-oup-com.gate2.inist.fr/cid/advance-article/doi/10.1093/cid/ciy063/4828127>
- 691 37. Zlateva KT, Vijgen L, Dekeersmaeker N, Naranjo C, Van Ranst M. Subgroup
692 Prevalence and Genotype Circulation Patterns of Human Respiratory Syncytial Virus in
693 Belgium during Ten Successive Epidemic Seasons. *J Clin Microbiol*. 2007 Sep;45(9):3022–
694 30.
- 695





Conclusion

A travers ce travail de thèse réalisé entre la fin de mon internat et mon clinicat de pédiatrie, j'ai pu découvrir véritablement le monde de la recherche virologique, que je ne connaissais pas, ayant réalisé mon Master 2 de Biologie Intégrative dans une unité INSERM étudiant la mucoviscidose. Bien qu'ayant un petit bagage concernant les techniques de laboratoire, il a fallu que j'apprenne toutes les composantes de la recherche en virologie, en commençant par les bases. Je me suis également, grâce à des formations en ligne, formée au codage, en apprenant à manier le logiciel R® qui m'était totalement inconnu.

Pour répondre à la question de ma thèse, portant sur les codétections virales, nous avons décidé de créer une cohorte en soins primaires, dont la mise en place a été très laborieuse, car il n'existe pas de réseau de soins primaires en Normandie. Il nous a donc fallu créer un lien entre les médecins généralistes de Haute Normandie et les chercheurs d'une part, mais également entre les médecins généralistes de Basse Normandie et les chercheurs d'autre part, car les deux anciennes régions ne sont pas encore rassemblées d'un point de vue universitaire. Notre rencontre avec chaque médecin généraliste investigateur a été préparée, personnalisée, afin de pouvoir inclure un nombre de patients suffisant. Ce projet a eu lieu, rappelons-le, avant la pandémie de SARS-CoV2, et la réalisation d'un prélèvement nasopharyngé au cabinet du médecin généraliste était considéré comme quelque chose d'inconnu, pouvant freiner les médecins généralistes, et les patients. Un gros travail de mise en place a dû être réalisé. J'ai également pu découvrir à travers ce projet comment mener à bien un projet de recherche, comment soumettre à un CPP (Comité de Protection des Personnes), mais également comment gérer le côté financier (comment trouver les fonds nécessaires pour la réalisation des projets). Heureusement, nous avons pu inclure 685 patients (sur les 1000 attendus). Nous avons à disposition également dans le laboratoire de Virologie du CHU de Caen, une biobanque de prélèvements issus d'une étude nationale (Guérande), qui nous permis, grâce à ses 719 prélèvements, de développer nos techniques et d'obtenir nos résultats.

Grâce à la cohorte Guérande, nous avons pu publier en 2021 un premier article dans la revue *Viruses*. Les principaux résultats étaient la mise en évidence d'un fort taux de codétections virales dans les prélèvements respiratoires de nourrissons de moins d'un an hospitalisés pour une première bronchiolite aigüe, en soulignant également l'importance de la



codétection HRV/RSV. C'est une donnée étonnante, car l'HRV est connu pour engendrer des pathologies sifflantes, mais plutôt chez le plus grand enfant. Nous avons également trouvé de façon intéressante que le risque d'être infecté par le HRV était plus élevé en l'absence de VRS, suggérant des interférences ou des mécanismes d'exclusion entre ces deux virus.

Nous avons ensuite analysé, grâce à la cohorte ECOVIR, les potentielles interférences virales mises en évidence lors des infections respiratoires aiguës en population générale. Nous avons trouvé 67% de prélèvements positifs, et 8% de prélèvements positifs à plusieurs virus, ce qui est une donnée originale, car l'immense majorité des études réalisées en soins primaire inclut plutôt des patients adultes. Les études portant sur les infections respiratoires aiguës de l'enfants sont presque exclusivement réalisées en milieu hospitalier. Les codétentions virales étaient associées aux VRS, HRV, Bocavirus, métapneumovirus et adénovirus, et non associées à la grippe et aux coronavirus endémiques. L'HRV et la grippe étaient négativement associés à tous les virus, à l'exception de l'ADV et du BoV. Les seules associations positives trouvées étaient entre les adénovirus et les bocavirus, et la grippe et les bocavirus.

Enfin, nous avons mis au point des techniques de quantification virale concernant le VRS et l'HRV, virus les plus fréquemment détectés dans les codétentions virales respiratoires. Nous avons également initialement tenté de mettre au point des techniques de quantification des coronavirus endémiques (NL63, 229E, HKU1 et OC43), mais concernant l'un deux, nos techniques n'ont pas fonctionné. Et concernant les trois autres, il n'y avait pas assez de prélèvements positifs pour faire des analyses statistiques. Nous avons également séquencé et génotypé les rhinovirus des prélèvements positifs en PCR multiplex. Nous avons trouvé que le risque d'être coinfected lors d'un épisode d'IRA était très augmenté en cas d'hospitalisation, ainsi qu'en cas de jeune âge. Il semble par ailleurs exister une vraie interférence négative entre l'HRV et le VRS, ce dernier semblant inhiber la multiplication de l'HRV lorsqu'ils infectent un même hôte simultanément, car les charges virales respiratoires de l'HRV sont moins importantes en cas de coinfection avec le VRS, alors que les charges virales du VRS sont augmentées en cas de coinfection à HRV.

A travers ce travail de thèse, j'ai donc poursuivi mes travaux de recherche qui, je l'espère, vont continuer au-delà de la soutenance, grâce à mon laboratoire de recherche, qui a été agréé INSERM récemment, et également à la FHU Respire à laquelle j'appartiens, qui, tous deux, nous permettent de travailler en équipe pour réaliser de beaux projets.



Annexes

Annexe 1- Compte-rendu des réunions de mise en place d'ECOVIR avec le DMG rouennais

Date	Lieu	Personnes présentes	Résumé de la réunion
18.05.18	DMG Rouen	Hortense PETAT Astrid VABRET Meriadeg LE GOUIL Matthieu SCHUERS Lucille PELLERIN Thibaut RAGINEL	Présentation du projet ECOVIR Premier contact avec les DMG
24.07.18	DMG Rouen	Hortense PETAT Astrid VABRET Lucille PELLERIN Matthieu SCHUERS	Discussion autour de la mise en place du projet ECOVIR
30.08.18	DMG Rouen	Hortense PETAT Astrid VABRET Christophe MARGUET Lucille PELLERIN Matthieu SCHUERS	Discussion autour de la mise en place du projet ECOVIR, faisabilité de l'étude, soumission au CPP
20.09.18	DMG Rouen	Hortense PETAT Matthieu SCHUERS Lucille PELLERIN Louise GOSSE Léa ROUAULT Marie TABOUELLE Robin LUGUEUX Rebecca COZETTE Paul AUBRY	Présentation d'ECOVIR aux internes de médecine générale
15.11.18	DMG Rouen	Hortense PETAT Matthieu SCHUERS Lucille PELLERIN Louise GOSSE Pierre-Alexandre LAMBERT Emmeline VERVISCH Thomas POUPON	Présentation d'ECOVIR aux internes de médecine générale
06.12.18	DMG Rouen	Hortense PETAT Matthieu SCHUERS Lucille PELLERIN Louise GOSSE Pierre-Alexandre LAMBERT Emmeline VERVISCH Thomas POUPON Bertille DESEILLE Pierre-Edouard PROTEAU	Présentation par Pierre-Edouard Proteau de son étude sur les bronchiolites, explication sur l'organisation des rappels
10.12.18	Domicile Hortense Peta	Hortense PETAT Louise GOSSE Pierre-Alexandre LAMBERT Emmeline VERVISCH Thomas POUPON Bertille DESEILLE	Premier contact avec logiciel Lime Survey, mise en ligne des questionnaires
12.12.18	Faculté médecine de Caen	Hortense PETAT François LEBAS Xavier HUBERT Andry RABIAZA	Présentation du projet finalisé au DMG de Caen
10.01.19	Faculté médecine de Rouen	Hortense PETAT Matthieu SCHUERS Louise GOSSE Pierre-Alexandre LAMBERT Emmeline VERVISCH	Dernière réunion de mise en place avant début de l'inclusion



		Thomas POUPON Bertille DESEILLE	
28.02.2019	Faculté médecine de Rouen	Hortense PETAT Matthieu SCHUERS Lucille PELLERIN Louise GOSSE Pierre-Alexandre LAMBERT Emmeline VERVISCH Thomas POUPON Bertille DESEILLE	Réunion « bilan à 1 mois » des inclusions
12.06.2019	Domicile Emmeline VERVISCH	Hortense PETAT Louise GOSSE Pierre-Alexandre LAMBERT Emmeline VERVISCH Thomas POUPON Bertille DESEILLE	Réunion thèse des internes de médecine générale
04.07.2019	DMG Rouen/ visoconférence DMG Caen		Réunion synthèse « première saison ECOVIR »
19.08.2019	Domicile Hortense PETAT	Hortense PETAT Pierre-Alexandre LAMBERT Emmeline VERVISCH Thomas POUPON	Réunion thèse des internes de médecine générale
21.01.2020	DMG Rouen	Hortense PETAT Matthieu SCHUERS Louise GOSSE Pierre-Alexandre LAMBERT Emmeline VERVISCH Thomas POUPON Bertille DESEILLE	Réunion thèse des internes de médecine générale
17.02.2020	Domicile Hortense PETAT	Hortense PETAT Pierre-Alexandre LAMBERT Emmeline VERVISCH Thomas POUPON	Réunion thèse des internes de médecine générale
04.06.2020	Domicile Hortense PETAT	Hortense PETAT Emmeline VERVISCH Bertille DESEILLE	Réunion thèse des internes de médecine générale




Annexe 2 - Présentation pour l'appel d'offre Innov'Eclair

ECOVIR

Etude des CO détections Virales dans les prélèvements Respiratoires : apport de la quantification virale normalisée pour la compréhension des infections respiratoires virales multiples et l'établissement de règles d'interprétation des nouveaux tests diagnostiques

Présentation Innov'Eclair
13.12.2018

H Petat, M Le Gouil, A Vabret



CONTEXTE

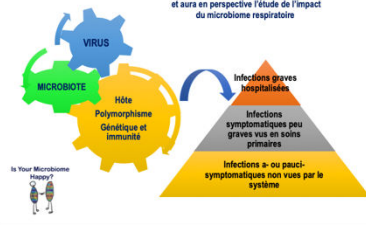
- THÉMATIQUE : Infections respiratoires algées (IRA):
 - très majoritairement d'origine virale
 - Infections les plus fréquentes en population générale / Impact hospitalier ++
 - premier « poste » de prescription d'antibiotiques inappropriée
 - Infections hautement transmissibles : enjeu sanitaire

COMPRENDRE ET TRAITER LES IRA : ENJEU MAJEUR EN SANTE PUBLIQUE

- Arsenal thérapeutique actuel pauvre : molécules et vaccin uniquement contre les virus Influenza A et B (grippe)
- En développement :
 - Traitements anti-infectieux spécifiques et vaccins (Virus respiratoire syncytial ++): nécessité d'obtenir un diagnostic virologique précis : quel virus ou quels virus impliqués dans la pathologie en cours ?
 - Changement de paradigme avec l'exploration des microbiotes respiratoires : Développement potentiel de cibles thérapeutiques non spécifiques d'un virus

DÉTERMINANTS DU PHÉNOTYPE DE L'INFECTION VIRALE

ECOVIR s'intéresse à la part virale de l'infection et aura en perspective l'étude de l'impact du microbiome respiratoire




Les principaux virus respiratoires d'intérêt médical « Panel respiratoire viral » :

17 virus différents détectés en routine hospitalière


Virus ARN Paramyxoviridae Virus Respiratoire Syncytial RSV A / RSV B Metapneumovirus humain IMPV 4 Parainfluenza PIV1-4	Virus ARN Orthomyxovirus Influenza A FLU A H1N1v / H3N2 Influenza B FLU B Influenza C FLU C	Virus ARN Coronavirus HCoV 229E HCoV OC43 HCoV NL63 HCoV HKU1 HCoV émergents SARS-CoV / MERS-CoV	Virus ARN Rhinovirus / Enterovirus	Virus ADN Adenovirus Bocavirus
---	--	--	--	---

Le diagnostic virologique respiratoire : pour qui ?

Populations cibles du diagnostic virologique respiratoire : 2 mots clefs : hospitalisés, communauté



Outils de détection de plus en plus performants : Diagnostic qualitatif multiplex rapide (2 Heures)



Détection moléculaire simultanée de 17 cibles virales « sample to result »

ePLEX® GenMark : outil acquis en 2016 après expertise / évaluation par les CHU de Caen et de Rouen sur budget innovation

Financement doctorant 3 ans : donateur Fondation Charles Nicolle / Hortense Petat. Codirection Pr C Marguet et A Vabret (GRAM 2.0)

CIBLE : LES CODÉTECTIONS VIRUS – VIRUS

- Représentant en routine hospitalière 20% des analyses des échantillons respiratoires
- Profil de co détections divers : 2, 3 ou 4 virus co détectés
 - Co-infections ? : virus répliqués au même niveau
 - Infections séquentielles ? : 1 virus répliqué et 1 ou x virus en voie de clairance
- Absence de marqueur virologique permettant d'identifier le virus dont la répllication est active au moment du prélèvement
- Nécessité d'un test de seconde ligne : quantification virale respiratoire normalisée
- Travaux virologiques prévus sur 2 biobanques :
 - Biobanque GUERANDE** : biobanque de 719 échantillons respiratoires hauts issue d'un essai clinique randomisé (PHRC national Guernade) inclusant 24 centres hospitaliers nationaux et dont les résultats cliniques ont été publiés: *Angouant F et al., JAMA Paediatrics, 2017.*
 - Biobanque ECOVIR** : échantillonnage prospectif d'échantillons respiratoires prélevés en soins primaires sur 2 saisons épidémiques en lien avec les départements de Médecine Générale des UFR Santé de Caen et de Rouen : la construction de cette biobanque fait l'objet de la demande de budget à TAO INNOVECLAIR.

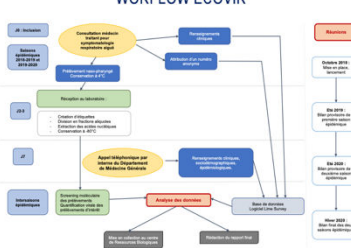
3 OBJECTIFS ECOVIR

- Demande budget**
Mise en place d'un échantillonnage en soins primaires associé à un recueil d'informations cliniques, socio-démographiques et écologiques : en cours (CPP favorable)
- Budget GRAM**
Caractérisation moléculaire virologique des échantillons de la cohorte en soins primaires
Développement / Validation analytique des charges virales respiratoires normalisées
Mesure des charges virales respiratoires normalisées dans les 2 cohortes
Analyse de l'apport diagnostique dans les cas de codétection : coinfections / infections séquentielles. Possible développement industriel
- Demande budget**
Mise en place d'une collection de « soins primaires » incluant des prélèvements respiratoires au cours d'infections respiratoires hautes et basses en période épidémique associées à des données cliniques, socio-démographiques et écologiques

ECOVIR : ECHANTILLONNAGE / RECUEIL DONNÉES CLINIQUES, SOCIO-DÉMOGRAPHIQUES ET ÉCOLOGIQUES, MISE EN COLLECTION

- Etude prospective observationnelle chez les patients de tous âges consultant en soins primaires
- Participants :
 - CHU CAEN : Laboratoire de virologie
 - GRAM UNICAEN UNIROUEN : H Petat (doctorante)
 - DMG UNICAEN UNIROUEN :
 - 3 maisons médicales Normandie orientale (19 médecins)
 - 6 maisons médicales Normandie occidentale (16 médecins)
 - 5 internes Médecine Générale (DMG UFR Santé Rouen)
 - CRS INNOVABIO
- Inclusions sur 2 saisons épidémiques : hivers 2016-2019 et 2019-2020 : environ 2300 échantillons attendus
- Mise en collection : critères à définir à partir des résultats virologiques

WORFLOW ECOVIR



J0

- Inclusion du patient par MD de maison médicale
- Information du patient
- Recueil de non-opposition
- Renseignements cliniques (questionnaire très rapide++)
- Prélèvement nasopharyngé (conservation au réfrigérateur)

J2

- Collecte des prélèvements
- Réception au laboratoire de virologie
- Aliquotage
 - 1 aliquote Caractérisation virologique
 - 1 aliquote Quantification virologique
 - 1 aliquote Réserve (microbes)
 - 1 aliquote CRS ?

J7

- Interne du DMG
- Appel téléphonique du patient ou de ses parents si mineur
- Aliquotage
 - 1 aliquote Quantification virologique, épidémiologiques, et cliniques (évolution depuis la consultation), différentes selon les classes d'âge
 - Environ 5 minutes/épave
 - Chaque semaine pendant la période d'inclusion
 - Données collectées sur le logiciel Lime Survey

ECOVIR CPP

3 maisons médicales Normandie Orientales (DMG UFR Santé Rouen)

- Maison de santé Saint-Eloi - 5 rue Herbain - 78000 ROUEN
- Maison de santé du Pays Neuchâtellain - 8 route d'Ardenne - 78270 Neuchâtel-en-Bray
- Maison Médicale Ancestrys - 8 rue Saint-Amand - 78120 Grand-Queville

4 maisons médicales Normandie Occidentales (DMG UFR Santé Caen)

- Pôle de santé du Puits-18 rue Marie-Fouquet - 94400 Granville
- Pôle de santé de Villeneuve - 24 rue du Général de Gaulle - 50000 Villeneuve
- Pôle santé Drenthe - 40 ter, rue Foch - 67100 Drenthe
- Cabinet médical Colibri - 10, avenue de la Braye - 14400 Colombelles - Pôle santé de Yvrouville - 147, rue de Yvrouville - 14100 Caen
- Maison médicale Desvillers Côte Fleurie - Coctive Place - 14000 Desvillers



BUDGET DEMANDÉ APPEL D'OFFRES INNOV'ECLAIR

	Forfait (1 médecin/50pts/an)	Montant 2018	Montant 2019
Echantillonnage	300 €	3000 €	3000 €
Collectes hebdomadaires	NA	1000 €	1000 €
Mise en collection	NA	2000 €	2000 €
TOTAL BUDGET		6 000 €	6000 €

Si début le 7 janvier 2019 : 16 semaines d'inclusion 1^{ère} saison et 24 semaines la seconde saison
« Forfait » par MG : tarif dégressif : 4 à 6 euros par prélèvements ; pour 50 patients inclus dans la saison: 300 euros, pour 40 patients inclus: 200 euros.

13



14

EFFET LEVIER

- Effet levier pour un PHRC dont l'objectif sera la validation de notre modèle de quantification virale respiratoire normalisée comme test diagnostique de seconde ligne au cours des infections respiratoires virales multiples, en vue d'une sélection pertinente des patients pouvant recevoir des molécules anti-RSV.
- Une valorisation industrielle pourra être envisagée pour les techniques quantitatives développées au cours de ce travail (pour 3 familles virales : Virus Respiratoire Syncytial A et B, rhinovirus A, B et C, et les 4 coronavirus circulants chez l'humain)
- Valorisation de la collection « ECOVIR » :
 - Dépôt d'un projet dans le cadre de l'appel d'offres RIN Recherche « Tremplin » 2019, dont l'objectif est l'étude du microbiome respiratoire haut dans le cadre d'infections respiratoires aiguës virales (approche –OMICS, séquençage haut-débit de dernière génération)
 - Mise à disposition des échantillons pour évaluation / expertise de trousse industrielles




Annexe 3- Power point de présentation du projet ECOVIR aux MGI

ECOVIR

Etude des COdétctions Virales dans les prélèvements Respiratoires : apport de la quantification virale normalisée pour la compréhension des infections respiratoires virales multiples et l'établissement de règles d'interprétation des nouveaux tests diagnostiques

Présentation et formation des MG investigateurs




Contexte

- Infections respiratoires aiguës (IRA): les plus fréquentes en population générale.
- Très majoritairement d'origine virale.
- Comprendre et traiter les IRA : enjeu majeur en santé publique.

Actuellement:


- Diagnostic qualitatif (PCR Multiplex). Disponible dans les centres hospitaliers, prélèvement naso-pharyngé
- Résultats rapides +++ (2 heures)
- Permet la détection d'agents infectieux respiratoires:

✓ 15 virus et 4 bactéries intracellulaires



Bénéfices d'un diagnostic virologique

- **Coût bénéfice/risque** : diminution de la durée d'hospitalisation, diminution de l'utilisation d'ATB, diminution des examens complémentaires
- **Importance d'étudier et de comprendre l'impact des co-détctions virales** : coinfection virale: très fréquent +++ mais quelle valeur?
- **Pathologies associées ou provoquées** : asthme (rhinovirus), exacerbation de BPCO, fièvre chez l'immunodéprimé (parainfluenzae virus, herpès)
- **Arrivée sur le marché de nouveaux antiviraux** (anti-VRS++), **de vaccins** : quand prescrire? et dans quelles situations (population à risque)? comment suivre efficacité vaccinale?




Objectifs

- **But de notre étude**: mettre en place une collection de prélèvements respiratoires au cours d'infections respiratoires hautes et basses en période épidémique associées à des données socio-démographiques
- Détecter les virus dans les prélèvements respiratoires et les typer
- Mesurer les charges virales de façon normalisée en fonction de la charge cellulaire des prélèvements: VRS, HRV, CoV
- Etudier les co-infections virales: la charge virale peut-elle aider à faire un diagnostic? Diagnostic précis de l'infection en cours?
- Analyser en fonction des groupes d'âge les résultats de charge virale

Etude dans la population de ville: unique++++

ECOVIR

- Etude prospective observationnelle, dans le cadre d'une thèse de science
- Multicentrique
- Haute et Basse Normandie
- Ville/ Hôpital
- 2 saisons épidémiques: hivers 2018-2019 et 2019-2020



ECOVIR

ACTEURS

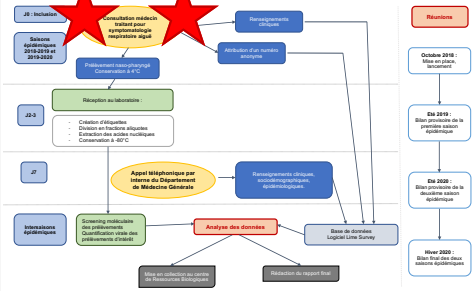
- Équipe de chercheurs de Caen: Pr Vabret, M. Ar Gouilh, H.Petat
- Pédiatres de Rouen: Pr Marguet
- DMG Rouen et Caen
- Médecins généralistes de ville Rouen/Caen: MG de maisons médicales de Normandie
- Internes du DMG de Rouen
- Cellule de promotion de la recherche clinique de Caen: F.Chailot
- Statisticien de Caen: Rémy Morello



ECOVIR

- Inclusion de patients de ville, tous âges
- Environ 20 médecins généralistes de maisons médicales normandes
- Classes d'âge: <24 mois, 2-6 ans, 6-18 ans, 18-65 ans, 65-75 ans et >75 ans
- Chaque médecin généraliste inclut environ 3 patients par semaine

Workflow



A JO



- MG de maison médicale inclut le patient
- Information du patient
- Recueil de non-opposition
- Renseignements cliniques (questionnaire très rapide+++)
- Prélèvement naso-pharyngé (conservation au réfrigérateur)

Dans la salle d'attente: poster d'information

Critères d'inclusion du patient

Symptômes de virose respiratoire

- Fièvre
- Rhinite
- Toux
- Otagie
- Odynophagie

Diagnostics

Syndrome pseudo-grippal, rhinite, angine, pharyngite, bronchite, pneumopathie, exacerbation d'asthme, exacerbation de BPCO, otite, sinusite

Pour chaque patient: une pochette



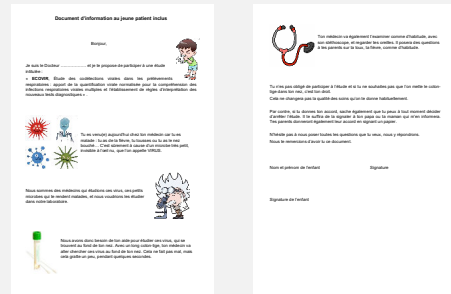
- Ecouvillon floqué
- Milieu de transport virologique
- Fiche d'information patient



Information éclairée du patient avec lettre de non-opposition

- 3 types selon l'âge: < 11 ans (parents), 11-18 ans et >18 ans
- Information orale, donner le document d'information, signée par le médecin
- Pas de signature du patient ou de ses parents

Pour les jeunes enfants: information complémentaire



Anonymisation du patient

- Numéro d'identification du médecin généraliste
- Première lettre du nom, première lettre du prénom, 2 derniers chiffres de l'année de naissance

Ex: Martine DUPONT née le 8 août 1945, incluse par le médecin n°11

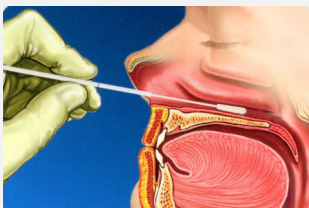
→ 11DM45

Prélèvement naso-pharyngé

Etape 1: Prélèvement endo-nasal

- Maintenir la tête du patient en arrière.
- Tout en repoussant la pointe du nez vers le haut, insérer l'écouvillon dans une narine le plus loin possible, **parallèlement au palais**.
- Laisser en place quelques secondes, puis retirer en imprimant un mouvement rotatif.
- Procéder de même dans l'autre narine avec le même écouvillon.

Prélèvement naso-pharyngé



Prélèvement naso-pharyngé

Etape 2: Elution du prélèvement

- Dévisser le bouchon du tube contenant le milieu de transport.
- Plonger l'écouvillon dans le liquide.
- Revisser soigneusement le bouchon sur le tube.
- Identifier le tube.
- Placer au réfrigérateur.



Prélèvement naso-pharyngé

Vidéo youtube

<https://www.youtube.com/watch?v=DVJNWefmHjE>

Recueil des données

Répondre au questionnaire en ligne J0 grâce au logiciel Lime Survey

Dure environ 5 min, rapide +++

Données cliniques essentiellement, recueillies habituellement

Fiche « récap' » inclusion

- 7 questions sur une petite fiche cartonnée, qui permet d'être sûr que tout est réalisé concernant l'inclusion du patient

Collecte tous les jeudis des prélèvements

- Puis acheminement au laboratoire de virologie de Caen pour aliquotage et congélation à -80°C
- Premières analyses dans les semaines suivantes (passage des prélèvements ensemble, selon le nombre d'inclusions)
- Analyses plus précises pendant les inter-saisons

Fiche de renseignements à J7

- Internes du DMG
- Appel téléphonique du patient ou de ses parents si mineur
- Données essentiellement sociodémographiques, épidémiologiques, et cliniques (évolution depuis la consultation), différentes selon les classes d'âge
- Environ 5 minutes/appel
- Chaque semaine pendant la période d'inclusion
- Données collectées sur le logiciel Lime Survey

Rémunération

- But d'ECOVIR: plus de 1500 prélèvements sur les 2 ans
- Si 12- 15 médecins « préleveurs »
- Si début le 21 janvier: 16 semaines d'inclusion
- Il faudrait inclure environ 3 patients par semaine
- « Forfaits »: pour 50 patients inclus dans la saison: 300 euros, pour 40 patients inclus: 200 euros.



Si vous acceptez de participer:

- Un mail va vous être envoyé, avec lien pour un court questionnaire sur vos pratiques
- Une fois le questionnaire rempli, un nouveau mail vous est envoyé avec votre identifiant, le lien du questionnaire à remplir
- Régulièrement: des SMS vous sont envoyés afin de vous informer du nombre de patients inclus
- Nous venons avant le début de l'étude pour mettre en place le poster, et vous remettre les pochettes (et répondre à vos questions)

Des questions? N'hésitez pas!!



etude.ecovir@gmail.com



Annexe XX- Poster informatif imprimé en A3 et affiché dans les salles d'attente des MGI



Votre médecin participe à la recherche



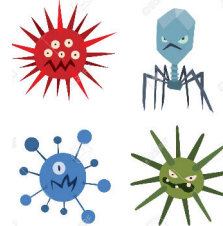
Qui sommes-nous?

Nous sommes des scientifiques chercheurs en virologie des CHU normands et des Universités de Caen et de Rouen.



Quel est notre objectif?

Notre étude est appelée ECOVIR (pour Etude des Codétections Virales dans les prélèvements Respiratoires). Elle étudie les virus responsables des infections respiratoires telles que la bronchite, la bronchiolite, le rhume, l'otite, la conjonctivite.



Comment votre médecin participe-t-il à la recherche?

Votre médecin participe activement à cette étude, en prélevant les sécrétions nasales de certains de ses patients présentant une infection respiratoire, et en recueillant des données cliniques. Si vous faites partie de la classe d'âge cible, votre médecin peut vous demander de participer à l'étude.

Comment pouvez-vous nous aider?

Si vous acceptez, votre médecin vous remettra une lettre d'information, et vous demandera votre accord pour participer. Pour les enfants de moins de 11 ans, ce sont les parents qui donnent leur autorisation. Puis votre médecin remplira un court questionnaire, vous examinera comme il le fait habituellement, et réalisera un prélèvement. Dans 7 jours, un médecin de notre équipe vous contactera afin de recueillir des informations (sur vos habitudes de vie, votre entourage) et également connaître l'évolution de vos symptômes.



En quoi consiste le prélèvement?

Le prélèvement est réalisé grâce à un écouvillon floqué qui ressemble à un long coton-tige. Le médecin introduit cet écouvillon dans une narine, fait quelques mouvements de rotation et le ressort. Cela n'est pas douloureux.

Qu'arrive-t-il au prélèvement?

Celui-ci est placé immédiatement au réfrigérateur à 4°C. Il sera ensuite acheminé au laboratoire de virologie pour faire les analyses.



Les données sont-elles anonymes?

Bien sûr. Tout ce qui vous sera demandé restera anonyme. Vous êtes protégés par le secret de la recherche.



Vous avez des questions?

Contactez nous! hortense.petat@univ-rouen.fr



Annexe 4- Liste des médecins généralistes investigateurs ayant participé au projet ECOVIR**Maison de santé St Eloi- 5 rue Herbières- 76000 ROUEN**

Dr Marianne LAINE
Dr Aude LEFLOCH
Dr Stéphane LEFRIEC
Dr Lucile PELLERIN
Dr Barbarin VATIN

Maison de santé du pays neufchâtelois- 8 route d'Aumale- 76270 Neufchâtel en Bray

Dr Florence CALERO
Dr Hélène COMONT
Dr Christophe GUILLERM
Dr Claire HOULE
Dr Vincent LEMARIE
Dr Sophie OZANNE
Dr Anne-Sophie PIMONT
Dr Matthieu SCHUERS
Dr Olivier WERMESTER

Maison médicale Armstrong- 8 rue Neil Armstrong- 76120 Grand-Quevilly

Dr Caroline JOUEN
Dr Jean-Yves MAUNOURY
Dr Elisabeth MAUVIARD
Dr Yveline SEVRIN
Dr Charlotte VIANNAYE

Pôle de santé du Port- 98 rue Marie Fougeray- 50400 Granville

Dr François LE BAS
Dr Alexis PLUNET

Pôle de santé de Villedieu- 24 rue du Général de Gaulle- 50800 Villedieu les Poêles

Dr Olivier BATAILLE
Dr Nicolas BOYER
Dr Philippe SABATHIER
Dr Thomas TRENIER

Maison médicale de Colombelles- 49 avenue de la liberté- 14460 Colombelles

Dr Elise BARBE-DELRUE
Dr Philippe GRUJART
Dr Jeanne LEBAS
Dr Stéphane VALLAYES

Pôle de santé de Vaucelles- 47 rue de Vaucelles- 14000 Caen

Dr Gregory DAIREAUX
Dr Xavier HUMBERT
Dr Charlotte MILCENT

Maison médicale de la côte fleurie- Créactive place- 14800 Deauville

Dr Andry RABIAZA
Dr Nicolas SAINMONT
Dr Laurent SIMON



Annexe 5- Cartons nominatifs distribués pour chaque saison épidémique à chaque médecin généraliste investigateur



Annexe 6- Premier questionnaire envoyé aux médecins généralistes investigateurs concernant leur mode d'exercice

UNIVERSITÉ DE ROUEN Service mutualisé de gestion d'enquêtes
Questionnaire médecin

0%

Informations principales :

✦ Quels sont vos nom et prénom ?

✦ Quel est votre sexe ?

Féminin Masculin

✦ Quel est votre âge ?

ⓘ Seul un nombre entier peut être inscrit dans ce champ.

UNIVERSITÉ DE ROUEN Questionnaire médecin

✦ Quel est votre type d'exercice ?

ⓘ Cochez la ou les réponses

Seul
 Cabinet de groupe
 Maison Santé Pluridisciplinaire
 Remplaçant

✦ Êtes-vous maître de stage ?

Oui Non

✦ Depuis combien de temps exercez-vous ? (en années)

ⓘ Seul un nombre entier peut être inscrit dans ce champ.



• Quel est le code postal de votre commune d'exercice ?

ⓘ Seul un nombre entier peut être inscrit dans ce champ.

• Combien de demi-journées par semaine travaillez-vous au cabinet ?

ⓘ Seul un nombre entier peut être inscrit dans ce champ.

Finir plus tard
Sortir et effacer vos réponses

Envoyer



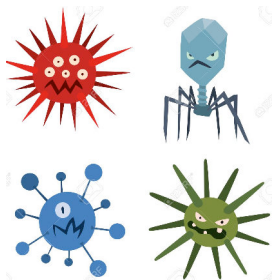
Annexe 7 - Document d'information expliquant l'étude ECOVIR, destiné aux enfants de moins de 6 ans

Document d'information au jeune patient inclus

Bonjour,

Je suis le Docteur et je te propose de participer à une étude intitulée :

« **ECOVIR**, Étude des codétections virales dans les prélèvements respiratoires : apport de la quantification virale normalisée pour la compréhension des infections respiratoires virales multiples et l'établissement de règles d'interprétation des nouveaux tests diagnostiques » .



Tu es venu(e) aujourd'hui chez ton médecin car tu es malade : tu as de la fièvre, tu tousses ou tu as le nez bouché... C'est sûrement à cause d'un microbe très petit, invisible à l'œil nu, que l'on appelle VIRUS.

Nous sommes des médecins qui étudions ces virus, ces petits microbes qui te rendent malades, et nous voudrions les étudier dans notre laboratoire.



Nous avons donc besoin de ton aide pour étudier ces virus, qui se trouvent au fond de ton nez. Avec un coton-tige, ton médecin va aller chercher ces virus au fond de ton nez. Cela ne fait pas mal, mais cela gratte un peu, pendant 3 secondes.





Ton médecin va également t'examiner comme d'habitude, avec son stéthoscope, et regarder tes oreilles. Il posera des questions à tes parents sur ta toux, ta fièvre, comme d'habitude.

Tu n'es pas obligé de participer à l'étude et si tu ne souhaites pas que l'on mette le coton-tige dans ton nez, c'est ton droit.

Cela ne changera pas la qualité des soins qu'on te donne habituellement.

Par contre, si tu donnes ton accord, sache également que tu peux à tout moment décider d'arrêter l'étude. Il te suffira de la signaler à ton papa ou ta maman qui m'en informera. Tes parents donneront également leur accord en signant un papier.

N'hésite pas à nous poser toutes les questions que tu veux, nous y répondrons. Nous te remercions d'avoir lu ce document.

Nom et prénom de l'enfant

Signature

Signature de l'enfant



Annexe 8- Document d'information destiné aux parents des enfants de moins de 11 ans inclus dans l'étude ECOVIR



FORMULAIRE D'INFORMATION

Madame, Monsieur

Il est proposé à votre enfant de participer à une étude intitulée : « Étude des codétéctions virales dans les prélèvements respiratoires : apport de la quantification virale normalisée pour la compréhension des infections respiratoires virales multiples et l'établissement de règles d'interprétation des nouveaux tests diagnostiques », coordonnée par les Professeurs Astrid Vabret et Christophe Marguet. Cette étude permettra d'améliorer les connaissances biologiques et médicales (travaux de recherche ayant une mission d'intérêt public : thèse de médecine, de sciences, articles scientifiques académiques).

Ce formulaire a pour but de vous expliquer ce que cette étude implique afin de vous permettre de décider si vous voulez que votre enfant y participe.

Informations Générales

L'objectif de l'étude, à laquelle nous vous proposons de participer, est d'étudier les différents virus impliqués dans les infections respiratoires hautes et basses hivernales, et en particulier d'étudier les infections où plusieurs virus sont mis en évidence. Notre étude porte sur la quantification virale et son intérêt en pratique clinique.

Déroulement

Les analyses effectuées concerneront le prélèvement naso-pharyngé et l'examen clinique qui seront réalisés au cabinet de votre médecin généraliste traitant aujourd'hui.

Le prélèvement naso-pharyngé réalisé aujourd'hui consiste en l'introduction dans la narine d'un écouvillon (qui ressemble à un long coton-tige), puis un mouvement de rotation sera réalisé pendant environ 3 secondes, et l'écouvillon sera ensuite ressorti de la narine. L'écouvillon sera alors mis dans un tube, conservé à 4°C par votre médecin traitant, puis sera acheminé au laboratoire de Virologie du CHU de Caen afin d'être analysé. Ces analyses permettront de savoir si un ou plusieurs virus sont responsables des symptômes de votre enfant. Si plusieurs virus sont mis en évidence, des analyses complémentaires seront réalisées au laboratoire sur votre prélèvement afin de savoir quel virus apparaît comme responsable principal de vos symptômes.

Dans 7 jours, un interne de médecine générale vous rappellera afin de connaître l'évolution des symptômes de votre enfant, et de recueillir des informations épidémiologiques et sociodémographiques.

Participation

La participation de votre enfant à ce projet de recherche est volontaire. Vous êtes libre de refuser que votre enfant y participe sans encourir aucune responsabilité. Vous avez bien entendu la possibilité de réfléchir avec votre entourage, avant de prendre votre décision ou de refuser sans aucun préjudice pour votre enfant.



Aspects légaux

Conformément aux dispositions de la loi n° 2018-493 du 20 juin 2018 relative à la protection des données personnelles, vous disposez d'un droit d'accès et de rectification de vos données personnelles ainsi que le droit à l'effacement, à l'oubli et le droit à la portabilité des données. Vous disposez également d'un droit d'opposition à la transmission des données couvertes par le secret professionnel susceptibles d'être utilisées dans le cadre de cette recherche et d'être traitées. Ce traitement automatisé de vos données de santé est conforme au règlement Européen du 27 avril 2016 relatif à la protection des personnes physiques à l'égard du traitement des données à caractère personnel et à la libre circulation de ces données.

Vous disposez d'un droit de réclamation auprès de la Commission National de l'Informatique et des Libertés (CNIL) : 3, place de Fontenoy – TSA 80715 – 75334 PARIS cedex 07 (01.53.73.22.22)



Annexe 9- Document d'information destiné aux patients enfants âgés de 11 à 18 ans ans inclus dans l'étude ECOVIR



FORMULAIRE D'INFORMATION

Bonjour,

Il t'est proposé de participer à une étude intitulée : « Étude des codétectons virales dans les prélèvements respiratoires : apport de la quantification virale normalisée pour la compréhension des infections respiratoires virales multiples et l'établissement de règles d'interprétation des nouveaux tests diagnostiques », coordonnée par les Professeurs Astrid Vabret et Christophe Marguet.

Cette étude permettra d'améliorer les connaissances biologiques et médicales (travaux de recherche ayant une mission d'intérêt public : thèse de médecine, de sciences, articles scientifiques académiques).

Ce formulaire a pour but de t'expliquer ce que cette étude implique afin de te permettre de décider si tu veux y participer.

Informations Générales

L'objectif de l'étude, à laquelle nous te proposons de participer, est d'étudier les différents virus impliqués dans les infections respiratoires hautes et basses hivernales, et en particulier d'étudier les infections où plusieurs virus sont mis en évidence. Notre étude porte sur la quantification virale et son intérêt en pratique clinique.

Déroulement

Les analyses effectuées concerneront le prélèvement naso-pharyngé et l'examen clinique qui seront réalisés au cabinet de ton médecin généraliste traitant aujourd'hui.

Le prélèvement naso-pharyngé réalisé aujourd'hui consiste en l'introduction dans la narine d'un écouvillon qui ressemble à un gros coton-tige, puis un mouvement de rotation sera réalisé pendant environ 3 secondes, et l'écouvillon sera ensuite ressorti de la narine. L'écouvillon sera alors mis dans un tube, conservé à 4°C par votre médecin traitant, puis sera acheminé au laboratoire de Virologie du CHU de Caen afin d'être analysé. Ces analyses permettront de savoir si un ou plusieurs virus sont responsables de tes symptômes (toux, nez qui coule, fièvre...). Si plusieurs virus sont mis en évidence, des analyses complémentaires seront réalisées au laboratoire sur votre prélèvement afin de savoir quel virus apparaît comme responsable principal de tes symptômes.

Dans 7 jours, un interne de médecine générale rappellera tes parents afin de connaître l'évolution de tes symptômes, et de recueillir d'autres informations sur tes habitudes de vie, ton entourage, etc.

Participation

Ta participation à ce projet de recherche est volontaire. Tu es libre de refuser d'y participer sans encourir aucune responsabilité. Tu as bien entendu la possibilité de réfléchir avec ton entourage, tes parents, avant de prendre ta décision ou de refuser sans aucun préjudice pour toi.

Aspects légaux

Conformément aux dispositions de la loi n° 2018-493 du 20 juin 2018 relative à la protection des données personnelles, tu disposes d'un droit d'accès et de rectification de tes données personnelles ainsi que le droit à l'effacement, à l'oubli et le droit à la portabilité des données. Tu disposes

également d'un droit d'opposition à la transmission des données couvertes par le secret professionnel susceptibles d'être utilisées dans le cadre de cette recherche et d'être traitées. Ce traitement automatisé de tes données de santé est conforme au règlement Européen du 27 avril 2016 relatif à la protection des personnes physiques à l'égard du traitement des données à caractère personnel et à la libre circulation de ces données.

Tu disposes d'un droit de réclamation auprès de la Commission National de l'Informatique et des Libertés (CNIL) : 3, place de Fontenoy – TSA 80715 – 75334 PARIS cedex 07 (01.53.73.22.22)



Annexe 10- Document d'information destiné aux patients majeurs dans l'étude ECOVIR



FORMULAIRE D'INFORMATION

Madame, Monsieur

Il vous est proposé de participer à une étude intitulée : « Étude des codétectations virales dans les prélèvements respiratoires : apport de la quantification virale normalisée pour la compréhension des infections respiratoires virales multiples et l'établissement de règles d'interprétation des nouveaux tests diagnostiques », coordonnée par les Professeurs Astrid Vabret et Christophe Marguet. Cette étude permettra d'améliorer les connaissances biologiques et médicales (travaux de recherche ayant une mission d'intérêt public : thèse de médecine, de sciences, articles scientifiques académiques).

Ce formulaire a pour but de vous expliquer ce que cette étude implique afin de vous permettre de décider si vous voulez y participer.

Informations Générales

L'objectif de l'étude, à laquelle nous vous proposons de participer, est d'étudier les différents virus impliqués dans les infections respiratoires hautes et basses hivernales, et en particulier d'étudier les infections où plusieurs virus sont mis en évidence. Notre étude porte sur la quantification virale (mesure de la charge virale respiratoire) et son intérêt en pratique clinique.

Déroulement

Les analyses effectuées concerneront le prélèvement naso-pharyngé et l'examen clinique qui seront réalisés au cabinet de votre médecin généraliste traitant aujourd'hui.

Le prélèvement naso-pharyngé réalisé aujourd'hui consiste en l'introduction dans la narine d'un écouvillon, puis un mouvement de rotation sera réalisé pendant environ 3 secondes, et l'écouvillon sera ensuite ressorti de la narine. L'écouvillon sera alors mis dans un tube, conservé à 4°C par votre médecin traitant, puis sera acheminé au laboratoire de Virologie du CHU de Caen afin d'être analysé. Ces analyses permettront de savoir si un ou plusieurs virus sont responsables de vos symptômes. Si plusieurs virus sont mis en évidence, des analyses complémentaires seront réalisées au laboratoire sur votre prélèvement afin de savoir quel virus apparaît comme responsable principal de vos symptômes. Dans 7 jours, un interne de médecine générale vous rappellera afin de connaître l'évolution de vos symptômes, et de recueillir des informations épidémiologiques et sociodémographiques.

Participation

Votre participation à ce projet de recherche est volontaire. Vous êtes libre de refuser d'y participer sans encourir aucune responsabilité. Vous avez bien entendu la possibilité de réfléchir avec votre entourage, avant de prendre votre décision ou de refuser sans aucun préjudice pour vous.

Aspects légaux

Conformément aux dispositions de la loi n° 2018-493 du 20 juin 2018 relative à la protection des données personnelles, vous disposez d'un droit d'accès et de rectification de vos données personnelles ainsi que le droit à l'effacement, à l'oubli et le droit à la portabilité des données. Vous disposez également d'un droit d'opposition à la transmission des données couvertes par le secret professionnel susceptibles d'être utilisées dans le cadre de cette recherche et d'être traitées. Ce traitement automatisé de vos données de santé est conforme au règlement Européen du 27 avril 2016 relatif à la



protection des personnes physiques à l'égard du traitement des données à caractère personnel et à la libre circulation de ces données.

Vous disposez d'un droit de réclamation auprès de la Commission National de l'Informatique et des Libertés (CNIL) : 3, place de Fontenoy – TSA 80715 – 75334 PARIS cedex 07 (01.53.73.22.22)





BIBLIOGRAPHIE

1. Monto AS. Medical reviews. Coronaviruses. *Yale J Biol Med.* déc 1974;47(4):234-51.
2. Monto AS, Malosh RE, Petrie JG, Thompson MG, Ohmit SE. Frequency of Acute Respiratory Illnesses and Circulation of Respiratory Viruses in Households With Children Over 3 Surveillance Seasons. *J Infect Dis.* 1 déc 2014;210(11):1792-9.
3. Fendrick AM, Monto AS, Nightengale B, Sarnes M. The economic burden of non-influenza-related viral respiratory tract infection in the United States. *Arch Intern Med.* 24 févr 2003;163(4):487-94.
4. Molinari NAM, Ortega-Sanchez IR, Messonnier ML, Thompson WW, Wortley PM, Weintraub E, et al. The annual impact of seasonal influenza in the US: measuring disease burden and costs. *Vaccine.* 28 juin 2007;25(27):5086-96.
5. GBD 2015 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet Lond Engl.* 8 oct 2016;388(10053):1545-602.
6. Chan JYC, Stern DA, Guerra S, Wright AL, Morgan WJ, Martinez FD. Pneumonia in Childhood and Impaired Lung Function in Adults: A Longitudinal Study. *Pediatrics.* 1 avr 2015;135(4):607-16.
7. Backman K, Piippo-Savolainen E, Ollikainen H, Koskela H, Korppi M. Irreversible airway obstruction in adulthood after bronchiolitis in infancy: Evidence from a 30-year follow-up study. *Respir Med.* 1 janv 2014;108(1):218-23.
8. Delmas MC, Guignon N, Leynaert B, Moisy M, Marguet C, Fuhrman C. Augmentation de la prévalence de l'asthme chez le jeune enfant en France. *Rev Mal Respir.* mai 2017;34(5):525-34.
9. de Blic J, Brouard J, Vabret A, Deschildre A. Interactions micro-organismes et voies aériennes distales : spécificités pédiatriques. *Rev Mal Respir.* févr 2017;34(2):134-46.
10. Brankston G, Gitterman L, Hirji Z, Lemieux C, Gardam M. Transmission of influenza A in human beings. *Lancet Infect Dis.* avr 2007;7(4):257-65.
11. Heikkinen T, Järvinen A. The common cold. *Lancet Lond Engl.* 4 janv 2003;361(9351):51-9.
12. Moriyama M, Hugentobler WJ, Iwasaki A. Seasonality of Respiratory Viral Infections. *Annu Rev Virol.* 29 sept 2020;7(1):83-101.
13. Drysdale SB, Mejias A, Ramilo O. Rhinovirus - not just the common cold. *J Infect.* juin 2017;74 Suppl 1:S41-6.
14. Jacobs SE, Lamson DM, St. George K, Walsh TJ. Human Rhinoviruses. *Clin Microbiol Rev.* janv 2013;26(1):135-62.
15. Fuchs R, Blaas D. Uncoating of human rhinoviruses. *Rev Med Virol.* sept 2010;20(5):281-97.
16. Saraya T, Kurai D, Ishii H, Ito A, Sasaki Y, Niwa S, et al. Epidemiology of virus-induced asthma exacerbations: with special reference to the role of human rhinovirus. *Front Microbiol.* 2014;5:226.
17. Hendley JO, Gwaltney JM. Mechanisms of transmission of rhinovirus infections. *Epidemiol Rev.* 1988;10:243-58.
18. Gwaltney JM, Moskalski PB, Hendley JO. Hand-to-hand transmission of rhinovirus colds. *Ann Intern Med.* avr 1978;88(4):463-7.
19. Dick EC, Jennings LC, Mink KA, Wartgow CD, Inhorn SL. Aerosol transmission of rhinovirus colds. *J Infect Dis.* sept 1987;156(3):442-8.
20. Gern JE. The ABCs of rhinoviruses, wheezing, and asthma. *J Virol.* août 2010;84(15):7418-26.
21. Ordóñez-Mena JM, Fanshawe TR, Butler CC, Mant D, Longhurst D, Muir P, et al. Relationship between microbiology of throat swab and clinical course among primary care patients with acute cough: a prospective cohort study. *Fam Pract.* 23 juill 2020;37(3):332-9.
22. Tran DN, Trinh QD, Pham NTK, Pham TMH, Ha MT, Nguyen TQN, et al. Human rhinovirus infections in hospitalized children: clinical, epidemiological and virological features. *Epidemiol Infect.* janv 2016;144(2):346-54.
23. Lemanske RF, Jackson DJ, Gangnon RE, Evans MD, Li Z, Shult PA, et al. Rhinovirus illnesses during infancy predict subsequent childhood wheezing. *J Allergy Clin Immunol.* 1 sept 2005;116(3):571-7.
24. Pomeranz G, Pando R, Hindiyeh M, Sherbany H, Meningher T, Sharabi S, et al. Rhinovirus infections in infants suggest that early detection can prevent unnecessary treatment. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol.* juin 2019;115:11-7.



25. Sansone M, Andersson M, Brittain-Long R, Andersson LM, Olofsson S, Westin J, et al. Rhinovirus infections in western Sweden: a four-year molecular epidemiology study comparing local and globally appearing types. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol*. juill 2013;32(7):947-54.
26. Gerna G, Campanini G, Rognoni V, Marchi A, Rovida F, Piralla A, et al. Correlation of viral load as determined by real-time RT-PCR and clinical characteristics of respiratory syncytial virus lower respiratory tract infections in early infancy. *J Clin Virol*. 1 janv 2008;41(1):45-8.
27. Jartti T, Hasegawa K, Mansbach JM, Piedra PA, Camargo CA. Rhinovirus-induced bronchiolitis: Lack of association between virus genomic load and short-term outcomes. *J Allergy Clin Immunol*. août 2015;136(2):509-512.e11.
28. Longtin J, Marchand-Austin A, Winter AL, Patel S, Eshaghi A, Jamieson F, et al. Rhinovirus outbreaks in long-term care facilities, Ontario, Canada. *Emerg Infect Dis*. sept 2010;16(9):1463-5.
29. Winther B, Brofeldt S, Grønborg H, Mygind N, Pedersen M, Vejlsgaard R. Study of bacteria in the nasal cavity and nasopharynx during naturally acquired common colds. *Acta Otolaryngol (Stockh)*. 1984;98(3-4):315-20.
30. Winther B, Gwaltney JM, Mygind N, Turner RB, Hendley JO. Sites of rhinovirus recovery after point inoculation of the upper airway. *JAMA*. 3 oct 1986;256(13):1763-7.
31. Gwaltney JM, Hendley JO, Simon G, Jordan WS. Rhinovirus infections in an industrial population. I. The occurrence of illness. *N Engl J Med*. 8 déc 1966;275(23):1261-8.
32. Lau SKP, Yip CCY, Woo PCY, Yuen KY. Human rhinovirus C: a newly discovered human rhinovirus species. *Emerg Health Threats J*. 2010;3:e2.
33. Howard LM, Johnson M, Gil AI, Griffin MR, Edwards KM, Lanata CF, et al. Molecular Epidemiology of Rhinovirus Detections in Young Children. *Open Forum Infect Dis*. janv 2016;3(1):ofw001.
34. Talj R, Amarin JZ, Rankin DA, Bloos SM, Shawareb Y, Rahman H, et al. Clinical characteristics, outcomes, and seasonality of acute respiratory infection associated with single and codetected rhinovirus species among hospitalized children in Amman, Jordan. *J Med Virol*. déc 2022;94(12):5904-15.
35. Ng KT, Oong XY, Lim SH, Chook JB, Takebe Y, Chan YF, et al. Viral load and sequence analysis reveal the symptom severity, diversity and transmission clusters of rhinovirus infections. *Clin Infect Dis [Internet]*. [cité 19 févr 2018]; Disponible sur: <https://academic-oup-com.gate2.inist.fr/cid/advance-article/doi/10.1093/cid/ciy063/4828127>
36. Morikawa S, Kohdera U, Hosaka T, Ishii K, Akagawa S, Hiroi S, et al. Seasonal variations of respiratory viruses and etiology of human rhinovirus infection in children. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. déc 2015;73:14-9.
37. Zhao Y, Shen J, Wu B, Liu G, Lu R, Tan W. Genotypic Diversity and Epidemiology of Human Rhinovirus Among Children With Severe Acute Respiratory Tract Infection in Shanghai, 2013-2015. *Front Microbiol*. 2018;9:1836.
38. Price RHM, Graham C, Ramalingam S. Association between viral seasonality and meteorological factors. *Sci Rep*. 30 janv 2019;9(1):929.
39. Jackson DJ, Gangnon RE, Evans MD, Roberg KA, Anderson EL, Pappas TE, et al. Wheezing Rhinovirus Illnesses in Early Life Predict Asthma Development in High-Risk Children. *Am J Respir Crit Care Med*. 1 oct 2008;178(7):667-72.
40. Corne JM, Marshall C, Smith S, Schreiber J, Sanderson G, Holgate ST, et al. Frequency, severity, and duration of rhinovirus infections in asthmatic and non-asthmatic individuals: a longitudinal cohort study. *Lancet Lond Engl*. 9 mars 2002;359(9309):831-4.
41. Mak RKY, Tse LY, Lam WY, Wong GWK, Chan PKS, Leung TF. Clinical spectrum of human rhinovirus infections in hospitalized Hong Kong children. *Pediatr Infect Dis J*. sept 2011;30(9):749-53.
42. Greenberg SB, Allen M, Wilson J, Atmar RL. Respiratory viral infections in adults with and without chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. juill 2000;162(1):167-73.
43. McManus TE, Marley AM, Baxter N, Christie SN, O'Neill HJ, Elborn JS, et al. Respiratory viral infection in exacerbations of COPD. *Respir Med*. nov 2008;102(11):1575-80.
44. Rhodes HL, Thomas P, Sporik R, Holgate ST, Cogswell JJ. A birth cohort study of subjects at risk of atopy: twenty-two-year follow-up of wheeze and atopic status. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 janv 2002;165(2):176-80.
45. Respiratory Syncytial Virus. *JAMA*. 27 mai 1961;176(8):647-67.
46. Shi T, McAllister DA, O'Brien KL, Simoes EAF, Madhi SA, Gessner BD, et al. Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children in 2015: a systematic review and modelling study. *Lancet Lond Engl*. 2 sept 2017;390(10098):946-58.



47. Moore HC, Lim FJ, Fathima P, Barnes R, Smith DW, de Klerk N, et al. Assessing the Burden of Laboratory-Confirmed Respiratory Syncytial Virus Infection in a Population Cohort of Australian Children Through Record Linkage. *J Infect Dis.* 16 juin 2020;222(1):92-101.
48. Demont C, Petrica N, Bardoulat I, Duret S, Watier L, Chosidow A, et al. Economic and disease burden of RSV-associated hospitalizations in young children in France, from 2010 through 2018. *BMC Infect Dis.* déc 2021;21(1):1-10.
49. Young M, Smitherman L. Socioeconomic Impact of RSV Hospitalization. *Infect Dis Ther.* mars 2021;10(Suppl 1):35-45.
50. Amarin JZ, Potter M, Thota J, Rankin DA, Probst V, Haddadin Z, et al. Clinical characteristics and outcomes of children with single or co-detected rhinovirus-associated acute respiratory infection in Middle Tennessee. *BMC Infect Dis.* 7 mars 2023;23:136.
51. Lambert L, Sagfors AM, Openshaw PJM, Culley FJ. Immunity to RSV in Early-Life. *Front Immunol.* 29 sept 2014;5:466.
52. Tawar RG, Duquerroy S, Vonrhein C, Varela PF, Damier-Piolle L, Castagné N, et al. Crystal Structure of a Nucleocapsid-Like Nucleoprotein-RNA Complex of Respiratory Syncytial Virus. *Science.* 27 nov 2009;326(5957):1279-83.
53. Bakker SE, Duquerroy S, Galloux M, Loney C, Conner E, Eléouët JF, et al. The respiratory syncytial virus nucleoprotein-RNA complex forms a left-handed helical nucleocapsid. *J Gen Virol.* 2013;94(8):1734-8.
54. Martínez I, Melero JA. Binding of human respiratory syncytial virus to cells: implication of sulfated cell surface proteoglycans. *J Gen Virol.* 2000;81(11):2715-22.
55. Noton SL, Fearn R. Initiation and regulation of paramyxovirus transcription and replication. *Virology.* mai 2015;479-480:545-54.
56. Bermingham A, Collins PL. The M2-2 protein of human respiratory syncytial virus is a regulatory factor involved in the balance between RNA replication and transcription. *Proc Natl Acad Sci.* 28 sept 1999;96(20):11259-64.
57. Collins PL, Graham BS. Viral and Host Factors in Human Respiratory Syncytial Virus Pathogenesis. *J Virol.* 3 janv 2008;82(5):2040-55.
58. Johnson SM, McNally BA, Ioannidis I, Flano E, Teng MN, Oomens AG, et al. Respiratory Syncytial Virus Uses CX3CR1 as a Receptor on Primary Human Airway Epithelial Cultures. *PLOS Pathog.* 11 déc 2015;11(12):e1005318.
59. McLellan JS, Chen M, Leung S, Graepel KW, Du X, Yang Y, et al. Structure of RSV Fusion Glycoprotein Trimer Bound to a Prefusion-Specific Neutralizing Antibody. *Science.* 31 mai 2013;340(6136):1113-7.
60. Garcia-Mauriño C, Moore-Clingenpeel M, Thomas J, Mertz S, Cohen DM, Ramilo O, et al. Viral Load Dynamics and Clinical Disease Severity in Infants With Respiratory Syncytial Virus Infection. *J Infect Dis [Internet].* [cité 12 févr 2019]; Disponible sur: <https://academic-oup-com.gate2.inist.fr/jid/advance-article/doi/10.1093/infdis/jiy655/5173953>
61. Batonick M, Wertz GW. Requirements for Human Respiratory Syncytial Virus Glycoproteins in Assembly and Egress from Infected Cells [Internet]. *Advances in Virology.* 2011 [cité 19 avr 2018]. Disponible sur: <https://www.hindawi.com/journals/av/2011/343408/>
62. Rameix-Welti MA, Le Goffic R, Hervé PL, Sourimant J, Rémot A, Riffault S, et al. Visualizing the replication of respiratory syncytial virus in cells and in living mice. *Nat Commun.* 3 oct 2014;5:5104.
63. L L, Am S, Pj O, Fj C. Immunity to RSV in Early-Life [Internet]. Vol. 5, *Frontiers in immunology.* *Front Immunol.* 2014 [cité 2 déc 2020]. Disponible sur: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/25324843/>
64. Hussain F, Delgado Thompson M, Vick D, West J, Edwards M. Clinical severity of RSV bronchiolitis. *Health Sci Rep.* 22 mars 2022;5(2):e543.
65. Boattini M, Almeida A, Christaki E, Marques TM, Tosatto V, Bianco G, et al. Severity of RSV infection in Southern European elderly patients during two consecutive winter seasons (2017-2018). *J Med Virol.* août 2021;93(8):5152-7.
66. Ackermann MR. Lamb Model of Respiratory Syncytial Virus-Associated Lung Disease: Insights to Pathogenesis and Novel Treatments. *ILAR J.* 1 janv 2014;55(1):4-15.
67. Buckingham SC, Bush AJ, Devincenzo JP. **nasal quantity of respiratory syncytial virus correlates with disease severity in hospitalized infants.** *Pediatr Infect Dis J.* 1 févr 2000;19(2):113-7.
68. DeVincenzo JP, Saleeby E, M C, Bush AJ. Respiratory Syncytial Virus Load Predicts Disease Severity in Previously Healthy Infants. *J Infect Dis.* 1 juin 2005;191(11):1861-8.
69. Taveras J, Garcia-Maurino C, Moore-Clingenpeel M, Xu Z, Mertz S, Ye F, et al. Type III Interferons,



- Viral Loads, Age, and Disease Severity in Young Children With Respiratory Syncytial Virus Infection. J Infect Dis.* 28 déc 2022;227(1):61-70.
70. Falsey AR, Walsh EE, Osborne RH, Vandendijck Y, Ren X, Witek J, et al. Comparative assessment of reported symptoms of influenza, respiratory syncytial virus, and human metapneumovirus infection during hospitalization and post-discharge assessed by Respiratory Intensity and Impact Questionnaire. *Influenza Other Respir Viruses.* janv 2022;16(1):79-89.
 71. Peret TC, Hall CB, Schnabel KC, Golub JA, Anderson LJ. Circulation patterns of genetically distinct group A and B strains of human respiratory syncytial virus in a community. *J Gen Virol.* 1998;79(9):2221-9.
 72. Martinello RA, Chen MD, Weibel C, Kahn JS. Correlation between Respiratory Syncytial Virus Genotype and Severity of Illness. *J Infect Dis.* 15 sept 2002;186(6):839-42.
 73. Gilca R, De Serres G, Tremblay M, Vachon M, Leblanc E, Bergeron MG, et al. Distribution and Clinical Impact of Human Respiratory Syncytial Virus Genotypes in Hospitalized Children over 2 Winter Seasons. *J Infect Dis.* janv 2006;193(1):54-8.
 74. Henderson FW, Collier AM, Clyde WA Jr, Denny FW. Respiratory-Syncytial-Virus Infections, Reinfections and Immunity. *N Engl J Med.* 8 mars 1979;300(10):530-4.
 75. Nair H, Simões EA, Rudan I, Gessner BD, Azziz-Baumgartner E, Zhang JSF, et al. Global and regional burden of hospital admissions for severe acute lower respiratory infections in young children in 2010: a systematic analysis. *The Lancet.* 20 avr 2013;381(9875):1380-90.
 76. Hall CB, Long CE, Schnabel KC. Respiratory Syncytial Virus Infections in Previously Healthy Working Adults. *Clin Infect Dis.* 15 sept 2001;33(6):792-6.
 77. Falsey AR, Hennessey PA, Formica MA, Cox C, Walsh EE. Respiratory Syncytial Virus Infection in Elderly and High-Risk Adults. *N Engl J Med.* 28 avr 2005;352(17):1749-59.
 78. al ZM et. Contribution of influenza and respiratory syncytial virus to community cases of influenza-like illness: an observational study. - PubMed - NCBI [Internet]. [cité 24 avr 2018]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=zambon+contribution+of+influenza+lancet+2001>
 79. Wu X, Chen D, Gu X, Su X, Song Y, Shi Y. Prevalence and risk of viral infection in patients with acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease: a meta-analysis. *Mol Biol Rep.* 1 juill 2014;41(7):4743-51.
 80. Savic M, Penders Y, Shi T, Branche A, Pirçon JY. Respiratory syncytial virus disease burden in adults aged 60 years and older in high-income countries: A systematic literature review and meta-analysis. *Influenza Other Respir Viruses.* janv 2023;17(1):e13031.
 81. Wilkinson TMA, Donaldson GC, Johnston SL, Openshaw PJM, Wedzicha JA. Respiratory Syncytial Virus, Airway Inflammation, and FEV1 Decline in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 avr 2006;173(8):871-6.
 82. J S, A H, S S. Early lung development: lifelong effect on respiratory health and disease [Internet]. Vol. 1, *The Lancet. Respiratory medicine. Lancet Respir Med;* 2013 [cité 2 déc 2020]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/24429276/>
 83. Mazur NI, Terstappen J, Baral R, Bardaji A, Beutels P, Buchholz UJ, et al. Respiratory syncytial virus prevention within reach: the vaccine and monoclonal antibody landscape. *Lancet Infect Dis.* janv 2023;23(1):e2-21.
 84. Griffin MP, Yuan Y, Takas T, Domachowske JB, Madhi SA, Manzoni P, et al. Single-Dose Nirsevimab for Prevention of RSV in Preterm Infants. *N Engl J Med.* 30 juill 2020;383(5):415-25.
 85. Heimdal I, Valand J, Krokstad S, Moe N, Christensen A, Risnes K, et al. Hospitalized Children With Common Human Coronavirus Clinical Impact of Codetected Respiratory Syncytial Virus and Rhinovirus. *Pediatr Infect Dis J.* mars 2022;41(3):e95-101.
 86. Su S, Wong G, Shi W, Liu J, Lai ACK, Zhou J, et al. Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends Microbiol.* 2016;24(6):490-502.
 87. Neuman BW, Adair BD, Yoshioka C, Quispe JD, Orca G, Kuhn P, et al. Supramolecular Architecture of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Revealed by Electron Cryomicroscopy. *J Virol.* 15 août 2006;80(16):7918-28.
 88. Armstrong J, Niemann H, Smeekens S, Rottier P, Warren G. Sequence and topology of a model intracellular membrane protein, E1 glycoprotein, from a coronavirus. *Nature.* 1984;308(5961):751-2.
 89. Nieto-Torres JL, DeDiego ML, Verdiá-Báguena C, Jimenez-Guardeño JM, Regla-Nava JA, Fernandez-Delgado R, et al. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Envelope Protein Ion Channel Activity Promotes Virus Fitness and Pathogenesis. *PLOS Pathog.* 1 mai 2014;10(5):e1004077.
 90. Stohlman SA, Lai MM. Phosphoproteins of murine hepatitis viruses. *J Virol.* 1 nov 1979;32(2):672-5.
 91. Hurst KR, Koetzner CA, Masters PS. Characterization of a Critical Interaction between the



- Coronavirus Nucleocapsid Protein and Nonstructural Protein 3 of the Viral Replicase-Transcriptase Complex. *J Virol.* 15 août 2013;87(16):9159-72.
92. Klausegger A, Strobl B, Regl G, Kaser A, Luytjes W, Vlasak R. Identification of a Coronavirus Hemagglutinin-Esterase with a Substrate Specificity Different from Those of Influenza C Virus and Bovine Coronavirus. *J Virol.* 1 mai 1999;73(5):3737-43.
 93. Enjuanes L, Sola I, Almazan F, Ortego J, Izeta A, Gonzalez JM, et al. Coronavirus derived expression systems. *J Biotechnol.* 12 juill 2001;88(3):183-204.
 94. Forni D, Cagliani R, Clerici M, Sironi M. Molecular Evolution of Human Coronavirus Genomes. *Trends Microbiol.* janv 2017;25(1):35-48.
 95. Chiu SS, Hung Chan K, Wing Chu K, Kwan SW, Guan Y, Man Poon LL, et al. Human Coronavirus NL63 Infection and Other Coronavirus Infections in Children Hospitalized with Acute Respiratory Disease in Hong Kong, China. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 15 juin 2005;40(12):1721-9.
 96. Recovery in tracheal organ cultures of novel viruses from patients with respiratory disease. [Internet]. [cité 23 avr 2020]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/pmc/articles/PMC224637/>
 97. Signs and symptoms in common colds. [Internet]. [cité 23 avr 2020]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/pmc/articles/PMC2271186/>
 98. van der Hoek L, Pyrc K, Berkhout B. Human coronavirus NL63, a new respiratory virus. *FEMS Microbiol Rev.* sept 2006;30(5):760-73.
 99. Fouchier RAM, Hartwig NG, Bestebroer TM, Niemeyer B, Jong JC de, Simon JH, et al. A previously undescribed coronavirus associated with respiratory disease in humans. *Proc Natl Acad Sci.* 20 avr 2004;101(16):6212-6.
 100. Woo PCY, Lau SKP, Chu C ming, Chan K hung, Tsoi H wah, Huang Y, et al. Characterization and Complete Genome Sequence of a Novel Coronavirus, Coronavirus HKU1, from Patients with Pneumonia. *J Virol.* 15 janv 2005;79(2):884-95.
 101. Gaunt ER, Hardie A, Claas ECJ, Simmonds P, Templeton KE. Epidemiology and Clinical Presentations of the Four Human Coronaviruses 229E, HKU1, NL63, and OC43 Detected over 3 Years Using a Novel Multiplex Real-Time PCR Method. *J Clin Microbiol.* 1 août 2010;48(8):2940-7.
 102. Advani S, Sengupta A, Forman M, Valsamakis A, Milstone AM. Detecting Respiratory Viruses in Asymptomatic Children. *Pediatr Infect Dis J.* déc 2012;31(12):1221.
 103. Yahya M, Rulli M, Toivonen L, Waris M, Peltola V. Detection of Host Response to Viral Respiratory Infection by Measurement of Messenger RNA for MxA, TRIM21, and Viperin in Nasal Swabs. *J Infect Dis.* 1 nov 2017;216(9):1099-103.
 104. Lieberman D, Shimoni A, Shemer-Avni Y, Keren-Naos A, Shtainberg R, Lieberman D. Respiratory Viruses in Adults With Community-Acquired Pneumonia. *Chest.* 1 oct 2010;138(4):811-6.
 105. Jansen RR, Wieringa J, Koekkoek SM, Visser CE, Pajkrt D, Molenkamp R, et al. Frequent detection of respiratory viruses without symptoms: toward defining clinically relevant cutoff values. *J Clin Microbiol.* juill 2011;49(7):2631-6.
 106. Van Bente I, Koopman L, Niesters B, Hop W, Van Middelkoop B, De Waal L, et al. Predominance of rhinovirus in the nose of symptomatic and asymptomatic infants. *Pediatr Allergy Immunol.* oct 2003;14(5):363-70.
 107. Goka EA, Vallely PJ, Mutton KJ, Klapper PE. Single and multiple respiratory virus infections and severity of respiratory disease: a systematic review. *Paediatr Respir Rev.* déc 2014;15(4):363-70.
 108. Ieven M, Coenen S, Loens K, Lammens C, Coenjaerts F, Vanderstraeten A, et al. Aetiology of lower respiratory tract infection in adults in primary care: a prospective study in 11 European countries. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* nov 2018;24(11):1158-63.
 109. Vos LM, Bruyndonckx R, Zuithoff NPA, Little P, Oosterheert JJ, Broekhuizen BDL, et al. Lower respiratory tract infection in the community: associations between viral aetiology and illness course. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* janv 2021;27(1):96-104.
 110. Zlateva KT, van Rijn AL, Simmonds P, Coenjaerts FEJ, van Loon AM, Verheij TJM, et al. Molecular epidemiology and clinical impact of rhinovirus infections in adults during three epidemic seasons in 11 European countries (2007–2010). *Thorax.* oct 2020;75(10):882-90.
 111. Souty C, Masse S, Valette M, Behillil S, Bonmarin I, Pino C, et al. Baseline characteristics and clinical symptoms related to respiratory viruses identified among patients presenting with influenza-like illness in primary care. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* sept 2019;25(9):1147-53.
 112. McGeoch LJ, Thornton HV, Blair PS, Christensen H, Turner NL, Muir P, et al. Prognostic value of upper respiratory tract microbes in children presenting to primary care with respiratory infections: A



- prospective cohort study. *PLOS ONE*. 12 mai 2022;17(5):e0268131.
113. Thornton HV, Hay AD, Redmond NM, Turnbull SL, Christensen H, Peters TJ, et al. Throat swabs in children with respiratory tract infection: associations with clinical presentation and potential targets for point-of-care testing. *Fam Pract*. 1 août 2017;34(4):407-15.
114. Khalid TY, Duncan LJ, Thornton HV, Lasseter G, Muir P, Toney ZA, et al. Novel multi-virus rapid respiratory microbiological point-of-care testing in primary care: a mixed-methods feasibility evaluation. *Fam Pract*. 25 sept 2021;38(5):598-605.
115. Nickbakhsh S, Mair C, Matthews L, Reeve R, Johnson PCD, Thorburn F, et al. Virus-virus interactions impact the population dynamics of influenza and the common cold. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 26 déc 2019;116(52):27142-50.
116. Bosch AATM, Biesbroek G, Trzcinski K, Sanders EAM, Bogaert D. Viral and Bacterial Interactions in the Upper Respiratory Tract. *PLoS Pathog*. 10 janv 2013;9(1):e1003057.
117. Wu A, Mihaylova VT, Landry ML, Foxman EF. Interference between rhinovirus and influenza A virus: a clinical data analysis and experimental infection study. *Lancet Microbe*. oct 2020;1(6):e254-62.
118. Yu J, Peterson DR, Baran AM, Bhattacharya S, Wylie TN, Falsey AR, et al. Host Gene Expression in Nose and Blood for the Diagnosis of Viral Respiratory Infection. *J Infect Dis*. 15 mars 2019;219(7):1151-61.
119. Landry ML, Foxman EF. Antiviral Response in the Nasopharynx Identifies Patients With Respiratory Virus Infection. *J Infect Dis*. 15 mars 2018;217(6):897-905.
120. Lim FJ, Wake ZV, Levy A, Tempone S, Moore HC, Richmond PC, et al. Viral Etiology and the Impact of Codetection in Young Children Presenting With Influenza-Like Illness. *J Pediatr Infect Dis Soc*. sept 2017;6(3):260-6.
121. Peng D, Zhao D, Liu J, Wang X, Yang K, Xicheng H, et al. Multipathogen infections in hospitalized children with acute respiratory infections. *Virol J*. déc 2009;6(1):1-7.
122. Kouni S, Karakitsos P, Chranioti A, Theodoridou M, Chrousos G, Michos A. Evaluation of viral co-infections in hospitalized and non-hospitalized children with respiratory infections using microarrays. *Clin Microbiol Infect*. 1 août 2013;19(8):772-7.
123. Martin ET, Kuypers J, Wald A, Englund JA. Multiple versus single virus respiratory infections: viral load and clinical disease severity in hospitalized children. *Influenza Other Respir Viruses*. 1 janv 2012;6(1):71-7.
124. Aberle JH, Aberle SW, Pracher E, Hutter HP, Kundi M, Popow-Kraupp T. Single versus dual respiratory virus infections in hospitalized infants: impact on clinical course of disease and interferon-gamma response. *Pediatr Infect Dis J*. juill 2005;24(7):605-10.
125. DaPalma T, Doonan BP, Trager NM, Kasman LM. A systematic approach to virus-virus interactions. *Virus Res*. avr 2010;149(1):1-9.
126. Piret J, Boivin G. Viral Interference between Respiratory Viruses. *Emerg Infect Dis*. févr 2022;28(2):273-81.
127. Visseaux B, Collin G, Ichou H, Charpentier C, Bendhafer S, Dumitrescu M, et al. Usefulness of multiplex PCR methods and respiratory viruses' distribution in children below 15 years old according to age, seasons and clinical units in France: A 3 years retrospective study. *PLOS ONE*. 24 févr 2017;12(2):e0172809.
128. Nickbakhsh S, Thorburn F, Wissmann BV, McMENAMIN J, Gunson RN, Murcia PR. Extensive multiplex PCR diagnostics reveal new insights into the epidemiology of viral respiratory infections. *Epidemiol Infect*. juill 2016;144(10):2064-76.
129. Cruz JS, de Souza Luna LK, Alves VRG, Conte DD, Bellei NCJ. Viral load of respiratory syncytial virus among children from primary care and hospital settings admitted to a university hospital in Brazil (2009-2013). *J Med Virol*. 2021;93(6):3397-400.
130. Greer RM, McErlean P, Arden KE, Faux CE, Nitsche A, Lambert SB, et al. Do rhinoviruses reduce the probability of viral co-detection during acute respiratory tract infections? *J Clin Virol*. 1 mai 2009;45(1):10-5.
131. Karppinen S, Toivonen L, Schuez-Havupalo L, Waris M, Peltola V. Interference between respiratory syncytial virus and rhinovirus in respiratory tract infections in children. *Clin Microbiol Infect*. 1 févr 2016;22(2):208.e1-208.e6.
132. Ånestad G, Vainio K, Hungnes O. Interference between outbreaks of epidemic viruses. *Scand J Infect Dis*. 1 janv 2007;39(6-7):653-4.
133. Haney J, Vijaykrishnan S, Streetley J, Dee K, Goldfarb DM, Clarke M, et al. Coinfection by influenza A virus and respiratory syncytial virus produces hybrid virus particles. *Nat Microbiol*. nov 2022;7(11):1879-90.
134. Casalegno JS, Ottmann M, Bouscambert-Duchamp M, Valette M, Morfin F, Lina B. Impact of the 2009 influenza A(H1N1) pandemic wave on the pattern of hibernal respiratory virus epidemics, France, 2009. *Eurosurveillance*. 11 févr 2010;15(6):19485.



135. Ånestad G, Nordbø SA. Virus interference. Did rhinoviruses activity hamper the progress of the 2009 influenza A (H1N1) pandemic in Norway? *Med Hypotheses*. 1 déc 2011;77(6):1132-4.
136. Debiaggi M, Canducci F, Ceresola ER, Clementi M. The role of infections and coinfections with newly identified and emerging respiratory viruses in children. *Viol J*. 27 oct 2012;9:247.
137. Scotta MC, Chakr VCBG, de Moura A, Becker RG, de Souza APD, Jones MH, et al. Respiratory viral coinfection and disease severity in children: A systematic review and meta-analysis. *J Clin Virol*. 1 juill 2016;80:45-56.
138. Wishaupt JO, Ploeg T van der, Groot R de, Versteegh FGA, Hartwig NG. Single- and multiple viral respiratory infections in children: disease and management cannot be related to a specific pathogen. *BMC Infect Dis*. déc 2017;17(1):62.
139. Bekhof J, Bakker J, Reimink R, Wessels M, Langenhorst V, Brand PLP, et al. Co-infections in children hospitalised for bronchiolitis: role of roomsharing. *J Clin Med Res*. déc 2013;5(6):426-31.
140. Asner SA, Rose W, Petrich A, Richardson S, Tran DJ. Is virus coinfection a predictor of severity in children with viral respiratory infections? *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. mars 2015;21(3):264.e1-6.
141. Calvo C, García-García ML, Blanco C, Vázquez MC, Frías ME, Pérez-Breña P, et al. Multiple simultaneous viral infections in infants with acute respiratory tract infections in Spain. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. juill 2008;42(3):268-72.
142. Libster R, Coviello S, Cavalieri ML, Morosi A, Alabart N, Alvarez L, et al. Pediatric hospitalizations due to influenza in 2010 in Argentina. *N Engl J Med*. 16 déc 2010;363(25):2472-3.
143. Marguet C, Lubrano M, Gueudin M, Roux PL, Deschildre A, Forget C, et al. In Very Young Infants Severity of Acute Bronchiolitis Depends On Carried Viruses. *PLOS ONE*. 25 févr 2009;4(2):e4596.
144. Anderson J, Oeum M, Verkolf E, Licciardi PV, Mulholland K, Nguyen C, et al. Factors associated with severe respiratory syncytial virus disease in hospitalised children: a retrospective analysis. *Arch Dis Child*. 1 avr 2022;107(4):359-64.
145. Mansbach JM, Piedra PA, Teach SJ, Sullivan AF, Forgey T, Clark S, et al. Prospective Multicenter Study of Viral Etiology and Hospital Length of Stay in Children With Severe Bronchiolitis. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 1 août 2012;166(8):700-6.
146. Cilla G, Oñate E, Perez-Yarza EG, Montes M, Vicente D, Perez-Trallero E. Hospitalization rates for human metapneumovirus infection among 0- to 3-year-olds in Gipuzkoa (Basque Country), Spain. *Epidemiol Infect*. janv 2009;137(1):66-72.
147. Drews AL, Atmar RL, Glezen WP, Baxter BD, Piedra PA, Greenberg SB. Dual respiratory virus infections. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. déc 1997;25(6):1421-9.
148. Venter M, Lassaunière R, Kresfelder TL, Westerberg Y, Visser A. Contribution of common and recently described respiratory viruses to annual hospitalizations in children in South Africa. *J Med Virol*. août 2011;83(8):1458-68.
149. Hartmann K, Liese JG, Kemmling D, Prifert C, Weißbrich B, Thilakarathne P, et al. Clinical Burden of Respiratory Syncytial Virus in Hospitalized Children Aged ≤5 Years (INSPIRE Study). *J Infect Dis*. 26 août 2022;226(3):386-95.
150. Houben ML, Coenjaerts FEJ, Rossen JWA, Belderbos ME, Hofland RW, Kimpen JLL, et al. Disease severity and viral load are correlated in infants with primary respiratory syncytial virus infection in the community. *J Med Virol*. juill 2010;82(7):1266-71.
151. Zhou L, Xiao Q, Zhao Y, Huang A, Ren L, Liu E. The impact of viral dynamics on the clinical severity of infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Med Virol*. 2015;87(8):1276-84.
152. Hasegawa K, Jartti T, Mansbach JM, Laham FR, Jewell AM, Espinola JA, et al. Respiratory Syncytial Virus Genomic Load and Disease Severity Among Children Hospitalized With Bronchiolitis: Multicenter Cohort Studies in the United States and Finland. *J Infect Dis*. 15 mai 2015;211(10):1550-9.
153. Martin ET, Kuypers J, Heugel J, Englund JA. Clinical disease and viral load in children infected with respiratory syncytial virus or human metapneumovirus. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1 déc 2008;62(4):382-8.
154. Saleeby E, M C, Bush AJ, Harrison LM, Aitken JA, DeVincenzo JP. Respiratory Syncytial Virus Load, Viral Dynamics, and Disease Severity in Previously Healthy Naturally Infected Children. *J Infect Dis*. 1 oct 2011;204(7):996-1002.
155. Granados A, Peci A, McGeer A, Gubbay JB. Influenza and rhinovirus viral load and disease severity in upper respiratory tract infections. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. janv 2017;86:14-9.
156. Granados A, Luinstra K, Chong S, Goodall E, Banh L, Mubareka S, et al. Use of an improved quantitative polymerase chain reaction assay to determine differences in human rhinovirus viral loads in different populations. *Diagn Microbiol Infect Dis*. déc 2012;74(4):384-7.



157. Takeyama A, Hashimoto K, Sato M, Sato T, Kanno S, Takano K, et al. Rhinovirus load and disease severity in children with lower respiratory tract infections. *J Med Virol.* 1 juill 2012;84(7):1135-42.
158. Esposito S, Daleno C, Scala A, Castellazzi L, Terranova L, Sferrazza Papa S, et al. Impact of rhinovirus nasopharyngeal viral load and viremia on severity of respiratory infections in children. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* janv 2014;33(1):41-8.
159. Xatzipsalti M, Kyrana S, Tsolia M, Psarras S, Bossios A, Laza-Stanca V, et al. Rhinovirus viremia in children with respiratory infections. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 oct 2005;172(8):1037-40.
160. Fuji N, Suzuki A, Lupisan S, Sombrero L, Galang H, Kamigaki T, et al. Detection of human rhinovirus C viral genome in blood among children with severe respiratory infections in the Philippines. *PloS One.* 2011;6(11):e27247.
161. Angoulvant F, Bellêtre X, Milcent K, Teglas JP, Claudet I, Guen CGL, et al. Effect of Nebulized Hypertonic Saline Treatment in Emergency Departments on the Hospitalization Rate for Acute Bronchiolitis: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Pediatr.* 1 août 2017;171(8):e171333-e171333.
162. Savolainen C, Blomqvist S, Mulders MN, Hovi T. Genetic clustering of all 102 human rhinovirus prototype strains: serotype 87 is close to human enterovirus 70. *J Gen Virol.* févr 2002;83(Pt 2):333-40.
163. Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol.* 25 mai 1975;94(3):441-8.
164. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* déc 1977;74(12):5463-7.
165. Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol.* 11 oct 2011;7:539.
166. Librado P, Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinforma Oxf Engl.* 1 juin 2009;25(11):1451-2.
167. Sauvage T, Plouviez S, Schmidt WE, Fredericq S. TREE2FASTA: a flexible Perl script for batch extraction of FASTA sequences from exploratory phylogenetic trees. *BMC Res Notes.* 5 mars 2018;11(1):164.





Etude des codétectations virales dans les prélèvements respiratoires :
Apport de la quantification virale normalisée
pour la compréhension des infections virales multiples

Résumé

Les infections respiratoires aiguës sont les infections les plus abondantes dans la population générale. Elles sont majoritairement dues à des virus respiratoires, qui infectent les patients de façon épidémique, engendrant des pathologies variées et différentes selon l'âge des patients. Les techniques moléculaires récentes permettent un diagnostic virologique qualitatif précis, accessible encore uniquement en milieu hospitalier. La détection de plusieurs virus dans les prélèvements respiratoires, ou codéttection virale, est fréquente, et la question de la significativité et de l'interprétation clinique se pose, à l'heure où les vaccins et les antiviraux spécifiques se développent et vont être très prochainement accessibles.

Nous avons utilisé les prélèvements issus de deux cohortes de patients, aux profils très différents, pour mettre au point des techniques de PCR quantitatives du VRS (virus respiratoire syncytial) et de l'HRV (rhinovirus humain), ces deux virus étant les plus fréquemment retrouvés dans les codétectations virales.

Grâce à la cohorte hospitalière « Guérande » (n=719), de nourrissons hospitalisés pour bronchiolite aiguë, nous avons retrouvé un taux de codéttection virale très important (plus de 50%), avec une présence de plus de 90% du VRS dans les échantillons respiratoires, et un taux de coinfections VRS/HRV de près d'un tiers. Le risque d'être infecté par le HRV était plus élevé en l'absence de VRS, suggérant des interférences ou des mécanismes d'exclusion entre ces deux virus.

La cohorte « ECOVIR », réalisée en soins primaires, a permis d'inclure 685 patients de tous âges se présentant au cabinet de leur médecin généraliste. Les prélèvements respiratoires étaient pour 67% d'entre eux positifs à au moins un virus, et 8% étaient positifs à au moins deux virus. Les codétectations virales étaient associées au VRS, à l'HRV mais également au bocavirus et au metapneumovirus. Nous avons analysé les associations entre les différents virus respiratoires, et avons retrouvé que l'HRV était associé négativement à tous les virus, à l'exception de l'adénovirus et du bocavirus.

Dans la dernière partie de ce travail de thèse, nous avons analysé les charges virales respiratoires du VRS et de l'HRV dans les prélèvements issus des deux cohortes, et séquencé les rhinovirus des prélèvements positifs en PCR Multiplex. Nous avons trouvé que le risque de codéttection virale était plus important chez les patients hospitalisés versus les patients ambulatoires. Nous avons également retrouvé une corrélation positive entre les charges virales respiratoires de l'HRV et du VRS et l'abondance cellulaire, reflet de l'activité lytique des virus. Nous avons retrouvé des charges virales respiratoires plus élevées chez les nourrissons et les personnes âgées, expliquant l'impact clinique plus important de ces virus dans ces populations fragiles. Nous avons enfin mis en évidence une charge virale HRV plus faible en cas de coinfection avec le VRS, confirmant encore une interférence négative entre ces deux virus, au détriment de l'HRV.

De nombreux paramètres influencent donc l'histoire naturelle des infections virales respiratoires, et la quantification des charges virales respiratoires peut grandement l'expliquer. Ce travail de thèse a permis de commencer à apporter des réponses ; de futurs projets portant sur le suivi des charges virales respiratoires pour chaque patient au cours d'une infection, ou encore sur l'environnement inflammatoire respiratoire lors de ces coinfections pourraient permettre d'étayer nos recherches.

Mots clés : Codétectations virales respiratoires- charges virales respiratoires- rhinovirus- virus respiratoire syncytial- interférences virus-virus

Abstract

Acute respiratory infections are the most abundant infections in the general population. They are mainly due to respiratory viruses, which infect patients in epidemic ways, generating a variety of pathologies that vary according to the age of the patient. Recent molecular techniques can provide precise qualitative virological diagnosis, which is still only available in hospitals. Detection of several viruses in respiratory samples, or viral co-detection, is frequent, and the question of significance and clinical interpretation arises when vaccines and specific antivirals are being developed and will be soon available.

We used samples from two patient cohorts with very different profiles to develop quantitative PCR techniques for RSV (respiratory syncytial virus) and HRV (human rhinovirus), the two viruses most frequently found in viral codetections. Using the "Guérande" hospital cohort (n=719) of infants hospitalized for acute bronchiolitis, we found a very high rate of viral codetection (over 50%), with over 90% presence of RSV in respiratory samples, and a RSV/HRV co-infection rate of almost a third. The risk of being infected with HRV was higher in the absence of RSV, suggesting interferences or exclusion mechanisms between these two viruses.

The "ECOVIR" cohort, conducted in primary care, included 685 patients of all ages presenting to their general practitioner's office. Respiratory samples were positive for at least one virus in 67% of cases, and 8% were positive for at least two viruses. Viral codetections were associated with RSV and HRV, but also with bocavirus and metapneumovirus. We analyzed the associations between the different respiratory viruses, and found that HRV was negatively associated with all viruses except adenovirus and bocavirus.

In the final part of this thesis, we analyzed the respiratory viral loads of RSV and HRV in samples from both cohorts, and sequenced rhinoviruses in positive samples in Multiplex PCR. We found that the risk of viral co-detection was higher in hospitalized versus ambulatory patients. We also found a positive correlation between HRV and RSV respiratory viral loads and cell abundance, reflecting the lytic activity of the viruses. We found higher respiratory viral loads in infants and the elderly, explaining the greater clinical impact of these viruses in these fragile populations. Finally, we demonstrated a lower HRV viral load in cases of co-infection with RSV, further confirming a negative interference between these two viruses, to the detriment of HRV.

Many parameters therefore influence the natural history of respiratory viral infections, and quantifying respiratory viral loads can go a long way towards explaining this. This thesis work has begun to provide some answers; future projects involving the monitoring of respiratory viral loads for each patient during the course of an infection, or the respiratory inflammatory environment during these coinfections, could provide further support for our research.

Keywords : respiratory viral codetections- respiratory viral loads- rhinovirus- respiratory syncytial virus- virus-virus-interferences

