



**HAL**  
open science

# Optimisation du diagnostic des infections à entérovirus et étude de leur pouvoir pathogène

Jérémy Lafolie

► **To cite this version:**

Jérémy Lafolie. Optimisation du diagnostic des infections à entérovirus et étude de leur pouvoir pathogène. Santé. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2018. Français. NNT : 2018CLFAS008 . tel-03348936

**HAL Id: tel-03348936**

**<https://theses.hal.science/tel-03348936>**

Submitted on 20 Sep 2021

**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.

*ECOLE DOCTORALE*  
*DES SCIENCES DE LA VIE, SANTE, AGRONOMIE,*  
*ENVIRONNEMENT*

***Thèse***

Présentée à l'Université Clermont Auvergne

Pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR D'UNIVERSITE**

**Spécialité : BIOLOGIE SANTE**

Le 20 décembre 2018 par

**Jérémy LAFOLIE**

---

**Optimisation du diagnostic des infections à  
entérovirus et étude de leur pouvoir pathogène**

---

Devant la commission d'examen composée de

Rapporteurs : M<sup>me</sup> Flore Rozenberg, PU-PH, Université Paris Descartes - Paris V  
M. Laurent Andréoletti, PU-PH, Université de Reims Champagne-Ardenne

Examineurs : M<sup>me</sup> Desguerre Isabelle, PU-PH, Université Paris Descartes - Paris V  
M. André Labbé, PU-PH, Université Clermont Auvergne  
M. Olivier Lesens, PU-PH, Université Clermont Auvergne

Directeur de thèse : M<sup>me</sup> Christine Archimbaud, MCU-PH des disciplines Pharmaceutiques,  
Université Clermont Auvergne

**Centre National de Référence des Entérovirus et Parechovirus – Laboratoire associé**  
**Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement (CNRS UMR 6023)**  
**Equipe EPIE : Epidémiologie et Pathogénèse des Infections à Entérovirus**



*ECOLE DOCTORALE*  
*DES SCIENCES DE LA VIE, SANTE, AGRONOMIE,*  
*ENVIRONNEMENT*

***Thèse***

Présentée à l'Université Clermont Auvergne

Pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR D'UNIVERSITE**

**Spécialité : BIOLOGIE SANTE**

Le 20 décembre 2018 par

**Jérémy LAFOLIE**

---

**Optimisation du diagnostic des infections à  
entérovirus et étude de leur pouvoir pathogène**

---

Devant la commission d'examen composée de

Rapporteurs : M<sup>me</sup> Flore Rozenberg, PU-PH, Université Paris Descartes - Paris V  
M. Laurent Andréoletti, PU-PH, Université de Reims Champagne-Ardenne

Examineurs : M<sup>me</sup> Desguerre Isabelle, PU-PH, Université Paris Descartes - Paris V  
M. André Labbé, PU-PH, Université Clermont Auvergne  
M. Olivier Lesens, PU-PH, Université Clermont Auvergne

Directeur de thèse : M<sup>me</sup> Christine Archimbaud, MCU-PH des disciplines Pharmaceutiques,  
Université Clermont Auvergne

**Centre National de Référence des Entérovirus et Parechovirus – Laboratoire associé**  
**Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement (CNRS UMR 6023)**  
**Equipe EPIE : Epidémiologie et Pathogénèse des Infections à Entérovirus**



## REMERCIEMENTS

### Aux membres du jury,

qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger la pertinence et la qualité de mes travaux.

A Mme le **Professeur Flore Rozenberg** et à Mr le **Professeur Laurent Andréoletti** qui ont accepté d'être les rapporteurs de cette thèse et dont les remarques et les commentaires m'ont permis de corriger certaines erreurs et d'améliorer la compréhension de ce mémoire.

A Mme le **Professeur Isabelle Desguerre** et à Mr le **Professeur Olivier Lesens** pour avoir accepté de consacrer du temps à l'évaluation de ce projet clinique et scientifique.

A Mr le **Professeur André Labbé** pour sa disponibilité, sa gentillesse et sa très précieuse aide dans cette étude qui n'aurait pas pu être réalisée sans vous. J'espère avoir répondu à vos attentes et que ce travail permettra de faire évoluer les pratiques cliniques en pédiatrie.

Mes remerciements les plus profonds à ma directrice de thèse, le **Docteur Christine Archimbaud**. Je te remercie de m'avoir confié un sujet de thèse aussi complet et au cœur de l'actualité. Ton encadrement ainsi que tes précieux conseils m'ont permis de m'affirmer professionnellement et de développer mon esprit scientifique. Je n'oublierais pas ta gentillesse, ta grande disponibilité, ton éternel optimisme. Que ce travail soit le gage de mon respect et l'expression de ma profonde reconnaissance.

### A mes collègues, mes amis,

Ma profonde gratitude au **Pr Hélène Peigue-Lafeuille** ainsi qu'au **Pr Cécile Henquell** pour m'avoir permis de découvrir le vaste univers de la Virologie et pour votre confiance sans limite dans de très nombreux travaux que ce soit dans le domaine hospitalier et universitaire.

Au **Dr Jean-Luc Bailly** d'avoir été mon co-directeur de thèse, pour le temps qu'il m'a accordé, sa franchise et ses qualités scientifiques.

A **Gwendoline Jugie**, pour son aide très précieuse en biologie moléculaire ainsi que pour sa grande patience et sa gentillesse.

Au **Dr Bruno Pereira** pour les (nombreuses !) analyses statistiques et son intérêt continu pour mon travail.

Au **Professeur Pascale Gueirard** pour votre participation ainsi que pour le suivi de mes travaux lors de mes deux comités de thèse.

Mes sincères et chaleureux remerciements à **Martine Chambon, Christel Regagnon, Audrey Mirand et Amélie Brebion** pour votre soutien, votre bonne humeur, votre gentillesse et vos conseils avisés. J'aurai sans doute la chance de pouvoir continuer à vous embêter régulièrement sur les entérovirus et sur la qualité.

A **l'ensemble du personnel du service de Virologie (CHU et faculté (équipe EPIE))** pour leur accueil chaleureux, leur aide précieuse ainsi que pour la bonne ambiance dans laquelle ce travail a été accompli. Grâce à vous, j'ai passé quatre années très agréables à vos côtés.

A **mes amis** de Clermont-Ferrand et d'ailleurs pour leur soutien et leur amitié. Merci plus particulièrement à Mélody, Pierre, Benjamin et Marc pour les sorties réalisées et les bons moments passés ensemble au cours de mon assistanat.

### *A ma famille,*

A **ma mère, mon père et ma soeur**, qui m'ont toujours soutenu, réconforté et aimé. La plus belle des thèses ne saurait vous remercier assez et vous faire part de l'amour et du respect que j'ai envers vous.

A ma grand-mère, « **Dr** » **Nicole**, que j'aime profondément.

A **mon grand-père**, qui nous a quitté trop tôt, pour sa sagesse et son courage.

# Table des matières

<b>Liste des figures et des tableaux</b> .....	9
<b>Abréviations</b> .....	11
<b>Introduction</b> .....	13
<b>Données Bibliographiques</b> .....	16
<b>I. Caractéristiques virologiques des entérovirus</b> .....	17
1. Caractéristiques structurales.....	17
1.1 Structure de la capsid.....	17
1.2 Organisation structurale et fonctionnelle du génome viral.....	20
2. Classification.....	23
3. Cycle de réplication des entérovirus.....	26
3.1 Phase d'initiation.....	26
3.1.1 Attachement cellulaire : récepteurs / co-récepteurs.....	28
3.1.2 Internalisation, décapsidation et libération du génome viral.....	30
3.2 Phase réplivative.....	31
3.2.1 Traduction du génome viral.....	31
3.2.2 Réplication du génome viral.....	33
3.3 Phase de libération.....	35
3.3.1 Assemblage et maturation des provirions.....	35
3.3.2 Libération des virions.....	35
4. Evolution et diversité génétique.....	36
4.1 Les mutations.....	36
4.2 Les recombinaisons.....	37
<b>II. Infections humaines à entérovirus</b> .....	40
1. Physiopathologie des infections à entérovirus.....	40
1.1 Pathogénèse générale.....	40
1.2 Phase de virémie.....	42
1.3 Voies d'entrée des entérovirus.....	43
1.3.1 Voie neuronale.....	43
1.3.2 Voie virémique.....	44
1.3.3 Processus viraux de franchissement de la barrière hémato-encéphalique (BHE).....	46
1.4 Réactions immunitaires.....	47



1.4.1	Généralités .....	47
1.4.2	Immunité et infections à entérovirus .....	51
2.	Epidémiologie .....	54
2.1	Modes de Transmission.....	54
2.2	Réseaux de surveillance .....	56
2.2.1	Surveillance spécifique des poliovirus .....	56
2.2.2	Surveillance des entérovirus non poliomyélitiques .....	57
2.3	Profils épidémiologiques et épidémiologie moléculaire.....	60
2.4	Facteurs favorisant les infections à entérovirus et leur sévérité .....	61
3.	Manifestations cliniques.....	62
3.1	Infections aiguës asymptomatiques et pauci-symptomatiques .....	62
3.2	Infections aiguës symptomatiques.....	64
3.2.1	Infections du système nerveux central.....	64
3.2.1.1	Méningites aiguës.....	66
3.2.1.2	Encéphalites.....	66
3.2.1.3	Poliomyélite et Paralysies flasques aiguës .....	68
3.2.2	Infections cutanéomuqueuses.....	71
3.2.2.1	Eruptions vésiculeuses.....	71
3.2.2.2	Conjonctivites aiguës hémorragiques .....	73
3.2.3	Infections cardiaques .....	73
3.2.4	Infections respiratoires .....	74
3.2.5	Autres infections.....	74
3.3	Infections chroniques.....	75
3.4	Infections chez des populations particulières .....	76
3.4.1	Femme enceinte et nouveau-nés.....	76
3.4.2	Immunodéprimés .....	78
<b>III.</b>	<b>Diagnostic des infections humaines à entérovirus .....</b>	<b>80</b>
1.	Techniques de diagnostic .....	80
1.1	Diagnostic virologique direct .....	80
1.1.1	Culture virale.....	80
1.1.2	Techniques de biologie moléculaire .....	83
1.1.2.1	Amplification génique par RT-PCR.....	83
1.1.2.2	Typage des entérovirus.....	84
1.2	Diagnostic virologique indirect: sérologie .....	85

2.	Prélèvements et stratégies de diagnostic .....	86
<b>IV.</b>	<b>Approches préventives et thérapeutiques des infections à entérovirus .....</b>	<b>89</b>
1.	Mesures prophylactiques non spécifiques .....	89
2.	Vaccination.....	90
2.1	Vaccination contre la poliomyélite.....	90
2.2	Vaccination contre les entérovirus non poliomyélitiques.....	93
3.	Traitements des infections humaines à entérovirus .....	94
3.1	Immunoglobulines polyvalentes.....	94
3.2	Antiviraux spécifiques.....	95
	<b>Objectifs des travaux de thèse .....</b>	<b>99</b>
	<b>Patients et méthodes .....</b>	<b>103</b>
<b>I.</b>	<b>Conception de l'étude et patients .....</b>	<b>104</b>
<b>II.</b>	<b>Définitions des tableaux cliniques .....</b>	<b>105</b>
<b>III.</b>	<b>Paramètres biologiques .....</b>	<b>107</b>
<b>IV.</b>	<b>Détection génomique des entérovirus .....</b>	<b>107</b>
<b>V.</b>	<b>Envoi, stockage et conservation des échantillons biologiques .....</b>	<b>108</b>
<b>VI.</b>	<b>Génotypage des entérovirus.....</b>	<b>108</b>
<b>VII.</b>	<b>Quantification des entérovirus par RT-qPCR.....</b>	<b>110</b>
<b>VIII.</b>	<b>Détection génomique et génotypage des parechovirus .....</b>	<b>110</b>
<b>IX.</b>	<b>Etude du tropisme et de la réplication des entérovirus dans les différentes populations leucocytaires du sang.....</b>	<b>110</b>
1.	Récupération de la fraction leucocytaire .....	112
2.	Marquage leucocytaire .....	112
3.	Tri cellulaire et préparation des différentes populations leucocytaires .....	112
4.	Extraction des acides nucléiques .....	113
5.	Techniques d'amplification géniques.....	113
6.	Analyses statistiques.....	116
	<b>Travaux Originaux.....</b>	<b>118</b>
<b>I.</b>	<b>Optimisation du diagnostic des infections à entérovirus dans la population pédiatrique .....</b>	<b>119</b>
1.	Rationnel de l'étude.....	119
2.	Objectifs de l'étude .....	120
3.	Article portant sur l'étude.....	121
4.	Commentaires de l'étude.....	136
5.	Résultats complémentaires .....	142

6.	Conclusion.....	146
7.	Valorisation de l'étude .....	146
<b>II.</b>	<b>Etude de la charge virale des entérovirus dans le sang et dans le LCR chez des enfants infectés.....</b>	<b>148</b>
1.	Rationnel de l'étude.....	148
2.	Objectif de l'étude .....	149
3.	Résultats préliminaires .....	149
4.	Commentaires de l'étude.....	159
5.	Conclusion.....	161
<b>III.</b>	<b>Etude du tropisme et de la réplication des entérovirus dans les différentes populations leucocytaires.....</b>	<b>162</b>
1.	Rationnel de l'étude.....	162
2.	Objectif de l'étude .....	163
3.	Etude de faisabilité .....	164
3.1	Matériels et méthodes.....	164
3.2	Résultats .....	164
4.	Résultats préliminaires du tropisme des entérovirus chez les patients virémiques .....	167
5.	Commentaires de l'étude.....	169
6.	Conclusion.....	171
	<b>Conclusion générale et perspectives.....</b>	<b>173</b>
	<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>179</b>
	<b>Annexes .....</b>	<b>199</b>

# Liste des figures et des tableaux

## ➤ Figures :

Figure 1 - Structure de la capsid e des entérovirus. ....	19
Figure 2 - Organisation structurale et fonctionnelle du génome des entérovirus.....	22
Figure 3 - Classification des 106 types d'entérovirus humains. ....	25
Figure 4 - Cycle de réplication des entérovirus.....	27
Figure 5 - Mécanisme de libération du génome des entérovirus.....	32
Figure 6 - Mécanisme de réplication génomique des entérovirus.....	34
Figure 7 - Mécanismes d'évolution des entérovirus : mutations et recombinaisons. ....	39
Figure 8 - Physiopathologie générale des infections à entérovirus.....	41
Figure 9 - Activités antivirales des interférons de type I. ....	50
Figure 10 - Transmissions des entérovirus.....	55
Figure 11 - Réseaux de surveillance des entérovirus dans le monde et en France. ....	59
Figure 12 - Epidémiologie des méningites à entérovirus en France. ....	65
Figure 13 - Tableaux de poliomyélite et de paralysies flasques aiguës dues aux entérovirus non poliomyélitiques. ....	70
Figure 14 - Signes cliniques associés au syndrome pieds-mains-bouche. ....	72
Figure 15 - Incidence des cas de poliomyélite dans le monde et en France.....	92
Figure 16 - Localisation géographique des laboratoires de biologie et des centres hospitaliers ayant participé à l'étude BLEDI. ....	106
Figure 17 - Algorithme de génotypage des entérovirus par séquençage Sanger appliqué par le CNR des entérovirus et des parechovirus, laboratoire associé.....	109
Figure 18 - Schéma résumant la méthodologie employée pour l'étude du tropisme et de la réplication des entérovirus dans les différentes fractions leucocytaires.....	111
Figure 19 - Schémas représentant l'amplification et la détection des brins d'ARN (-) des entérovirus (A) et de l'obtention de la gamme de dilutions d'ARN transcrits négatifs (B)...	115
Figure 20 - Comparaison des charges virales dans le sang et dans le LCR en fonction de l'âge des patients. ....	151
Figure 21 - Comparaison des charges virales dans le sang et dans le LCR en fonction du tableau clinique. ....	152

Figure 22 - Comparaison des charges virales dans le sang et dans le LCR en fonction du type d'EV.....	153
Figure 23 - Comparaison des 3 profils de cinétique d'infection en fonction des types d'entérovirus chez les patients âgés $\leq 16$ ans. ....	158

➤ Tableaux :

Tableau 1 - Principaux récepteurs cellulaires utilisés par les entérovirus en fonction de leur type.....	29
Tableau 2 - Principales cytokines et chimiokines dosées dans le sang et/ou dans le LCR de patients infectés par un entérovirus. ....	53
Tableau 3 - Principales pathologies (aiguës et chroniques) observées chez des patients infectés par un entérovirus.....	63
Tableau 4 - Principales études portant sur la prévalence des entérovirus chez les nouveau-nés. ....	79
Tableau 5 - Sensibilité de différentes lignées cellulaires les plus communément utilisées pour l'isolement des entérovirus. ....	81
Tableau 6 - Prélèvements à réaliser dans les principaux tableaux cliniques pour le diagnostic des infections à entérovirus. ....	88
Tableau 7 - Liste des principales molécules antivirales à action directe ou indirecte contre les entérovirus.....	96
Tableau 8 - Comparaison du taux de détection des entérovirus dans le sang et dans le LCR des patients infectés avec et sans les dates et/ou heures incertaines du début des symptômes. ...	141
Tableau 9 - Caractéristiques des infections à parechovirus. ....	143
Tableau 10 - Comparaison des infections à entérovirus et à parechovirus chez des nourrissons âgés de moins de 5 mois.....	145
Tableau 11 - Caractéristiques cliniques et biologiques des patients inclus dans les 3 profils de cinétique d'infection à entérovirus.....	156
Tableau 12 - Etude du tropisme des entérovirus pour 4 fractions leucocytaires du sang (étude de faisabilité). ....	166
Tableau 13 - Etude du tropisme des entérovirus pour les 4 fractions leucocytaires du sang pour 6 patients virémiques (étude BLEDI). ....	168

# Abréviations

3Dpol	Polymérase 3D
2Apro et 3Cpro	Protéases 2A et 3C
aa	Acides aminés
ADN	Acide désoxyribonuléique
ADNc	Acide désoxyribonuléique complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
BHE	Barrière Hémato-Encéphalique
BLAST	Basic local alignment search tool
CDC	Centers for disease control
CHU	Centre Hospitalier Universitaire
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CNR EV/HPeV	Centre national de référence des entérovirus et des parechovirus
CTL	Cytotoxic T lymphocytes
CV	Charge virale
CV-A, -B	Coxsackievirus-A, -B
Da	Dalton s
DNQ	DéTECTABLE non quantifiable
dNTP	désoxyribonucléotide triphosphate
E	Echovirus
ECP	Effet cytopathogène
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EV	Entérovirus
HPeV	Parechovirus humains
HSV	Herpes Simplex Virus
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobulines
IL	Interleukine
IRES	Internal ribosomal entry site
LCR	Liquide céphalo rachidien
MFA	Myélite flasque aiguë
NC	Non codant
NK	Natural Killer
nt	Nucléotides
OMS	Organisation mondiale de la santé
OR	Odds Ratio
ORF	Open reading frame
Pb	Paire de bases
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PCR	Polymerase chain réaction
PFA	Paralysie flasque aiguë
PMB	Pied-main-bouche
PV	Poliovirus
PVR	Poliovirus Receptor
PVDV	Poliovirus dérivé de vaccin
qPCR	Quantitative polymerase chain réaction
RSE	Réseau de surveillance des entérovirus
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

RV	Rhinovirus
SNC	Système Nerveux Central
TNF	Tumor necrosis factor
VPI	Vaccin anti-poliomyélique inactivé
VPO	Vaccin anti-poliomyélique oral
vs	versus

# **Introduction**



Les entérovirus humains (EV) sont une cause importante de morbidité dans le monde. Ils peuvent être responsables d'infections très diverses, généralement bénignes et spontanément résolutive, voire d'infections plus graves. L'expression clinique la plus fréquente est la méningite aigüe aseptique qui touche préférentiellement la population pédiatrique, mais aussi les adultes (30% des cas) (**Peigue-Lafeuille et al., 2016**). Les infections cliniques graves sont rares et se manifestent par des infections cérébrales comme les encéphalites, ou les paralysies flasques aiguës. Le diagnostic de ces infections neuroméningées repose sur la détection génomique des EV dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) ou liquide cérébrospinal (LCS). Les moyens thérapeutiques disponibles sont presque inexistantes et la prise en charge est essentiellement symptomatique.

Les services d'urgences pédiatriques et de pédiatrie accueillent chaque année un nombre important d'enfants pour **suspicion de méningite**. La pathogénie des **syndromes neuro-méningés** provoqués par les entérovirus reste mal connue. Elle est complexe à cause de la multiplicité des sites de multiplication virale et du rôle possible de la virémie dans la dissémination virale et l'atteinte du système nerveux central. La variabilité génétique et la diversité des populations virales générées *in vivo* dans les tissus infectés ont aussi été évoquées en tant que facteurs associés à la physiopathologie.

**La fièvre sans point d'appel** et les **infections de type «sepsis»** sont également des affections fréquentes des nourrissons (0 à 2 ans) qui peuvent être la conséquence d'une infection virale notamment à entérovirus. Or, actuellement le diagnostic des EV dans le sang est très peu réalisé dans la pratique courante et une sous-estimation probable des EV dans ces infections peut être envisagée. L'intérêt du diagnostic des infections à EV dans le sang parallèlement ou non au LCR reste aujourd'hui à être démontré chez les enfants hospitalisés pour méningite, fièvre ou *sepsis*.

La première partie bibliographique de cette thèse s'appuie principalement sur les approches physiopathologiques, cliniques, diagnostiques et thérapeutiques des infections à EV. La poliomyélite, fléau épidémique du 20<sup>ème</sup> siècle, est en passe d'être éradiquée grâce à la vaccination généralisée et la mobilisation de grandes institutions mondiales comme l'OMS. L'implication des EV non poliomyélitiques en médecine humaine est omniprésente. Récemment, des épidémies importantes d'infections neurologiques sévères à EV-A71 et d'infections respiratoires à EV-D68 associées à des paralysies flasques aiguës ont été rapportées. Un regain d'intérêt pour ces virus a été observé par les autorités de santé du fait de

leur potentiel pathogène et épidémique (Ooi et al., 2010 ; Antona et al., 2016 ; Holm-Hansen et al., 2016).

Dans la seconde partie, nos travaux de recherche sont ensuite présentés. Dans un 1<sup>er</sup> article accepté pour publication, nous détaillons la mise en place de l'étude multicentrique BLEDI (*Blood Enterovirus Diagnosis*) qui avait pour objectif d'évaluer l'apport du diagnostic moléculaire (RT-PCR) des EV dans le sang chez les nouveau-nés, nourrissons et enfants hospitalisés pour une fièvre isolée, un sepsis ou une suspicion de méningite. Nous présentons les résultats de la détection génomique des EV dans les deux compartiments biologiques ainsi que les résultats d'une analyse univariée et multivariée sur les facteurs associés à la virémie. Dans un second temps, nous avons réalisé l'étude prospective des charges virales EV dans le sang et le LCR des patients de l'étude BLEDI. Puis nous avons exploré le tropisme et la réplication des EV dans les différentes fractions leucocytaires du sang, après infection *in vitro* des cellules sanguines avec des souches d'EV. Nous avons utilisé une méthodologie innovante reposant : 1) sur le tri et la récupération des fractions leucocytaires par cytométrie en flux, 2) sur le développement d'une technique d'amplification permettant la détection des EV réplicatifs (amplification des brins d'ARN de polarité négative).

## **Données Bibliographiques**

# I. Caractéristiques virologiques des entérovirus

## 1. Caractéristiques structurales

Les enterovirus (EV) sont constitués d'une capsidie protéique qui renferme un génome viral de type ARN. Ce sont des virus nus, dépourvus d'enveloppe lipido-protéique, qui sont très résistants dans le milieu extérieur. En effet, les EV sont relativement thermostables (inactivation du pouvoir infectieux à des températures  $> 50^{\circ}\text{C}$ ) et résistent en milieu acide (jusqu'à des pH de 3) d'où leur adaptation à l'environnement acide du tube digestif et leur passage dans l'intestin. De plus, ils sont résistants au phénol, aux solvants des lipides (éther et chloroforme) ainsi qu'aux principaux désinfectants à base d'alcools (éthanol à 70%, isopropanol) ou d'ammoniums quaternaires. Néanmoins, les produits à base de formaldéhyde, de glutaraldéhyde, d'acides forts (acide chlorhydrique) ou de composés chlorés (eau de Javel) ainsi que les ultraviolets inactivent les EV (**Melnick, 1996 ; Pallansch et al., 2013 ; Racaniello, 2013 ; Betancourt et Shulman, 2015**).

### 1.1 Structure de la capsidie

Le poliovirus, notamment de type 1, a été le premier EV caractérisé par microscopie électronique (**Loring et al., 1946**) puis sa structure a été affinée à l'échelle atomique grâce à l'utilisation de la cristallographie (**Hogle et al., 1985**). Depuis, les structures précises de la capsidie de plusieurs EV sont disponibles dans le RCSB Protein Data Bank ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)) (Figure 1A).

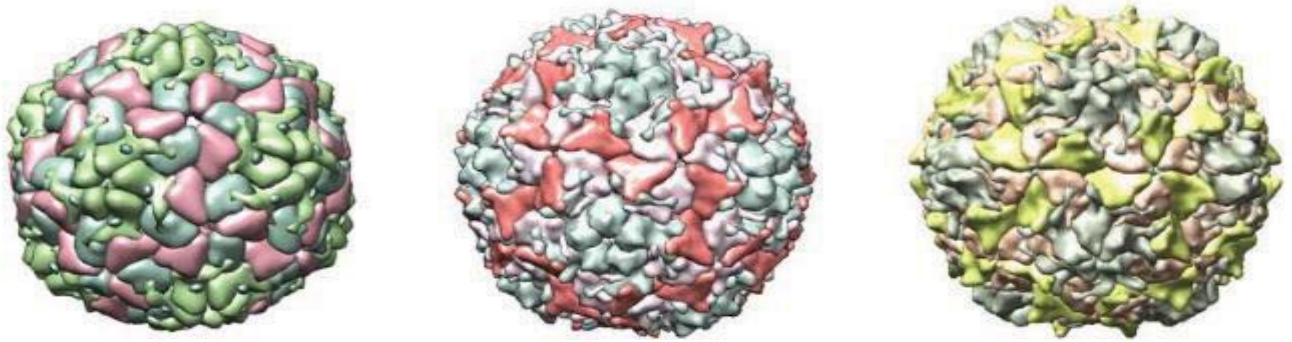
La capsidie des EV est formée de 60 protomères (ou capsomères) identiques. Chacune de ces unités est constituée d'un exemplaire de 4 protéines structurales nommées VP1 à VP4. Cinq protomères s'assemblent pour constituer un pentamère puis les 12 pentamères se regroupent pour créer une armature de type icosaédrique (**Racaniello, 2013**). Les protéines VP1, VP2 et VP3 (34, 30 et 26 kDa, respectivement) ont une conformation commune de 8 feuillets  $\beta$  antiparallèles qui forment une structure dite en tonneau ou en rouleau (*jelly roll, swiss roll*). L'assemblage de ces 3 protéines constitue une capsidie dense et rigide et la stabilité de cette structure est consolidée par des interactions entre leurs extrémités N-terminales et la protéine VP4, petite protéine (7 kDa) interne de la capsidie, qui permet également des interactions avec

le génome viral. Les boucles peptidiques exposées à la surface des protéines VP1, VP2 et VP3 sont les régions les plus variables de la capsid. Elles forment différents reliefs dont la topologie définit la reconnaissance des récepteurs cellulaires et expose les épitopes viraux. L'analyse tridimensionnelle de la capsid a montré une topographie de type ondulé avec un plateau proéminent en forme d'étoile (*mesa*) entouré de dépressions (*canyons*). Les protéines VP1, VP2 et VP3 forment entre elles une dépression (ou canyon) qui abrite les sites d'attachement au récepteur cellulaire humain et sous le plancher du canyon, il y a la présence d'une poche hydrophobe qui est occupée par une molécule lipidique (*pocket factor*) pour stabiliser le virion (Colston et Racaniello, 1994 ; Rossmann et al., 2002 ; Racaniello, 2013) (Figures 1B et 1C). La bordure sud du « canyon » est formée d'une boucle particulièrement proéminente de VP2, appelée *puff*, et des boucles de VP3 forment une importante protrusion appelée *knob* (Plevka et al., 2012).

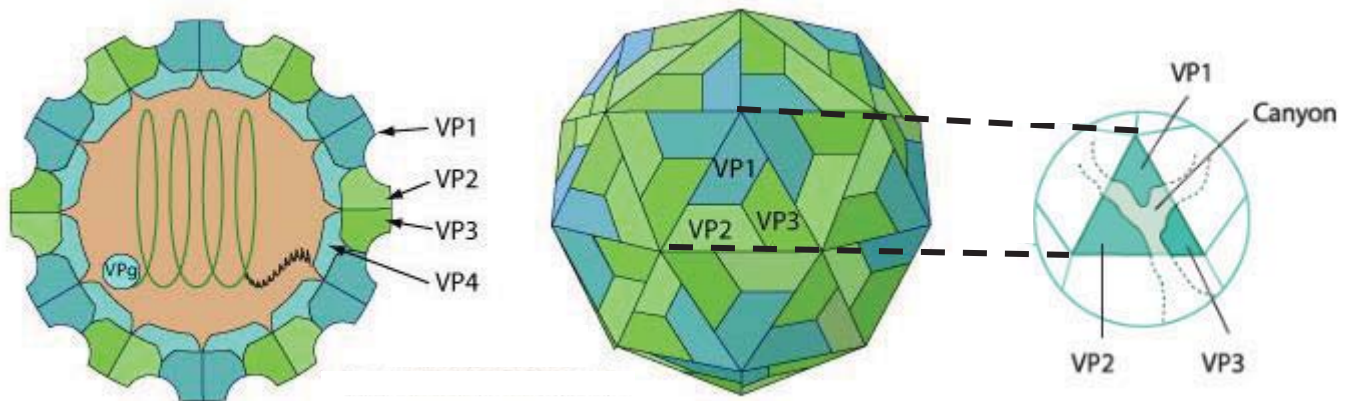
La description de ces différents éléments structuraux a permis de comprendre les nombreux rôles de la capsid (Racaniello, 2013) :

- Protéger le génome viral contre les différents agresseurs environnementaux (nucléases)
- Participer à la réponse immunitaire via la présence de sites antigéniques (boucles peptidiques et extrémités C-terminale). Ces sites antigéniques varient selon les EV et présentent souvent des mutations ponctuelles ce qui explique l'absence d'immunité croisée au sein du genre EV ainsi que les phénomènes d'échappement du système immunitaire
- Reconnaître ses récepteurs cellulaires spécifiques par l'intermédiaire des « *canyons* » et des boucles VP2 et VP3 afin de libérer le génome viral dans les cellules hôtes
- Contenir les informations nécessaires à l'encapsidation du génome viral et à la maturation des virions.

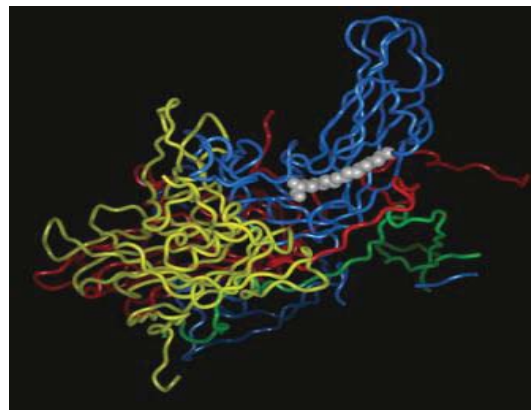
(A)



(B)



(C)



**Figure 1 - Structure de la capside des entérovirus.**

- (A) Représentation de la capside entière de l'extérieur de l'entérovirus D68, de l'entérovirus A71 et du poliovirus type 1 Mahoney (de gauche à droite) après cristallographie (d'après la base de données rscb ; [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)).
- (B) La capside icosaédrique des entérovirus est constituée des protéines structurales VP1 à VP3, qui sont présentes à la surface de la capside formant entre elles une dépression (*canyon*), ainsi que de la protéine structurale VP4, présente sur la surface interne (d'après the Swiss Institute of Bioinformatics 2010 ; [www.viralzone.expasy.org](http://www.viralzone.expasy.org)).
- (C) Vue de côté d'un protomère du poliovirus de type 1 constitué d'une copie des protéines VP1, VP2, VP3 et VP4. Les sphères grises représentent une molécule de sphingosine liée dans la poche hydrophobe qui est située en dessous du plancher du canyon (d'après **Racaniello, 2013**).

## 1.2 Organisation structurale et fonctionnelle du génome viral

Le génome des EV est un ARN monocaténaire, d'environ 7500 nt (7100-7450 nt soit 2138-2214 aa), de polarité positive et infectieux c'est-à-dire qu'il peut être traduit directement pour produire toutes les protéines nécessaires à sa réplication lorsqu'il atteint le cytoplasme de la cellule hôte (**Racaniello, 2013 ; Zell, 2018**). La structure, l'organisation et l'expression du génome des EV, qui a été décrite en premier chez les poliovirus (**Kitamura et al., 1981**), est globalement conservée parmi les picornaviridae (Figure 2A). Il comprend un large cadre de lecture ouvert précédé d'une région 5' non codante et suivi d'une région 3' non codante qui se termine par une queue polyadénylée et peut être résumé par la formule suivante : VPg+5'UTR<sup>IRES-I</sup>[1A-1B-1C-1D/2A<sup>pro</sup>-2B-2C/3A-3B-3C-3D]3'UTR-poly(A) (**Zell, 2018**).

### - Régions non codantes

Les **régions non codantes** (NC) représentent environ 10% de l'ensemble du génome viral. A l'extrémité 5', il existe une région NC, hautement conservée, d'une longueur d'environ 750 nt qui possède plusieurs structures secondaires numérotées de I à VI en forme de tige-boucle (*stem-loop*). La structure I forme un élément multifonctionnel en 5' terminal sous la forme d'un trèfle (Ori L) qui intervient dans la traduction et la réplication du génome viral (**Andino et al., 1990 ; Garmanik et Andino, 1998 ; Vogt et Andino, 2010**). Les structures (II à IV) forment un site d'initiation interne de la traduction (IRES), qui va amarrer les ribosomes sur l'ARN viral et différents inducteurs cellulaires de la traduction. Cette région IRES est obligatoire pour la traduction du génome viral à cause de l'absence de coiffe en 5'NC (**Pelletier et Sonnenberg, 1988 ; Fernandez-Miragall et al., 2009 ; Balvay et al., 2009**). Une petite protéine dénommée VPg est liée de façon covalente avec cette région 5' NC et elle est libérée après clivage par la protéase cellulaire TDP2 (5'-tyrosyl-DNA phosphodiesterase-2) (**Virgen-Slane et al., 2012**) pour donner un ARNm fonctionnel. A l'autre extrémité 3', il existe également une région NC, d'une longueur d'environ 300 nt, sur laquelle on retrouve des motifs secondaires conservés qui forment un élément *cis* régulateur (Ori R). Cet élément est impliqué dans la production de l'antigénome viral en collaboration avec la région 5'NC via une circularisation du génome viral (**Pilipenko et al., 1996 ; Zoll et al., 2009**). La queue polyadénylée, d'une longueur de 20 à 150 nt selon les EV, influence l'efficacité de la traduction et de la réplication virale (**Silvestri et al., 2006**).

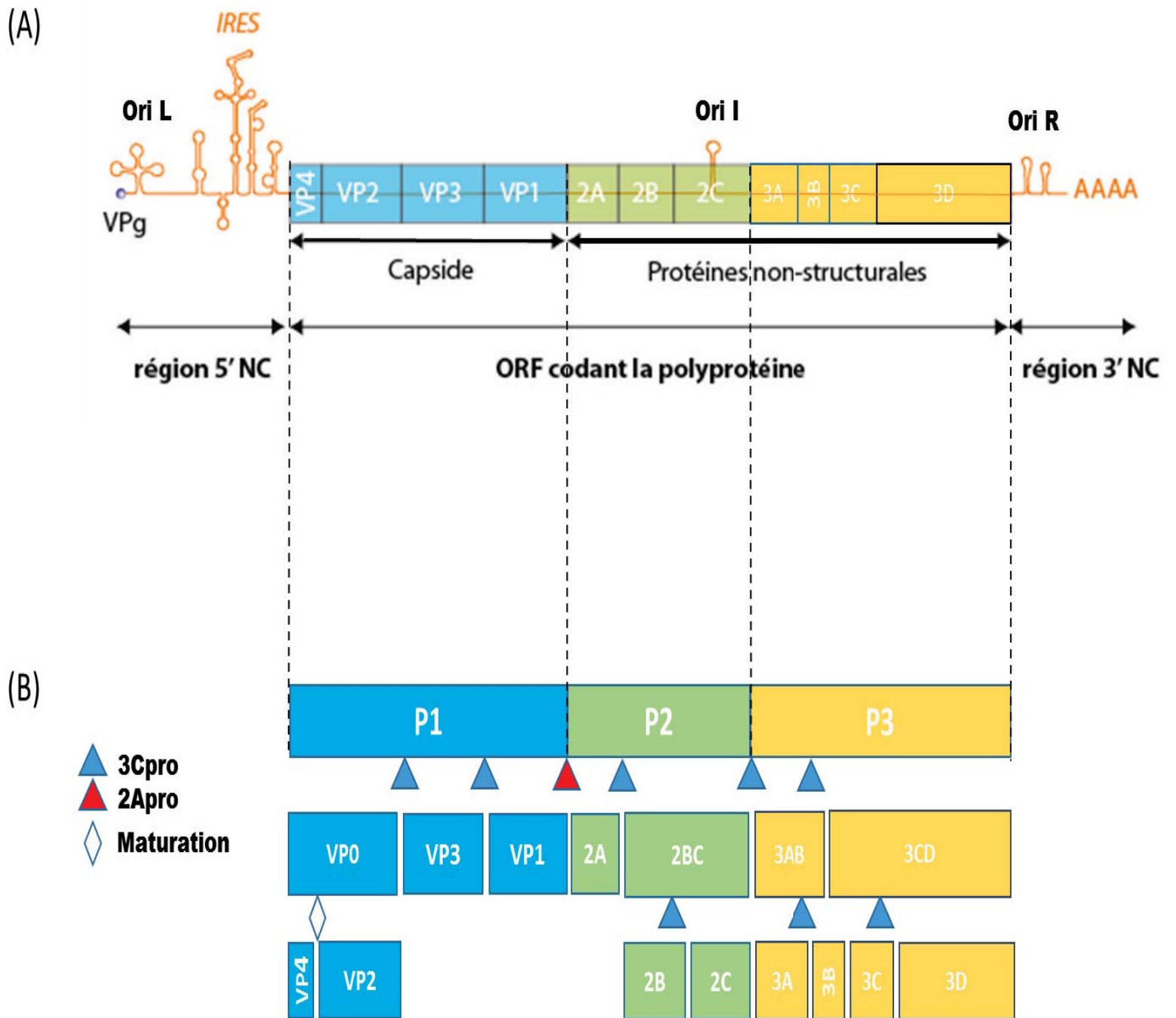
- Cadre ouvert de lecture

Les régions NC encadrent un cadre de lecture ouvert (ORF) unique d'une longueur d'environ 6400 nt. Cette région génomique est traduite en une polyprotéine d'environ 250 kDa contenant une région structurale (P1) et deux régions non structurales (P2 et P3). La maturation est assurée par les protéases virales et génère 11 polypeptides viraux fonctionnels (**Racaniello, 2013**) (Figure 2B).

- La région P1 possède les quatre gènes (1A à D) codant respectivement les protéines structurales de la capsid : **VP4, VP2, VP3 et VP1**. Dès que P1 est libéré du reste de la polyprotéine par la protéase 2A, il est à son tour clivé en VP0, VP3 et VP1 par la protéase 3C, VP0 donnant ultérieurement VP4 et VP2 lors de l'assemblage du virion.
- Les régions P2 et P3 contiennent les gènes codant pour 7 protéines non structurales :
  - ⇒ **2Apro** et **3Cpro** sont des protéases impliquées dans l'auto-clivage de la polyprotéine virale, mais elles clivent également plusieurs protéines de la cellule hôte afin de favoriser la production de nouvelles particules virales (**Sun et al., 2016 ; Laitinen et al., 2016**).
  - ⇒ **3B (VPg)** participe, après avoir été polyuridylée, directement à la réplication du génome viral en servant d'amorce à l'ARN polymérase-ARN dépendante (**Paul et al., 1998**). Un élément cis régulateur (Ori I) présent dans le gène 2C sert de matrice pour l'uridylation de cette protéine (**Zoll et al., 2009**).
  - ⇒ **3Dpol** possède une fonction ARN polymérase-ARN dépendante dépourvue d'activité éditrice et permet l'uridylation de la protéine VPg (**Neufeld et al., 1991, Paul et al., 1998**).
  - ⇒ **2B, 2C et 3A**, via leur fixation aux différentes membranes cellulaires, sont impliquées dans l'inhibition des fonctions cellulaires et participent à la réplication du génome viral (**Choe et al., 2005, Van der schaar et al., 2016**).

La protéine codée par les gènes 3CD assure une activité protéase importante pour la maturation des protéines structurales (**Ypma-Wong et al., 1988**) et contrôle la balance réplication-traduction du génome viral (**Garmanik et Andino, 1998**).





**Figure 2 - Organisation structurale et fonctionnelle du génome des entérovirus.**

- (A) Représentation du génome viral avec les différentes régions génomiques et ses principales structures secondaires (adaptée du site internet [www.virologie-uclouvain.be](http://www.virologie-uclouvain.be), consulté le 05/07/2018).
- (B) Le cadre de lecture ORF code pour une polyprotéine contenant une région structurale (P1) et deux régions non structurales (P2 et P3). Elle est ensuite clivée, via des protéases virales (triangle rouge pour 2Apro et triangle bleu pour 3Cpro), en différents intermédiaires protéiques jusqu'à obtention de 11 protéines virales fonctionnelles. La protéine VP0 est clivée en protéines VP4 et VP2 via un processus encore non connu lors de la maturation du provirion (d'après **Zell et al., 2017**).

## 2. Classification

La classification des EV a connu de nombreuses modifications depuis la découverte de ces virus et elle est réactualisée régulièrement par le Comité International de Taxonomie Virale, suite aux avancées technologiques et à la découverte de nouveaux virus. Cette classification avait été établie initialement en prenant en compte des caractères phénotypiques (**Pallansch et al., 2013**) :

- caractérisation des poliovirus, coxsackievirus A et B et des echovirus en fonction de leur pathogénicité chez l'Homme et l'animal
- définition de sérotypes, au sein de chaque groupe, en fonction de leurs propriétés antigéniques. Ces propriétés antigéniques étaient recherchées par séroneutralisation à l'aide de pools d'antisérum constitués à partir des souches prototypes de différents sérotypes d'EV (**Lim et Benyesh-Melnick, 1960**).

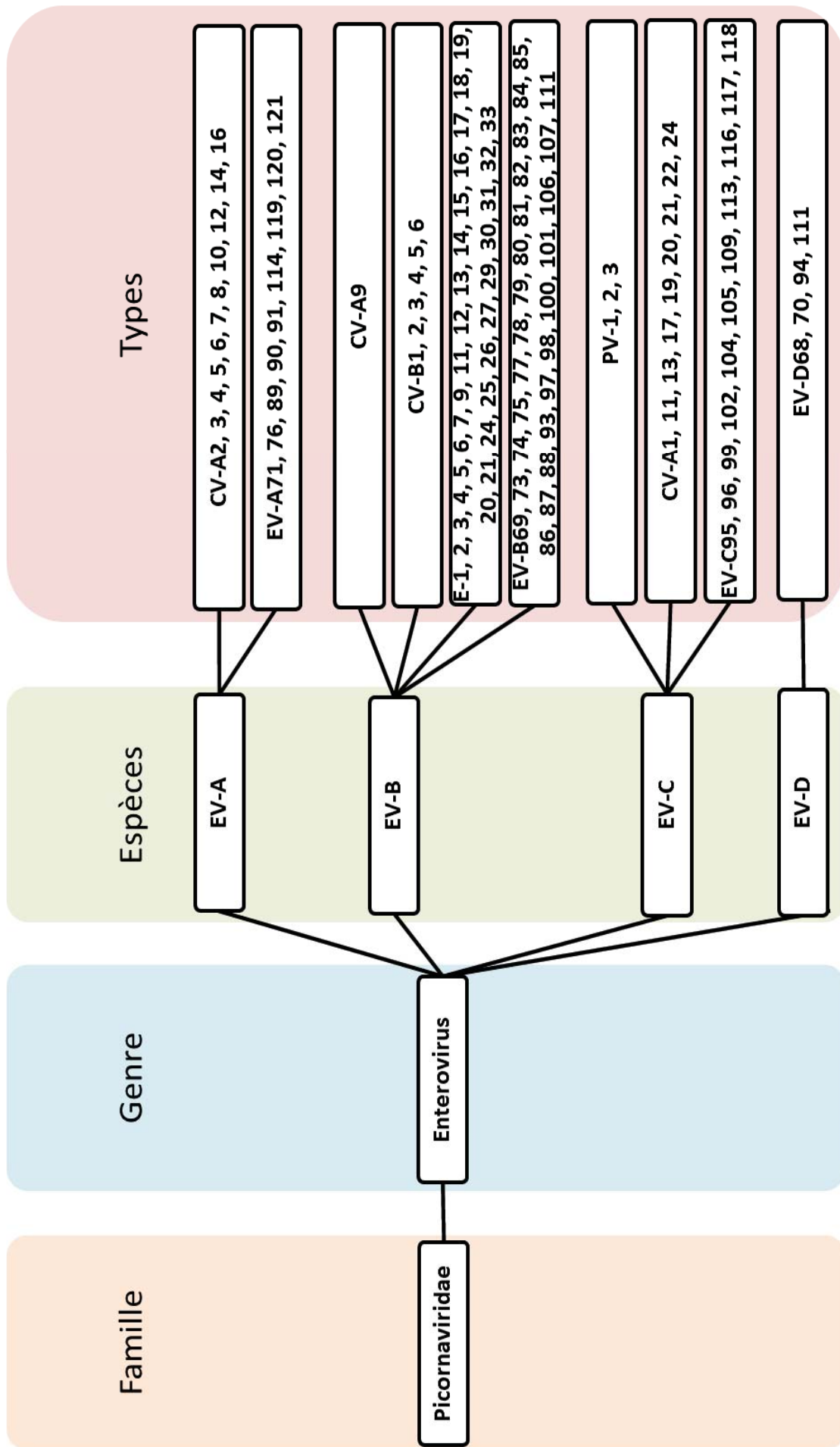
Le typage moléculaire a progressivement remplacé la séroneutralisation du fait de l'avènement de techniques moléculaires plus simples d'utilisation, rapides et sensibles et de la difficulté d'interprétation croissante des profils de séroneutralisation notamment due aux variations antigéniques des souches en circulation par rapport aux souches prototypes. L'exploitation des données moléculaires a permis de montrer de nouveaux liens de parenté entre certains EV isolés chez des hôtes d'espèces différentes ou d'exclure certains virus du genre EV (echovirus 22 et 23 classés dans un nouveau genre nommé parechovirus (**Peigue-Lafeuille et al., 2016**)). La classification récente des EV est basée sur leur degré de parenté génétique par des méthodes de phylogénie moléculaire qui réalisent la comparaison sur plusieurs régions génomiques des différentes souches prototypes. La discrimination des anciens sérotypes et des nouveaux types est meilleure sur la région génomique P1, excepté pour le gène 1A codant la protéine de capsid VP4 (**Pallansch et al., 2013**). La classification récente des EV est basée sur le séquençage du gène 1D codant la protéine de capsid VP1.

En 2018, le genre EV est un des 40 genres de la famille des Picornaviridae ([www.picornaviridae.com](http://www.picornaviridae.com); consulté le 28/11/2018). Le terme Picornaviridae est issu de l'acronyme Pico (qui correspond au grec ancien au préfixe du Système international d'unités (SI) qui représente  $10^{-12}$  fois l'unité) ainsi que du type d'acide nucléique qui constitue leur génome viral (RNA correspondant à l'ARN). Cette famille virale possède une importante

diversité et elle inclut les plus petits pathogènes humains et animaux connus (30 nm de diamètre).

Les espèces sont définies par plusieurs critères : au moins 45% de différence au niveau nucléotidique sur le gène 1D<sup>VP1</sup> ou 40% de différence d'acides aminés sur la région P1. Deux souches sont considérées comme homotypiques (de même type) si elles présentent plus de 75% de similitude nucléotidique ou de 88% en acides aminés sur le gène 1D<sup>VP1</sup> (**Pallansch et al., 2013 ; Zell, 2018**). L'analyse moléculaire peut permettre de caractériser, au-delà du type, des liens de parenté entre différentes souches. Néanmoins, ces niveaux taxonomiques inférieurs qui possèdent divers dénominations selon les auteurs (génotypes, génogroupes, clades, ...) ne sont pas formellement définis.

Actuellement, le genre EV comprend 15 espèces dont 7 sont retrouvés chez l'Homme : 4 espèces d'entérovirus (EV-A à D) qui regroupent 106 types d'EV humains (Figure 3) dont 20 types au sein de l'EV-A, 59 types pour l'EV-B, 23 types pour l'EV-C et seulement 4 types pour l'EV-D et 3 espèces de rhinovirus (RV-A à C). Les groupes définis par l'ancienne classification se répartissent au sein de ces différentes espèces d'EV : les poliovirus font partie des EV-C, les coxsackievirus A se retrouvent au sein des espèces EV-A à C et les coxsackievirus B et les echovirus sont regroupés dans l'espèce EV-B. Les nouveaux EV qui étaient non classés dans ces anciens groupes sont nommés EV, suivis de leur espèce ainsi que de leur numéro d'ordre de découverte (EV-D68, EV-A70, EV-A71, ...) et ils sont classés dans les 4 espèces d'EV.



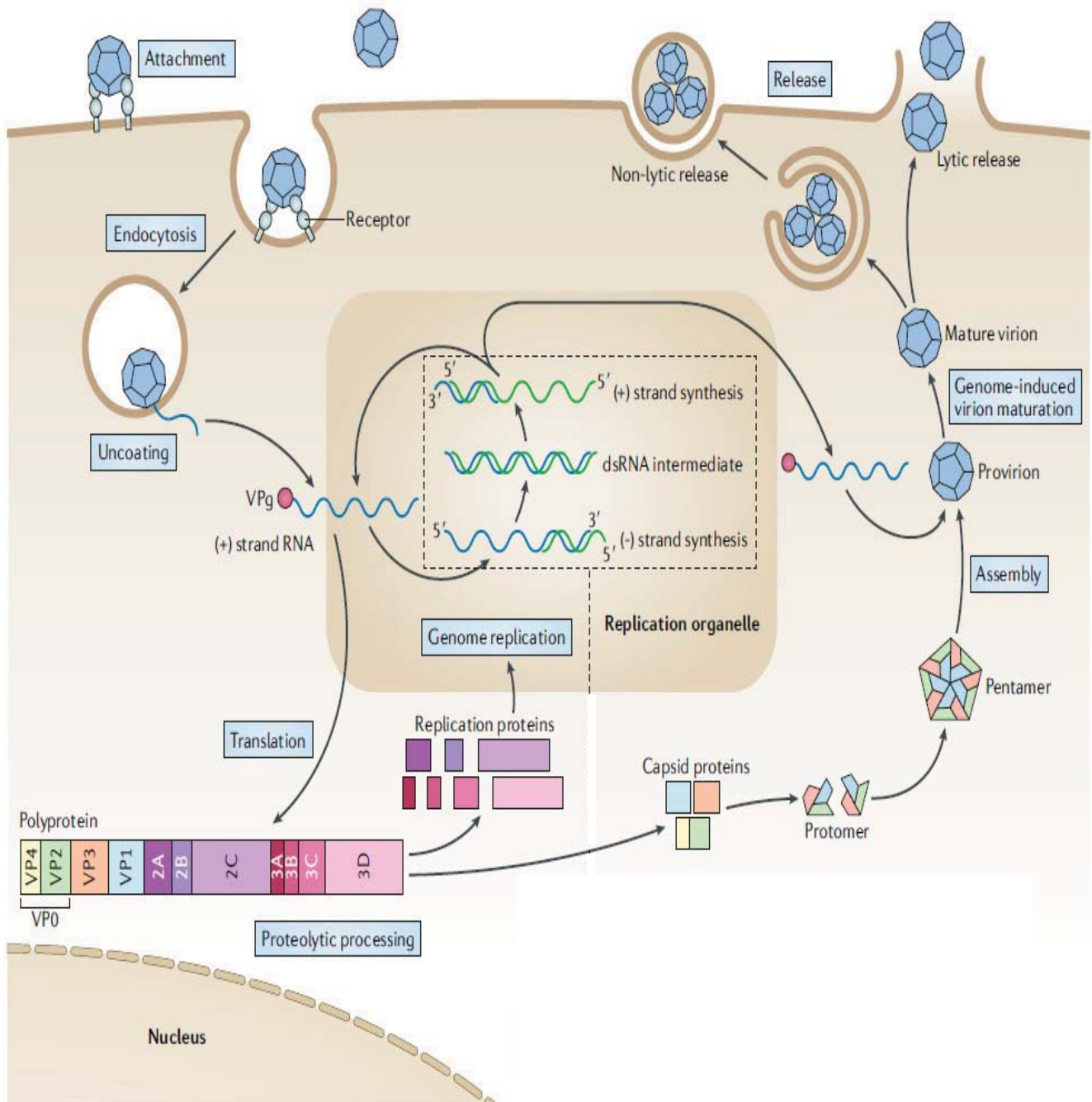
**Figure 3 - Classification des 106 types d'entérovirus humains** (d'après [www.picornaviridae.com](http://www.picornaviridae.com), consulté le 28/11/18) (CV-A : Coxsackievirus A, EV : Entérovirus, CV-B : Coxsackievirus B, E : Echovirus, PV : Poliovirus).

### 3. Cycle de réplication des entérovirus

Le cycle de multiplication des EV correspond à celui des membres de la famille des picornaviridae et se déroule totalement dans le cytoplasme de la cellule hôte (Figure 4). La durée de ce cycle varie entre 5 et 10 heures et dépend de plusieurs paramètres comme la température, le pH, les cellules hôtes et la multiplicité d'infection (**Racaniello, 2013**). Bien que ces virus aient été largement étudiés, certains aspects du cycle viral sont encore mal compris. Plusieurs étapes successives vont se dérouler lors de l'infection cellulaire des EV : phases d'initiation, de réplication et de libération. La multiplication des EV au niveau cellulaire va entraîner de nombreuses modifications morphologiques traduisant l'effet cytopathogène (ECP) du virus ainsi que fonctionnelles par l'inhibition de plusieurs fonctions de la machinerie cellulaire.

#### 3.1 Phase d'initiation

Lors de la phase d'initiation, les EV vont se fixer sur les récepteurs cellulaires spécifiques présents sur la surface des cellules provoquant l'internalisation par endocytose de la particule virale puis la libération du génome viral dans le cytoplasme cellulaire après réarrangement et déstabilisation de la capsid virale. La disponibilité d'un récepteur spécifique des EV à la surface cellulaire détermine leur tropisme viral et leur pathogénèse mais la présence de ces récepteurs cellulaires ne suffit pas toujours à expliquer le pouvoir pathogène de ces virus. Chez les souris transgéniques, une expression du récepteur spécifique des poliovirus (PVR, *Poliovirus Receptor*) a été retrouvée à des degrés variables dans de nombreux types cellulaires : les neurones, les lymphocytes T en développement dans le thymus, les cellules épithéliales du rein, les cellules alvéolaires dans les poumons, les cellules endocrines dans les surrénales et à des niveaux faibles dans l'intestin, la rate et le muscle squelettique. Néanmoins, après infection, la réplication du poliovirus n'a été détectée que dans les cellules du système nerveux central (SNC) (**Racaniello 2013**). Ce tropisme restreint est régulé par la réponse IFN de type I qui limite la réplication virale dans les tissus extra-neuronaux (**Ida-Hosonuma et al., 2005**).



**Figure 4 - Cycle de répliation des entérovirus.**

Après liaison des EV aux récepteurs cellulaire et absorption endocyttaire dans la cellule, un changement de conformation de la particule virale va permettre la libération du génome dans le cytoplasme de la cellule. Le génome est directement traduit en une seule polyprotéine qui sera clivée pour générer les différentes protéines virales nécessaires à sa répliation. La répliation de l'ARN génomique commence par la synthèse d'un antigénome de polarité négative qui sert de matrice à la synthèse de nouvelles molécules d'ARN de polarité positive. Les protéines de capside et les molécules d'ARN de polarité positive néoformées s'assemblent en provirions qui vont ensuite être maturés et libérés de la cellule (d'après **Baggen et al., 2018**).

### 3.1.1 Attachement cellulaire : récepteurs / co-récepteurs

L'attachement du virus sur la cellule cible se produit *via* l'interaction des projections (boucles) ou dépressions de la capsid virale (canyon) avec un (ou des) récepteur(s) spécifique(s) de la cellule. Les EV sont susceptibles de recruter une large gamme de récepteurs membranaires (Tableau 1). Certains récepteurs sont spécifiques à un faible nombre d'EV et d'autres récepteurs peuvent fixer de nombreux types d'EV.

Ces récepteurs comprennent ceux de la superfamille des immunoglobulines qui vont interagir avec le « *canyon* » de la capsid virale. Ils regroupent principalement PVR qui est le récepteur spécifique des 3 types de poliovirus, CAR (*Coxsackie Adenovirus Receptor*) qui est le récepteur principal des coxsackievirus B et ICAM-1 et 5 (*InterCellular Adhesion Molecule*) qui sont respectivement les récepteurs des coxsackievirus A et de l'EV-D68. D'autres récepteurs ont aussi été décrits mais dont leur rôle exact dans l'infection par les EV reste peu connu : des intégrines, des acides sialiques, des sulfates d'héparane, des effecteurs de la voie endo-lysosomale (*SCAvenger Receptor class B member 2* (SCARB2)), des molécules d'adhésion cellulaire (*P-selectin glycoprotein ligand-1* (PSGL1)), des facteurs du complément (*Decay Accelerating Factor* (DAF)) et des annexines (Anx2).

Il existe deux catégories de récepteurs : (1) les récepteurs majeurs ou « *uncoating* » qui induisent des changements conformationnels dans la capsid virale et qui interviennent dans le processus de décapsidation, (2) les récepteurs d'attachement ou co-récepteurs qui concentrent les virus à la surface cellulaire facilitant ainsi leur fixation et potentialisent leur entrée. Pour certains EV, leur fixation à un seul type de récepteur est suffisante pour assurer leur pénétration à l'intérieur de la cellule. Pour d'autres, l'implication d'un co-récepteur est nécessaire. Par exemple, la fixation uniquement au récepteur DAF ne permet pas l'internalisation des particules virales et suggère que le récepteur DAF n'est qu'un récepteur d'attachement ubiquitaire. L'interaction du CV-A21 sur le récepteur DAF n'est pas suffisante pour permettre l'internalisation, il faut la présence concomitante du récepteur ICAM-1 pour permettre l'infection (Shafren et al., 1997). L'expression de l'intégrine  $\alpha V\beta 6$ , en complément du récepteur DAF, a montré une augmentation de l'infection des cellules humaines de cancer du côlon par le CV-B1 (Agrez et al., 1997).

**Tableau 1 - Principaux récepteurs cellulaires utilisés par les entérovirus en fonction de leur type.**

Nature	Récepteur/Co-récepteur	Types d'EV	Références
Superfamille des immunoglobines	PVR (CD155)	Poliovirus 1,2,3	Mendelsohn et al., 1989
	ICAM-1 (CD54)	CV-A11 (ex CV-A15), CV-A13, CV-A18, CV-A20, CV-A21	Shafren et al., 1997; Newcombe et al., 2003
	ICAM-5 (telencephaline)	EV-D68	Weil et al., 2016
	CAR	CV-B1, CV-B2, CV-B3, CV-B4, CV-B5 et CV-B6	Martino et al., 2000
Intégrines	$\alpha V\beta 3$	CV-A9, E-7, E-9, E-11, E-25, E-30, E-32	Paananen et al., 2003; Heikkila et al., 2009; Ylipastoo et al., 2010
	$\alpha 2\beta 1$	E-1, E-8	Bergelson et al., 1993
	$\alpha V\beta 6$	CV-A9	Heikkila et al., 2009
Acides sialiques	$\alpha 2,3$ $\alpha 2,6$	EV-A70, EV-A71, EV-D68, EV-D70, CV-A24	Nokhbeh et al., 2005; Nilsson et al., 2008; Yang et al., 2009; Weil et al., 2016
	/	CV-B3, E-5, E-6, EV-A71	Zautner et al., 2006; Israelsson et al., 2010; Tan et al., 2013
Effecteur voie endo-lysosomale	SCARB2	CV-A7, CV-A14, CV-A16, EV-A71	Yamayoshi et al., 2012
Molécule d'adhésion	PSGL1 (CD162)	CV-A2, CV-A7, CV-A10, CV-A14, CV-A16 et EV-A71	Nishimura et Shimizu, 2012; Yamayoshi et al., 2013
Facteur du complément	DAF (CD55)	CV-A21, CV-B1, CV-B3, CV-B5, E-3, E-6, E-7, E-11, E-12, E-13, E-19, E-20, E-21, E-25, E-29, E-30, E-33, EV-D68, EV-A70	Karnauchow et al., 1996; Shafren et al., 1997; Powell et al., 1998; Blomqvist et al., 2002
Annexines	Anx2	EV-A71	Yang et al., 2011

Abréviations : PVR : Poliovirus Receptor, ICAM : InterCellular Adhesion Molecule, CAR : Cocksackie Adenovirus Receptor, SCARB2 : SCAvenger Receptor class B member 2, PSGL-1 : P-selectin glycoprotein ligand-1, DAF : Decay Accelerating Factor, CV-A : Cocksackievirus A, EV : Entérovirus, CV-B : Cocksackievirus B, E : Echovirus.



### 3.1.2 Internalisation, décapsidation et libération du génome viral

Les EV peuvent infecter le cytoplasme de la cellule soit en traversant directement la membrane cytoplasmique, soit en utilisant les membranes d'organites internes (endosomes, réticulum endoplasmique, cavéosomes, ...) après une ou plusieurs voies d'endocytose. Les EV privilégient les voies d'endocytose et l'activation d'une voie par rapport à une autre dépend de l'EV, du récepteur et de la cellule hôte (**Pelkmans et Helenius, 2003**). L'endocytose du virus permet un accès direct au cytoplasme à travers les membranes cellulaires et le cytosquelette cortical, ces différentes barrières rencontrées au cours de l'infection permettent de retarder la détection du virus par le système immunitaire. De plus, les vésicules d'endocytose contiennent des enzymes (protéases) qui sont nécessaires à l'entrée et à la décapsidation du virus. Les mécanismes de signalisation intracellulaire induits par l'interaction EV-récepteur sont complexes et reposent sur l'activation de kinases (tyrosines kinases majoritairement). Leurs activations vont à leur tour induire une cascade de signalisations à travers le cytoplasme jusqu'au noyau permettant le recrutement de seconds messagers tels que le calcium, de petites GTPases appartenant à la superfamille des protéines Ras ainsi que de nombreux autres régulateurs du transport cellulaire et de la réorganisation des fibres constitutives du cytosquelette dont les filaments d'actine (**Coyne et al., 2007 ; Karjalainen et al., 2008 ; Bozym et al., 2010**). Diverses protéines comme la clathrine, la cavéoline, la dynamine, ou d'autres médiateurs notamment lipidiques sont recrutés au niveau de la membrane cellulaire et sont capables d'induire une réorganisation du cytosquelette basal permettant le transfert de vésicules néo-formées à travers le cytoplasme qui permet l'internalisation du virus par endocytose.

Le mécanisme de décapsidation, étudié principalement chez les poliovirus, suit plusieurs étapes qui déstabilisent progressivement la particule virale et conduisent à la libération du génome. La fixation de la capsid virale au récepteur cellulaire, majoritairement au niveau du « *canyon* », provoque l'expulsion du *pocket factor*, l'effondrement de la poche hydrophobe et la déstabilisation de la capsid virale. En plus de la liaison au récepteur, certains EV s'appuient sur l'acidification endosomale pour amorcer la décapsidation. La capsid virale va devenir plus hydrophobe suite à des changements conformationnels qui sont caractérisés par l'expansion de la capsid, l'externalisation de l'extrémité N-terminale de la protéine VP1 ainsi que par la perte de la protéine VP4 provoquant une réduction du virion mature de 160S à une particule virale A altérée de 135S (Figure 5A). La partie N-terminale de la protéine VP1 et la

protéine VP4 s'insèrent dans la membrane plasmique cellulaire créant un canal hydrophile qui assure la translocation de l'ARN viral vers le cytoplasme (Figure 5B) (**Hogle, 2002 ; Baggen et al., 2018**).

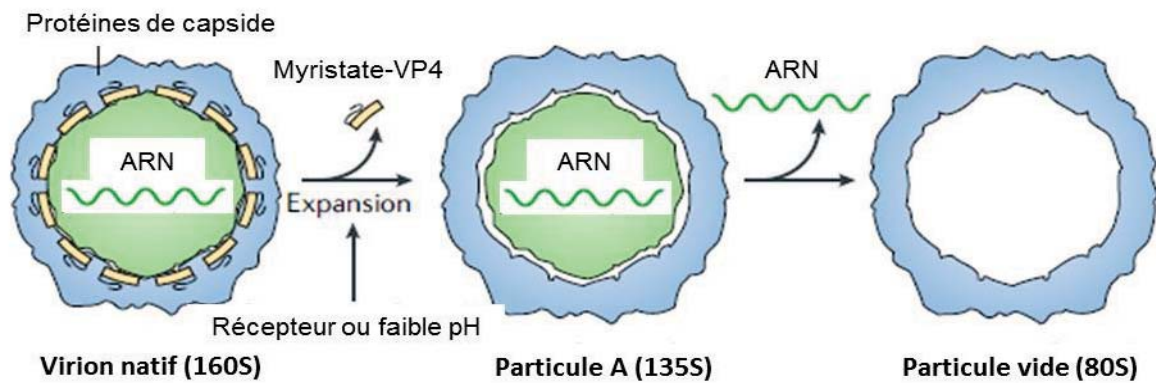
### 3.2 Phase répllicative

Bien que les EV utilisent des récepteurs différents et des voies d'entrée différentes, de nombreuses étapes après l'entrée de l'ARN dans le cytoplasme de la cellule sont hautement conservées. Après sa libération dans le cytoplasme, le génome viral est tout d'abord traduit, du fait de l'absence de protéines non structurales véhiculées dans la capsid virale (à l'exception de la protéine VPg liée à l'extrémité 5' du génome viral), puis des copies de l'ARN viral sont synthétisées en quantité importante avant d'être encapsidées pour former de nouveaux virions.

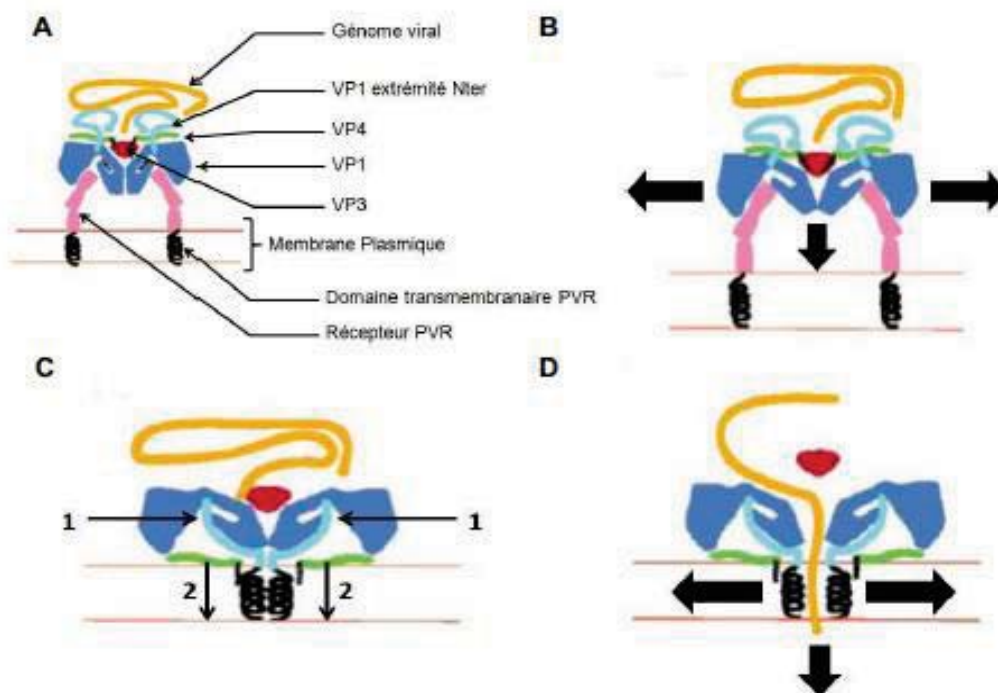
#### 3.2.1 Traduction du génome viral

Après clivage de VPg lié à la région 5' NC, l'ARN viral, de polarité positive, est directement traduit à partir du cadre de lecture ouvert (ORF), en une grande polyprotéine. Dès que les protéases virales 2Apro, 3Cpro et 3CDpro sont formées, cette polyprotéine subit immédiatement une série de clivages co-translationnels en 11 polypeptides viraux fonctionnels (Figure 2B). Cette traduction est médiée par un mécanisme coiffe-indépendant qui repose sur la capacité de la séquence IRES à recruter les ribosomes notamment les sous unités 40S (**Pelletier et Sonnenberg, 1988**). Plusieurs mécanismes vont permettre de potentialiser et d'optimiser la traduction du génome viral des EV au sein de la cellule infectée. La protéase 2Apro clive plusieurs facteurs cellulaires dont le facteur d'initiation de la traduction eIF4G, ce qui inhibe la traduction des ARNm cellulaires dépendant de la coiffe et potentialise la traduction des ARN viraux (**Gradi et al., 1998, Kempf et Barton, 2008a**). De plus, des protéines chaperonnes d'origine cellulaire telles la protéine PTB (*Polypyrimidine-Tract-Binding protein*) ou la protéine PCBP2 (*Poly(rC)-Binding Protein*) maintiennent la stabilité de la séquence IRES afin d'interagir avec la machinerie traductionnelle ou encore protègent le génome viral d'une action exonucléasique 5' ciblant les ARN dépourvus de coiffe (**Blynn et al., 1997 ; Kempf et Barton, 2008b ; Kafasla et al., 2010, Dave et al., 2017**).

(A)



(B)



**Figure 5 - Mécanisme de libération du génome des entérovirus.**

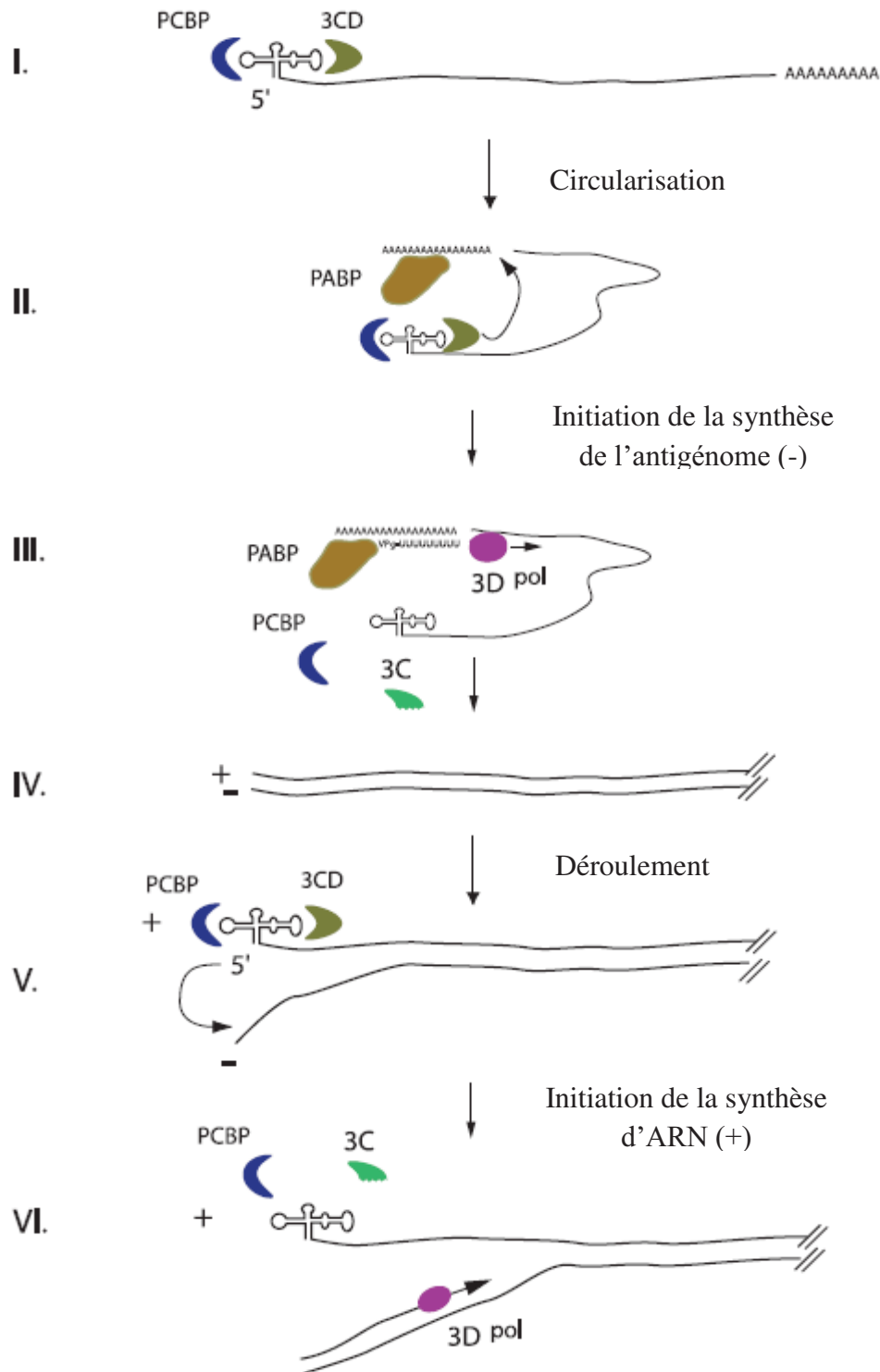
(A) Représentation des différents types de particules virales observés lors de la décapsidation du génome viral *in vitro*, avec leurs coefficients de sédimentation respectifs entre parenthèses (d'après **Baggen et al., 2018**). La liaison aux récepteurs et/ou le faible pH induisent des changements conformationnels de la capsidie qui convertissent le virion natif en une particule altérée (particule A) : l'expansion de la capsidie, l'externalisation de l'extrémité N-terminale de la protéine VP1 et la libération de la protéine VP4. La libération ultérieure du génome d'ARN donne une particule virale vide.

(B) Modèle du mécanisme de libération du génome des poliovirus dans le cytoplasme cellulaire (d'après **Hogle et al., 2002**). Après attachement du virus à son récepteur PVR (A), des changements conformationnels de la capsidie se produisent notamment une expansion de la capsidie (B) permettant l'insertion de l'hélice amphiphatique N-terminale de VP1 [1] et du groupe myristate de VP4 [2] dans la membrane plasmique (C). Ces insertions provoquent la formation d'un pore qui va par la suite s'ouvrir (peut être grâce à un flux concentré de  $Ca_{2+}$ ), dégageant le bouchon formé par la protéine VP3 et permettant ainsi la translocation du génome viral dans le cytoplasme (D).

### 3.2.2 Réplication du génome viral

La réplication du génome viral débute par la synthèse d'ARN viral à polarité négative qui servira ensuite de matrice pour synthétiser de nouveaux ARN viraux de polarité positive. Cette réplication est dépendante de la protéine 3Dpol qui est une ARN polymérase ARN dépendante (Neufeld *et al.*, 1991) et nécessite des organites de réplication virale. Ces organites sont des structures tubulo-vésiculaires dérivées des membranes du réticulum endoplasmique et/ou de l'appareil du Golgi formés sous l'action de plusieurs protéines virales telles que 3A, 2B et 2C (Van der schaar *et al.*, 2016). Le génome viral des EV peut servir de matrice soit pour la traduction virale sous forme d'ARNm soit pour la réplication virale après la synthèse intermédiaire d'un antigénome de polarité négative. Ces deux mécanismes ne se déroulent pas de manière concomitante et leur régulation est réalisée principalement par la quantité de protéines virales produites. La protéine intermédiaire 3CDpro va réprimer la traduction et stimuler la synthèse du brin négatif de l'ARN viral (Garmanik *et Andino*, 1998). Néanmoins, des phénomènes de collision entre les ribosomes et la polymérase virale pourraient exister (Racaniello, 2003).

La synthèse de l'antigénome de polarité négative débute par la mise en jeu d'interactions entre le complexe PCBP/3CDpro lié à la région 5'NC et la protéine PABP (*Poly-A Binding Protein*) liée à la région 3'NC. Ces interactions provoquent une circularisation du génome viral et génèrent un complexe d'initiation par le rapprochement des séquences Ori L et Ori R. La protéine 3Dpol polyuridyle la protéine VPg au niveau de la séquence Ori I puis sa forme polyuridylée va se lier sur la queue polyadénylée pour servir d'amorce à la synthèse du brin complémentaire par la polymérase virale 3Dpol. Les hétéroduplexes (ARN bicaténaires contenant un brin d'ARN positif et un brin d'ARN négatif) constituent les formes répliquatives et ils sont dissociés par la protéine virale 2C via sa fonction hélicase, ce qui permet de libérer le brin d'ARN positif. La protéine VPg polyuridylée est recrutée au niveau de l'extrémité 3' du brin négatif néosynthétisé puis va servir d'amorce pour initier la synthèse d'ARN de polarité positive via 3Dpol (Figure 6) (Pilipenko *et al.*, 1996 ; Paul *et al.*, 1998 ; Zoll *et al.*, 2009 ; Vogt *et Andino*, 2010). La réplication du génome viral est asymétrique puisque la synthèse des brins d'ARN positifs est de 30 à 70 fois supérieure à la synthèse des brins d'ARN négatifs (Novak *et Kirkegaard*, 1991). Les ARN viraux nouvellement synthétisés servent ensuite de matrice pour une traduction et une réplication supplémentaire ou sont encapsidés dans de nouveaux virions.



**Figure 6 - Mécanisme de répllication génomique des entérovirus (d'après Vogt et Andino, 2010).**

La synthèse d'ARN à polarité négative (-) est initiée par la circularisation du brin d'ARN à polarité positive (+) via un pont protéine-protéine formé par l'interaction du complexe ternaire à l'extrémité 5'NC (3CDpro et PCBP liés à la structure de la feuille de trèfle) avec PABP lié à la queue polyadénylée à l'extrémité 3'NC (I + II). La protéine VPg uridylée (VPg-pUpU) va servir d'amorce à la polymérase 3Dpol pour la synthèse de l'antigénome (-) (III), formant un ARN intermédiaire mixte positif-négatif (IV). Cet hétéroduplex va ensuite se dérouler (V) puis l'amorce VPg-pUpU est recrutée sur l'extrémité 3' de l'antigénome (-) afin que le nouveau brin d'ARN (+) soit synthétisé par la polymérase 3Dpol (VI).

### 3.3 Phase de libération

La morphogénèse des virions comprend plusieurs étapes successives : encapsidation du génome viral, maturation des provirions puis libération des virions. L'encapsidation du génome viral est un processus spécifique de telle sorte que ni l'ARN négatif, ni les ARN cellulaires ne peuvent être encapsidés (**Novak et Kirkegaard, 1991**). Récemment, il a été montré que cette spécificité d'encapsidation est régie par une interaction entre la protéine virale 2C, qui est un composant important du complexe de réplication, et les protéines de capsid virale VP1 et VP3 (**Liu et al., 2010 ; Wang et al., 2012**).

#### 3.3.1 Assemblage et maturation des provirions

Une fois que le précurseur protéique P1 est libéré par la protéase 2Apro, les liaisons interprotéiques VP0-VP3 et VP3-VP1 sont clivées par la protéinase 3CDpro. La première unité structurelle est un protomère 5S formé après autoassemblage de ces 3 protéines capsidales puis 5 protomères s'associent en un pentamère 14S (**Palmenberg, 1982**). L'acide myristique joue un rôle dans la stabilisation de ces pentamères et plus récemment, le glutathion pour certains EV (**Moscufo et Chow, 1992 ; Thibaut et al., 2014**). De nombreuses interrogations persistent sur la suite de l'assemblage du provirion et deux modèles ont été proposés. Le premier modèle repose sur l'assemblage de 12 pentamères en une procapside virale vide (80S) qui ensuite recrute spécifiquement l'ARN viral néosynthétisé via une ouverture produisant un provirion (150S) dans laquelle VP0 n'est pas clivée (**Jacobson et Baltimore, 1968**). Le second modèle privilégie un assemblage séquentiel au cours duquel les 12 pentamères s'associent autour du génome viral natif pour former le provirion (**Nugent et al., 1999**). La morphogénèse de particules virales stables et infectieuses (160S), qui s'accumulent dans le cytoplasme cellulaire, est achevée par le clivage de la protéine VP0 en VP4 et VP2 via un processus encore non connu (**Basavappa et al., 1994**).

#### 3.3.2 Libération des virions

Les mécanismes de libération des virions néo formés hors de la cellule hôte restent peu connus. Deux modes de libération des particules virales existent : un mode lytique et un mode non lytique. Les EV sont généralement considérés comme des virus cytolitiques c'est-à-dire

qu'ils lysent leur cellule hôte pour pouvoir libérer les virions. Les EV peuvent initier, inhiber et orienter plusieurs mécanismes de défense impliqués dans la mort cellulaire : l'apoptose, la nécrose et l'autophagie (Agol et al., 2000 ; Lai et al., 2016). L'apoptose survient précocement lors du cycle viral suite à l'inhibition de l'expression de plusieurs gènes cellulaires. A un stade intermédiaire, l'apoptose est inhibée par la multiplication virale, au cours de laquelle la protéine virale 2B serait impliquée, une commutation vers une mort par nécrose avec destruction de la membrane plasmique et libération des nouveaux virions est observée (Van Kuppeveld et al., 1997). Cependant, plusieurs études ont révélé que les EV peuvent également être libérés de manière non lytique notamment par un processus de sortie médiée par les autophagosomes (*autophagosome-mediated exit without lysis (AWOL)*) (Robinson et al., 2014 ; Too et al., 2016). Les EV détournent l'autophagie en régulant positivement la formation d'autophagosomes qui « englobent » des amas de virions. La fusion de ces autophagosomes avec les lysosomes est inhibée par les virus pour empêcher la dégradation de leur contenu. La fusion de la membrane externe d'autophagosomes, riche en virions néoformés, avec la membrane plasmique permet leur expulsion vers le milieu extracellulaire.

#### 4. Evolution et diversité génétique

Les EV sont caractérisés par une très grande plasticité génétique et possèdent en conséquence une importante diversité. L'introduction de mutations ponctuelles et l'échange de segments génomiques par recombinaison sont les deux principaux mécanismes d'évolution des EV lors de la dissémination entre les individus. Ces mécanismes peuvent modifier les caractéristiques antigéniques ou répliquatives des virus et ainsi leur donner des avantages évolutifs en termes de virulence, de tropisme cellulaire, ...

##### 4.1 Les mutations

Au fur et à mesure des cycles viraux, des mutations ponctuelles sont présentes dans les génomes néo-synthétisés et sont produites par la polymérase virale 3Dpol qui est dépourvue d'activité exonucléase correctrice (Figure 7A). Le taux de mutations pour les souches d'EV est l'un des plus élevés parmi les virus à ARN : chez les poliovirus, il est estimé de  $10^{-3}$  à  $10^{-4}$  soit une à deux mutations / génome (Ward et al., 1988). Si un taux de mutations trop élevé

est synonyme d'un grand nombre de virus défectifs et d'une extinction de la souche, les nombreuses erreurs contribuent à créer un mélange de quasi-espèces virales (mutants majoritaires et minoritaires) susceptibles de s'adapter aux multiples environnements et pressions de sélection rencontrés au cours de l'infection (**Domingo et al., 2008 ; Lauring et al., 2013**). Les mutants sont le plus souvent soumis à une sélection négative ou purifiante qui va diminuer la fréquence des mutations délétères pour le virus notamment dans les régions génomiques ayant des fonctions essentielles, comme la reconnaissance d'un récepteur cellulaire ou encore la synthèse d'une protéine enzymatique nécessaire à sa réplication. Néanmoins, une sélection positive peut amener les EV à augmenter la fréquence des mutations avantageuses. Par exemple, la pression du système immunitaire de l'hôte peut amener à la sauvegarde de mutations présentes sur des sites antigéniques impliqués dans la réponse immunitaire, ce qui se traduit par un échappement immunitaire.

#### 4.2 Les recombinaisons

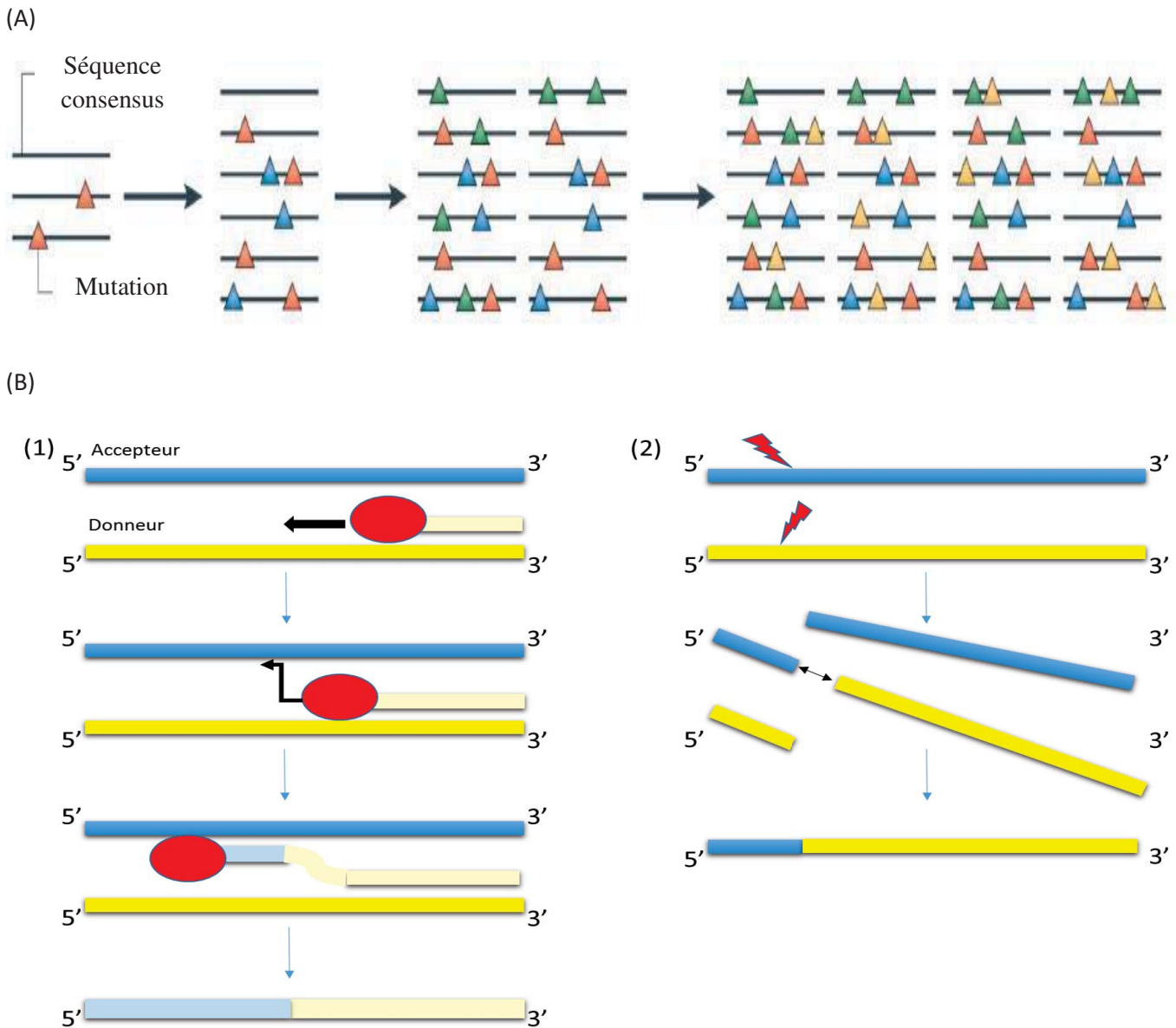
La recombinaison repose sur l'échange de matériel génétique, en cas de co-infection par au moins deux souches d'EV dans la même cellule hôte, et aboutit à la formation de variants recombinants ou mosaïques. La constante co-circulation de plusieurs EV et leur ubiquité parmi les populations humaines fait que les recombinaisons sont très fréquentes. L'importance de ce phénomène en fait un critère de définition de l'espèce EV et Lukashev l'a même défini comme étant « *un nombre fini de gènes de capsid associés à un pool commun de gènes non structuraux constituant un réservoir inépuisable de diversité* » (**Lukashev, 2005 ; Zell, 2018**).

Les recombinaisons se font préférentiellement au sein d'une même espèce et peuvent se réaliser sur l'ensemble du génome. Les zones de recombinaison les plus fréquentes sont les jonctions 5'NC-VP4, P1-P2, P2 (pour les EV-A et B), et P3 pour les EV-C (**Kyriakopoulou et al., 2015**). Deux modèles de recombinaison valides ont été proposés (Figure 7B), cependant il n'est pas possible de conclure lequel d'entre eux est prédominant:

- le modèle « répliatif » ou choix de copie (**Kirkegaard et Baltimore, 1986**) => la recombinaison a lieu au moment de la réplication du génome viral durant laquelle la polymérase 3Dpol « saute » en cours de synthèse d'un brin d'ARN matrice à un autre brin adjacent qui présente une similarité nucléotidique.



- le modèle « non réplcatif » ou rupture-jointure (Gmyl et *al.*, 1999) => la recombinaison se produit en l'absence de réplication et repose sur le clivage puis la ligation à leurs extrémités de différents fragments génomiques, quelle que soit la présence d'activité enzymatique.



**Figure 7 - Mécanismes d'évolution des entérovirus : mutations et recombinaisons.**

(A) La réplication à faible fidélité, impliquant la polymérase virale 3Dpol dépourvue d'activité éditrice, aboutit après plusieurs cycles de réplication à l'obtention d'une population diverse de variants génotypiques uniques tout en maintenant la même séquence de génome consensus. Chaque trait représente un génome viral et les mutations acquises dans chaque cycle de réplication sont représentées par des triangles de couleurs différentes (d'après **Lauring et al., 2013**).

(B) Deux modes de recombinaison ont été décrits :

- Le modèle « choix de copie » (1) (d'après **Kirkegaard et Baltimore, 1986 et Pallansch et al., 2013**)  
Deux génomes parentaux, l'accepteur et le donneur, sont représentés. Au moment de la réplication, l'ARN polymérase (en rouge) va copier l'extrémité 3' de l'ARN donneur puis basculer vers le génome accepteur adjacent. À la suite de ce changement, un ARN recombinant est ainsi formé.
- Le modèle « rupture-jointure » (2) (d'après **Gmyl et al., 1999**)  
La cassure des deux ARN parentaux suivie d'une ligation des deux fragments peut se réaliser en dehors de la réplication.

## II. Infections humaines à entérovirus

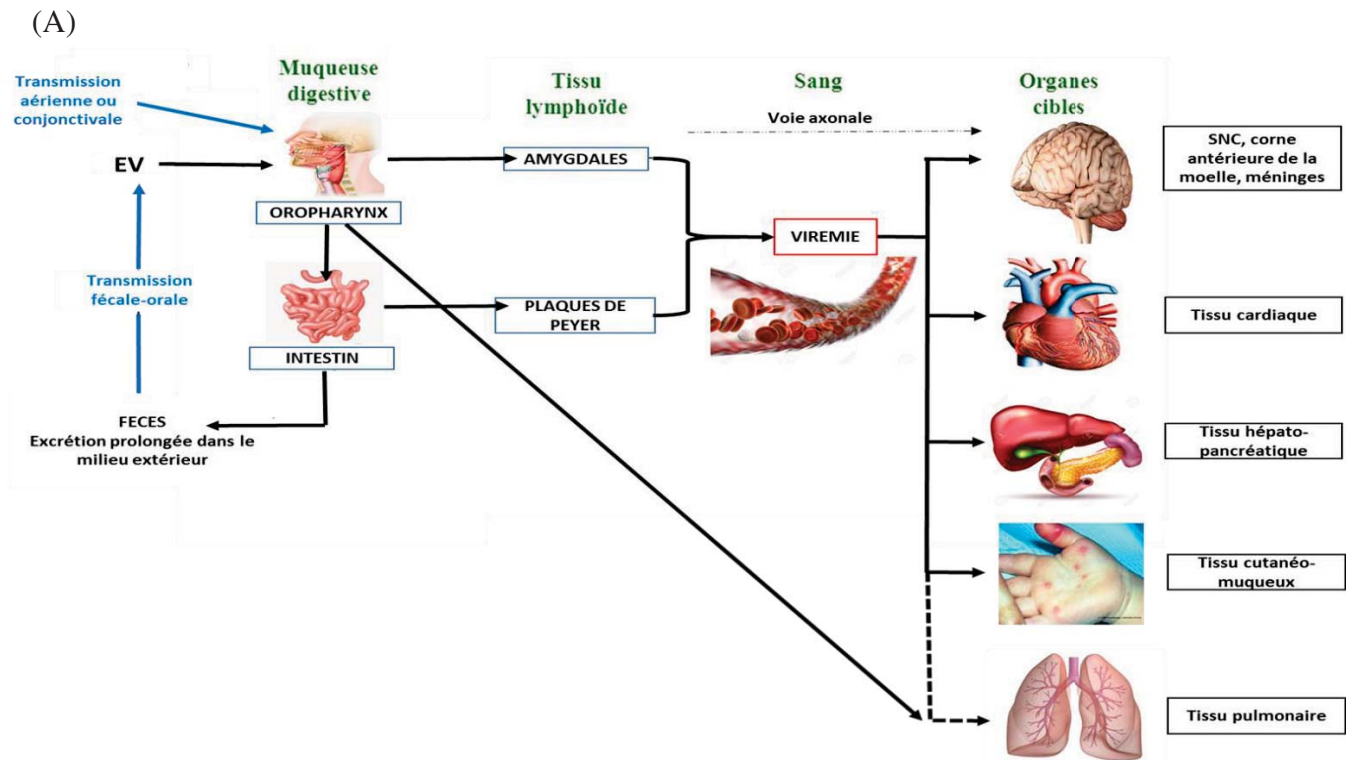
Les EV sont des pathogènes largement ubiquitaires avec une répartition mondiale. L'Homme est le seul réservoir et les infections associées à ces virus sont extrêmement fréquentes en pathologie humaine. Du fait d'une fréquence importante d'infections asymptomatiques et de la mise en place de systèmes de surveillance ciblés (sur une pathologie et/ou un EV en particulier), il est donc difficile de définir une prévalence précise des infections à EV, leur implication est probablement sous-estimée. Néanmoins, on estime qu'il y a 50 millions d'infections à EV chaque année aux Etats-Unis et potentiellement 1 milliard à travers le Monde (**Palacios et Oberste, 2005**).

### 1. Physiopathologie des infections à entérovirus

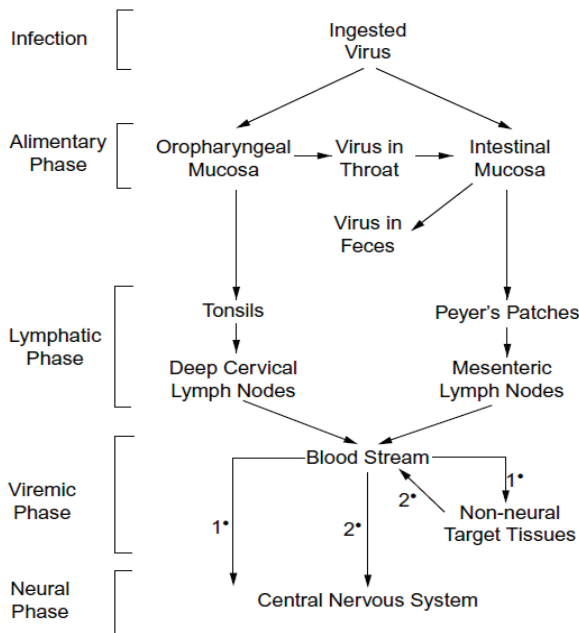
La physiopathologie des infections à EV demeure mal connue et repose sur des données provenant principalement d'études expérimentales portant surtout sur les poliovirus. Pourtant, la compréhension précise de cette physiopathologie est essentielle notamment pour la conception de nouvelles approches thérapeutiques ou diagnostiques.

#### 1.1 Pathogénèse générale

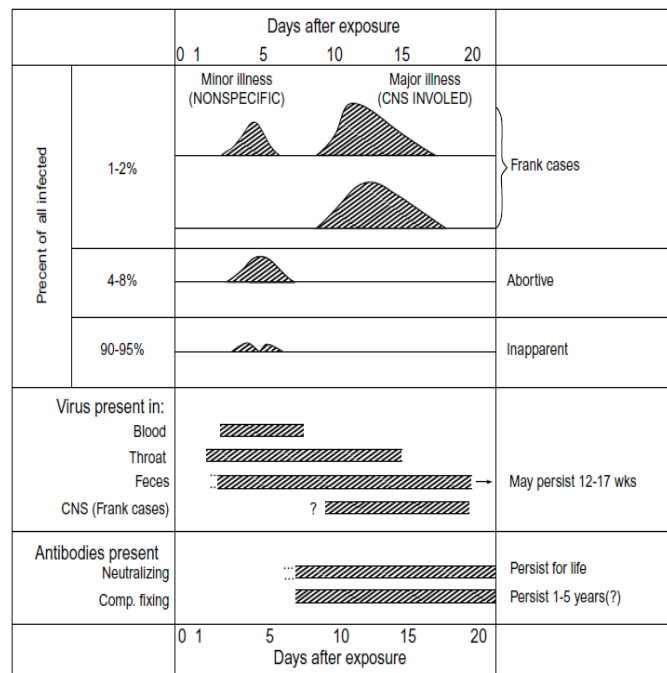
Dans la plupart des cas (hormis les conjonctivites associées à des EV), les EV infectent l'organisme par voie orale (Figure 8A). Ils vont pénétrer dans l'oropharynx et se multiplier dans les sites primaires de réplication présents dans les muqueuses pharyngiennes et intestinales ainsi que dans les tissus lymphoïdes régionaux comme les amygdales et les plaques de Peyer. Ils se propagent ensuite dans les ganglions cervicaux et mésentériques (phase lymphatique) puis ils passent dans le sang (phase virémique) et sont disséminés vers les différents organes ou tissus cibles (méninges, bulbe rachidien, moelle épinière, foie, cœur, pancréas...) (**Melnick et al., 1996 ; Racianello, 2006**). La période d'incubation recouvrant ces différentes phases est d'environ 5 à 14 jours, avec des extrêmes pouvant varier de 2 à 35 jours. La progression du virus vers ces différents tissus dépend du tropisme de la souche et des réponses immunes de l'hôte. Les tableaux cliniques correspondent aux différentes atteintes tissulaires qui sont provoquées soit par la réplication du virus lui-même, soit par la réponse immunitaire de l'hôte.



(B<sub>1</sub>)



(B<sub>2</sub>)



**Figure 8 - Physiopathologie générale des infections à entérovirus.**

(A) Après une contamination préférentiellement fécale-orale, les sites primaires de multiplication sont les tissus muqueux et lymphoïdes de l'oropharynx et de l'intestin grêle. Les EV passent ensuite dans la circulation sanguine (virémie) avant d'atteindre les différents organes ou tissus cibles (système nerveux central (SNC), cœur, foie, pancréas ...).

(B) Représentations schématiques de la pathogénèse de la poliomyélite. (B<sub>1</sub>) Importance de la virémie primaire et secondaire dans l'invasion du SNC. (B<sub>2</sub>) Représentation des différentes formes cliniques, de la présence des virus dans les différents compartiments biologiques et de la présence des anticorps sériques (Jubelt et Lipton, 2014).

## 1.2 Phase de virémie

Peu d'études se sont intéressées au passage des virus dans le sang. Deux virémies successives ont été décrites et seraient soit cliniquement silencieuses, soit elles s'accompagneraient de signes cliniques non spécifiques (fièvre, ...). La virémie dite primaire ou mineure serait observée juste après la phase lymphatique. Cette virémie permettrait surtout l'atteinte des tissus « non nerveux » bien que l'invasion du SNC puisse être également possible (Figure 8B). Les tissus « non nerveux » comprennent les muscles, la peau, le myocarde, le péricarde et le pancréas. Après une réplication des EV dans ces sites, une virémie dite secondaire ou majeure, quantitativement plus importante que la première, serait observée et conduirait souvent à l'infection du SNC (**Jubelt et Lipton, 2014**). Ces deux virémies semblent précoces et transitoires (durant la première semaine de l'infection). Abzug et ses collègues ont réalisé des prélèvements sanguins itératifs chez des nouveau-nés présentant une infection à EV (**Abzug et al., 1995**). A J1, le taux de détection génomique des EV était positif dans 81% (13/16) des échantillons de sang testés alors qu'à J3, il n'était plus que de 44% (7/16). Récemment, des résultats similaires ont été observés à Taiwan chez 224 enfants âgés de moins de 18 ans présentant des infections à EV-A71 (**Cheng et al., 2014**). Dans cette étude, une virémie à EV a été diagnostiquée chez 59 patients et dans les 3 premiers jours après le début de l'infection pour 68% (40/59) d'entre eux. Le pourcentage de patients virémiques était plus élevé le premier jour après le début des symptômes (100%, 83%, 31%, 22%, 14%, 6% et 0%, respectivement de J1 à J7 après le début des symptômes).

Le rôle de la virémie et notamment la participation des leucocytes sanguins dans l'infection reste peu exploré. De rares études, réalisées sur les cellules mononuclées du sang ont montré que les monocytes étaient permissifs aux PV, les lymphocytes B aux CV-B3 et que les PBMC (incluant les lymphocytes, monocytes et cellules NK) permettaient la réplication des E-5 et E-11 alors qu'aucune réplication n'a été observée pour l'E-9 (**Dagan et Menegus, 1992 ; Eberle et al., 1995 ; Mena et al., 1999**). Vuorinen *et al.*, ont montré que le CV-B3 se répliquait mieux dans les lignées de lymphocytes B et T que dans les monocytes (**Vuorinen et al., 1999**). Cependant, la réplication des EV dans les différentes populations leucocytaires varie avec le type d'EV. Récemment, Hwang et ses collègues ont montré que le CV-A24 (EV-A) se répliquait dans les lymphocytes B et les monocytes et que l'EV-D70 (EV-D) se répliquait uniquement dans les monocytes (**Hwang et al., 2012**).

Ces variations de réplication peuvent s'expliquer en partie par une expression différente des récepteurs cellulaires aux EV à la surface des leucocytes. L'expression des récepteurs DAF et  $\alpha 2$  a été observée uniquement sur les monocytes alors que le récepteur des poliovirus (PVR) était exprimé sur les monocytes et les lymphocytes T (**Vuorinen et al., 1999**). Dans une étude plus récente, différents récepteurs cellulaires aux EV ont été recherchés par cytométrie en flux à l'aide d'anticorps monoclonaux : le **récepteur CAR** a été localisé sur les lymphocytes B et les monocytes, le **récepteur DAF** sur les monocytes, les lymphocytes B et T, et les **acides sialiques** uniquement sur les lymphocytes T (**Hwang et al., 2012**). Néanmoins, l'infection des cellules hématopoïétiques est un phénomène complexe dans lequel les récepteurs cellulaires aux EV joueraient un rôle important dans la permissivité à l'infection mais pas de manière absolue. Une entrée médiée par une stimulation dépendante des anticorps anti-EV dans les cellules peut être également envisagée. Jarasch-Altolf et ses collègues ont observé que 1) la réplication du CV-B3 dans les lymphocytes B a été réduite après incubation avec des dilutions successives de sérum humain et 2) l'entrée du CV-B3 dans ces lymphocytes a été réduite après blocage des portions Fc des immunoglobulines, démontrant que la présence d'anticorps anti-EV dans le sang jouerait également un rôle dans la permissivité des EV dans les leucocytes (**Jarasch-Altolf et al., 2010**).

### 1.3 Voies d'entrée des entérovirus

La compréhension des voies d'entrée des EV dans les différents organes cibles est encore limitée. Deux approches ont été formulées à partir d'études portant principalement sur les atteintes du système nerveux central par les poliovirus : la voie neuronale et la voie virémique.

#### 1.3.1 Voie neuronale

La voie neuronale suggère que les virus sont transmis par un transport rétrograde axonal des tissus infectés vers le SNC via les nerfs périphériques (cheminement le long des microtubules pour aller jusqu'au corps cellulaire du neurone). Dans les modèles murins, les poliovirus peuvent être transportés le long des nerfs par des processus dépendants ou indépendants de leur récepteur PVR (récepteur CD155) (**Sabin, 1956 ; Ohka et al., 2012**). L'étude réalisée par Lancaster et Pfeiffer chez des souris inoculées avec le PV-1, suggère l'existence de 3

barrières majeures au transport rétrograde axonale : 1) la réponse interféron, qui limite l'infection dans le système nerveux périphérique, 2) la multiplication limitée du PV dans les neurones périphériques d'origine murine, 3) le faible nombre de particules virales transportées par la voie axonale rétrograde, malgré sa rapidité. Ce transport est augmenté par une injection intra musculaire. Lancaster et Pfeiffer ont comparé le transport rétrograde axonal du PV à « *un très long grand-huit, dont les voitures dépourvues de ceinture perdraient la majorité de leurs passagers le long du circuit* ». Ceci expliquerait, d'après les auteurs, la très faible proportion de patients infectés par le PV développant une poliomyélite (**Lancaster et Pfeiffer, 2010**).

Cette même hypothèse a été avancée pour l'EV-A71. L'utilisation de la colchicine, un inhibiteur rapide du transport axonal, chez des souris après injection intramusculaire, a réduit la neuro-invasion d'EV-A71 dans la moelle épinière et le cerveau d'une manière dose-dépendante, indiquant une transmission neuronale du virus (**Chen et al., 2007**). Une autre étude histopathologique réalisée sur des tissus du SNC et digestifs chez des enfants atteints d'encéphalomyélite mortelle a montré que l'EV-A71 a été principalement détecté dans le cytoplasme neuronal, dans les différents noyaux du tronc cérébral et de la moelle épinière ainsi que dans les racines nerveuses de la moelle épinière et les ganglions autonomes des intestins (**Xing et al., 2016**). Plus récemment, une étude a montré une forte prévalence de souris paralysées suite à l'inoculation de différentes souches d'EV-D68 par voie intramusculaire et un faible nombre de cas de paralysie chez les souris infectées par voie intrapéritonéale (témoin de la voie intraveineuse). Ces résultats suggèrent que la voie neuronale participe à la neuropathogénèse de l'EV-D68 (**Hixon et al., 2017**).

### 1.3.2 Voie virémique

La dissémination des EV vers les méninges et les tissus cérébraux par la voie hématogène pendant la virémie, a été peu explorée. Pour les poliovirus, la voie virémique repose sur le franchissement du virus à travers l'endothélium vasculaire cérébral à partir de la circulation sanguine (**Bodian, 1955 ; Coyne et al., 2007**). Yang et al. ont comparé la quantité d'inoculum disséminé dans différents tissus après inoculation intraveineuse de souches de poliovirus (PV-1) à des souris transgéniques et non transgéniques pour le récepteur PVR (CD155) (**Yang et al., 1997**). Ils ont montré que l'inoculum s'accumulait dans le parenchyme cérébral en quantité similaire, aussi bien chez les souris transgéniques permissives que chez

les souris non transgéniques. Les auteurs concluent que le PV-1 peut atteindre le SNC sans l'implication de son récepteur PVR. Récemment, le rôle de TfR1 (récepteur 1 de la transferrine) en tant que récepteur cellulaire pour l'invasion du SNC par les poliovirus a été démontré *in vitro* sur des cellules endothéliales microvasculaire cérébrale de souris (MBEC4) (**Mizutani et al., 2016**).

Un modèle *in vitro* d'endothélium microvasculaire cérébral réalisé à partir de la lignée hCMEC/D3 (cellules humaines endothéliales microvasculaire cérébrale) a été infecté avec plus de 42 types d'EV (**Volle et al., 2015**). Les résultats ont montré que les cellules hCMEC/D3 non polarisées étaient permissives à un grand nombre d'EV et que la sensibilité de ces cellules variait avec le type d'EV. L'étude du franchissement des EV à travers les cellules polarisées hCMEC/D3, mimant une barrière endothéliale, a montré deux types de franchissement : (1) l'infection par des EV cytolitiques s'est traduite par une modification de l'étanchéité de la barrière en 24 heures, puis sa destruction. (2) A l'opposé, l'infection par des EV peu cytolitiques n'a entraîné aucun effet sur la perméabilité bien que la multiplication virale ait été poursuivie à faible rendement pendant au moins 96 heures. Un aspect important était que les EV particulièrement cytolitiques incluaient des génotypes fréquemment impliqués dans des syndromes méningés (E-30, E-6, E-11) et que les EV peu cytolitiques regroupaient des types neurotropes pouvant être associés à des atteintes profondes du SNC (EV-A71 et CV-B).

L'hypothèse d'un franchissement de la barrière hémato-encéphalique par l'intermédiaire de leucocytes infectés (processus de « cheval de Troie »), a été documenté pour les CV-B et pour d'autres virus neurotropes (VIH, *Tick Borne Encephalitis virus*) (**Sin et al. 2015 ; Michalicová et al., 2017**).

Les atteintes des tissus « non nerveux » provoquées par les EV semblent se produire en grande partie par la voie hématogène après franchissement de l'endothélium vasculaire irriguant ces tissus. En effet, de nombreux génotypes d'EV présentent un tropisme pour différents types de tissus endothéliaux : cellules HUVEC (cellules endothéliales humaines primaires de la veine du cordon ombilical) (**Sajets et al., 2003**), cellules HDMEC (cellules endothéliales humaines microvasculaires du derme) (**Zanone et al., 2003**), cellules HAEC (cellules endothéliales primaires humaines aortiques) (**Bozym et al., 2010**).



### 1.3.3 Processus viraux de franchissement de la barrière hémato-encéphalique (BHE)

De nombreux agents pathogènes ont été décrits pour franchir ou affecter la BHE : bactéries, champignons et agents parasitaires (Combes *et al.*, 2012). De très nombreux virus peuvent affecter l'intégrité de la BHE : HSV-1, HIV-1, HTLV-1, virus de l'encéphalite japonaise, virus West Nile, virus de l'encéphalite à tiques, virus de la Rage, virus de la Rougeole (Combes *et al.*, 2012 ; Spindler et Hsu, 2012 ; Michalicová *et al.*, 2017). Les altérations de la BHE sont liées au franchissement (HIV-1, HTLV-1, virus West Nile, virus de l'encéphalite à tique, virus de la Rougeole) ou aux atteintes occasionnées par l'infection cérébrale (virus de la Rage, HSV-1). Elles sont causées par l'altération de l'expression des protéines de jonctions serrées, la destruction des cellules ou la réponse immunitaire.

Trois principaux processus viraux de franchissement de la BHE ont été décrits :

#### - Franchissement par transcytose

Ce processus a été montré pour le virus West Nile, qui peut franchir *in vitro* l'endothélium cérébral, sans en affecter l'intégrité, en utilisant un transport transmembranaire associé aux radeaux lipidiques (Hasebe *et al.*, 2010).

#### - Mécanisme du « cheval de Troie »

Typiquement associé au virus HIV-1 et aux virus leucotropes, ce processus repose sur l'infection d'un ou de plusieurs types de leucocytes qui sont amenés à franchir la BHE (Michalicová *et al.*, 2017). L'atteinte cérébrale par le HIV-1 débute dès les premiers stades de la virémie. Au sein du SNC, les cibles primaires du HIV-1 sont les cellules immunitaires résidentes : macrophages et microglie. La réponse immunitaire cérébrale permet une élimination du virus.

#### - Infection de l'endothélium microvasculaire cérébral

Les virus peuvent franchir la BHE, en infectant les cellules de l'unité neurovasculaire. Des études *in vitro* montrent que différents virus neurotropes utilisent ce processus : virus West Nile (Verma *et al.*, 2009), HTLV-1 (Afonso *et al.*, 2008), HIV-1 (Liu *et al.*, 2002). Le virus de la Rougeole présente un mélange de traits : cheval de Troie et infection (Dittmar *et al.*, 2008).

Des études récentes suggèrent que les coxsackievirus et d'autres picornavirus (virus hépatite A) peuvent acquérir une enveloppe au moment de l'autophagie formant des microvésicules extracellulaires (*extracellular microvesicles* (EVM)) (Sin et al. 2015). Les protéines 2BC et 3A du CV-B pourraient « s'incorporer » dans les membranes du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi de façon à former des phagophores dont la maturation en autophagosomes serait assurée par la conversion du facteur LC3-I en LC3-II. L'acquisition d'une enveloppe pourrait alors apporter des avantages aux virions, tels que la résistance aux anticorps neutralisants et la propagation efficace de virus non-lytiques. En effet, ces EVM pourraient permettre la diffusion des virions vers des tissus cibles et permettraient de franchir des barrières comme la BHE.

#### 1.4 Réactions immunitaires

La faible incidence des infections graves à EV s'explique par l'existence de barrières immunitaires (immunité innée et adaptative) qui réduisent la production de virus infectieux. Cependant, dans certains cas, la réponse immunitaire peut aussi être délétère pour l'organisme et les virus peuvent présenter des mécanismes permettant d'échapper à la réponse immunitaire.

##### 1.4.1 Généralités

**L'immunité innée** est la première ligne de défense de l'hôte et joue un rôle central dans la lutte antivirale (Bouttier et al., 2008). Cette immunité naturelle est activée par des motifs moléculaires conservés au sein des agents pathogènes (virus et bactéries) nommés PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*) et ils sont reconnus par des récepteurs appelés PRRs (*pattern recognition receptors*). Au total, 3 familles de récepteurs protéiques ont principalement été identifiées : les TLR (*Toll-like receptor*), les NLR (*NOD-like receptor*) et les RLR (*RIG-like receptor*) (Harris et Coyne, 2013).

- Les récepteurs TLR sont transmembranaires et se scindent en 2 catégories selon leurs localisations cellulaires. Les TLR-1, 2, 4, 5 et 6, localisés à la surface de la membrane plasmique, reconnaissent des protéines bactériennes. Les TLR-3, 7, 8 et 9, localisés dans la lumière des endosomes, reconnaissent des motifs d'acides nucléiques,

généralement d'origine virale. Le TLR-3 reconnaît des ARN bicaténaires, les TLR-7 et 8, des ARN monocatéaires et le TLR-9, des ADN non méthylés.

- Il existe 3 récepteurs RLR : RIG-I, MDA5, qui sont les mieux caractérisés, et LGP2. Le récepteur RIG-1 détecte la présence cytoplasmique de petits ARN bicaténaires et d'ARN monocatéaires à extrémité 5' triphosphate. Le récepteur MDA5 détecte la présence cytoplasmique de longs ARN double brin.
- L'Homme compte 22 types de NLR. Ce sont des récepteurs cytoplasmiques, plutôt dédiés à la reconnaissance des PAMPs bactériens.

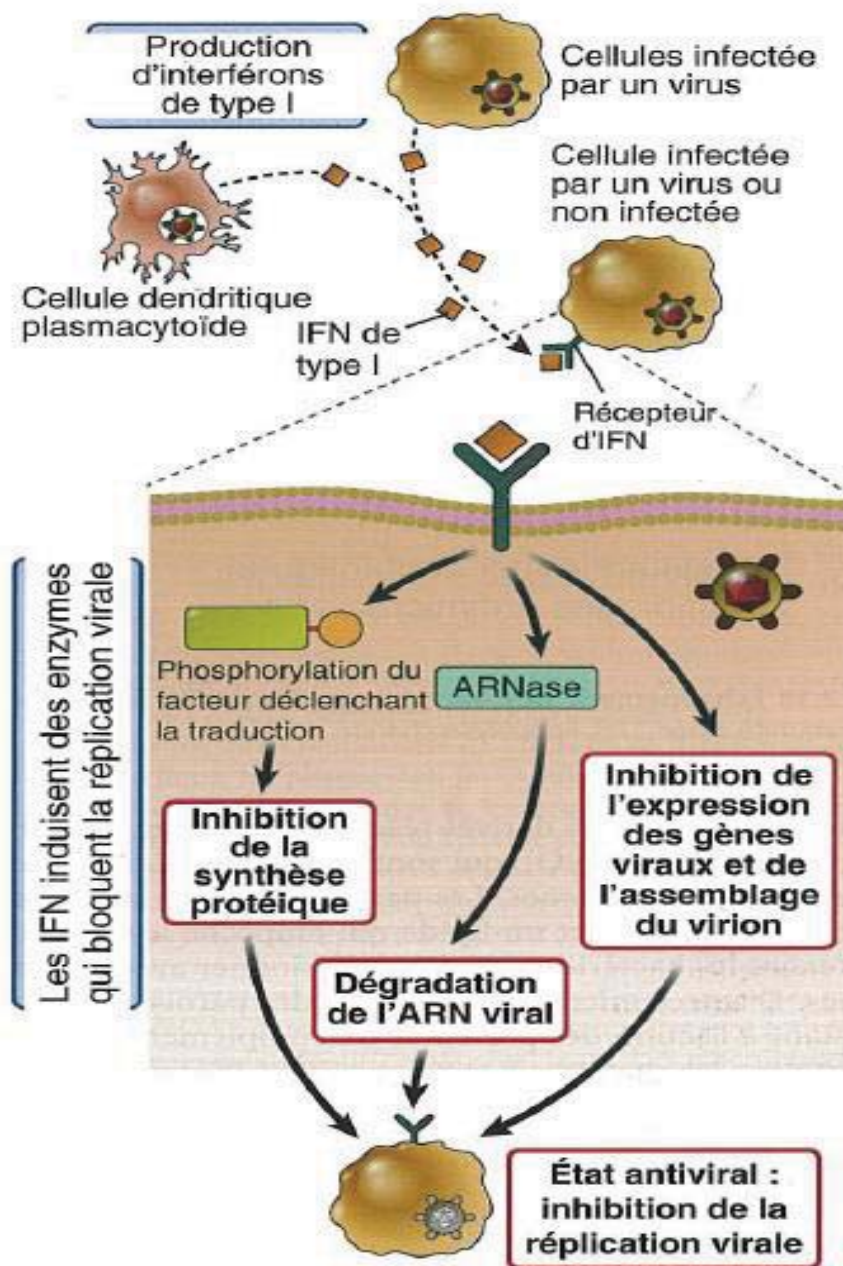
L'engagement des 3 types de récepteurs active plusieurs cascades de signalisation qui vont par l'intermédiaire de facteurs de transcription (NF- $\kappa$ B et IRF) permettre la production d'IFNs de type I (principalement IFN  $\alpha$  et  $\beta$ ) ainsi que diverses cytokines pro-inflammatoires.

La réponse IFNs de type I, produite par les cellules infectées et les cellules dendritiques plasmacytoïdes, joue un rôle essentiel dans l'immunité innée antivirale (Figure 9). Elle va stimuler de manière autocrine ou paracrine via un récepteur (*Interferon alpha receptor* ou IFANR) les cellules infectées ou non et activer des voies de signalisation intracellulaires qui vont réguler l'expression d'un ensemble de gènes (*Interferon-stimulated genes* ou ISG). Leur expression permet de mettre en place un état antiviral : inhibition de la réplication virale, élimination des composants viraux des cellules infectées et augmentation de la capacité des cellules hôtes non infectées à résister à une nouvelle infection par des virus. Cette réponse IFNs et les cytokines pro-inflammatoires vont participer à l'élimination de l'infection virale en provoquant une inflammation et en recrutant des cellules immunitaires innées comme les cellules NK ou les macrophages ainsi que des cellules de l'immunité adaptative comme les cellules dendritiques qui une fois activées expriment des molécules costimulatrices ainsi que des cytokines, qui permettront une lutte spécifique et l'établissement d'une mémoire immunologique contre le virus.

Lors de la **réponse adaptative**, qui fait suite à l'immunité innée, la réponse humorale (par le biais des lymphocytes B et la production d'anticorps) et la réponse cellulaire (via les lymphocytes T CD8+) se complètent et forment ensemble une forte barrière spécifique contre les infections virales (Abbas *et al.*, 2016). Lors de l'immunité innée, les cellules dendritiques et les macrophages phagocytent l'agent infectieux et expriment ensuite des antigènes propres au virus présenté à leur surface par des molécules du CMH (complexe majeur

d'histocompatibilité). Ces cellules présentatrices de l'antigène se dirigent ensuite vers les organes lymphoïdes secondaires proches et rentrent en contact avec les lymphocytes T naïfs. La reconnaissance des antigènes viraux par les récepteurs des lymphocytes T (TCR, *T-cell Receptor*) ainsi que l'implication de co-récepteurs et de cytokines secrétées lors de la réponse innée (IL-12, IFN- $\gamma$ , IFN de type I) va entraîner des signaux intracellulaires permettant aux lymphocytes T CD4+ de se multiplier et de se différencier en lymphocytes T CD4+ auxiliaires de type Th1. Ces lymphocytes T CD4+ auxiliaires Th1 vont permettre via la sécrétion de cytokines (notamment l'IL-2 et l'interféron  $\gamma$ ) 1) d'activer les macrophages afin d'amplifier la destruction des virus phagocytés, 2) permettre la multiplication et la différenciation de lymphocytes T CD8+ naïfs activés par des antigènes viraux en lymphocytes T CD8+ cytotoxiques (CTL, *cytotoxic T lymphocytes*). Au niveau des foyers infectieux, ces CTL via la sécrétion de perforines et de granzymes (protéines cytotoxiques) sont capables de tuer les cellules infectées exprimant à leur surface ces antigènes viraux via le CMH de type I, diminuant ainsi le réservoir de l'infection.

De même, des antigènes viraux libres peuvent être reconnus par les lymphocytes B naïfs via des anticorps membranaires. Les lymphocytes T CD4+ auxiliaires peuvent également contribuer à la multiplication et à la différenciation des lymphocytes B naïfs en plasmocytes, cellules sécrétrices d'anticorps présentant la même spécificité que les anticorps membranaires. Ces anticorps libres vont se fixer sur les virus circulants et les recouvrir (opsonisation). Cette opsonisation va permettre ainsi leur neutralisation et leur destruction après phagocytose notamment via la liaison à des récepteurs spécifiques du fragment Fc des anticorps portés par les neutrophiles et les macrophages.



**Figure 9 - Activités antivirales des interférons de type I.**

Les interférons de type I sont produits par les cellules dendritiques plasmacytoïdes et des cellules infectées par un virus en réponse à une signalisation intracellulaire des TLR et d'autres détecteurs d'acides nucléiques viraux. Ils se lient à des récepteurs sur les cellules infectées et non infectées et activent les voies de signalisation qui induisent l'expression de diverses enzymes qui bloquent des étapes de la réplication virale : inhibition de la traduction des protéines virales, dégradation croissante de l'ARN viral, inhibition de l'expression des gènes viraux et de l'assemblage du virion (d'après Abbas *et al.*, 2016).

#### 1.4.2 Immunité et infections à entérovirus

Le génome viral et les intermédiaires de réplication (ARN viraux doubles brins) des EV vont pouvoir être reconnus par les TLR 3, 7, 8 et 9 au niveau des endosomes après internalisation mais également par les RLR (récepteurs RIG-I et MDA-5) (Lei et al., 2016). L'activation des TLR et RLR modifie l'expression de nombreux gènes codant des cytokines et des chimiokines et en particulier les interférons de type I (IFN Type I). L'induction de la signalisation d'IFNs de type I est importante pour le contrôle des infections à EV *in vivo*. Suite à l'inoculation intraveineuse de poliovirus chez des souris déficientes pour le récepteur aux IFN de type I (IFN-R), une augmentation de la sévérité des lésions a été observée dans le système nerveux central, le foie, la rate et le pancréas ainsi qu'une létalité plus importante (Ida-Hosonuma et al., 2005).

Les EV semblent faire une exception par rapport aux autres virus lors de la réponse immunitaire adaptative et c'est principalement **l'immunité humorale** qui semble jouer un rôle important dans la lutte contre la propagation virémique des EV. En effet, des souris, déficientes en lymphocytes B, infectées par une souche de CV-B3 ont développé une infection chronique avec des titres élevés de CV-B3 dans de nombreux organes, tels que le cœur, le foie, le poumon et le pancréas. Après l'injection de lymphocytes B chez ces souris, une élimination du CV-B3 dans tous les tissus a été observée (Mena et al., 1999). Des infections persistantes et sévères ont été également documentées principalement chez des patients agammaglobulinémiques, la transfusion d'immunoglobulines a permis dans certains cas de réduire la charge virale ainsi que les symptômes chez ces patients (Halliday et al. 2003). Très rapidement après le début de l'infection, une forte réponse en anticorps neutralisants est induite avec la production d'IgM puis d'IgG spécifiques contre un type d'EV qui ciblent préférentiellement la protéine de capsid virale VP1. Par contre, l'absence d'immunité croisée explique qu'un individu peut présenter plusieurs infections à EV au cours de sa vie.

**L'immunité cellulaire** dans les infections à EV a été peu explorée (Pallansch et al., 2013). Les lymphocytes B auraient besoin des lymphocytes T notamment de type CD4+ pour permettre l'induction d'une réponse humorale efficace mais la réponse médiée par les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques pourrait également jouer un rôle dans la clairance des EV, malgré de faibles titres en CTL retrouvés *in vivo*.

Plusieurs études portant majoritairement sur l'EV-A71 ont exploré la réponse immunitaire de patients infectés par un EV via le dosage de très nombreuses et diverses **cytokines et chimiokines** dans le sang et/ou dans le LCR (Tableau 2). Au cours d'une méningite à EV, les cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6, IL-8, IFN- $\gamma$  sont produites pendant la phase aigüe afin de contrôler l'infection puis elles diminuent et les cytokines anti-inflammatoires dont l'IL-10, TGF- $\beta$ 1 sont ensuite synthétisées dès la disparition des EV lors de la phase de convalescence (**Sato et al., 2003**). Cependant, des différences de profils cytokiniques ont été observées en fonction du tableau clinique et du type d'EV impliqué. Une étude a montré que l'IL-6 était prédominante dans le LCR de patients présentant une méningite alors que le TNF- $\alpha$  était plus élevé chez les patients avec un tableau d'encéphalite (**Liu et al., 2005**). La production d'interleukines IL-4, IL-5, IL-22 et IL-23 était plus importante dans le sang d'enfants présentant une encéphalite comparée aux enfants présentant un syndrome pieds-mains-bouche (**Zhang et al., 2015**). Dans cette même étude, l'IL-2, le TNF- $\alpha$ , l'IL-4, l'IL-22 et l'IL-1 $\beta$  étaient plus élevés chez les patients présentant un syndrome pieds-mains-bouche à EV-A71 par rapport à ceux présentant un syndrome pieds-mains-bouche dû au CV-A16. De nombreuses études ont montré un lien entre la sévérité de la maladie et une réponse importante en médiateurs notamment pro-inflammatoires dont l'IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  et IP-10 dans le sang et/ou dans le LCR de patients infectés par un EV-A71 (**Lin et al., 2003a ; Wang et al., 2007 ; Ye et al., 2015 ; Shao et al., 2017**).

Tableau 2 - Principales cytokines et chimiokines dosées dans le sang et/ou dans le LCR de patients infectés par un entérovirus.

Auteurs	TNF- $\alpha$	IL-1	IL-2	IL-4	IL-5	IL-6	IL-8	IL-10	IL-12	IL-13	IL-17	IL-18	IL-23	IFN- $\gamma$	IP-10	RANTES	MCP-1	MIG
Lin et al., 2003a*		X <sup>a,b</sup>				X <sup>a,b</sup>												
Liu et al., 2005	X <sup>a,b</sup>					X <sup>a,b</sup>												
Sulik et al., 2014**	X <sup>a</sup>	X <sup>a</sup>					X <sup>a</sup>							X <sup>a</sup>				
Ye et al., 2015*	X <sup>a,b</sup>	X <sup>a,b</sup>				X <sup>a,b</sup>	X <sup>a,b</sup>	X <sup>a,b</sup>							X <sup>a,b</sup>	X <sup>a,b</sup>	X <sup>a,b</sup>	X <sup>a,b</sup>
Ichiyama et al., 2005**	X <sup>a</sup>		X <sup>a</sup>	X <sup>a</sup>		X <sup>a</sup>		X <sup>a</sup>						X <sup>a</sup>				
Wang et al., 2007*	X <sup>a</sup>	X <sup>a</sup>	X <sup>a</sup>	X <sup>a</sup>		X <sup>a</sup>		X <sup>a</sup>		X <sup>a</sup>				X <sup>a</sup>				
Wang et al., 2008a*							X <sup>b</sup>									X <sup>b</sup>	X <sup>b</sup>	X <sup>b</sup>
Bastos et al., 2015	X <sup>a</sup>					X <sup>a</sup>		X <sup>a</sup>	X <sup>a</sup>		X <sup>a</sup>			X <sup>a</sup>				
Sato et al., 2003						X <sup>a</sup>	X <sup>a</sup>	X <sup>a</sup>						X <sup>a</sup>				
Han et al., 2014*	X <sup>b</sup>	X <sup>b</sup>	X <sup>b</sup>	X <sup>b</sup>		X <sup>b</sup>	X <sup>b</sup>	X <sup>b</sup>	X <sup>b</sup>	X <sup>b</sup>	X <sup>b</sup>	X <sup>b</sup>		X <sup>b</sup>				
Makis et al., 2010				X <sup>a,b</sup>					X <sup>a,b</sup>									
Chen et al., 2012*											X <sup>b</sup>		X <sup>b</sup>	X <sup>b</sup>				
Zhang et al., 2013*	X <sup>a,b</sup>	X <sup>a,b</sup>	X <sup>a,b</sup>	X <sup>a,b</sup>	X <sup>a,b</sup>	X <sup>a,b</sup>	X <sup>a,b</sup>	X <sup>a,b</sup>	X <sup>a,b</sup>	X <sup>a,b</sup>	X <sup>a,b</sup>	X <sup>a,b</sup>	X <sup>a,b</sup>	X <sup>a,b</sup>	X <sup>a,b</sup>	X <sup>a,b</sup>	X <sup>a,b</sup>	X <sup>a,b</sup>
Zhang et al., 2015	X <sup>a,b</sup>	X <sup>a,b</sup>	X <sup>a,b</sup>	X <sup>a,b</sup>	X <sup>a,b</sup>	X <sup>a,b</sup>		X <sup>a,b</sup>		X <sup>a,b</sup>	X <sup>a,b</sup>		X <sup>a,b</sup>					
Shao et al., 2017	X <sup>b</sup>			X <sup>b</sup>			X <sup>b</sup>		X <sup>b</sup>			X <sup>b</sup>		X <sup>b</sup>	X <sup>b</sup>	X <sup>b</sup>	X <sup>b</sup>	X <sup>b</sup>
Shang et al., 2017	X <sup>b</sup>			X <sup>b</sup>			X <sup>b</sup>	X <sup>b</sup>	X <sup>b</sup>			X <sup>b</sup>		X <sup>b</sup>	X <sup>b</sup>	X <sup>b</sup>	X <sup>b</sup>	X <sup>b</sup>

Abbréviations : TNF : *Tumor Necrosis Factor*, IL : *Interleukine*, IFN : *Interféron*, IP-10 (CXCL10): *Interferon  $\gamma$  - Inducible Protein 10*, RANTES (CCL5) : *Chemokine Ligand 5*, MCP-1 (CCL2) : *Monocyte Chemoattractant Protein 1*, MIG (CXCL9): *Monokine Induced by Gamma interferon*.

\* Travaux réalisés sur l'EV-A71

<sup>a</sup> Dosage réalisé dans le LCR, <sup>b</sup> Dosage réalisé dans le sang



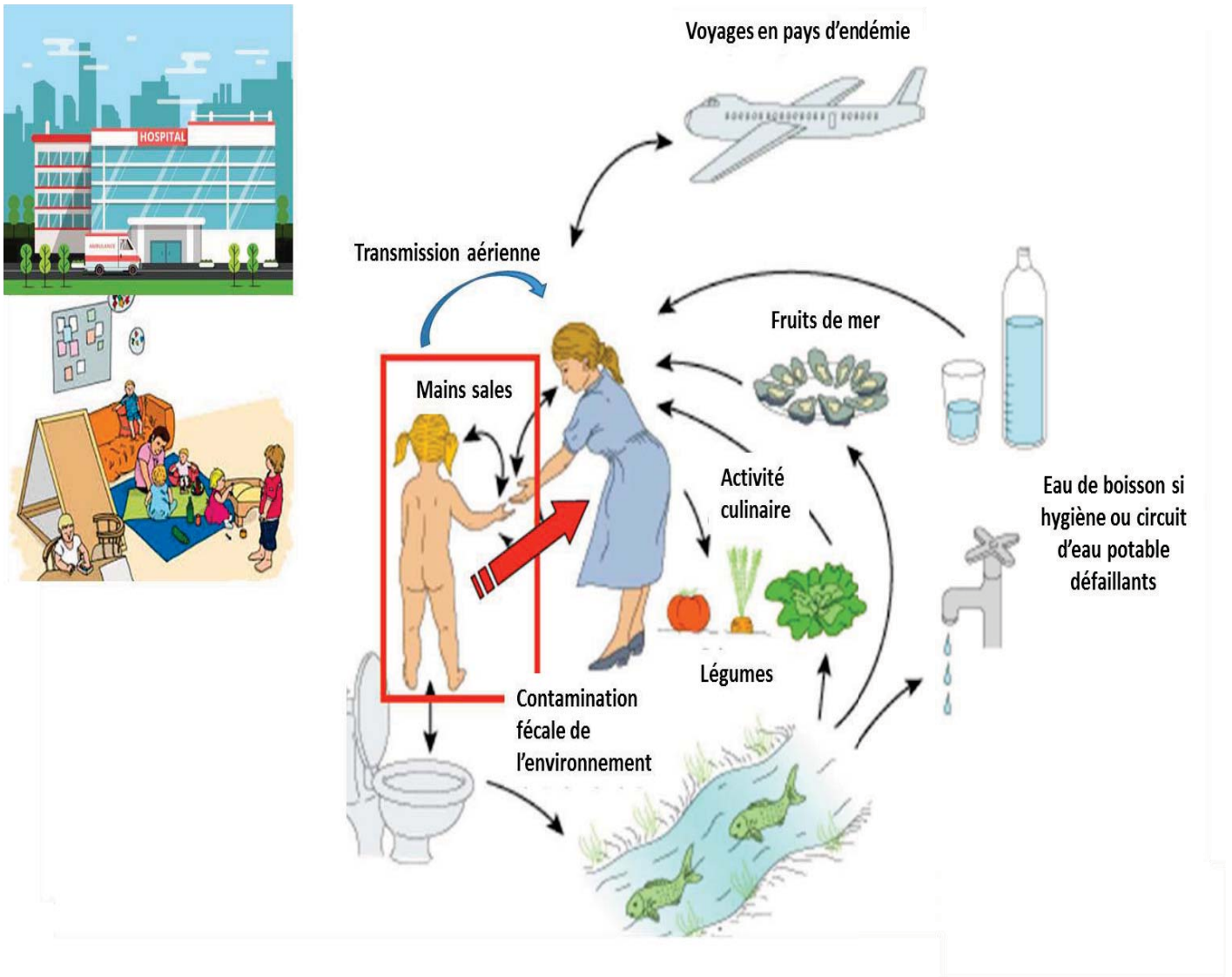
## 2. Epidémiologie

### 2.1 Modes de Transmission

Plusieurs modes de transmission ont été mis en évidence pour les EV et ils varient en fonction du type, du contexte clinique et environnemental (Figure 10).

Les EV sont des virus ubiquitaires qui font partie des virus entériques. Leur réplication intestinale explique leur excrétion en grande quantité dans les selles (comprise entre  $10^6$  et  $10^7$  EV par gramme de selles) d'individus infectés, malades ou asymptomatiques. Cette excrétion virale peut persister plusieurs semaines après une infection à EV voire plusieurs mois ou années principalement chez les personnes immunodéprimées (**Betancourt et Shulman, 2015 ; Mohanty et al., 2017**). L'absence d'enveloppe rend les EV résistants dans l'environnement où ils peuvent survivre plusieurs mois dans des conditions favorables de pH, de température, d'humidité ou encore de teneur en matières organiques (**Betancourt et Shulman, 2015**).

Ces caractéristiques virologiques expliquent que le mode principal de transmission des EV est la voie fécale-orale. La transmission peut s'effectuer directement entre individus par contact avec des mains sales ou indirectement par un environnement souillé via la manipulation d'objets ou la consommation d'eau ou d'aliments (légumes, fruits, coquillages, ...) contaminés par des selles infectées. Cette voie de transmission est donc directement dépendante du niveau d'hygiène de la population et elle est favorisée par les eaux usées et récréatives ainsi que les boues (**Begier et al., 2008 ; Betancourt et Shulman, 2015**). Dans les pays en voie de développement, l'absence d'éducation sur les principes d'hygiène universelle, en particulier le lavage et la désinfection des mains, et l'inexistence d'installations traitant les eaux usées expliquent la survenue d'épidémies causées par les virus entériques notamment les EV.



**Figure 10 - Transmissions des entérovirus.**

La transmission des entérovirus est principalement fécale-orale directement entre individus par l'intermédiaire des mains sales ou indirectement par l'eau ou les aliments souillés mais elle peut être aussi aérienne pour certains types d'entérovirus. L'infection peut être contractée lors d'un voyage en pays d'endémie ou dans des collectivités publiques denses et/ou fermées comme les hôpitaux, les crèches ou les écoles (adapté d'après **Hureaux et al., 2003**).

D'autres types de transmission directe ou indirecte via différents fluides corporels ont été également rapportés :

- Une transmission par voie aérienne (via des gouttelettes nasopharyngées infectées par des EV) a été rapportée pour certains types d'EV (EV-D68) ayant une prédilection pour le système respiratoire (**La Rosa et al., 2013**).
- Les EV responsables d'éruptions vésiculaires peuvent potentiellement se propager par le biais du liquide vésiculaire riche en virus infectieux.
- Les EV responsables de conjonctivites aiguës hémorragiques peuvent se transmettre via les sécrétions oculaires infectées (larmes) soit de façon manuportée, soit indirectement par des eaux des piscines insuffisamment chlorées ou encore via du matériel ophtalmologique mal décontaminé (**Lévêque et al., 2010**).
- Des cas de transmission materno-fœtale ont été également décrits.

## 2.2 Réseaux de surveillance

La mise en place de réseaux de surveillance clinique et/ou virologique des EV est primordiale du fait de leur caractère épidémique ainsi que de leur potentielle gravité.

### 2.2.1 Surveillance spécifique des poliovirus

En 1988, l'OMS a adopté l'Initiative Mondiale pour l'Eradication de la Polio (IMEP) afin d'éliminer les trois sérotypes de poliovirus. Le succès de tout programme d'éradication dépend d'une stratégie d'intervention efficace ainsi que de systèmes de surveillance capables de détecter les PV. Les systèmes de surveillance capables de détecter les PV sont coordonnés par l'OMS en relation avec les différentes autorités de santé des différents pays et ils reposent sur deux approches complémentaires : clinique et environnementale. Le système de surveillance des paralysies flasques aiguës (PFA) est la méthode de référence pour détecter les cas de poliomyélites (**World Health Organization and Regional Office for Europe, 2015**). Tous les cas mondiaux de PFA chez les enfants âgés de moins de 15 ans sont notifiés et doivent faire l'objet d'une investigation strictement codifiée sur des échantillons de selles dans des laboratoires agréés par l'OMS afin de déterminer l'implication ou non d'un poliovirus. Cette surveillance s'appuie également sur une surveillance environnementale des PV sauvages et

vaccinaux notamment dans les eaux usées (Asghar et al., 2014). Une circulation active et silencieuse des PV dans l'environnement est possible (dans les pays endémiques) en l'absence de PFA du fait d'une excrétion prolongée de ces virus chez des personnes infectées rarement symptomatiques.

Afin d'optimiser cette surveillance et pour mettre en place plus rapidement des stratégies efficaces d'éradication des PV, l'OMS a créé en 1990 le réseau mondial de laboratoires pour la poliomyélite qui comprend 146 laboratoires accrédités par l'OMS, répartis dans 92 pays dans les six grandes régions mondiales de l'OMS (Maes et al., 2017) (Figure 11A). Ce réseau réalise la détection et la caractérisation des PV sur plus de 220 000 échantillons de selles provenant de cas de PFA (et de leurs contacts) et plus de 8 000 échantillons d'eaux usées par an. En France, la surveillance de la poliomyélite comporte un volet environnemental coordonné par le Laboratoire d'Hygiène de la Ville de Paris et un volet « humain » coordonné par le Centre National de Référence des EV et parechovirus (CNR EV/HPeV) à Lyon.

### 2.2.2 Surveillance des entérovirus non poliomyélitiques

Par rapport à la surveillance structurée et active des PV, la surveillance des infections à EV non poliomyélitiques, non obligatoire, est hétérogène et non exhaustive selon les pays. Généralement, cette surveillance passive est intégrée dans les systèmes nationaux de veille sanitaire des maladies infectieuses propres à chaque pays et elle est basée sur le volontariat (déclarations et/ou recueils de données uniquement cliniques, principalement hospitalières). Ces réseaux de surveillance sont présents majoritairement dans les pays occidentaux (USA et Europe). En Afrique comme dans d'autres régions (les plus démunies) du monde, aucune surveillance n'est documentée. En Asie, suite à d'importantes épidémies de syndromes pieds-mains-bouche (PMB) parfois associés à des complications neurologiques potentiellement mortelles, l'OMS a décidé de renforcer la surveillance de cette maladie dans la région Pacifique Ouest avec l'obligation de la déclarer dans de nombreux pays (*World Health Organization-Western Pacific Region, 2018*).

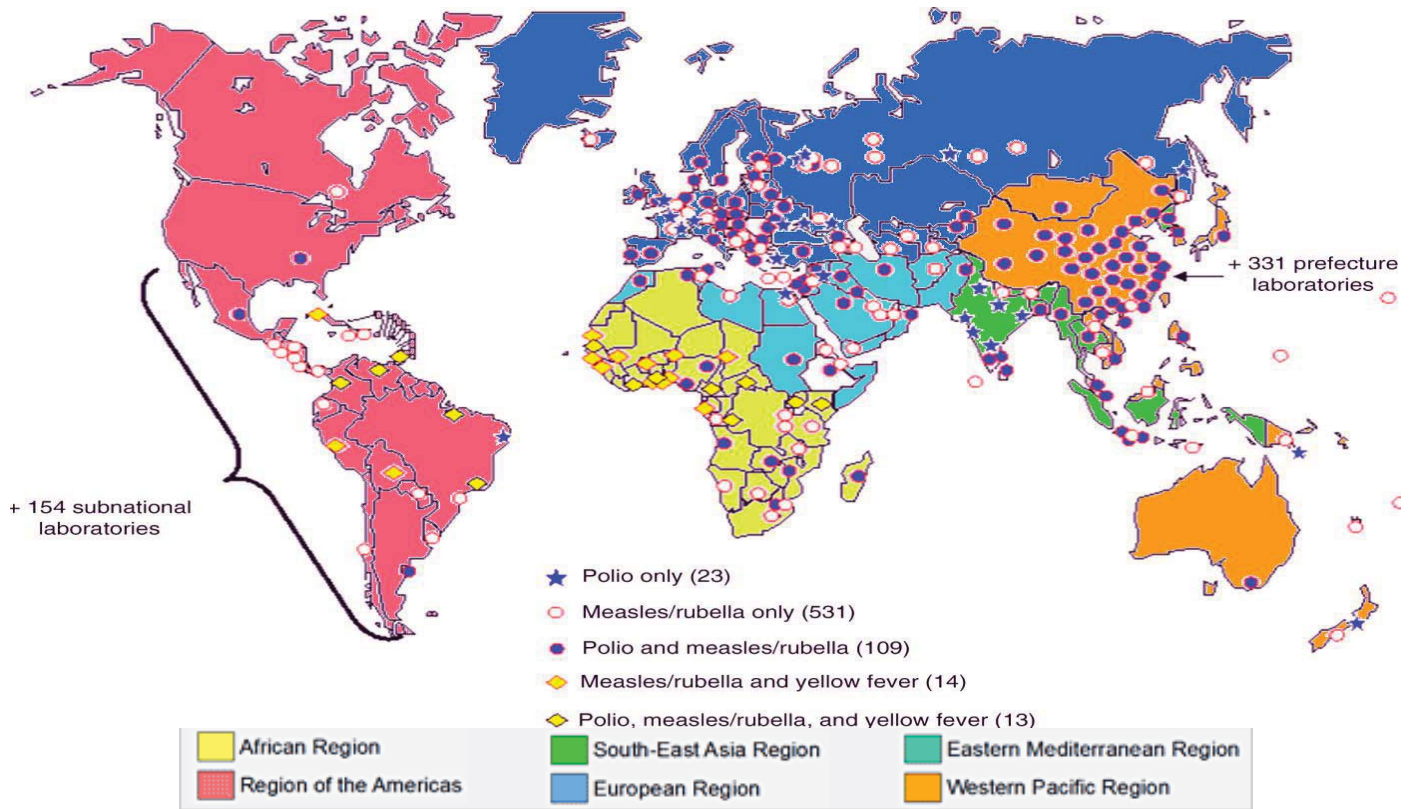
Aux USA, le NESS (*National Enterovirus Surveillance System*) a été créé en 1961 par le CDC et est actuellement constitué de 17 laboratoires participants (Abedi et al., 2015). Ces laboratoires sont invités à signaler mensuellement l'ensemble des données récupérées suite au diagnostic d'une infection à EV permettant ainsi de centraliser les cas d'infections

diagnostiquées, d'identifier les souches circulantes et éventuellement de mener des investigations plus poussées dans des situations épidémiques. Des systèmes de surveillance des EV sont également présents en Europe. Néanmoins, une enquête réalisée par Harvala et ses collègues en 2016 a montré au sein des laboratoires de diagnostic clinique une surveillance européenne hétérogène des EV. Aussi, cette étude a souligné les besoins évidents d'homogénéiser et de renforcer la détection et le typage des EV, et de collecter systématiquement les données associées à ces infections (**Harvala et al., 2017**).

La France bénéficie d'un Réseau de Surveillance des Entérovirus (RSE) sous l'égide de l'agence Santé publique France et du CNR EV/HPeV dont les missions de conseil, d'expertise, de contribution à la surveillance et d'alerte sont définies dans un cahier des charges spécifiques. Les laboratoires de Virologie de Lyon (Hospices Civils de Lyon, Pr Bruno Lina, laboratoire coordonnateur) et de Clermont-Ferrand (CHU de Clermont-Ferrand, Pr Cécile Henquell, laboratoire associé) sont les deux laboratoires constituant le CNR EV/HPeV (Figure 11B). Ce Réseau de Surveillance des EV est composé de 36 laboratoires hospitaliers volontaires, présents sur la quasi-totalité du territoire français. La finalité de ce RSE est double : émettre une alerte précoce lors de la survenue d'une épidémie ou l'émergence d'une forme clinique inhabituelle, et suivre les types associés aux différents syndromes cliniques. Par l'intermédiaire d'un site web dédié, les biologistes du RSE déclarent « en temps réel » toutes les infections à EV non poliomyélitiques diagnostiquées dans chaque centre, avec un recueil standardisé des données démographiques, cliniques et virologiques.

Afin de renforcer cette surveillance au niveau national, un réseau de surveillance spécifique sur la maladie pieds-mains-bouche, réalisée par l'observatoire PARI (Panel Ambulatoire de Recherche en Infectiologie), a été mise en place en 2014 afin d'investiguer les types d'EV circulants ainsi que les tableaux cliniques associés à ce syndrome (**Mirand et al., 2016**). Cet observatoire est constitué de pédiatres libéraux (79 en 2017) qui déclarent quotidiennement le nombre de cas de maladies pieds-mains-bouche et d'herpangine via un logiciel médical dédié et transmettent des prélèvements pour la recherche et l'identification des EV au CNR EV/HPeV, laboratoire associé (Clermont-Ferrand) (**Schuffenecker et al., 2018**).

(A)



(B)

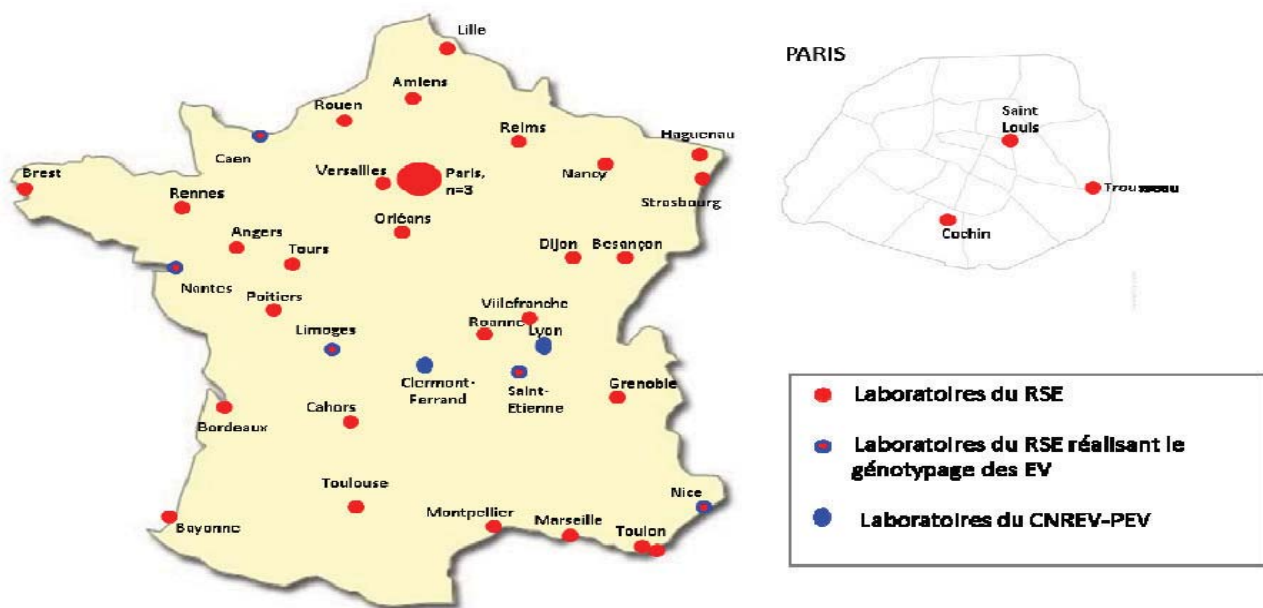


Figure 11 - Réseaux de surveillance des entérovirus dans le monde et en France.

(A) Représentation du réseau mondial des laboratoires participants à la surveillance de la poliomyélite dans les six grandes régions mondiales de l'OMS (adapté d'après les cartes obtenues sur [www.who.int](http://www.who.int) et [Cochi et al., 2014](#)).

(B) Représentation du réseau de surveillance des entérovirus en France en 2017 composé des laboratoires membres dont certains réalisent le génotypage des EV ainsi que des 2 laboratoires du CNR ([Schuffenecker et al., 2018](#)).

Le renforcement et la structuration d'un réseau mondial de surveillance des EV non poliomyélitiques est nécessaire afin d'améliorer la détection d'EV (ré) émergents liés à des tableaux cliniques graves et/ou à des épidémies mais aussi pour créer une base de données sur toutes les infections à EV (en particulier les types les moins étudiés) (*World Health Organization and Regional Office for Europe, 2015*). De plus, l'ajout d'une surveillance environnementale, comme pour les PV, permettrait de fournir une image plus détaillée de l'épidémiologie de ces EV notamment en terme de circulation et de diversité voire d'identifier les souches potentiellement pathogènes en les comparant aux souches cliniques (*Bisseux et al., 2018*).

### 2.3 Profils épidémiologiques et épidémiologie moléculaire

Les données épidémiologiques issues de ces réseaux de surveillance ont permis de définir un concept important dans la compréhension de l'épidémiologie des EV qui est la variation selon le type, le temps, la localisation géographique et la maladie associée. Dans les pays tropicaux et sub-tropicaux, les infections surviennent sur un mode endémique (présent tout au long de l'année) avec des épidémies occasionnelles. Dans les pays à climat tempéré, des pics épidémiques sont fréquents pendant la saison estivo-automnale avec des cas sporadiques qui peuvent être observés tout au long de l'année (*Chambon et al., 2001 ; Mirand et al., 2016*). Aux Etats-Unis, 78% de toutes les détections rapportées par le NESS sur une période de 35 ans avaient eu lieu entre juin et octobre (*Khetsuriani et al., 2006*).

Le développement des techniques de biologie moléculaire a permis d'observer que plusieurs types d'EV différents co-circulent en permanence dans la population et que cette distribution est extrêmement variable et imprévisible dans le temps et dans les zones géographiques (*Khetsuriani et al., 2006 ; Molet et al., 2016 ; Weng et al., 2017*). Certains types comme l'E-9, l'E-11, l'E-30 et le CV-B5 présentent un profil « épidémique » c'est-à-dire que leur circulation fluctue d'une année sur l'autre avec d'importants pics épidémiques entrecoupés de périodes quiescentes plus ou moins longues. Par contre, d'autres types comme le CV-B2, le CV-A9, le CV-B4 et le CV-A16 ont un profil « endémique » avec une circulation constante mais généralement de faible ampleur avec quelques pics épidémiques modérés. L'émergence de nouveaux variants ou la ré-émergence de certains types est donc fréquente. Récemment, la réalisation du typage moléculaire lors d'importantes épidémies d'infections neurologiques sévères suite à des syndromes pieds-mains-bouche a permis de mettre en évidence l'implication de l'EV-A71, qui circule activement en Asie et plus récemment en Europe. De

même, des épidémies d'infections respiratoires compliquées de signes neurologiques graves ont été associées à l'EV-D68 dans une vingtaine de pays (USA, Europe, ...) (**Ooi et al., 2010 ; Antona et al., 2016 ; Holm-Hansen et al., 2016**).

Néanmoins, ces données épidémiologiques ne sont que partielles et permettent d'avoir une vue que de la partie émergée de l'iceberg. Ceci s'explique par les limites des systèmes de surveillance actuels qui ne sont pas présents dans tous les pays et qui ciblent majoritairement certaines maladies potentiellement sévères. De plus, il est important de noter que les données nationales peuvent masquer d'importantes variations régionales et locales de la prévalence virale.

#### 2.4 Facteurs favorisant les infections à entérovirus et leur sévérité

L'âge, le sexe, le statut immunitaire et les conditions socio-économiques sont les principaux facteurs influençant la survenue des infections et leur sévérité (**Pallansch et al., 2013**). De plus, les contacts rapprochés, facilités dans les collectivités publiques denses et/ou fermées, favorisent cette transmission. L'ensemble de ces facteurs peuvent expliquer le développement d'épidémies pouvant être intrafamiliales, scolaires ou nosocomiales. Des infections nosocomiales dans des services de néonatalogie ont été observées chez des nouveau-nés présentant une méningite à E-30 et plus récemment, chez des nouveau-nés présentant des tableaux d'entérocrites nécrotiques à E-27 (**Bailly et al., 2000 ; Alidjinou et al., 2018**). Chez des patients âgés, une épidémie d'infections respiratoires à EV-D68 a été observée dans une maison de retraite médicalisée (**Bal et al., 2015**).

Les infections à EV sont observées dans toutes les tranches d'âge. Cependant, ce sont les jeunes enfants qui sont majoritairement infectés. Les adultes de tous âges peuvent aussi être infectés, particulièrement ceux en contact avec les enfants (famille ou métier exposé). Selon les données françaises du RSE, 76% des infections à EV ont été diagnostiquées chez des enfants âgés de moins de 15 ans en 2017. Les nouveau-nés et les nourrissons sont les plus vulnérables en raison de l'immaturation de leur réponse immunitaire et du faible taux d'anticorps maternels spécifiques transmis (**Salur et al., 2011**). Les immunodéprimés constituent également une population de patients à risque d'infections sévères aux EV. D'autre part, les garçons sont plus souvent infectés que les filles avec un sex-ratio homme / femme compris entre 1,5 et 2,5.



### 3. Manifestations cliniques

Les EV peuvent être responsables d'un large panel d'infections, qui sont dans la grande majorité des cas asymptomatiques, bénignes et spontanément résolutive (Pallansch *et al.*, 2013). Les infections symptomatiques peuvent conduire à des consultations médicales voire à des hospitalisations et représentent donc un coût non négligeable en santé publique. Les infections graves sont rares mais fréquemment observées dans certaines populations (immunodéprimés, nouveau-nés) et certaines infections aiguës peuvent être associées à des pathologies chroniques (Tableau 3). Du fait de la grande diversité des EV et de l'absence d'immunité croisée, un individu a la possibilité de faire plusieurs infections à EV durant sa vie. Certains tableaux cliniques sont associés à un type d'EV et à l'inverse, plusieurs types d'EV peuvent être responsables du même syndrome clinique.

#### 3.1 Infections aiguës asymptomatiques et pauci-symptomatiques

Plus de 90% des infections à EV sont asymptomatiques d'où un portage très fréquent des EV dans la population générale. En Chine, sur 667 selles collectées chez des personnes asymptomatiques (âgées de 2 mois à 63 ans), un EV a été détecté dans 13,5% des cas. Cette détection était plus importante chez les moins de 1 an (23,5%) et diminuait avec l'âge des patients (8% chez les plus de 10 ans) (Wu *et al.*, 2017). En Afrique, le taux de détection des EV dans les selles de porteurs sains étaient de 22,8% dans la population ivoirienne (âgées de 1 mois à 53 ans) et de 24,2% chez des enfants ghanéens âgés de moins de 8 ans dont 56% chez les moins de 2 ans (Attoh *et al.*, 2014 ; Cristanziano *et al.*, 2015).

Lorsque l'infection est symptomatique, elle s'accompagne fréquemment chez les jeunes patients, d'une fièvre isolée qui peut être associée à d'autres signes cliniques peu spécifiques et sans gravité tels qu'un rash, une diarrhée, des myalgies et/ou des infections ORL (pharyngite, conjonctivite, rhinite, ...). Deux études réalisées chez des nourrissons fébriles âgés de moins de 3 mois ont montré un taux de détection des EV variant de 20 à 26% avec des taux plus importants en période épidémique (36 à 50%) (Byington *et al.*, 1999 ; Rittichier *et al.*, 2005). Dans l'étude de Rotbart *et al.*, 54% des nourrissons fébriles âgés de moins de 3 mois (n=122) ont présenté une infection à EV durant la saison estivale (Rotbart *et al.*, 1999).

**Tableau 3 - Principales pathologies (aiguës et chroniques) observées chez des patients infectés par un entérovirus.**

Organes cibles	Pathologies aiguës	Pathologies chroniques	Type EV incriminés
Poumons	Infections respiratoires hautes, bronchite, bronchiolite, pneumopathie	-	CV-A, CV-B, Echovirus, EV-D68, EV-A71, EV-C104, EV-C109
Coeur	Péricardite, myocardite	Cardiomyopathie dilatée	CV-A, CV-B, Echovirus
Pancréas	Pancréatite	Diabète insulino-dépendant	CV-B, Echovirus
Foie	Hépatite		CV-B, Echovirus
Système nerveux central	Méningite, encéphalite, poliomyélite, paralysie flasque aigue	Syndrome post-poliomyélitique Méningo-encéphalite chez immunodéprimés	Poliovirus, CV-A, CV-B, Echovirus, EV-D68 EV-A71
Muscles striés squelettiques	Pleurodynies	Sclérose latérale amyotrophique, syndrome de fatigue chronique	CV-B, Echovirus
Epiderme, muqueuse	Herpangine, syndrome pieds-mains-bouche	-	CV-A, CV-B, EV-A71
Conjonctive	Conjonctivite hémorragique	-	CV-A24, EV-D70



Les entérovirus sont impliqués dans de nombreuses infections, qui sont dans la grande majorité des cas asymptomatiques, bénignes et spontanément résolutive. Après une atteinte de différents organes cibles, les EV peuvent être responsables d'infections symptomatiques aiguës qui peuvent évoluer vers une infection persistante à l'origine d'une pathologie chronique (adaptée d'après **Renois et al., 2014**).

Abréviations : CV-A : Coxsackievirus A, CV-B : Coxsackievirus B, EV : Entérovirus.

Etant donné l'absence de spécificité clinique dans ces infections chez les jeunes nourrissons, le diagnostic différentiel vis-à-vis d'autres étiologies virales ou bactériennes est compliqué. En effet, un tableau de fièvre isolée chez les nourrissons peut initialement mimer un sepsis d'origine bactérienne ou une infection virale plus sévère qui nécessitent une hospitalisation ainsi qu'un traitement probabiliste. Dans l'étude de Rotbart *et al.*, 82% des enfants fébriles infectés par un EV avaient été hospitalisés et 99% avaient reçu un traitement antibiotique probabiliste (**Rotbart *et al.*, 1999**).

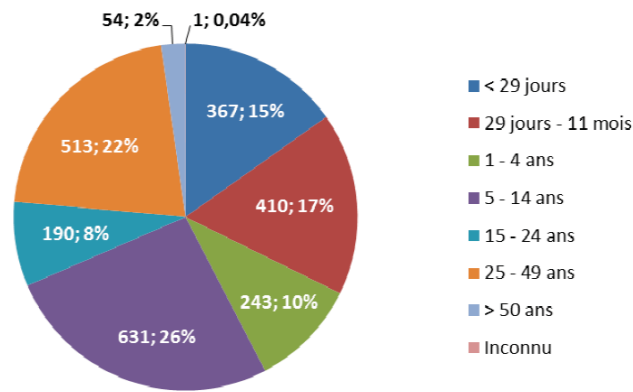
### 3.2 Infections aiguës symptomatiques

#### 3.2.1 Infections du système nerveux central

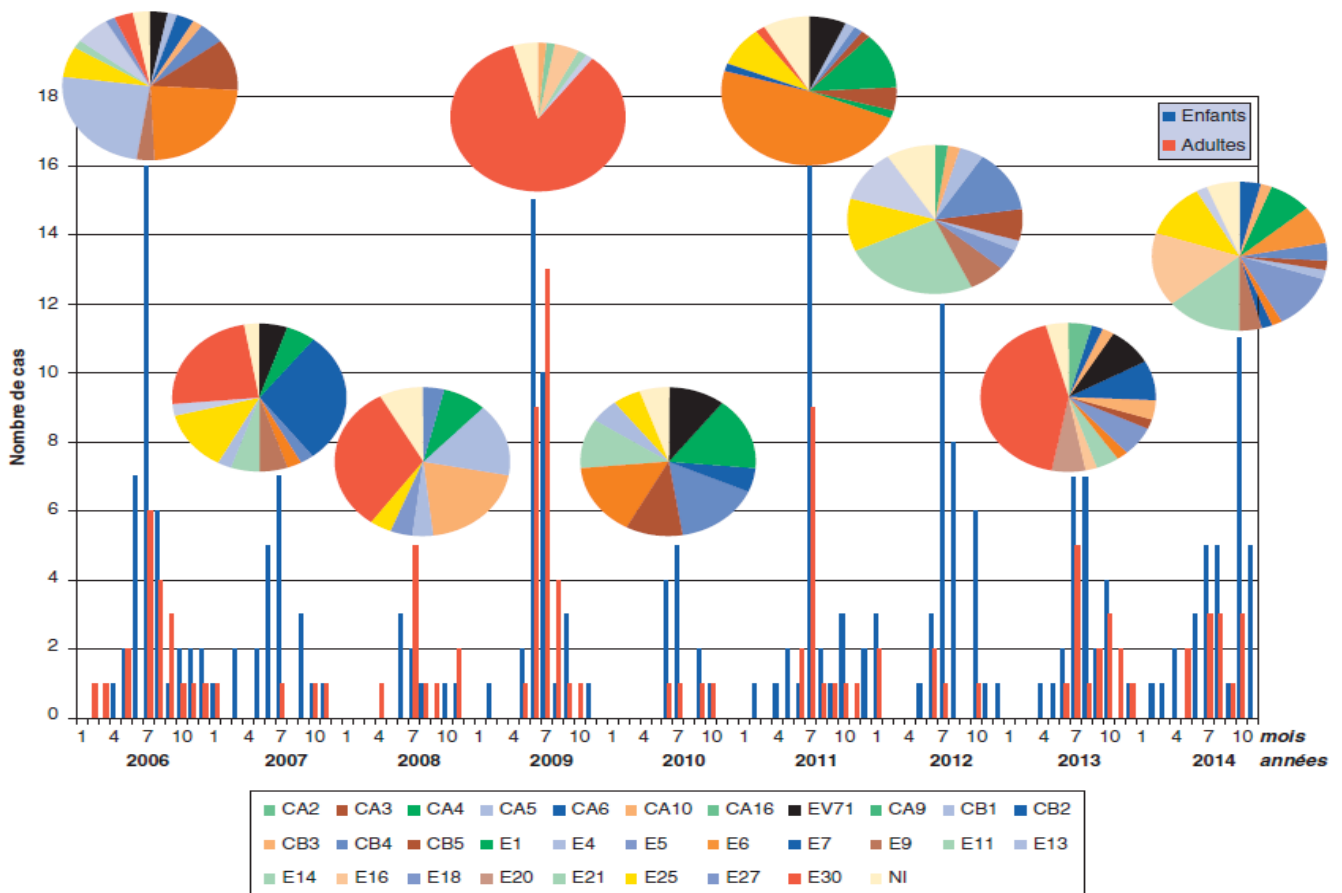
Les EV peuvent être responsables d'atteintes neurologiques du fait de leur caractère neurotrope mais cette neurovirulence est plus ou moins marquée en fonction du type d'EV. Ces infections neuroméningées peuvent survenir à tout âge mais sont majoritairement retrouvées dans la population pédiatrique. En France, 68% des infections neuroméningées à EV ont été diagnostiquées chez des enfants âgés de moins de 15 ans en 2017 (**Schuffenecker *et al.*, 2017**). Ces atteintes neurologiques se manifestent principalement sous la forme de trois entités cliniques qui sont par ordre de fréquence : les méningites aiguës (dites aseptiques), les encéphalites et les myélites.

Classiquement dans les tableaux de méningites et d'encéphalites, une pléiocytose (présence de leucocytes dans le LCR) est observée. Cette pléiocytose débute par une prédominance des polynucléaires puis évolue en 8 à 48 heures vers une prédominance lymphocytaire qui s'accompagne d'une hyperprotéinorachie modérée (**Jubelt et Lipton, 2014**). Cependant, cette pléiocytose n'est pas toujours observée dans les cas de méningite, en particulier pour les jeunes patients. Dans une étude portant sur 73 méningites à EV (présence du génome viral dans le LCR (PCR positive)), une pléiocytose a été observée respectivement chez 96% (22/23) et 88% (29/33) des enfants et des adultes alors qu'elle était présente seulement chez 41% des nourrissons (7/17) (**Archimbaud *et al.*, 2013**).

(A)



(B)



**Figure 12 - Epidémiologie des méningites à entérovirus en France.**

(A) Répartition des cas de méningite à EV par classe d'âge (LCR positif en EV) en 2017 en France (d'après **Schuffenecker et al., 2018**)

(B) Répartition des cas de méningites à EV diagnostiqués de 2006 à 2014 au CHU de Clermont-Ferrand en fonction du temps (mois et années), de l'âge des patients (colonne bleu pour les enfants et rouge pour les adultes) et des types d'EV identifiés par génotypage (représenté par des cercles de couleurs différentes selon le type d'EV avec leur proportion respective). Les méningites ont principalement été observées chez les enfants lors de la saison estivo-automnale mais 30% des cas ont été retrouvés chez l'adulte et 1/3 des méningites sont survenues en hiver (d'après **Peigue-Lafeuille et al., 2016**).

### 3.2.1.1 Méningites aiguës

Le tableau neurologique le plus fréquent parmi ces infections neuroméningées est la **méningite aseptique**. Les EV représentent plus de 75% des cas de méningites aseptiques aiguës chez les enfants et les adolescents mais ces infections peuvent également toucher les adultes (**De Ory et al., 2013 ; Peigue-Lafeuille et al., 2016 ; Martin et al., 2016**). Les méningites à EV sont présentes à bas bruit tout au long de l'année et surviennent surtout sous forme d'épidémies pendant la saison estivo-automnale (**Chambon et al., 2001**) (Figure 12). Plusieurs types d'EV peuvent être responsables de ces méningites aseptiques et plus particulièrement ceux de l'espèce EV-B (échovirus et coxsackievirus B); ces types d'EV circulent et se remplacent au cours des années. Généralement, ces méningites sont spontanément résolutive et sans séquelles.

Plusieurs présentations cliniques sont possibles selon l'âge des patients (**Rotbart, 2000**). La réaction inflammatoire qui se développe dans les méninges suite à la présence d'un EV va provoquer cliniquement un syndrome infectieux représenté principalement par de la fièvre d'apparition brutale et qui peut suivre un schéma biphasique. Chez les nouveau-nés et les jeunes nourrissons, l'irritabilité, la léthargie et la fontanelle bombée peuvent être les seules caractéristiques cliniques. Le syndrome infectieux chez les patients plus âgés est souvent associé à un syndrome méningé typique qui comprend de la fièvre, des céphalées, une raideur de la nuque, une photophobie, des nausées et/ou des vomissements. Il n'y a pas d'atteintes du parenchyme cérébral et l'état général est globalement conservé. D'autres signes non spécifiques peuvent parfois être présents comme une diminution de la prise alimentaire, des éruptions cutanées vésiculeuses (certaines très spécifiques comme le syndrome pieds-mains-bouche), des atteintes respiratoires ou des douleurs abdominales.

### 3.2.1.2 Encéphalites

Les **encéphalites** à EV sont rares et peuvent survenir soit d'emblée, soit en complication d'une méningite. Néanmoins, les EV représentent une des principales causes d'encéphalite virale (première étiologie en Asie et aux USA (**Glaser et al., 2006 ; Ai et al., 2017**) et troisième cause en Europe (**De Ory et al., 2013 ; Popiel et al., 2017**)) et donc doivent être recherchés en première intention avec l'herpès simplex virus et le virus varicelle zona (**Venkatesan et al., 2013**). L'encéphalite à EV correspond à une inflammation du

parenchyme cérébral qui se traduit cliniquement par de la fièvre et des signes neurologiques centraux : altération de la conscience et du comportement (désorientation, somnolence voire coma), convulsions ou déficit neurologique central. Le diagnostic peut s'avérer difficile notamment chez les jeunes enfants devant la difficulté d'évaluer certains troubles comportementaux et ce tableau peut également mimer une encéphalite herpétique. La distinction entre les méningites aseptiques et les encéphalites à EV est très importante car les encéphalites sont cliniquement plus sévères, avec la possibilité de séquelles neurologiques graves voire de décès. Toutes les tranches d'âge peuvent présenter ce tableau neurologique, cependant ces infections sont plus fréquentes dans la population des immunodéprimés et chez les jeunes enfants notamment les nouveau-nés.

Plusieurs types d'EV peuvent être responsables d'encéphalites sévères. Des complications neurologiques graves et potentiellement fatales associées à l'EV-A71 ont été plus fréquemment observées chez les enfants âgés de moins de 5 ans au cours d'épidémies de maladie pieds-mains-bouche survenues dans la région Asie-Pacifique (**Ooi et al., 2010 ; World Health Organization-Western Pacific Region, 2011**). Ces auteurs ont montré que 10 à 30% des enfants avec une maladie pieds-mains-bouche liée à EV71 ont présenté des manifestations neurologiques dont la présentation la plus fréquente était l'encéphalite (58%) suivie par la méningite aseptique (36%). Plus rarement, des tableaux de paralysie flasque aiguë ressemblant à la poliomyélite ainsi que des encéphalites avec atteinte du tronc cérébral et de la moelle pouvant évoluer vers une détresse cardiorespiratoire ont été rapportés. Ces tableaux cliniques représentent la principale cause de décès sinon de séquelles neurologiques à long-terme comme des faiblesses ou des atrophies des membres, une dysphagie avec nutrition parentérale, une hypoventilation centrale nécessitant une assistance respiratoire, une paralysie du nerf facial, des convulsions, des retards psychomoteurs ou encore des atteintes cognitives (**Chang et al., 2007**).

Trois grades de sévérité croissante ont été définis (**Ooi et al., 2010**) :

- Le grade 1 correspond à une encéphalite sans complication avec des symptômes de type contractions myocloniques, ataxie, tremblements et léthargie.
- Le grade 2 correspond à une dérégulation du système nerveux autonome et/ou des paires crâniennes qui est caractérisée par des lésions médullaires et bulbaires à l'imagerie par résonance magnétique et qui se traduit cliniquement par des paralysies du nerf crânien

évidentes à partir de troubles oculaires (nystagmus, strabisme ou parésie du regard), faiblesse faciale et paralysie bulbaire (dysphagie, dysarthrie et dysphonie).

- Le grade 3, survenant 5 jours après les signes cutanéomuqueux, correspond à l'apparition brutale d'une insuffisance cardio-respiratoire souvent mortelle (80 à 90% des cas) avec un œdème pulmonaire et des hémorragies dans les heures qui suivent le développement d'une tachycardie et d'une tachypnée.

Le processus physiopathologique conduisant à la survenue de l'œdème pulmonaire sévère n'est pas bien connu. Sa survenue semble fortement associée à la combinaison d'une intense réponse inflammatoire systémique et du SNC via la libération de nombreuses cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, TNF $\alpha$  et IFN- $\gamma$ ) et chemokines (MCP-1, IP-10, MIG) entraînant une hyperstimulation du système sympathique et une augmentation de la perméabilité vasculaire pulmonaire (Solomon *et al.*, 2010).

### 3.2.1.3 Poliomyélite et Paralysies flasques aiguës

La **poliomyélite antérieure aiguë** (PAA) est la plus ancienne pathologie neurologique à avoir été associée aux poliovirus de type 1 à 3 (Melnick, 1996). Seulement une infection à PV sur 200 va entraîner la maladie paralytique connue sous le nom de PAA (Pallansch *et al.*, 2013). Après 4 à 10 jours d'incubation, des atteintes motrices, qui se traduisent cliniquement par des paralysies, s'installent rapidement dans un contexte de fièvre, de céphalées et de myalgies. Ces atteintes motrices sont liées à l'inflammation et à la destruction des motoneurons de la corne antérieure de la moelle épinière (poliomyélite spinale) et ces atteintes dans 10 à 15% des cas peuvent s'étendre plus profondément dans le tronc cérébral (poliomyélite bulbaire). La poliomyélite spinale est caractérisée par des paralysies flasques généralement asymétriques, limitées aux extrémités et au tronc se traduisant par une légère faiblesse jusqu'à une tétraplégie (Figure 13A). La poliomyélite bulbaire est caractérisée par des paralysies des nerfs crâniens entraînant des dysphagies, des dysarthries, des diplopies et/ou des paralysies faciales. L'atteinte de la formation réticulée peut entraîner des paralysies des muscles respiratoires nécessitant potentiellement un soutien ventilatoire voire le décès du patient. Après une phase de récupération partielle de quelques semaines à quelques mois, des séquelles subsistent dans 75% des cas (amyotrophie d'un membre, anomalie de croissance).

Récemment, une méta-analyse incluant des études de surveillance ainsi que des séries de cas portant sur les **paralysies flasques aiguës** (PFA) non poliomyélitiques a montré que de nombreux types d'EV appartenant aux 4 espèces pouvaient être impliqués dans les PFA (**Suresh et al., 2018**). Les importantes épidémies de maladie pieds-mains-bouche dues à l'EV-A71 et d'infections respiratoires causées par l'EV-D68 ont mis en exergue ces deux virus dans l'implication des cas de PFA. Bien que l'EV-A71 soit fréquemment responsable d'encéphalite, il peut également être à l'origine de PFA avec une destruction des motoneurons de la corne antérieure, infection généralement moins grave que celle causée par les PV et avec un taux de récupération plus élevé (**Ooi et al., 2010**). La circulation accrue de l'EV-D68 en 2014 et en 2016 a coïncidé temporellement et géographiquement avec l'augmentation des cas de myélite flasque aiguë (MFA). La surveillance prospective de la MFA en Californie depuis 2012 a montré une augmentation de l'incidence de ces infections (passant de 0,028 à 0,16 cas pour 100 000 années-personnes d'août 2014 à janvier 2015) coïncidant avec l'épidémie d'infections respiratoires liés à l'EV-D68 (**Van Haren et al., 2015**). Au Colorado, le nombre de cas de MFA entre août et octobre 2014, au cours de la flambée d'EV-D68, était trois fois plus élevé que le nombre de cas rétrospectivement identifiés d'août à octobre sur les 4 dernières années (**Aliabadi et al., 2016**). Plusieurs cas MFA ont également été observés dans d'autres états des Etats-Unis ainsi qu'au Canada et dans plusieurs pays européens sur la même période (**Mesaccar et al., 2018**).

Comme pour les PV et l'EV-A71, l'EV-D68 est fréquemment responsable de séquelles neurologiques avec des déficits moteurs des muscles proximaux des membres supérieurs associés à des atrophies ou la persistance de faiblesses musculaires des membres inférieurs (Figure 13B). Par contre, certaines différences sont caractéristiques des PFA dues à l'EV-D68 comme une atteinte fréquente des membres supérieurs ou des nerfs crâniens, l'absence de complications cardiopulmonaires et d'encéphalites (**Mirand et al., 2018**).



(A)



(B)



**Figure 13 - Tableaux de poliomyélite et de paralysies flasques aiguës dues aux entérovirus non poliomyélitiques.**

- (A) Enfant et adulte présentant une amyotrophie du membre inférieur droit due à la poliomyélite (d'après la banque d'image PHIL (Public Health Image Library) du CDC, image #5578 (à gauche) et image #134 (à droite)).
- (B) Enfants présentant une atrophie de l'extrémité supérieure proximale gauche ainsi que de la ceinture scapulaire (à gauche) et une atrophie asymétrique persistante de la jambe droite (à droite), respectivement 8 mois et 1,5 an après une myélite flasque aiguë (MFA). Ces patients sont issus d'une cohorte de patients du Colorado qui ont présenté une myélite flasque aiguë en 2014, en corrélation avec une importante épidémie d'infections respiratoires sévères due à l'EV-D68 aux Etats-Unis (d'après **Martin et al., 2017**).

### 3.2.2 Infections cutanéomuqueuses

#### 3.2.2.1 Eruptions vésiculeuses

L'**herpangine** est caractérisée par une pharyngite vésiculeuse associée à une dysphagie et de la fièvre. Ces vésicules, qui se transforment en ulcérations peu profondes, se retrouvent le plus souvent sur les piliers amygdaliens, mais également sur le voile du palais, les amygdales, la luette ou la langue. Ces lésions cicatrisent en 7 jours et les complications sont rares. L'herpangine apparaît fréquemment lors d'épidémies touchant principalement la population pédiatrique et ce sont les EV de l'espèce EV-A qui sont les plus incriminés (**Li et al., 2016 ; Chansaenroj et al., 2017**). La gingivostomatite herpétique est un diagnostic différentiel important du fait de l'existence d'un traitement (aciclovir).

La **maladie pieds-mains-bouche** (PMB) est une maladie majoritairement bénigne dont l'évolution est spontanément favorable en 7 à 10 jours. Cette maladie se traduit par de la fièvre associée à une éruption classiquement papulo-vésiculeuse qui apparaît au niveau des plantes des pieds et/ou des paumes des mains. Des ulcération buccales peuvent être présentes et sont souvent associées à une herpangine (Figure 14A). Dans quelques cas, l'éruption peut se manifester sous forme maculo-papuleuse sur les fesses, les genoux et les coudes (**World Health Organization-Western Pacific Region, 2011**). L'espèce A et plus particulièrement l'EV-A71 ainsi que les coxsackievirus A16, A6 et A10 sont les types les plus fréquemment associés à cette maladie (**Mirand et al., 2012 ; Pons-Salort et al., 2015**). Cette maladie touche préférentiellement les enfants âgés de moins de 5 ans et survient sous forme d'épidémies mais elle n'est pas rare chez les adultes vivant au contact d'enfants infectés (**Blomqvist et al., 2010**).

Récemment, des formes atypiques, associées fréquemment au CV-A6, ont été rapportées (**Mathes et al., 2013 ; Mirand et al., 2016**) (Figure 14B) : des lésions cutanées extensives (sur l'intégralité du corps), des « eczéma coxsackium » qui sont caractérisés par des lésions érosives chez des enfants atopiques, des éruptions similaires au syndrome de Gianotti-Crosti (acrodermatite papuleuse au niveau des membres et du visage) et des éruptions purpuriques ou pétéchiales ont été observés. D'autres manifestations cliniques tardives (4 à 8 semaines) peuvent s'observer comme des desquamations cutanées des extrémités associées à des atteintes ongulaires pouvant aller jusqu'à une onychomadèse (chute de l'ongle) (Figure 14C). Ces atteintes sont transitoires et l'ongle repousse normalement (**Clementz et al., 2000**).

(A)



(B)



(C)



**Figure 14 - Signes cliniques associés au syndrome pieds-mains-bouche.**

- (A) Lésions typiques autour de la main, des pieds et de la bouche des enfants atteints du syndrome pieds-mains-bouche (d'après [www.impatientoptimists.org](http://www.impatientoptimists.org)).
- (B) Eczéma coxsackium chez un jeune enfant avec une infection à CV-A6 confirmée : présence de vésicules sur l'intégralité du corps et d'érosions localisées dans les régions touchées par une dermatite atopique (ici le siège et l'arrière des genoux) (d'après **Mathes et al., 2013**).
- (C) Onychomadèse partielle ou complète des ongles d'un garçon de sept ans ayant présenté un épisode de maladie pieds-mains-bouche huit semaines auparavant (d'après **Gan et Zhang, 2017**).

### 3.2.2.2 Conjonctivites aiguës hémorragiques

La **conjonctivite aiguë hémorragique** (CAH) est une maladie virale extrêmement contagieuse, d'apparition brutale (24 à 48 heures) qui guérit spontanément dans un délai de 1 à 2 semaines (**Lévêque et al., 2010**). Elle se caractérise cliniquement par un œil rouge et douloureux, le plus souvent l'atteinte est bilatérale et associe un œdème des paupières, des larmoiements excessifs et parfois un épanchement sanguin sous-conjonctival. Un ganglion prétragien volumineux et douloureux à la palpation est toujours retrouvé. Dans de rares cas, les CAH s'accompagnent d'un fébricule qui n'excède pas 38°C et des atteintes type kératites superficielles ont été observées. L'évolution est favorable, même si des surinfections microbiennes peuvent survenir ainsi que des complications neurologiques telles que des PFA (**Wadia et al., 1983**). L'EV-D70 et un variant du CVA-24 ont été le plus souvent incriminés dans des épidémies explosives de CAH qui surviennent majoritairement dans les régions subtropicales pendant les saisons chaudes et pluvieuses (**Lévêque et al., 2010 ; Pons-Salort et al., 2015**). Le diagnostic différentiel repose principalement sur les conjonctivites à adénovirus ou à HSV.

### 3.2.3 Infections cardiaques

Les EV, plus particulièrement les CV-B, sont une des principales causes virales de myocardites et de myopéricardites aiguës chez les enfants et les jeunes adultes (**Bowles et al., 2003 ; Andréoletti et al., 2009**). Dans une méta-analyse, les données cumulatives obtenues sur 12 études ont montré la présence d'un EV dans le tissu cardiaque chez 23% (68/289) des patients présentant une myocardite aiguë vs 6% (14/216) chez des patients contrôles (Odds Ratio de 4,4) (**Baboonian et Treasure, 1997**). Ces infections correspondent à une inflammation du muscle cardiaque (myocarde) et/ou de la membrane protégeant le cœur (péricarde). Les manifestations cliniques sont extrêmement variables et se présentent sous formes d'infections asymptomatiques, qui sont très fréquentes, pouvant évoluer jusqu'au choc cardiogénique. La myopéricardite est classiquement caractérisée par de la fièvre, des douleurs thoraciques pseudo-angineuses, des palpitations, une dyspnée d'effort et la survenue d'arythmies. Une élévation des enzymes cardiaques est souvent retrouvée. Même si le tableau initial peut être bruyant, la résolution de l'infection est en règle générale favorable. Cependant, de graves complications cardiaques, ainsi que des décès ont été observés notamment chez les nouveau-nés (**Freund et al., 2010**).

### 3.2.4 Infections respiratoires

Les manifestations respiratoires associées aux EV ont été peu étudiées par comparaison aux rhinovirus (RV). De plus, les trousse de diagnostic ne permettent généralement pas de faire la distinction entre les RV et les EV et l'implication des EV dans les infections respiratoires n'est pas toujours facile à prouver du fait de l'existence fréquente de co-infection bactérienne et/ou virale.

Néanmoins, des atteintes respiratoires hautes (rhinite, sinusite, otite, pharyngite) et basses (bronchite, pneumonie, bronchiolite) ont été décrites impliquant divers types d'EV dont les EV-D68 ainsi que les nouveaux EV de l'espèce C qui ont un tropisme respiratoire marqué (**Royston et Tapparel, 2016 ; Mirand et al., 2018**). Récemment, la prévalence des EV a été évaluée à 10% dans les tableaux d'exacerbation d'asthme mais des différences de prévalence ont été observées en fonction de la localisation géographique (plus importante en Asie, puis en Europe) et en fonction de l'âge des patients (fréquente chez les enfants) (**Zheng et al., 2018**). Des études européennes effectuées dans la population pédiatrique ont montré que les EV se situaient au 3<sup>ème</sup> rang des étiologies virales de bronchiolite et/ou d'exacerbation d'asthme, derrière le virus respiratoire syncytial et les RV (**Jartti et al., 2004 ; Jacques et al., 2008**). La plupart de ces tableaux respiratoires sont bénins et spontanément résolutifs en 1 à 2 semaines. Des infections respiratoires sévères (détresses respiratoires aiguës) conduisant à de nombreuses hospitalisations en soins intensifs avec assistance ventilatoire ont été décrites notamment avec l'EV-D68 (**Midgley et al., 2015 ; Schuffenecker et al., 2016**). Les personnes qui ont une pathologie respiratoire sous-jacente ou une immunodépression ont un risque plus important d'infection grave.

### 3.2.5 Autres infections

La **maladie de Bornholm**, appelée également pleurodynie ou myalgie épidémique, est une pathologie musculaire aiguë, d'apparition brutale, qui entraîne des douleurs abdominales et/ou thoraciques intenses souvent associées à de la fièvre, des céphalées et des malaises. Les symptômes guérissent habituellement en 2 à 4 jours mais des rechutes peuvent survenir dans les quelques jours qui suivent et persister ou récidiver pendant plusieurs semaines. Cette infection est généralement associée aux CV-B, parfois aux CV-A et aux echovirus (**Huang et al., 2010a**).

Même si des diarrhées ont fréquemment été rapportées dans les infections à EV, ces virus ne sont pas considérés comme des agents de gastroentérite. En effet, la responsabilité des EV est difficile à prouver car ils coexistent souvent avec d'autres virus comme les rotavirus ou les norovirus et leur portage asymptomatique est très fréquent. D'autres troubles digestifs non spécifiques comme des douleurs abdominales, des nausées et des vomissements ont été également observés. En France, le RSE a rapporté en 2017 la présence de signes digestifs chez 37,4% des patients ayant eu une infection à EV (**Schuffenecker et al., 2018**).

De rares pancréatites aiguës ont également été rapportées chez des enfants et des adultes, généralement dans le cadre d'une infection généralisée et en présence d'autres signes cliniques (**Zhang et al., 2016a, Akuzawa et al., 2014**).

### 3.3 Infections chroniques

Les EV sont majoritairement éliminés par la mise en place des mécanismes de défense immunitaire à médiation humorale et cellulaire. Cependant, dans certains cas, la clairance virale n'est que partielle car les EV peuvent échapper à la surveillance du système immunitaire et évoluer vers une infection virale persistante. Cette persistance est caractérisée par l'absence de virus infectieux et l'émergence de variants moléculaires viraux qui vont impacter le fonctionnement de la cellule infectée mais aussi entretenir des mécanismes d'inflammation chronique et d'auto-immunité (**Renois et al., 2014**).

Plusieurs résultats issus d'études expérimentales chez l'animal et observationnelles chez l'Homme ont montré une probable association entre des infections persistantes à EV et le développement de certaines pathologies chroniques :

- le syndrome post-poliomyélitique (SPP) se caractérise chez 15 à 80% des survivants d'une paralysie poliomyélitique aiguë par l'apparition de nouveaux symptômes neuromusculaires tels qu'une faiblesse et/ou atrophie musculaire, une fatigabilité anormale et intense, des douleurs musculaires et/ou articulaires, des fasciculations, des crampes et une intolérance au froid, plusieurs années après la récupération de la maladie ( $\geq 15$  ans) (**Farbu, 2010**). Le sexe féminin, l'âge précoce d'apparition de la poliomyélite, l'utilisation d'orthèses ou d'aide à la marche, des antécédents de traitement médical et la présence de troubles respiratoires pendant la phase aiguë de la poliomyélite ont été

identifiés comme les principaux facteurs de risque pour le SPP (**Bertolasi et al., 2012 ; Bang et al., 2014**).

- la cardiomyopathie dilatée (CMD) est caractérisée par une dilatation uni ou biventriculaire associée à des altérations de la contractilité du muscle cardiaque. Les myocardites virales aiguës peuvent évoluer vers la chronicité et progresser dans environ 10% des cas vers une CMD dont l'issue est une insuffisance cardiaque terminale avec décès en l'absence de greffe (**Andréoletti et al., 2009**).
- le diabète de type 1 est une pathologie métabolique auto-immune entraînant la destruction des cellules  $\beta$  pancréatiques qui interviennent dans l'homéostasie du glucose via la sécrétion d'insuline (hormone hypoglycémisante). Une méta-analyse réalisée sur 25 études « cas-témoins » a montré une association significative entre les infections à EV et la survenue d'un diabète de type I (Odds Ratio de 9,8) (**Yeung et al., 2011**).

Suite à la détection d'EV dans la moelle épinière ou dans le LCR de patients atteints de la sclérose latérale amyotrophique (SLA) (maladie neurodégénérative progressive des motoneurons) et dans des tissus musculaires de patients atteints du syndrome de fatigue chronique, l'implication des EV dans ces pathologies a été émise mais reste controversée (**Renois et al., 2014**). La conjonction de multiples facteurs (génétiques, immunitaires et environnementaux) serait à l'origine de la plupart de ces pathologies chroniques (**Poller et al., 2005 ; Bergamin et Dib, 2015**).

### 3.4 Infections chez des populations particulières

#### 3.4.1 Femme enceinte et nouveau-nés

Actuellement, il existe peu de données sur les infections à EV pendant la grossesse. La symptomatologie des infections à EV chez la femme enceinte ne diffère pas de celle de l'adulte en général. Quelques études observationnelles chez l'Homme ainsi que des études expérimentales animales ont montré la possibilité d'une transmission *in utero* au moment de la virémie maternelle (**Garcia et al., 1990 ; Jaïdane et al., 2017**). Des infections foetales sévères à EV (malformations intra-utérines, défaillances multiviscérales) ont été diagnostiquées dans le liquide amniotique, le sang de cordon ou différents tissus fœtaux. Des accouchements prématurés associés à des hypotrophies, des fausses couches spontanées ou

encore des morts fœtales *in utero* ont également été décrits (**Chen et al., 2010 ; Méreaux et al., 2017**). Tous les types d'EV peuvent être impliqués dans cette transmission transplacentaire avec une plus grande fréquence rapportée pour les CV-B. La période de transmission la plus fréquente est observée au moment de l'accouchement à partir des sécrétions vaginales, du sang ou des selles de la mère ou après la naissance dans un contexte intrafamilial ou nosocomial (**Modlin et al., 1986**).

Les nouveau-nés sont les sujets les plus à risque d'acquérir une infection à EV et il est difficile de différencier les infections congénitales d'expression néonatale et les infections postnatales précoces. Les infections néonatales à EV sont probablement sous-estimées car la recherche des EV n'est pas systématique chez les nouveau-nés. En France, une infection à EV a été déclarée chez 440 nouveau-nés soit 12,3% (440/3564) des patients ayant présenté une infection à EV en 2017 (**Schuffenecker et al., 2018**). Aux USA, 11% d'infections néonatales ont été rapportés sur la période 1983-2003 (**Khetsuriani et al., 2006**). Le taux de positivité en EV chez les nouveau-nés varie de 3 à 47 % suivant les études (Tableau 4). Les taux les plus élevés ont été observés en période épidémique mais les nouveau-nés présenteraient plutôt un profil endémique par rapport aux adultes.

L'infection à EV est asymptomatique dans 79% des cas ; le diagnostic ayant été réalisé par isolement sur culture cellulaire à partir d'écouvillons rectaux et naso-pharyngés itératifs chez des nouveau-nés (**Jenista et al., 1984**). Chez les nouveau-nés symptomatiques, un rétablissement complet sans séquelles est observé dans la majorité des cas. Dans une étude taïwanaise, les nouveau-nés infectés par un EV ont présenté soit un épisode fébrile isolé ou accompagné de signes aspécifiques dans 30% des cas (43/146), soit une méningite aseptique isolée dans 40% des cas (61/146). Cependant, dans 30% des cas (42/146), des tableaux d'hépatite nécrosante associés à une coagulopathie, une myocardite et/ou des défaillances multiviscérales ont été observés (**Lin et al., 2003b**). Ces formes sévères sont à l'origine de taux de mortalité élevés (de 24 à 100%) ; le décès survenant fréquemment après un collapsus cardiovasculaire et/ou des phénomènes hémorragiques (**Abzug et al., 2001 ; Lin et al., 2003b**). Chez les survivants, des séquelles à long terme cardiaques ou neurologiques ont été documentées (**Verboon-Maciolek et al., 2006 ; Freund et al., 2010**). La précocité des symptômes (premiers jours de vie), la prématurité, la notion de symptômes chez la mère, la présence d'une anémie et/ou d'une hyperleucocytose sont les principaux facteurs de risque de sévérité (**Lin et al., 2003b**).



L'ensemble de ces données incite à rechercher plus largement les EV dans les tableaux infectieux de la mère et du nouveau-né, quel que soit le tableau clinique.

#### 3.4.2 Immunodéprimés

La population des immunodéprimés présente un risque particulièrement élevé d'infections sévères et persistantes à EV. Les personnes présentant une immunodépression humorale congénitale ou après traitement par Rituximab sont les plus à risque de développer une méningo-encéphalite chronique et fatale et dans une moindre mesure, une dermatomyosite (**Halliday et al., 2003 ; Palacios et al., 2015**). Chez les receveurs de greffe et les patients atteints de tumeurs malignes, les infections à EV touchent généralement les voies respiratoires, mais des cas d'encéphalomyélite et d'infection disséminée grave ont été décrits (**Aswathyraj et al., 2018**).

Tableau 4 - Principales études portant sur la prévalence des entérovirus chez les nouveau-nés.

Auteurs de l'article	Pays	Type d'étude	Période de l'étude	Nombre de patients inclus	Tableaux cliniques étudiés	Echantillons testés	Taux de positivité en EV
<b>Jordán et al., 2009</b>	Espagne	Prospectif	09/2003 - 12/2004	328	Fièvre	LCR, sang	3% (10/238)
<b>Cilla et al., 2015</b>	Espagne	Non précisé	09/2012 - 08/2014	57	Fièvre, Sepsis et Méningite	LCR	9% (5/57)
<b>Piralla et al., 2014</b>	Italie	Prospectif	01/2010 – 10/2013	60	Sepsis, Méningite	LCR, sang	12% (7/60)
<b>Ahmad et al., 2013</b>	Koweït	Non précisé	3 ans et ½ (dates non précisés)	139	Sepsis	LCR, sang, selles	24% (34/139)
<b>Cabrero et al., 2015</b>	Espagne	Prospectif	01/2013 – 12/2013	84	Fièvre, Sepsis, Méningite	LCR, sang, gorge	38% (32/84)
<b>Lu et al., 2016</b>	Chine	Prospectif	Été-automne sur 2 ans (2011-2012)	334	Fièvre, Sepsis	LCR, selles	39% (131/334)
<b>Rotbart et al., 1999</b>	USA	Prospectif	06/1994 – 10/1994	58	Fièvre isolée, Méningite	LCR, sang, urines, gorge	47% (27/58)

Abréviations : EV : Entérovirus, LCR : Liquide Céphalo Rachidien.

### III. Diagnostic des infections humaines à entérovirus

Le diagnostic des infections à EV peut s'avérer compliqué lorsque l'on se base uniquement sur des arguments cliniques étant donné le large éventail de symptômes observés dont la plupart manquent de spécificité. Un diagnostic présomptif peut cependant être établi sur certains signes cliniques et sur la base d'informations épidémiologiques, comme la saisonnalité des infections à EV dans les pays tempérés ou un contexte épidémique. Le plus souvent, un diagnostic différentiel avec d'autres infections (virales, bactériennes, ...) doit être envisagé pour une mise en place rapide d'un traitement (antibiotiques dans le cas de méningites bactériennes ou d'antiviraux (aciclovir) dans les suspicions d'infections herpétiques).

#### 1. Techniques de diagnostic

Comme pour la plupart des virus, le diagnostic virologique des EV est basé sur deux approches : le **diagnostic virologique direct** qui repose sur la mise en évidence du virus ou de l'un de ses constituants (génome, antigènes viraux) ou le **diagnostic virologique indirect** qui s'appuie sur la mise en évidence de la réponse du système immunitaire de l'hôte vis-à-vis de l'infection virale. L'introduction de techniques moléculaires plus sensibles, spécifiques et rapides a constitué un progrès considérable dans le diagnostic des infections à EV tant dans les pathologies aiguës que dans les infections chroniques et ce diagnostic moléculaire représente actuellement la méthode de référence.

##### 1.1 Diagnostic virologique direct

###### 1.1.1 Culture virale

L'isolement du virus à partir de la culture cellulaire a longtemps été la méthode de « référence » pour le diagnostic des infections à EV avant l'arrivée des outils de diagnostic moléculaire. La procédure d'isolement implique l'inoculation d'échantillons appropriés sur des cellules sensibles et permissives aux EV. Il n'existe pas de lignée cellulaire capable de cultiver tous les EV car les récepteurs cellulaires permettant l'entrée des EV dans la cellule cible sont différents en fonction du type d'EV.

Tableau 5 - Sensibilité de différentes lignées cellulaires les plus communément utilisées pour l'isolement des entérovirus.\*

Lignées cellulaires	CV-A	CV-B	Echovirus	PV	EV-C	EV-D**
<i>Lignées humaines</i>						
RD	++	+	++	++	++	++
HEp-2	+/-	++	+/-	++	++	
HEL	+/-	+/-	++	++		++
A549	+/-	++	++	++	++	++
MRC5	+	+	++	++		
MCF-7				++	++	
Caco-2	-	+	++	++		
HFS	-	-	++	++		
HeLa	+	++	+	++		++
KB		++		++		
<i>Lignées animales</i>						
L20B	-	-	-	++	-	-
BGMK	+/-	++	+	++		
LLC-MK2	+/-	++	++	++	-	
Vero	+	++	++	++		

Abréviations : RD: *Human Rhabdomyosarcoma*, HEp-2: *Human Epidermoid Carcinoma*, HEL: *Human Embryonic Lung*, A549: *Human Epithelial Lung Carcinoma*, MRC5: *Human Embryonic Lung Fibroblast*, MCF-7: *Human Mammary Gland Adenocarcinoma*, Caco-2: *Human Adenocarcinoma Colon*, HFS: *Human ForeSkin*, HeLa: *Human Epitheloid Cervix Adenocarcinoma*, KB: *Human Squamous Carcinoma*, L20B: *Mice cell line with transgenic poliovirus receptor (CD155)*, BGMK: *Buffalo Green Monkey Kidney*, LLC-MK2: *Rhesus Monkey Kidney*, Vero: *African Green Monkey Kidney*, CV-A : Cocksackievirus A, CV-B : Cocksackievirus B, PV : Poliovirus, EV : Entérovirus.

- : insensible ; +/- : sensibilité variable ; + : faible sensibilité ; ++ : bonne sensibilité

\*Compilation des sensibilités observées dans plusieurs publications : **Chonmaitre et al., 1988** ; **Trabelsi et al., 1995** ; **Sedmak et al., 2003** ; **Prim et al., 2013**, **Shukla et al., 2013** ; **Wieczorek et al., 2013** ; **Liu et al., 2015** ; **Betancourt et Shulman, 2015, 2015** ; **Zhang et al., 2016b** ; **Brown et al., 2018** ; **Donbraye et al., 2018**.\*\*Données disponibles principalement pour EV-D68.

Il est donc courant d'utiliser plusieurs lignées cellulaires d'origine humaine ou simienne pour augmenter leur détection (Tableau 5). Récemment, Prim et ses collègues ont proposé que l'utilisation combinée de 3 lignées cellulaires, les cellules MRC5 (fibroblastes embryonnaires de poumons humains), les cellules A549 (cellules humaines d'adenocarcinome pulmonaire) et les cellules RD (cellules humaines de rhabdomyosarcome), permettait d'optimiser l'isolement des EV à partir d'échantillons cliniques, les meilleurs résultats étant obtenus avec les cellules MRC5 (**Prim et al., 2013**).

La mise en évidence d'un EV en culture cellulaire se fait par l'observation quotidienne en microscopie optique de la survenue d'un effet cytopathogène (ECP) caractéristique de l'infection à EV qui apparaît 2 à 15 jours après l'inoculation en fonction du type d'EV. Cet ECP se traduit à l'état frais par l'apparition de cellules qui se rétractent, deviennent réfringentes sur l'ensemble du tapis cellulaire et se détachent de la boîte de culture (nappe détruite). Après coloration, on peut observer la disparition des nucléoles, un refoulement du noyau en périphérie prenant une forme incurvée et la rétraction du cytoplasme. La confirmation de cet ECP se fait soit par immunofluorescence en utilisant des anticorps monoclonaux anti-VP1, soit à l'aide d'une technique de biologie moléculaire (RT-PCR). Il est impossible de distinguer les différents types d'EV sur la base de l'ECP et l'identification ne peut se faire qu'après séroneutralisation ou séquençage. Par contre, dans le cadre de la surveillance et de l'éradication des poliovirus, la lignée cellulaire L20B de souris transgénique pour le récepteur CD155 permet d'isoler spécifiquement les 3 types de PV en culture cellulaire (**Wood et Hull, 1999**).

Le principal intérêt de la culture cellulaire est la mise en évidence du pouvoir infectieux des EV présents dans un échantillon. Dans certains cas exceptionnels, la culture cellulaire peut aider au diagnostic en cas de virus variant non détecté par la RT-PCR. Néanmoins, cette méthode longue et laborieuse n'est plus utilisée en routine pour le diagnostic des infections à EV. D'autres part, certains types d'EV se répliquent mal ou pas du tout *in vitro* comme les CV-A et l'EV-A71 (espèce EV-A) ou encore l'EV-D68 qui nécessite des températures d'incubation inférieures à celles normalement appliquées aux EV (**Harvala et al., 2018**). De plus, la sensibilité de la culture cellulaire est inférieure à celle des techniques de biologie moléculaire notamment dans les échantillons ayant des faibles titres viraux (LCR) (**Van Doornum et al., 2007**). Elle est aujourd'hui réservée aux centres nationaux de référence ou de recherche dans le cadre de la surveillance de souches circulantes (en particulier du poliovirus) ou afin de tester des thérapeutiques antivirales.

## 1.1.2 Techniques de biologie moléculaire

### 1.1.2.1 Amplification génique par RT-PCR

Les limites de la culture cellulaire ont favorisé le développement des techniques de biologie moléculaire permettant l'amplification et la détection du génome viral des EV. La mise au point de techniques de détection « universelle » des EV par RT-PCR a été possible grâce à la présence de segments génomiques hautement conservés dans la région 5'NC des EV. Différents couples d'amorces ciblant plusieurs parties de la région 5'NC ont permis de faire un diagnostic de genre sans précision du type. Au fur et à mesure des années, ces techniques ont connu de nombreuses évolutions technologiques permettant d'optimiser le diagnostic des infections à EV. Au début des années 1990, la détection génomique des EV reposait sur des techniques « maison » avec un délai de rendu des résultats d'environ 8 heures (**Hyypiä et al., 1989 ; Rotbart, 1990 ; Chapman et al., 1990**). Ces techniques consistaient à amplifier le génome viral par une RT-PCR classique puis à détecter les produits amplifiés par divers procédés : électrophorèse sur gel d'agarose ou hybridation moléculaire avec des sondes froides. Depuis les années 2000, l'apparition des techniques de PCR en temps réel a permis de réduire de manière considérable le délai de rendu des résultats (environ 3 heures) (**Monpoeho et al., 2002 ; Archimbaud et al., 2004 ; Dierssen et al., 2008**). Ces techniques utilisent des appareils (thermocycleurs), dotés d'un système de lecture de la fluorescence, permettant simultanément l'amplification et la détection des séquences d'ADN grâce à l'utilisation de molécules fluorescentes. Plusieurs fluorophores sont disponibles : des agents intercalants comme le Sybr Green qui s'intercalent dans l'ADN double brin en formation ou des sondes oligonucléotidiques d'hydrolyse (Taqman™) ou d'hybridation (Beacon™) qui s'apparient spécifiquement sur la séquence cible. L'automatisation des étapes d'extraction des acides nucléiques et d'amplification/détection des séquences d'ADN est maintenant accessible à tout laboratoire. Récemment, l'apparition de systèmes complètement automatisés réalisant l'ensemble des étapes d'extraction et d'amplification dans une seule cartouche réactionnelle a permis de réduire encore plus le délai de rendu des résultats (<2h). Les étapes manuelles de la réalisation de la PCR, le temps technique et les risques de contamination ont ainsi été significativement réduits (**Marlowe et al., 2008**).

La technique de PCR est devenue la méthode de référence pour le diagnostic de nombreuses infections virales: elle est très sensible, spécifique, standardisée et elle permet un diagnostic de certitude rapidement sur des petits volumes d'échantillons. De nombreuses études,

réalisées dans le cadre du diagnostic des méningites à EV, ont démontré la supériorité de la PCR par rapport à la culture virale (environ 1000 fois plus sensible) (**Van Doornum et al., 2007**). Le diagnostic des EV repose sur la **détection qualitative** du genome viral par PCR (avec un rendu des résultats positif ou négatif) dans divers prélèvements (LCR, sang, gorge, selles...). Des **techniques quantitatives** « maison » réalisées à partir de gammes standardisées de plasmides ou d'ARN transcrits ont été développées (**Monpoeho et al., 2002 ; Dierssen et al., 2008 ; Volle et al., 2012**). Cependant, ces techniques quantitatives ont peu d'intérêt en pratique courante dans le diagnostic des infections à EV. Elles présentent cependant un intérêt dans le suivi des infections chroniques à EV chez des sujets immunodéprimés (ou agammaglobulinémiques), infections qui sont rares (**Yen et al., 2007**). La quantification reste cependant un outil intéressant en recherche pour mieux connaître la physiopathologie des infections à EV.

A l'ère de l'approche syndromique, les EV peuvent être recherchés en association avec d'autres agents viraux voire bactériens, mycologiques et /ou parasitaires grâce à l'utilisation de PCR multiplex. Bien que ces tests présentent les avantages évidents d'une exécution simple et d'un délai de rendu de résultat rapide permettant une amélioration de la prise en charge des patients, il reste encore certains inconvénients quant à leur utilisation dans la pratique quotidienne comme le coût et leur place dans la stratégie diagnostique.

#### 1.1.2.2 Typage des entérovirus

Dans la majorité des cas, le diagnostic de genre est suffisant car l'identification précise du type d'EV en cause n'a pas d'impact sur la prise en charge du patient. Néanmoins, le typage permet d'identifier les PV dans le cadre du programme d'éradication de la poliomyélite, de suivre la circulation des EV et de découvrir ainsi de nouveaux variants d'EV, de caractériser le type responsable d'une épidémie ou d'une manifestation clinique atypique ou encore d'établir l'origine nosocomiale d'une infection (**Bailly et al., 2000**).

Pendant de très nombreuses années, l'identification du type d'EV s'effectuait grâce à des sérums immuns par séroneutralisation en culture cellulaire (sérotypage). Actuellement, le typage des EV repose sur des techniques de biologie moléculaire (génotypage) qui permettent l'amplification puis le séquençage par la méthode Sanger d'une région variable du genome viral à partir de la souche isolée en culture cellulaire ou plus fréquemment, directement à

partir de l'échantillon clinique (**Mirand et al., 2008**). Plusieurs méthodes de typage moléculaire des EV (génériques ou spécifiques des 4 espèces d'EV) ont été proposées et ciblent principalement les gènes codant les protéines structurales de la capsidie (**Nix et al., 2006 ; Mirand et al. 2008, Mirand et al., 2016**). Le gène 1D codant la protéine majeure VP1 est le plus utilisé du fait d'une parfaite corrélation avec le sérotype des souches et d'une excellente discrimination de tous les rangs taxonomiques (de l'espèce au variant) (**Oberste et al., 1999; Mirand et al., 2008**). Les typages moléculaires reposant sur la région VP4 et VP2 peuvent également être utilisés en cas d'échec sur la région VP1 mais les recombinaisons dans la région VP4 limitent leur efficacité pour l'identification des EV-B (**Harvala et al., 2018**). La séquence obtenue est ensuite assignée à un type d'EV par une analyse phylogénétique qui permet de comparer cette séquence à un jeu de séquences connues et représentatives des différents types d'EV-A à D. Face à la pathogénèse particulière de certains EV comme l'EV-D68 ou l'EV-A71 ou dans le cadre de la surveillance des poliovirus, des PCR spécifiques permettant la détection d'un seul type d'EV ont été mises au point. Le but étant de dépister plus rapidement ces types d'EV afin de mettre en place plus efficacement une capacité de réponse face à une alerte sanitaire (**Tan et al., 2008 ; Zhuge et al., 2015**). Des méthodes de séquençage de nouvelle génération (NGS : *Next Generation Sequencing*) sont en cours de développement afin d'obtenir le génome complet des EV, avec ou sans amplification génomique au préalable, et devraient permettre l'identification de nouveaux événements de recombinaison, et la détection des infections mixtes, en particulier celles causées par deux types de virus de la même espèce (**Harvala et al., 2018**).

## 1.2 Diagnostic virologique indirect: sérologie

Le diagnostic virologique indirect repose sur la détection des anticorps anti-EV (IgG et IgM) produits par l'hôte suite à une infection à EV. Plusieurs techniques sérologiques ont été développées : la séroneutralisation, la fixation du complément, l'inhibition de l'hémagglutination ou encore des techniques immunoenzymatiques (ELISA). La séroneutralisation est la méthode la plus utilisée. Cette technique consiste d'abord à mettre en contact une quantité constante et connue d'un type d'EV avec un volume de sérum dilué de façon croissante puis ces mélanges sont ensuite inoculés en culture cellulaire. On observe quotidiennement s'il y a une inhibition du pouvoir infectieux pour chaque mélange c'est-à-dire une absence d'ECP du fait de la neutralisation du virus par les anticorps. La dernière



dilution pour laquelle une inhibition du pouvoir infectieux est observée fournit le titre en anticorps neutralisants dans le sérum testé. Deux sérums du même patient correspondant aux périodes aiguë et tardive de l'infection à EV sont nécessaires et testés en parallèle pour rechercher une séroconversion ou une variation significative du titre des anticorps entre les deux échantillons. Une augmentation du titre x 4 entre les deux échantillons signe une infection récente (**Harvala et al., 2018**).

Ces techniques de diagnostic indirect, majoritairement manuelles et non standardisées, ont connu un intérêt et un développement très limité pour plusieurs raisons : 1) l'absence d'antigène commun entre les EV, 2) la diversité antigénique des EV, 3) la possibilité de réactions croisées entre types qui rend l'interprétation des résultats très complexe. La sérologie n'a donc plus d'intérêt pour le diagnostic des infections à EV mais elle peut être utile pour des études épidémiologiques afin de connaître la séroprévalence d'un type donné dans une population ou encore pour évaluer l'immunité post vaccinale contre les 3 poliovirus responsables de la poliomyélite.

## **2. Prélèvements et stratégies de diagnostic**

La recherche des EV peut être réalisée dans tous types d'échantillons biologiques (Tableau 6) (**Harvala et al., 2018**). Ces prélèvements doivent être réalisés au site de l'infection, le plus précocement possible après le début des signes cliniques. Des prélèvements périphériques complémentaires (gorge, selles, nasopharynx) peuvent aider au diagnostic de certaines infections à EV. Dans les encéphalomyélites à EV-A71, la recherche combinée dans le LCR, le sang, la gorge et les selles a permis d'atteindre 91% de positivité contre 17% de détection uniquement à partir du LCR (**Tsai et al., 2014**). La détection d'EV dans le sang parallèlement au LCR chez des patients présentant une suspicion de méningite a permis d'augmenter la sensibilité du diagnostic virologique de 14% (sang+/LCR-) par rapport au LCR (**Marque Juillet et al., 2013**). Les critères de définition de la suspicion de méningite incluaient : fièvre accompagnée de vomissements ou de symptômes méningés (raideur de nuque voire hypotonie axiale chez le nourrisson), de céphalées, de photophobies, de troubles de la conscience ou d'autres signes neurologiques, de convulsions fébriles ou de fièvre mal supportée chez les enfants de moins de 3 mois. La méningite à EV était définie par la présence du génome viral dans le LCR (PCR positive), avec ou sans pléiocytose.

Le diagnostic rapide des méningites à EV par RT-PCR dans le LCR a permis une meilleure prise en charge des patients qui s'est traduite par une diminution de la durée d'hospitalisation, un arrêt des traitements (antibiotique ou antiviral) et des investigations complémentaires (Archimbaud et *al.*, 2013).

**Tableau 6 - Prélèvements à réaliser dans les principaux tableaux cliniques pour le diagnostic des infections à entérovirus (d'après Peigue-Lafeuille et al., 2016 ; Harvala et al., 2018).**

Présentations cliniques	Echantillons biologiques à prélever pour la détection génomique des EV
Méningites / Encéphalites	<b>Liquide céphalo-rachidien</b> , écouvillonnage de gorge ou aspiration nasopharyngée, selles voire sang
Paralysie / Myélite flasque aigüe (PFA, MFA)	<b>Écouvillonnage de gorge ou aspiration nasopharyngée, selles</b> , liquide céphalo-rachidien et sang
Maladie pieds-mains-bouche (PMB), herpangine, éruptions atypiques	<b>Vésicules</b> (cutanées et/ou buccales) et/ou écouvillonnage de gorge ou aspiration naso-pharyngée et/ou selles
Suspicion d'infection materno-foetale	Sang maternel, écouvillonnage de gorge ou aspiration nasopharyngée, selles et/ou liquide amniotique
Sepsis néonatal	<b>Liquide céphalo-rachidien</b> , sang, écouvillonnage de gorge ou aspiration nasopharyngée, selles, urines et/ou biopsies tissulaires, liquides d'épanchement accompagnés si possible de prélèvements maternels
Infections respiratoires	<b>Aspiration ou écouvillonnage nasopharyngés</b> , lavage broncho-alvéolaire voire selles
Conjonctivite hémorragique	<b>Prélèvement conjonctival</b>
Myocardite, péricardite	Selles, écouvillonnage de gorge et/ou aspiration nasopharyngée, sang et/ou liquide d'épanchement, <b>biopsie cardiaque</b> si disponible

Les prélèvements en caractère gras représentent l'échantillon de référence en fonction du tableau clinique.

## IV. Approches préventives et thérapeutiques des infections à entérovirus

La prévention des infections à EV a longtemps été privilégiée par rapport à l'approche thérapeutique avec des mesures non spécifiques (règles d'hygiène universelle) mais surtout la vaccination (anti-poliovirus), qui est le moyen de prévention le plus efficace. Néanmoins, l'existence de formes sévères, l'amélioration des connaissances sur la physiopathologie des infections à EV ainsi que la mise en place d'un diagnostic virologique moléculaire rapide ont stimulé le développement de nouvelles approches thérapeutiques.

### 1. Mesures prophylactiques non spécifiques

La transmission des EV étant principalement fécale-orale, les mesures préventives à mettre en place sont destinées à lutter contre le péril fécal. L'une des mesures préventives les plus importantes est le maintien, l'amélioration ou la mise en oeuvre des conditions d'hygiène et d'assainissement dans certains pays. L'éducation sanitaire est fondamentale et doit comporter de nombreux rappels, en particulier chez les personnes les plus exposées telles que les voyageurs, les populations « défavorisées ». Les conseils pour lutter contre la transmission des EV sont principalement :

- l'hygiène corporelle et le lavage des mains notamment par des solutions hydro-alcooliques (SHA) après avoir été aux toilettes ou dans des situations favorisant la manipulation d'excréta humains (changement des couches des bébés par exemple)
- l'hygiène et l'entretien des objets, des surfaces et des locaux avec des désinfectants chlorés (eau de Javel)
- l'hygiène alimentaire avec la désinfection des matériaux et des surfaces utilisés pour la production alimentaire, le chauffage des aliments pour inactiver le virus, l'utilisation d'eau non contaminée ou traitée pour le lavage des aliments
- l'installation de sanitaires (latrines, fosses septiques, tout-à-l'égout). Malheureusement, pour environ 2,4 milliards de personnes, soit un tiers de la population mondiale actuelle, ces dispositifs sont incomplets voire inexistantes (**OMS, 2015**)
- la mise en place de traitements efficaces pour les eaux usées dans les stations d'épuration.

En milieu hospitalier, la transmission des EV peut-être redoutable dans les services accueillant des patients à risque comme les nouveau-nés ou les patients immunodéprimés. La principale source de contamination est fécale-orale, via des malades symptomatiques ou asymptomatiques, mais peut-être aussi respiratoire. La mise en place de mesures d'hygiène hospitalières à travers les précautions standard, qui repose principalement sur l'hygiène des mains, mais aussi via des précautions complémentaires de type contact ou de type gouttelettes peuvent permettre de limiter voire d'éviter les infections nosocomiales à EV. Parfois, la mise en quarantaine d'un service peut être considérée en complément de ces mesures comme ce fut le cas lors d'une épidémie à EV-A71 impliquant 7 nourrissons à Taiwan (**Huang et al., 2010b**).

## 2. Vaccination

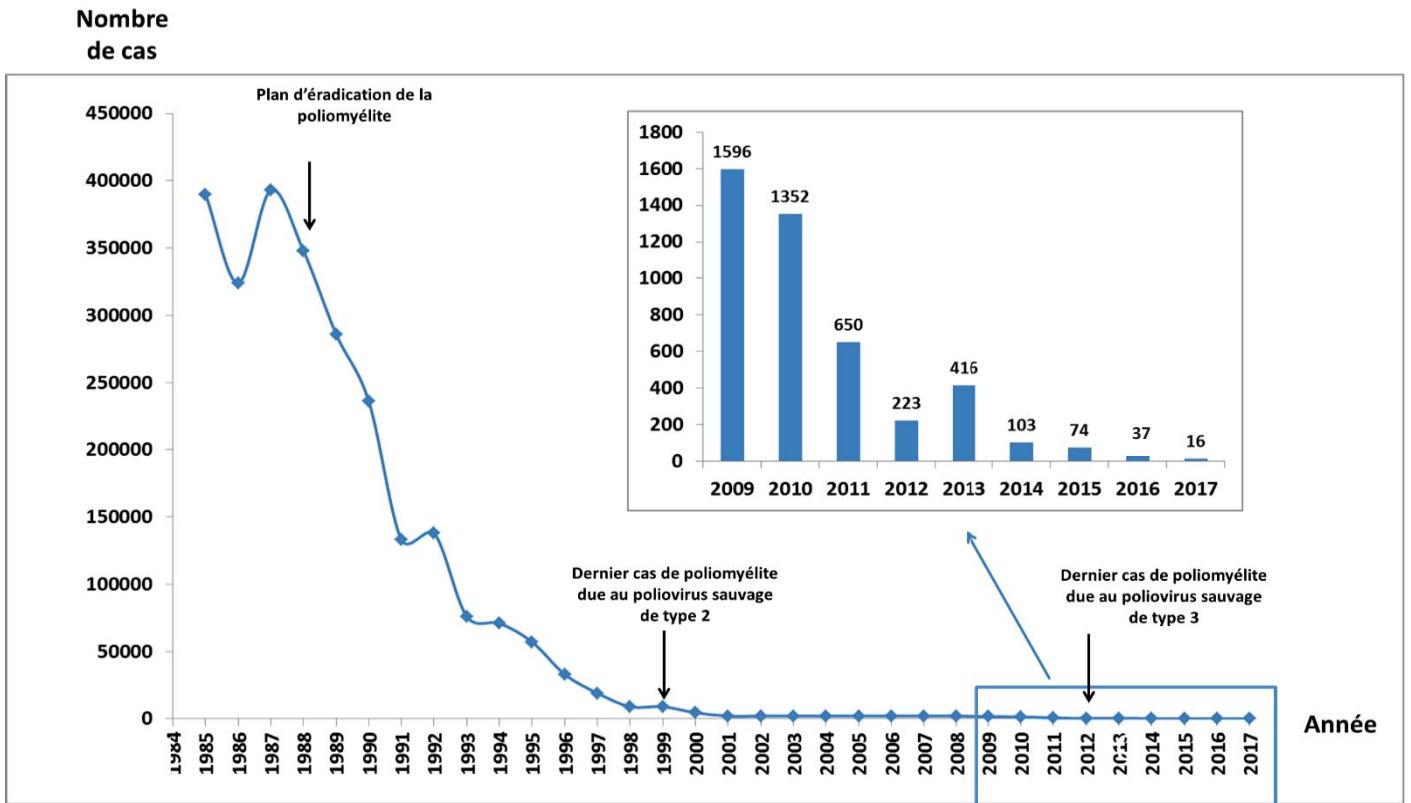
### 2.1 Vaccination contre la poliomyélite

Deux vaccins, mis au point dans les années 1950, sont utilisés dans la protection contre la poliomyélite au niveau mondial. Le premier est un vaccin injectable (sous-cutané ou intramusculaire) développé par Jonas Salk qui est constitué des trois souches de PV inactivées par le formol (VPI) (**Salk et al., 1954**). Le second est un vaccin polio oral (VPO) d'Albert Sabin, élaboré grâce à des souches vivantes atténuées (vaccin trivalent contre le poliovirus type 1, 2 et 3) capables de se multiplier dans l'intestin humain sans provoquer de maladie neurologique et d'induire une immunité durable générale (**Sabin, 1959**). Le VPO a longtemps été privilégié comme vaccin de l'éradication de la poliomyélite par rapport au VPI pour plusieurs raisons : (1) son faible coût, (2) sa facilité d'administration (voie orale), de stockage et de transport, (3) sa capacité à restreindre la circulation des PV sauvages en réduisant le nombre d'excréteurs potentiels grâce à l'induction d'une immunité durable et intestinale supérieure à celle du VPI, et (4) son immunité de contact par immunisation passive des personnes non vaccinées via l'excrétion des souches vaccinales dans les selles (**Bandyopadhyay et al., 2015**). Cependant, le VPO peut être responsable exceptionnellement dans 4,7 cas pour 1 million de paralysie (poliomyélite paralytique associée au vaccin (ou PPAV)), avec un risque plus important chez les personnes immunodéprimées (**Platt et al., 2014**). De plus, les souches vaccinales incluses dans le VPO présentent l'inconvénient d'être génétiquement instables et sont donc susceptibles de devenir neurovirulentes, dans des

communautés où la couverture vaccinale est insuffisante. Cette instabilité génétique se traduit par des mutations et/ou des recombinaisons génétiques avec d'autres EV de la même espèce, en particulier certains CV-A de l'espèce C : on parle alors de poliovirus dérivés du vaccin ou PVDV (**Combélas et al., 2011**). Ces PVDV et plus particulièrement le PVDV de type 2 ont été responsables de cas sporadiques ou d'épidémies de poliomyélite dans de nombreux pays comme au Nigéria, au Pakistan, en Syrie et plus récemment, en République Démocratique du Congo (**Jorba et al., 2017**). Devant l'importance de la circulation des PVDV notamment de type 2 et le risque de réversion de la neurovirulence des souches vaccinales, l'OMS a été amené à retirer en 2016 la souche vaccinale de type 2 du VPO trivalent avant la substitution totale du VPO par le VPI (**World Health Organization, 2013**).

L'objectif d'éradiquer mondialement la poliomyélite a été adopté en 1988 par l'OMS grâce à l'utilisation de deux vaccins efficaces. La vaccination a permis de réduire >99% des cas de poliomyélite dans le monde passant de 350 000 en 1988 à 37 cas notifiés en 2016, et d'éviter la paralysie chez plus de 16 millions de personnes (**World Health Organization, 2018**) (Figure 15A). Au total, 4 des 6 régions OMS ont été certifiées exemptes de poliomyélite : la Région des Amériques (1994), la Région du Pacifique Occidental (2000), la Région Europe (2002) et la Région de l'Asie du Sud-Est (2014). Le PV-2 a été éradiqué en 1999 et aucun cas d'infection au PV-3 n'a été signalé depuis 2012. En France, la vaccination obligatoire depuis 1964 a permis de diminuer rapidement le nombre de cas. Le dernier cas de poliomyélite autochtone due à un PV sauvage remonte à 1989 et le dernier cas importé à 1995 (**InVS, 2016**) (Figure 15B). L'éradication complète de la poliomyélite, initialement espérée en 2000, a été repoussée à de nombreuses reprises en raison des difficultés d'application de la vaccination dans certaines régions du Monde et elle est actuellement prévue courant 2018-2020. Seuls le Pakistan, le Nigéria et l'Afghanistan sont actuellement considérés comme endémiques et constituent donc un réservoir de virus. Le risque d'exportation de ces poliovirus vers les pays devenus indemnes implique de maintenir une surveillance mondiale étroite des PV. En 2013, 36 cas de poliomyélite dûs à la souche sauvage de PV-1 ont été signalés en Syrie alors que le dernier cas de PV sauvage autochtone et importé avait été déclaré respectivement en 1995 et en 1999. En Israël, la PV-1 sauvage a été détecté dans des prélèvements environnementaux (eaux usées) et clinique (patients asymptomatiques) en 2013 alors que les derniers cas de poliomyélite autochtones dans ce pays avaient été recensés en 1988. Ces souches de PV-1 sauvages en Syrie et en Israël étaient proches de celles ayant circulé notamment au Pakistan (**Shulman et al., 2014 ; Mbaeyi et al., 2017**).

(A)



(B)

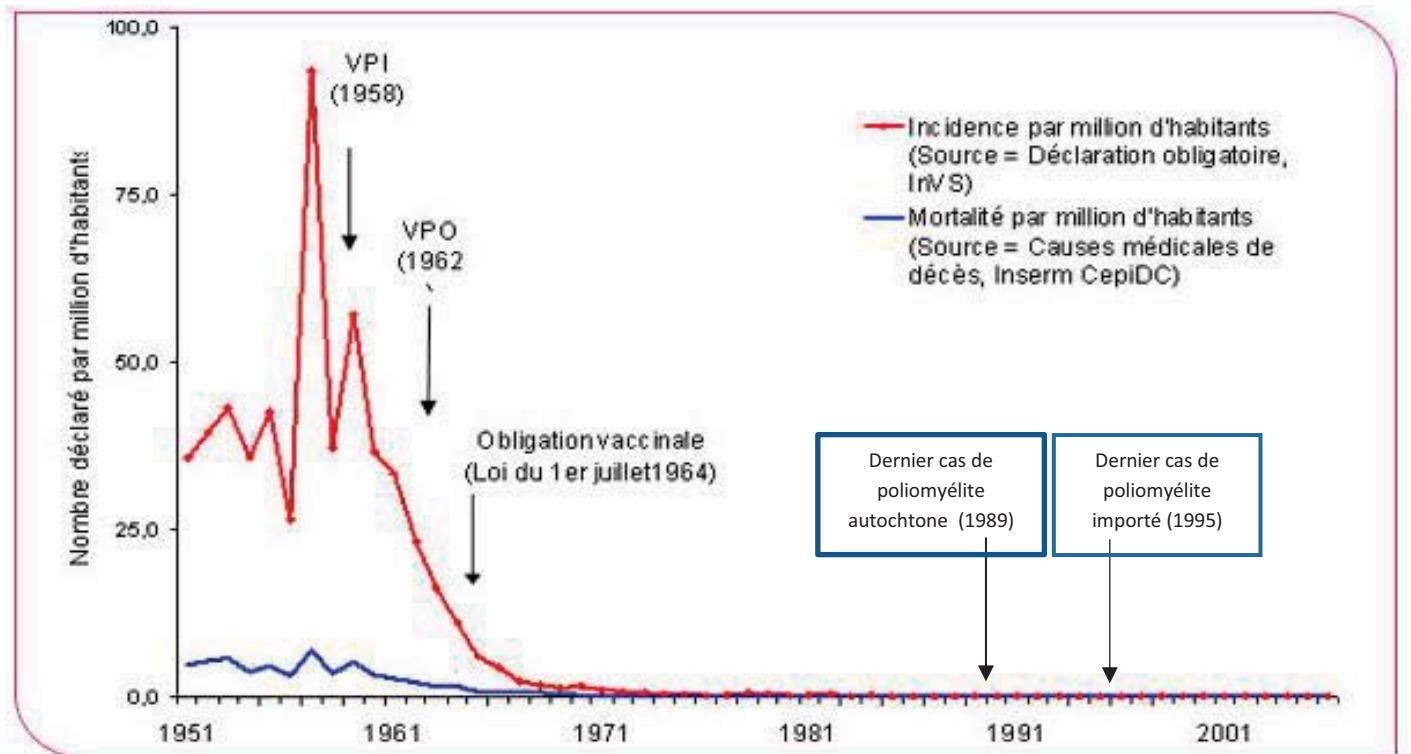


Figure 15 - Incidence des cas de poliomyélite dans le monde et en France.

(A) Représentation du nombre de cas notifiés de poliomyélite par année dans le Monde de 1985 à 2017 (d'après les données de *World Health Organization*, 2018).

(B) Nombre de cas déclarés de poliomyélite et de décès par million d'habitants et par année en France de 1951 à 2006 (d'après les données de *InVS*, 2016).

## 2.2 Vaccination contre les entérovirus non poliomyélitiques

Actuellement, il n'existe pas de vaccin permettant de prévenir l'ensemble des infections dues aux EV non poliomyélitiques. Pourtant, le développement de vaccins contre ces EV semble pertinent, face au succès des campagnes de vaccination pour éradiquer la poliomyélite, afin d'enrayer efficacement leur dissémination et de contrôler la survenue d'épidémies. L'objectif d'obtenir un vaccin polyvalent, sûr et efficace contre les EV non poliomyélitiques semble difficile actuellement à mettre au point du fait de la très grande diversité de ces EV et de l'évolution constante de ces souches. Néanmoins, cet objectif semble possible grâce aux résultats de Lee et ses collègues qui ont réussi à induire chez des macaques, après l'injection d'un vaccin combinant 50 types de rhinovirus, des anticorps neutralisants contre 98 % (49/50) de ces types (**Lee et al., 2016**).

La recherche actuelle se focalise principalement sur la mise en place d'un vaccin préventif contre l'EV-A71 suite à l'émergence de la maladie PMB et de ses complications neurologiques chez les jeunes enfants dans la région Asie-Pacifique. L'objectif est le développement d'un vaccin de faible coût, facile à administrer, efficace et sécurisé contre tous les génotypes d'EV-A71 (**Kok et al., 2015**). Actuellement, plusieurs vaccins contre l'EV-A71 sont en cours de développement, principalement en Asie. Différentes approches technologiques ont été envisagées: les protéines et peptides synthétiques, les virus-like particules, les vaccins à ADN (insertion d'un gène viral dans un vecteur d'expression eucaryote comme un plasmide), les vaccins atténués et les vaccins inactivés ; cette dernière approche est privilégiée du fait de leur innocuité et de l'absence de risque de réversion de la neurovirulence des souches vaccinales (**Yee et Laa Poh, 2017**). Actuellement, trois vaccins (Sinovac Biotech, CAMS (Chinese Academy of Medical Science) and Beijing Vigoo Biological) ont achevé les essais cliniques de phase III et leurs commercialisations ont été autorisées pour deux d'entre eux par les autorités chinoises (CAMS en 2015 et Sinovac Biotech en 2016). Ces trois vaccins sont inactivés et sont dirigés contre l'EV-A71 de génotype C4. Après vaccination, un taux de séroconversion de 95 à 100 % a été observé avec une protection/couverture vaccinale pouvant persister pendant 2 à 5 ans et une efficacité vaccinale de plus de 90 % contre la maladie PMB et de 100% contre les complications neurologiques (**Wei et al., 2017 ; Hu et al., 2018**). Une autre problématique a été soulevée concernant l'immunogénicité croisée vis-à-vis des autres variants d'EVA-71. Aussi, il est



envisagé de développer un vaccin multivalent intégrant les autres variants d'EVA-71 ainsi que d'autres EV responsables de maladie PMB sévères.

Récemment, un vaccin tétravalent incluant des virus-like particules (capsides virales vides, sans génome viral) d'EV-A71, de CV-A16, de CV-A6 et de CV-A10 a montré après injection chez des souris une réponse efficace et durable en anticorps protecteurs contre ces 4 types d'EV (**Zhang et al., 2018**).

### **3. Traitements des infections humaines à entérovirus**

Actuellement, le traitement des infections à EV est uniquement symptomatique. Le traitement des infections sévères à EV (notamment à EV-A71) repose sur une prise en charge du patient en réanimation avec une intubation précoce voire une oxygénation par membrane extracorporelle (ECMO), l'administration d'agents inotropes (plus particulièrement la milnirone) et d'immunoglobulines polyvalentes en fonction du stade de l'infection (**World Health Organization-Western Pacific Region, 2011 ; Wang, 2016**). Bien que les recherches soient très actives, il n'y a pas encore d'antiviraux contre les infections à EV disponibles pour les patients. Pourtant, ce traitement spécifique est crucial pour les infections sévères et en l'absence de vaccins polyvalents efficaces.

#### **3.1 Immunoglobulines polyvalentes**

Actuellement, il existe peu de données sur le bénéfice des immunoglobulines intraveineuses (IgIV) dans le traitement préventif et curatif des infections sévères à EV. En effet, quelques cas rapportés ou des études observationnelles incluant de faibles effectifs de patients ont été publiés. Globalement, le succès de ces IgIV dans le traitement de ces infections est très variable suivant les études. Chez les patients avec un déficit constitutionnel de l'immunité humorale, le traitement consiste à initier une thérapie d'IgIV à haute dose voire dans certaines situations par voie intrathécale. Plusieurs rapports de rémission ont été documentés mais également des échecs ont été observés (**Quartier et al., 1999 ; Halliday et al., 2003**). Une étude portant sur 67 infections néonatales sévères à EV a montré une évolution favorable du pronostic après l'administration précoce d'IgIV (dans les 3 jours après le début de la

symptomatologie) (**Yen et al., 2015**). Le bénéfice des IgIV dans les atteintes neurologiques à EV-A71 est contrasté. Aucun bénéfice appréciable n'a été retrouvé chez des enfants australiens présentant des manifestations neurologiques graves à EV-A71 (**McMinn et al., 2001**). Par contre, un meilleur taux de survie a été observé après utilisation d'IgIV lors d'épidémies d'infections sévères à EV-A71 à Taiwan (**Wang et al., 2008b**). Le traitement par IgIV réduirait la production d'IL-6, d'IL-8, d'IL-10 et d'IL-13 au début de la dérégulation du système nerveux autonome associée à l'EV-A71 et empêcherait ainsi la progression vers l'œdème pulmonaire (**Wang et al., 2006**).

Ces résultats hétérogènes pourraient s'expliquer par des différences dans la méthode de préparation de ces IgIV qui sont fabriquées à partir de milliers de donneurs de plasma dont le titre en immunoglobulines anti-EV est variable en fonction des donneurs (**Arora et al., 2011**). De plus, il existe des disparités entre les régions géographiques en anticorps contre certains types et sous-types d'EV chez les donneurs de plasma. En effet, la faible efficacité de certains IgIV dans les infections à EV-A71 peut s'expliquer par leur fabrication à partir de plasma de donneurs provenant de régions où les infections à EV-A71 sont faiblement prévalentes (**McMinn et al., 2001**). Il serait judicieux de choisir des IgIV dérivées de plasma provenant de régions où les infections à EV-A71 sont endémiques comme chez les sujets taiwanais ou chinois qui présentent des taux d'anticorps anti-EV-A71 contre certains sous-génotypes élevés pouvant valider leur usage thérapeutique dans certaines infections sévères à EV-A71 (**Wu et al., 2013**). Récemment, il a été démontré que l'utilisation d'IgIV pouvait conduire à une aggravation d'une infection à EV-A71 qui s'expliquerait par la présence d'anticorps facilitants anti-EV-A71 appartenant à la sous-classe des IgG3 (**Cao et al., 2013**). La mise au point d'anticorps monoclonaux pourrait pallier ces inconvénients, après caractérisation fine des sites antigéniques.

### 3.2 Antiviraux spécifiques

Actuellement, aucun traitement médicamenteux n'est disponible dans le traitement des infections sévères à EV. L'efficacité de plusieurs molécules antivirales a été testée *in vitro* ainsi que sur des modèles animaux. De très nombreuses molécules ont été développées afin d'inhiber les différentes étapes du cycle de réplication des EV (de l'attachement à l'assemblage des particules virales) soit directement, soit indirectement en inhibant des facteurs de l'hôte (**Bauer et al., 2017 ; Baggen et al., 2018**) (Tableau 7).

**Tableau 7 - Liste des principales molécules antivirales à action directe ou indirecte contre les entérovirus (d'après Bauer et al., 2017, Baggen et al., 2018).**

<u>Cibles thérapeutiques</u>	<u>Molécules antivirales</u>
<b>Action antivirale directe</b>	
Décapidation	Pléconaril <sup>b</sup> (VP-63843), Pocopavir <sup>b</sup> (V-073), Vapendavir <sup>b</sup> (BTA-798), Pirodavar, NLD
Protéase 3C	Rupintrivir <sup>b</sup> (AG7088), Composé 1 <sup>a</sup> (AG7404), DC07090
Polymérase 3D	Gemcitabine, NITD008, Ribavirine, Amiloride, DTrip-22, Acide aurintricarboxylique, BPR-3P0128, Gliotoxine, GPC-N114
ATPase 2C	Dibucaine, Fluoxetine, HBB, Pirlindole, Chlorure de guanidinium, MRL-1237, TBZE-029, Zuclopenthixol
<b>Action antivirale indirecte (facteurs de l'hôte)</b>	
HSP90	17-AAG, Geldanamycine (analogue 17-AAG)
PI4KB	Enviroxime <sup>b</sup> , BF738735, MDL-860, GW5074, PIK93, T-007127-HEV1
OSBP	Itraconazole, OSW-1, 25-hydroxycholestérol, AN-12-H5, T-00127-HEV2, TTP-8307
Cyclophilines	Ciclosporine, HL05100P2, NIM-811
Glutathione	Buthionine sulfoximine, TP219
N-myristoyltransférase 1	Acide 2-hydroxymyristique

Abréviations: HSP90 : *Heat shock protein 90*, PI4KB : *Phosphatidylinositol 4-kinase beta*, OSBP : *Oxysterol-binding protein*.

<sup>a</sup> Etude clinique de phase 1, <sup>b</sup> Etude clinique de phase 2 ou terminée

Certaines molécules utilisées dans d'autres indications thérapeutiques ont également montré un effet antiviral contre les EV comme la fluoxétine (antidépresseur) ou encore l'itraconazole (antifongique).

Actuellement, plusieurs molécules bloquant la réplication du génome viral ont montré un intérêt thérapeutique :

- le pléconaril (VP-63843), le pocapavir (V-073) et le vapendavir (BTA-798) sont des molécules qui empêchent la décapsidation des virus en s'incorporant dans le canyon de la capsid virale
- la rupintrivir (AG-7088) et le composé 1 (AG-7404) sont des inhibiteurs de la protéase 3C
- l'enviroxime (AR-336) est un inhibiteur de la phosphatidylinositol 4-kinase type III $\beta$  (PI4KB).

Le **pléconaril** présente une activité antivirale à large spectre contre les EV mais il est peu actif voire inactif sur le PV-1 et sur l'EV-A71 (**De Palma et al., 2008 ; Smee et al., 2016**). Il a montré une certaine efficacité dans le traitement des méningites chez les adultes et les enfants, dans les sepsis chez les nouveau-nés et dans les infections chroniques neuroméningées chez les enfants agammaglobulinémiques (**Rotbart et Webster, 2001**). Cependant, son utilisation à grande échelle n'a pas été approuvée par la FDA (*Food and Drug Administration*) notamment du fait que le pleconaril pourrait sélectionner des souches virales résistantes (**Senior, 2002**). Récemment, une étude multicentrique randomisée (pléconaril vs placebo) réalisée aux USA en double aveugle chez 41 nouveau-nés présentant un sepsis à EV a montré que le pléconaril permettait de réduire la durée de l'infection (négativité plus rapide des cultures et des PCR sur plusieurs sites anatomiques (oropharynx, rectum, urine, sérum)) et d'améliorer le taux de survie des patients traités (**Abzug et al., 2016**).

Le **pocapavir** a une activité antivirale sur les PV ainsi que sur d'autres EV et fait actuellement l'objet d'investigations pour participer à l'éradication des PV (**Buentempo et al., 1997**). Cet antiviral a montré une diminution rapide de la clairance des EV dans les selles de sujets vaccinés par un vaccin antipoliomyélitique oral monovalent de type 1. Néanmoins, il a été observé dans 44% des cas (41/93) l'émergence de souches résistantes (**Collett et al., 2017**). Il a été également utilisé dans le traitement d'un sepsis néonatal à CV-B3 et dans le traitement d'une myocardite fulminante à EV chez des jumeaux en association avec des immunoglobulines intraveineuses et une prise en charge cardiopulmonaire (**Torres-Torres et**

*al.*, 2015 ; **Amdani et al.**, 2018). Cette molécule semble être bien tolérée mais son efficacité reste à démontrer sur un plus grand nombre de patients infectés.

D'autres molécules comme le varendavir, le rupintrivir, le composé 1 ou encore l'enviroxime ont présenté une importante activité antivirale *in vitro* et chez l'animal contre un large panel d'EV mais les essais cliniques ont été interrompus en raison d'une activité limitée chez l'Homme, et d'une toxicité trop importante (**Thibaut et al.**, 2012 ; **Bauer et al.**, 2017).

## **Objectifs des travaux de thèse**

Les services d'urgences pédiatriques et de pédiatrie accueillent chaque année un nombre important d'enfants pour **suspicion de méningite**. La pathogénie des syndromes neuro-méningés provoqués par les EV reste mal connue. Elle est complexe à cause de la multiplicité des sites de multiplication virale (oropharynx, épithélium de l'intestin grêle et tissus lymphoïdes associés), et du rôle possible de la virémie dans la dissémination virale et l'atteinte du système nerveux central. La variabilité génétique et la diversité des populations virales générées *in vivo* dans les tissus infectés ont aussi été évoquées en tant que facteurs associés à la physiopathologie.

La **fièvre sans point d'appel** et les infections de type « **sepsis** » sont également des affections fréquentes des nourrissons ( $\leq 2$  ans) qui peuvent être la conséquence d'une infection virale notamment à EV. Or, actuellement le diagnostic des EV dans le sang est très peu réalisé dans la pratique courante et une sous-estimation probable des EV dans ces infections peut être envisagée.

L'intérêt du diagnostic des infections à EV dans le sang parallèlement ou non au LCR reste aujourd'hui à être démontré chez les enfants hospitalisés pour méningite, fièvre ou sepsis.

Plusieurs interrogations persistent notamment sur le rôle de la virémie dans la dissémination des EV vers les différents organes (SNC), sur l'existence ou non d'une répllication virale intra-leucocytaire, et enfin sur l'importance des charges virales dans le sang et dans le LCR et leur corrélation éventuelle avec l'intensité du processus inflammatoire réactionnel.

Mes travaux de thèse, axés à la fois sur une recherche clinique appliquée et une recherche plus fondamentale, s'inscrivent dans la problématique du diagnostic des infections à EV ainsi que sur la compréhension de la pathogénèse de ces infections. Ils ont pour objectif d'une part de démontrer l'intérêt de réaliser la détection génomique des EV dans le sang et d'autre part d'améliorer notre compréhension de la physiopathologie des infections à EV.

Pour atteindre ces objectifs, mon travail de thèse s'est déroulé en deux parties :

Une première partie a consisté à étudier le taux de détection des EV dans le sang et/ou le LCR chez les nouveau-nés, nourrissons et enfants hospitalisés pour une fièvre isolée, un sepsis ou un syndrome méningé. Pour atteindre cet objectif, une étude multicentrique prospective nationale (étude BLEDI) sur deux ans a été mise en place.

Le principal résultat attendu était de montrer que la détection génomique des EV dans le sang permettait d'améliorer l'exhaustivité du diagnostic des infections à EV.

La seconde partie de mes travaux a consisté à explorer et à approfondir nos connaissances sur la pathogénèse des infections à EV à travers trois axes :

- ✓ L'étude prospective de la charge virale des EV dans le sang et dans le LCR.

Pour effectuer ce travail, nous avons utilisé la technique quantitative « maison » (RT-qPCR) développée dans notre laboratoire.

Le résultat attendu sera de mieux comprendre la physiopathologie de ces infections en exploitant les résultats des charges virales en fonction des données cliniques, biologiques et virologiques (génotype des EV).

- ✓ L'étude du tropisme et de la réplication des EV dans les différentes populations leucocytaires du sang

Pour réaliser cette étude, les échantillons de sang positif en EV (patients de l'étude BLEDI) ont été sélectionnés. Les leucocytes sanguins ont été marqués avec des anticorps monoclonaux et un immunophénotypage par cytométrie en flux a permis de trier et de récupérer 4 fractions leucocytaires (monocytes, lymphocytes B, lymphocytes T + cellules NK, polynucléaires). Sur chacune de ces populations leucocytaires, trois techniques d'amplification génique ont été effectuées :

- une PCR ciblant un gène de ménage cellulaire permettant de connaître la quantité de cellules présentes dans chaque fraction leucocytaire
- la technique quantitative « maison » (RT-qPCR) des EV ciblant les brins d'ARN (+) et (-) afin d'observer la présence ou non d'EV
- une technique quantitative (RT-qPCR) ciblant uniquement les brins d'ARN (-) c'est-à-dire les EV répliatifs. Cette technique a été développée dans notre laboratoire.

Les résultats attendus seront : (1) d'identifier si les EV se répliquent dans les fractions leucocytaires du sang; (2) d'identifier si les EV sont uniquement adsorbés sur la surface des leucocytes ou phagocytés par ces cellules.



✓ L'étude de la réponse inflammatoire dans le sang et dans le LCR.

L'étude de la réponse inflammatoire sera réalisée via le dosage de cytokines dans le LCR et dans le sang chez les patients présentant une méningite à EV. Un panel à façon de plusieurs cytokines sera dosé à l'aide d'une technique ELISA par cytométrie en flux. En parallèle, un groupe contrôle ne présentant pas d'infections (virales et bactériennes) sera inclus.

Les résultats attendus seront : (1) d'identifier si une ou plusieurs cytokines est/sont majoritairement présente(s) dans l'un ou l'autre des compartiments biologiques ; (2) de corrélérer le dosage de ces cytokines avec le type d'EV ainsi qu'avec les charges virales.

## **Patients et méthodes**

## I. Conception de l'étude et patients

Une étude prospective multicentrique nationale intitulée « Intérêt de la détection génomique des entérovirus dans le sang d'enfants admis à l'hôpital pour suspicion d'infection méningée, de fièvre isolée ou de sepsis » a été initiée en collaboration avec le Pr André Labbé, chef du service de Pédiatrie du CHU de Clermont-Ferrand. L'étude dénommée BLEDI (*Blood Entérovirus Diagnosis Infection*) a été approuvée par le comité d'éthique français (AU1180) sous le numéro IRB 00008526 (*Institutional Review Board*) avec un avis favorable du CPP (Comité de Protection des Personnes), du CCTIRS (Comité Consultatif sur le Traitement de l'Information en matière de Recherche dans le domaine de la Santé), et de la CNIL (Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés). Cette étude a été réalisée sur **2 ans** durant la période de circulation des EV, du 1er Juin au 31 Octobre 2015 et 2016 (**Antona et al., 2007**). Seize centres hospitaliers, incluant 35 services hospitaliers (urgences pédiatriques et pédiatrie), rattachés à 5 laboratoires de virologie/microbiologie (Clermont-Ferrand, Cochin, Meaux, Versailles et Rennes) ont participé à cette étude (Figure 16).

Les **critères d'inclusion** étaient les suivants :

- Fièvre inexplicée chez des patients âgés de 0 à 2 ans inclus
- Tableau septique/sepsis chez les patients âgés de 0 à 2 ans inclus
- Suspicion de méningite chez les patients âgés de 0 à 16 ans inclus.

Les **critères d'exclusion** incluait :

- l'opposition des parents,
- l'absence d'échantillons de sang,
- les échantillons de sang et de LCR dans lesquels une infection bactérienne et/ou virale avait été diagnostiquée au cours de l'hospitalisation.

Le **consentement verbal** concernant l'utilisation d'échantillons cliniques à des fins de recherche a été obtenu auprès des parents ou des tuteurs légaux ou directement auprès des enfants âgés de plus de 8 ans (Annexes I à III). La notice d'information et de non opposition à la conservation et à l'utilisation d'échantillons a été signée par le pédiatre et envoyée au laboratoire de Virologie de Clermont-Ferrand avec les échantillons biologiques. Un échantillon de sang sur tube EDTA obtenu par ponction veineuse était la condition nécessaire pour participer à l'étude. La ponction lombaire a été effectuée chez les patients en fonction du

tableau clinique. Le diagnostic final d'hospitalisation des patients a été réexaminé à partir des dossiers cliniques et/ou compte rendus d'hospitalisation par un pédiatre sénior (Pr André Labbé). Les patients recrutés incluaient les nouveau-nés (âgés  $\leq 28$  jours), les nourrissons (âgés  $> 29$  jours à  $\leq 2$  ans) et les enfants (âgés  $> 2$  ans à  $\leq 16$  ans). Chaque patient inclus dans l'étude a été identifié à l'aide d'un numéro d'anonymisation constitué du numéro de centre, de la première lettre du nom, de la première lettre du prénom puis d'un numéro d'inclusion.

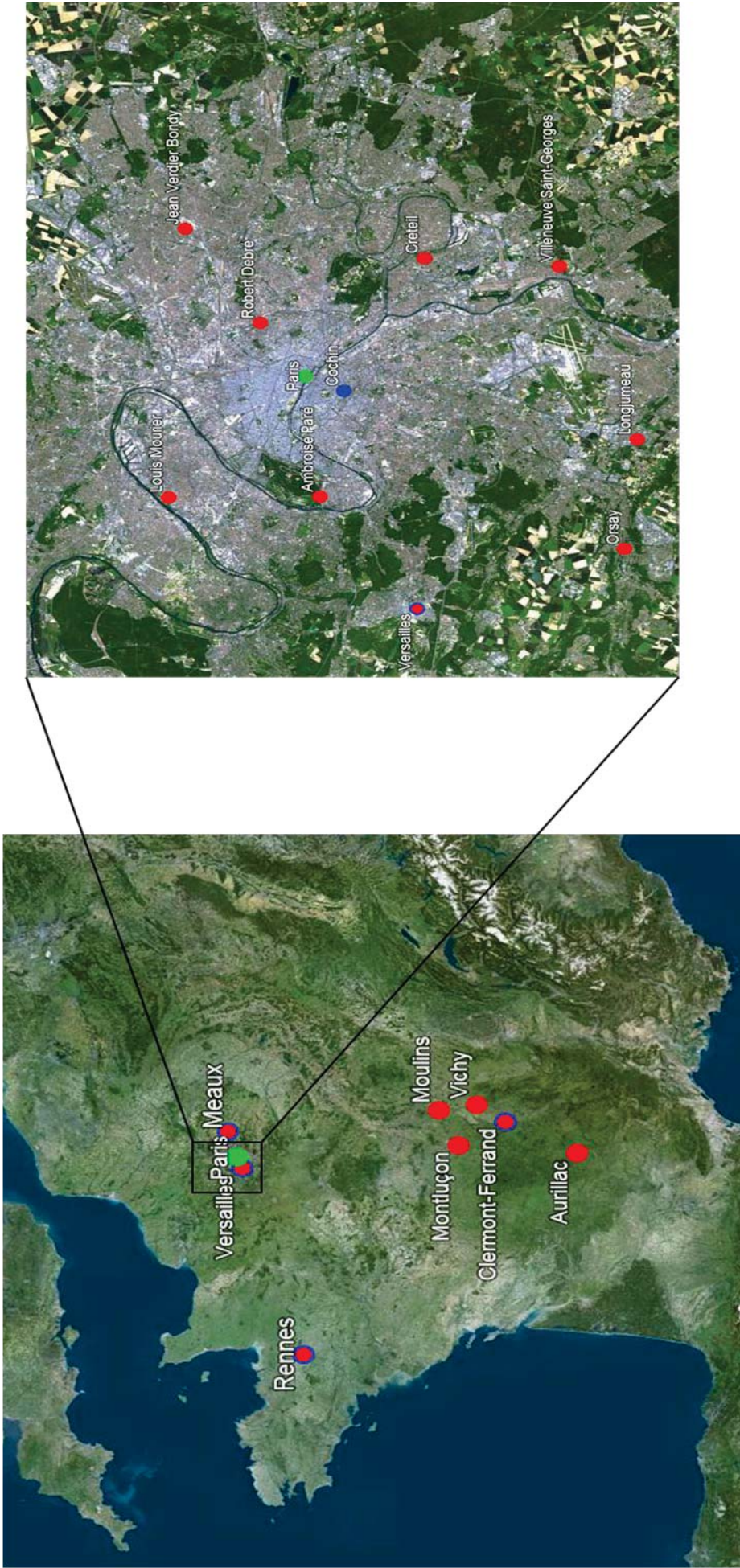
## II. Définitions des tableaux cliniques

La **fièvre isolée** a été définie par la présence d'une fièvre supérieure ou égale à  $38^{\circ}\text{C}$  sur une durée de moins de 7 jours chez un enfant dont les antécédents médicaux et l'examen clinique ne révélaient pas la cause de la fièvre (**Baraff, 2000**). La température corporelle a été évaluée par deux techniques: la température axillaire a été prise chez les nourrissons  $< 1$  an et la température tympanique chez les enfants plus âgés, conformément aux recommandations de la Société Française de Pédiatrie et de la HAS (Haute Autorité de Santé) (**HAS, 2016**).

Le **sepsis** a été défini par la présence d'une infection suspectée ou prouvée et la présence d'au moins deux des quatre critères suivants, dont l'un devait être une température anormale ( $> 38,5^{\circ}\text{C}$  ou  $< 36^{\circ}\text{C}$ ) ou une numération leucocytaire anormale ( $< 4000 \times 10^9$  cellules/L ou  $> 20000 \times 10^9$  cellules/L), et les autres critères incluaient une tachycardie ou une bradycardie, ou une tachypnée. Les données biologiques incluaient une numération plaquettaire  $< 100000 \times 10^9$  cellules / L et une protéine C réactive (CRP)  $> 15$  mg/L (**European Medicines Agency, 2010**).

La **méningite** a été définie par la présence d'au moins deux signes ou symptômes neurologiques (céphalées, rigidité de la nuque, photophobie, fontanelle bombée, irritabilité, léthargie, nausées/vomissements, signe de Kerning ou de Brudzinsky positif) accompagnés ou non d'une pléiocytose, définie en fonction de l'âge des patients (voir ci-dessous).

Dans les 24 heures après l'admission du patient, le médecin remplissait un questionnaire standardisé incluant la nature et la durée des symptômes, ainsi que les résultats de l'examen clinique effectué au moment de l'hospitalisation (Annexe IV).



**Figure 16 - Localisation géographique des laboratoires de biologie et des centres hospitaliers ayant participé à l'étude BLEDI.**

Seize centres hospitaliers, incluant 35 services (urgences pédiatriques et pédiatrie), rattachés à 5 laboratoires de virologie/microbiologie ont participé à l'étude BLEDI.

### III. Paramètres biologiques

Les résultats du laboratoire comprenaient la date et l'heure de réalisation des prélèvements biologiques (ponction lombaire et prise de sang), les résultats de l'examen cytot bactériologique et biochimique du LCR (protéinorachie et glycorachie), la numération de la formule sanguine (NFS), ainsi que le dosage de la CRP et de la glycémie. Les biologistes participants ont également communiqué les résultats d'autres examens bactériologiques et/ou virologiques réalisés au moment de l'admission ou lors de l'hospitalisation des patients.

La durée des symptômes correspondait à l'intervalle de temps entre l'apparition des premiers symptômes et la réalisation de la ponction veineuse et/ou lombaire. En l'absence de données précises concernant l'heure d'apparition des premiers symptômes, les temps de 8h, 14h, 20h et 2h du matin ont été fixés arbitrairement pour définir respectivement le matin, l'après-midi, le soir et la nuit.

Les critères de définition de la pleiocytose dans le LCR variaient avec l'âge des patients : présence d'une pléiocytose si le nombre de leucocytes dans le LCR était  $>19$  cellules/mm<sup>3</sup> chez les patients âgés  $\leq 28$  jours,  $\geq 10$  cellules/mm<sup>3</sup> chez les patients dont l'âge était compris entre 29 et 56 jours et  $>5$  cellules/mm<sup>3</sup> chez les patients plus âgés (**Kestenbaum et al., 2010**). La protéinorachie a été considérée comme normale si elle était  $\leq 0,9$  g/L pour les nouveau-nés âgés  $\leq 28$  jours et  $\leq 0,45$  g/L pour les patients plus âgés.

### IV. Détection génomique des entérovirus

Le diagnostic moléculaire des EV par RT-PCR dans les échantillons de plasma et de LCR a été réalisé dans cinq laboratoires de virologie/microbiologie à l'aide de tests commerciaux (test Cepheid Xpert EV<sup>®</sup>, Californie; Enterovirus R-gene<sup>®</sup>, bioMérieux; O-DiaENT<sup>™</sup>, Diagenode) et d'une technique de RT-PCR « maison » (**Dierssen et al., 2008**).

L'extraction des acides nucléiques à partir des échantillons biologiques a été réalisée soit à l'aide de techniques automatisées (NucliSens<sup>®</sup> EasyMAG<sup>™</sup>, bioMérieux ; QIASymphony SP<sup>®</sup>, Qiagen ; MagNA Pure LC 2.0 System, Roche ; EZ1<sup>®</sup> Advanced, Qiagen ; QIAcube<sup>®</sup>, Qiagen), soit par une méthode manuelle sur colonne (QIAamp<sup>®</sup> MinElute Virus Spin Kit, Qiagen).

Le test Xpert EV<sup>®</sup> de Cepheid a été réalisé uniquement sur des échantillons de LCR (l'extraction et l'amplification étant réalisées dans la cartouche de réaction sur l'automate GeneXpert<sup>®</sup> de Cepheid).

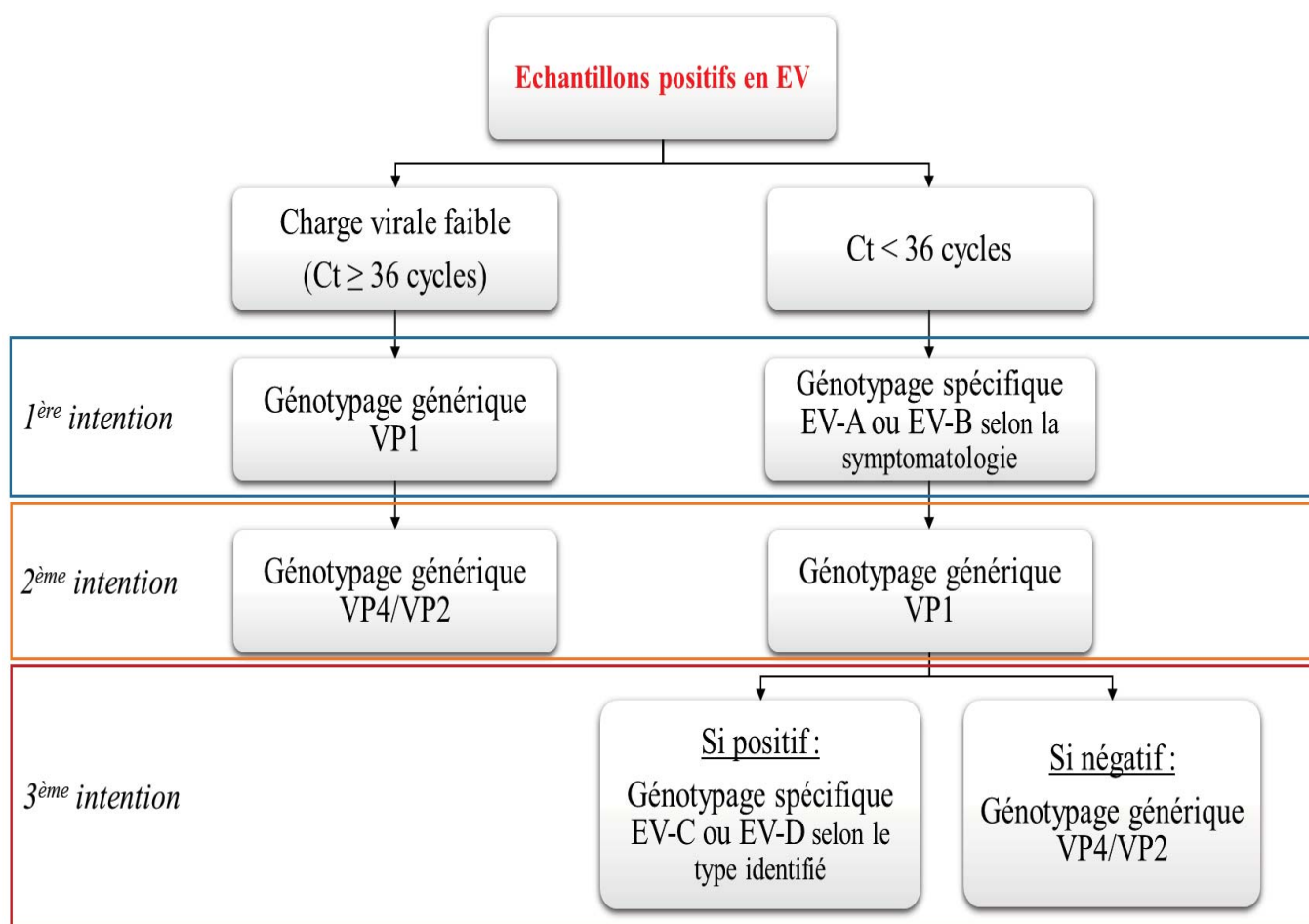
## **V. Envoi, stockage et conservation des échantillons biologiques**

Après réalisation du diagnostic des EV, les biologistes participants ont organisé le stockage des échantillons biologiques puis leur envoi au Centre National de Référence des entérovirus et paréchovirus (CNR EV/HPeV) de Clermont-Ferrand où ils ont été conservés à -80°C. Le typage des souches d'EV, la quantification des EV dans les 2 compartiments biologiques, ainsi que la détection génomique et le typage des parechovirus (HPeV) ont été réalisés au laboratoire de virologie (CNR EV/HPeV) de Clermont-Ferrand.

## **VI. Génotypage des entérovirus**

Le typage des EV a été réalisé soit à partir d'extraits d'acides nucléiques, soit à partir des échantillons de sang et de LCR positifs en EV. L'extraction des acides nucléiques, sur l'extracteur NucliSens<sup>®</sup> EasyMAG<sup>™</sup> (bioMérieux) (selon les recommandations du fournisseur), a été réalisée à partir d'une prise d'essai de 200µL et un volume d'élution de 50µL.

Le génotypage a été réalisé avec les extraits ARN des prélèvements de LCR, et de sang selon l'algorithme mise en place par le CNR EV/HPeV de Clermont-Ferrand (Figure 17). Les séquences obtenues ont ensuite été analysées par BLAST (*Basic Local Alignment Sequence Tool*) et par analyse phylogénétique à l'aide du logiciel MEGA6 par comparaison à des bases de séquences homologues représentant les différents types d'EV.



**Figure 17 - Algorithme de génotypage des entérovirus par séquençage Sanger appliqué par le CNR des entérovirus et des parechovirus, laboratoire associé.**

Génotypage spécifique d'espèce : RT-PCR semi-nichée ciblant la région VP1 (gène 1D complet) avec des amorces spécifiques pour les 4 espèces d'EV-A à D développées par le CNR EV/HPeV (laboratoire associé) (EV-B : **Mirand et al., 2008**, EV-A : **Mirand et al., 2016**, autres espèces : amorces non publiées).

Génotypage générique VP1 : RT puis PCR nichée ciblant la région VP1 (gène 1D partiel) (**Nix et al., 2006**, adaptée par le CNR EV/HPeV (laboratoire associé)).

Génotypage générique VP4-VP2 : RT-PCR ciblant la région VP4/VP2 (gène complet 1A et partiel 1B) à l'aide des amorces décrites par **Savolainen et al., 2002** (adaptée par le CNR EV/HPeV (laboratoire associé), **C. Henquell et al., 2012**). Cette PCR peut être suivie en cas d'échec par une PCR nichée à l'aide des amorces décrites par **Linsuwanon et al., 2009**.



## **VII. Quantification des entérovirus par RT-qPCR**

La détection quantitative des EV a été réalisée grâce à l'utilisation d'une technique de RT-qPCR en temps réel « maison » développée et validée dans notre laboratoire (Volle *et al.*, 2012). Elle a été effectuée sur les extraits nucléiques ayant servi au diagnostic ou au génotypage des EV. Le contrôle interne d'amplification a été rajouté dans ces extraits afin de s'assurer de l'absence d'inhibiteur de PCR. Les résultats de quantification ont été exprimés en  $\log_{10}$  copies/mL, en prenant en compte les conditions de l'étape d'extraction spécifique à chaque laboratoire. Le seuil de détection de cette technique était de 750 copies/mL (2,88  $\log_{10}$  copies/mL) et le seuil de quantification reproductible de 1875 copies/mL (3,27  $\log_{10}$  copies/mL).

## **VIII. Détection génomique et génotypage des parechovirus**

Le diagnostic des HPeV a été réalisé à l'aide de la technique commercialisée « Parechovirus r-gene <sup>TM</sup>, bioMérieux », conformément aux recommandations du fabricant. L'amplification a été faite, à partir des échantillons de sang et de LCR négatifs en EV, et pour lesquels le volume d'échantillon était suffisant. Le typage des HPeV reposait sur l'amplification et le séquençage du gène complet 1D<sup>VP1</sup> à l'aide d'une RT-PCR nichée en 3 étapes puis séquençage Sanger (Nix *et al.*, 2010 ; optimisée par le CNR EV/HPeV (laboratoire associé)). Comme pour le typage des EV, les séquences obtenues ont été comparées à des séquences de référence représentant les différents types de HPeV.

## **IX. Etude du tropisme et de la réplication des entérovirus dans les différentes populations leucocytaires du sang**

Seuls les centres de Versailles et de Clermont-Ferrand ont participé à cette sous-étude pour des raisons liées au délai de transport des échantillons. La méthodologie permettant de réaliser cette étude est résumée dans la figure 18. L'optimisation de chaque étape a été réalisée en vue d'obtenir une plus grande quantité de cellules dans chaque population leucocytaire.

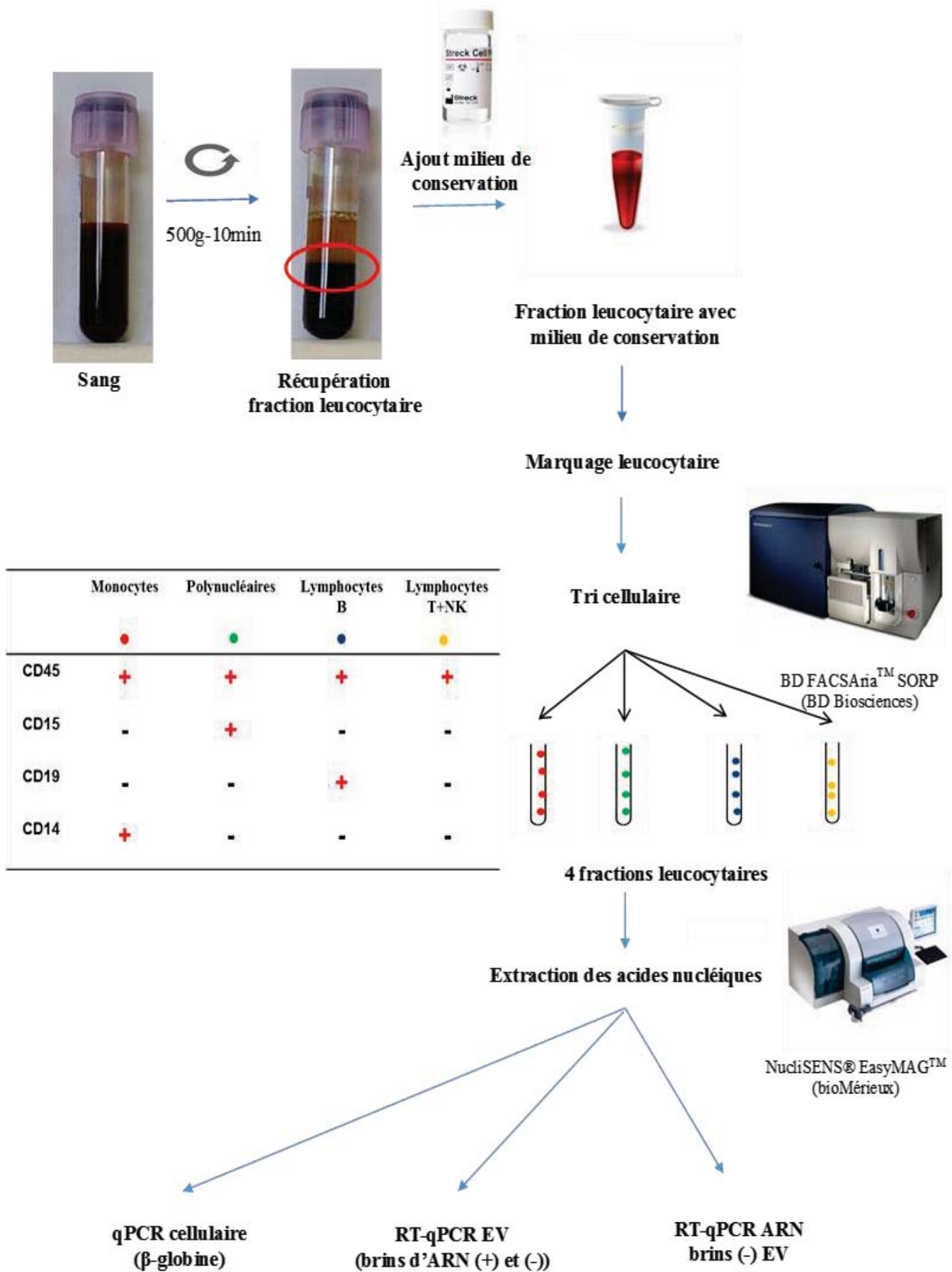


Figure 18 - Schéma résumant la méthodologie employée pour l'étude du tropisme et de la réplication des entérovirus dans les différentes fractions leucocytaires.

## **1. Récupération de la fraction leucocytaire**

Les échantillons de sang dès leur arrivée au laboratoire ont été centrifugés à 500 g pendant 10 minutes à 20°C. Le plasma a été utilisé pour le diagnostic des EV (200µL), et la fraction leucocytaire a été récupérée et mélangée à volume égal, avec un milieu de conservation des cellules (Streck Cell Preservative™, Streck), milieu qui stabilise l'intégrité des cellules leucocytaires et l'expression des antigènes cellulaires pendant 6 jours.

## **2. Marquage leucocytaire**

A partir des résultats positifs de RT-PCR EV dans le sang, les cellules sanguines (mêlées à la solution de conservation) ont été marquées à l'aide d'anticorps monoclonaux spécifiques des différentes cellules leucocytaires pendant 20 minutes à l'obscurité. Un volume de 30µL de chacun des anticorps monoclonaux fluorescents (BD Biosciences) ciblant des clusters de différenciation a été utilisé : anticorps anti-CD14 (CD14 Hu - APC-H7 - clone MΦP9), anticorps anti-CD19 (CD19 Hu - PE-Cy™7 - clone SJ25C1), anticorps anti-CD45 (CD45 Hu BD Horizon™ V500 - clone HI30) et anticorps anti-CD15 (CD15 - Hu - Brilliant UltraViolet™ 395 - Clone HI98). Les hématies ont ensuite été lysées à l'aide d'un tampon de lyse (14 ml) (10X dilué préalablement au 1/10 (BD Pharm Lyse, BD Biosciences)) pendant 10 minutes à l'obscurité. Après une centrifugation à 500 g pendant 10 minutes à 20°C, le surnageant a été éliminé et le culot a été récupéré dans 500µL de PBS Ca+/Mg+ (Tampon PBS de Dulbecco, Eurobio). L'échantillon marqué a ensuite été conservé dans la glace jusqu'au tri cellulaire réalisé dans le laboratoire d'Hématologie situé sur le site du CHU Estaing.

## **3. Tri cellulaire et préparation des différentes populations leucocytaires**

Après homogénéisation de l'échantillon marqué, le mélange a été filtré (filtre de 50µm (BD™ Medimachine Filcon 50µm Cup-Type, BD Biosciences)) et récupéré dans un tube de polypropylène. Le tri cellulaire a été réalisé par immunophénotypage par cytométrie en flux à l'aide du cytomètre BD FACSAria™ SORP (BD Biosciences). Ce cytomètre, équipé de 5 lasers, permet de récupérer jusqu'à 4 populations cellulaires différentes simultanément. Sur la

base de la taille, de la complexité de la structure interne (granulosité) et de l'intensité de fluorescence des particules analysées, des populations leucocytaires ont été identifiées à l'aide du logiciel d'acquisition et d'analyse BD FACS Diva 7.0 puis triées. Ce tri cellulaire a duré environ 20 minutes par échantillon. Régulièrement, des essais de pureté ont été réalisés afin de vérifier que le tri cellulaire était correctement réalisé.

Les quatre populations leucocytaires ont été récupérées dans des tubes coatés par 500µL de PBS BSA à 1% (Tampon PBS BSA, Eurobio) (évite l'éclatement des cellules lors du tri) puis conservées dans de la glace. Chaque fraction leucocytaire a ensuite été centrifugée à 400g pendant 10 min à 4°C. Les cellules ont été lavées avec 200µL de PBS Ca+/Mg+ (Tampon PBS de Dulbecco, Eurobio) puis le culot a été repris avec 200µL de tampon de lyse (Nuclisens® Lysis Buffer, bioMérieux) et congelé à -80°C.

#### **4. Extraction des acides nucléiques**

Les acides nucléiques totaux de chaque fraction leucocytaire ont été extraits sur l'automate NucliSens® EasyMAG™ (bioMérieux) en suivant le programme spécifique B 2.0.1 du fabricant. L'extraction a été réalisée à partir d'une prise d'essai de 200µL et un volume d'élution de 40µL. L'éluat a ensuite été aliquoté en 4 aliquotes puis congelé à -80°C jusqu'aux analyses moléculaires.

#### **5. Techniques d'amplification géniques**

Trois techniques d'amplification génique par PCR ont été réalisées sur les extraits d'acides nucléiques de chacune des fractions leucocytaires :

(1) La **quantification des cellules** a été effectuée à l'aide d'une technique de PCR commercialisée ciblant un gène de ménage cellulaire (la β-globine) (LightCycler® Control Kit DNA et LightCycler® FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup> HybProbe, Roche). L'amplification génique a été réalisée sous un volume de 20µL avec 2µL d'éluat et un mélange réactionnel contenant 2µL de β-Globin Primer Mix, 2µL de β-Globin HybProbe Mix (LightCycler® Red 640-labeled), 4µL de LightCycler® FastStart Reaction Mix et de l'eau (qsp 20µL). Une gamme de

quantification, comprise entre 1,5 pg/ $\mu$ L à 15000 pg/ $\mu$ L d'ADN humain, a été réalisée extemporanément à chaque série d'amplification.

(2) La **quantification des EV** a été réalisée sur une quantité de 5 $\mu$ L d'éluat grâce à l'utilisation de la RT-qPCR en temps réel « maison » développée dans le laboratoire (**Volle et al., 2012**). Les résultats ont été exprimés en copies d'ARN / cellule.

(3) La **quantification des brins répliatifs (ARN brin (-)) des EV** a été mise au point par notre laboratoire en nous inspirant des travaux de Bessaud et *al.* qui décrivent l'amplification du brin négatif des poliovirus (**Bessaud et al., 2008**). Ces chercheurs ont montré que lorsqu'on utilise des amorces complémentaires des zones consensus du gène (ex: ARN brin (-)), il peut se produire des amplifications non spécifiques et des séquences qui ne sont pas entières. Aussi Bessaud et *al.* ont réalisé l'amplification du brin négatif des poliovirus, en affectant une séquence tag à l'amorce sens EV1 (tag-EV1) lors de la synthèse d'ADNc. De plus cette amorce tag-EV1 a été utilisée à une très faible concentration de façon à limiter les amplifications non spécifiques (concentration finale : 0,02  $\mu$ M).

- L'amplification génique a été réalisée en utilisant les amorces (sens (EV1) et antisens (EV2)) et la sonde (EV probe) dessinées dans notre laboratoire (**Volle et al., 2014**). Cette amplification a été réalisée en deux étapes successives (Figure 19A) :

✓ 1<sup>ère</sup> étape : synthèse de l'ADNc du brin négatif

La synthèse d'ADNc à partir du brin d'ARN (-) a été obtenue à l'aide de l'amorce Tag-EV1 (concentration finale 0,02  $\mu$ M) en utilisant la trousse « SuperScript<sup>TM</sup> III Reverse Transcriptase (200 U/ $\mu$ L) » (Invitrogen<sup>TM</sup>).

✓ 2<sup>ème</sup> étape : amplification de l'ADNc par une PCR en temps réel

L'amplification génique de l'ADNc a été réalisée sous un volume de 20 $\mu$ L avec 5 $\mu$ L d'ADNc et 15 $\mu$ L de mélange réactionnel contenant 0,25 $\mu$ L d'amorce Tag (sens) (20  $\mu$ M), 0,25 $\mu$ L d'amorce EV2 (antisens) (20  $\mu$ M), 0,5 $\mu$ L de sonde EV (5  $\mu$ M), 12,5 $\mu$ L de Platinum<sup>TM</sup> Quantitative PCR SuperMix-UDG (Invitrogen<sup>TM</sup>) et de l'eau (qsp 20 $\mu$ L). Après une étape d'incubation à 50°C pendant 2 min puis une étape d'activation de l'ADN polymérase à 95°C pendant 2 min, 40 cycles d'amplification ont été réalisés incluant une étape de dénaturation de 15 sec à 95°C et une étape d'hybridation/élongation de 60 secondes à 60°C.

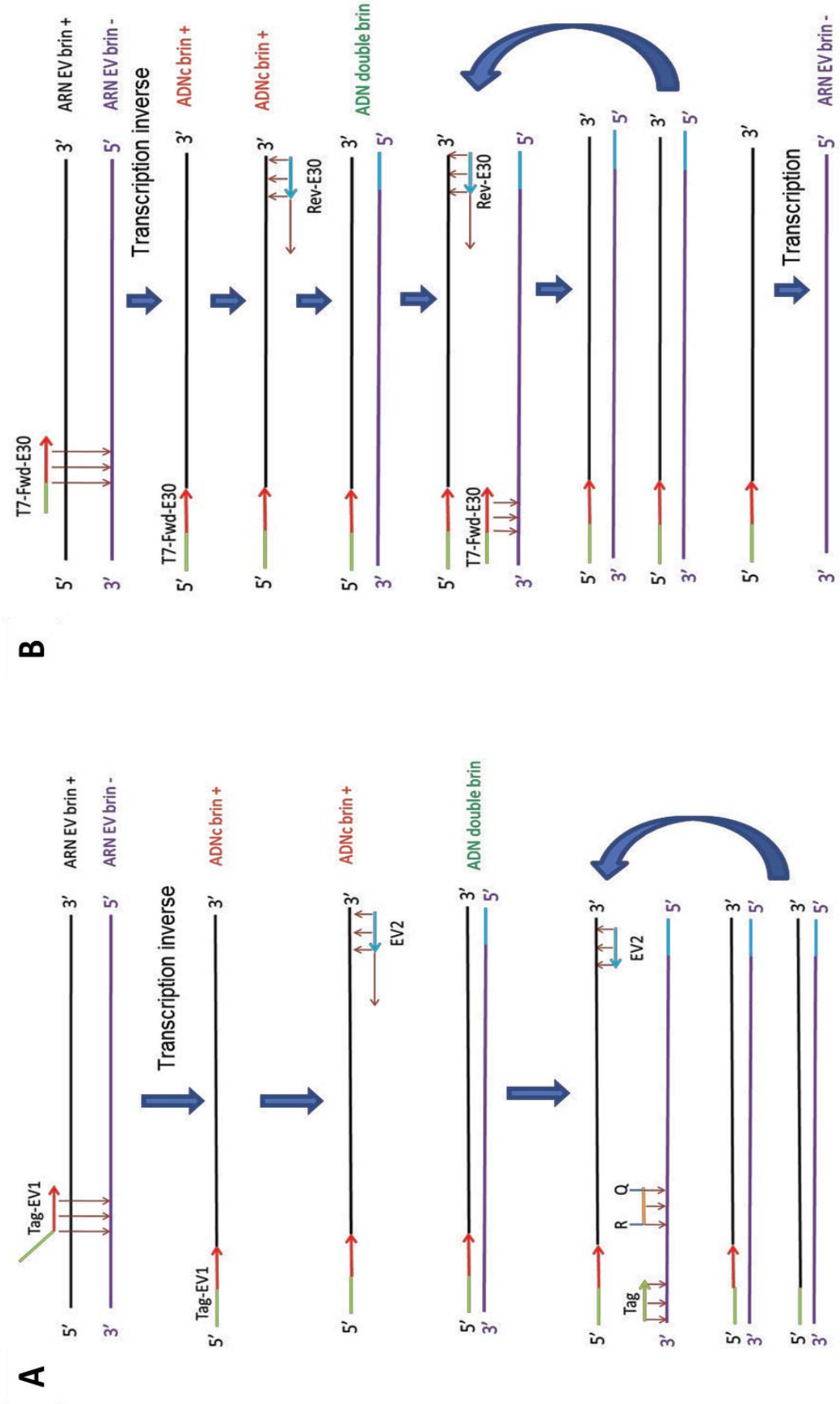


Figure 19 - Schémas représentant l'amplification et la détection des brins d'ARN (-) des entérovirus (A) et de l'obtention de la gamme de dilutions d'ARN transcrits négatifs (B).

- Réalisation d'une gamme quantitative d'ARN brins négatifs à partir de l'échovirus 30

L'ARN viral extrait à partir de la souche de référence d'E-30 Bastiani a été amplifié en utilisant des amorces sens (T7-Fwd-E30) et antisens (Rev-E30) situées dans la région 5'NC permettant d'amplifier un segment de 550 bases (Figure 19B). Lors de cette étape, l'amorce sens a été affectée de la séquence du promoteur T7 afin de réaliser ultérieurement la transcription *in vitro* de l'ADN amplifié ciblant le brin négatif.

Après purification sur colonne (NucleoSEQ®, Macherley-Nagel), la transcription *in vitro* a été effectuée à l'aide du kit RiboMAX™ Large Scale RNA Production Systems–SP6 and T7 (Promega). L'ARN viral (brin (-)) obtenu a été purifié à l'aide du kit NucleoSpin® RNA Virus (Macherley-Nadel) et sa concentration finale a été déterminée par spectrométrie (NanoDrop® 1000, ThermoFischer). Enfin, une gamme de dilutions (d'ARN transcrits négatifs) de raison 10 (360 à 360000 d'ARN (-)/ $\mu$ L) a été réalisée dans de l'eau RNases free puis aliquotée et congelée à -80°C.

## 6. Analyses statistiques

L'analyse statistique a été réalisée avec Stata 13 (StataCorp, College Station, TX). Tous les tests statistiques ont été effectués au risque d'erreur de première espèce  $\alpha$  de 5%.

Les variables continues ont été présentées sous forme de médiane, interquartile (IQR) pour chaque catégorie d'âge (nouveau-nés, nourrissons et enfants) et en utilisant le nombre de patients ou les pourcentages associés pour les données catégorielles. La comparaison des taux de détection génomique des EV dans le sang par rapport à ceux du LCR a été estimée en mesurant le coefficient kappa, la sensibilité, la spécificité et les valeurs prédictives ainsi que leurs intervalles de confiance à 95% (IC) (Terwee *et al.*, 2007). Les tests du Chi-2, test exact de Fisher et la procédure de Marascuilo ont été utilisés pour les variables catégorielles et les tests de Student ou de Mann-Whitney (lorsque les hypothèses de test t n'étaient pas remplies) ont été utilisés pour les variables quantitatives.

Un modèle de régression a été réalisé pour les nouveau-nés et les nourrissons afin d'identifier les facteurs associés à la virémie, en utilisant une approche par étapes (*backward and forward stepwise*). Les covariables ont été déterminées en fonction des résultats de l'analyse univariée

( $p \leq 0,15$ ) et en intégrant des paramètres biologiques et cliniques pertinents, tels que le nombre de globules blancs dans le LCR, la durée des symptômes, la tachycardie, l'hypotonie, l'irritabilité et les convulsions. Une attention particulière a été accordée à l'étude de la multicolinéarité. Les résultats ont été exprimés en odds-ratios (OR) ainsi qu'en intervalle de confiance de 95% (IC) et ils ont été représentés sous forme de graphiques « en forêt ». Une analyse de sensibilité a ensuite été réalisée pour l'analyse multivariée appliquée aux groupes des patients virémiques et non virémiques.

Enfin, une analyse de sensibilité a été réalisée pour évaluer l'impact des dates et/ou heures inexacts du début des symptômes dans notre étude.

Concernant l'étude des charges virales, les comparaisons entre les groupes (d'âges et de tableaux cliniques) ont été analysées par le test de Student pour les données appariées et le test de Kruskal-Wallis.



# **Travaux Originaux**

## I. Optimisation du diagnostic des infections à entérovirus dans la population pédiatrique

### 1. Rationnel de l'étude

Les EV représentent la cause la plus fréquente des **méningites aseptiques** dans la population pédiatrique et leur diagnostic virologique est rapidement réalisable par RT-PCR à partir du LCR (De Ory *et al.*, 2013 ; Martin *et al.*, 2016). Cependant, dans certains cas, l'ARN viral peut être absent du LCR : 1) si la ponction lombaire est réalisée très tôt après le début d'apparition des signes cliniques et 2) pour certains types d'EV notamment l'EV-A71 et l'EV-D68 responsables d'encéphalites gravissimes (Tsai *et al.*, 2014 ; Harvala *et al.*, 2018). Aussi la détection des EV dans le sang (phase qui précède la diffusion aux méninges) pourrait permettre d'augmenter la sensibilité du diagnostic de ces infections. Les études publiées concernant la recherche de ces virus dans le sang sont rares. Récemment, l'étude française de Marque-Juillet *et al.*, a montré, chez un nombre restreint d'enfants âgés de 0 à 16 ans (n=44), hospitalisés pour une suspicion d'infection méningée, que la recherche des EV dans le sang parallèlement au LCR avait permis d'augmenter la sensibilité du diagnostic des méningites à EV dans 14% des cas (Marque-Juillet *et al.*, 2013). L'étude de De Crom *et al.*, a montré que le taux de détection des EV dans le sang chez des enfants hospitalisés pour une suspicion de méningite était de 76% (De Crom *et al.*, 2013).

D'autre part, les pédiatres sont régulièrement confrontés à des tableaux de **fièvre isolée ou de sepsis** (« **sepsis-like syndrome** ») chez les nourrissons. Durant la période estivo-automnale, ces tableaux cliniques non spécifiques peuvent être la conséquence d'une infection bactérienne sévère (nécessitant rapidement une hospitalisation et un traitement empirique par des antibiotiques) ou d'une infection virale notamment à entérovirus. L'implication des EV dans ces tableaux cliniques est souvent peu documentée car le diagnostic virologique est peu réalisé dans la pratique quotidienne et les études publiées sont rares et sont réalisées sur un nombre restreint de patients. Récemment, un EV a été détecté dans le sang chez 24% des nouveau-nés hospitalisés pour un sepsis (Ahmad *et al.* 2013). Deux études, réalisées chez des nourrissons âgés de moins de 90 jours hospitalisés pour un sepsis ou une fièvre isolée, ont montré que le taux de détection des EV dans le sang était respectivement de 69 et 77% et que ces taux étaient comparables à ceux du LCR (Byington *et al.*, 1999 ; Rittichier *et al.*, 2005).

L'intérêt du diagnostic des infections à EV dans le sang parallèlement au LCR dans la pratique quotidienne restait donc à être démontré chez un plus grand nombre d'enfants hospitalisés.

## 2. Objectifs de l'étude

L'objectif principal de l'étude était d'évaluer le taux de détection des EV dans le sang et/ou LCR chez les nouveau-nés, nourrissons et enfants hospitalisés pour une fièvre isolée, un sepsis ou une suspicion de méningite afin de déterminer si la détection de ces virus dans le sang permettait d'améliorer l'exhaustivité du diagnostic.

Pour atteindre cet objectif, nous avons initié avec le Pr André Labbé une étude multicentrique nationale prospective qui s'est déroulée sur deux ans (2015 et 2016). Afin d'avoir une cohorte de patients infectés par un EV la plus importante possible et pour obtenir des résultats statistiquement robustes, plusieurs critères de sélection ont été préalablement définis notamment le choix de la période d'étude ainsi que les centres et laboratoires hospitaliers participants.

La période d'étude a été fixée de Juin à Octobre car elle correspond à la période de circulation accrue des EV en France et plus généralement dans les pays tempérés (**Antona et al., 2007 ; Peigue-Lafeuille et al., 2016**). Une étude américaine réalisée chez des nourrissons fébriles âgés de moins de 3 mois a montré un taux annuel de détection des EV de 26%, avec un taux plus important en période épidémique (50%) (**Byington et al., 1999**).

Cinq laboratoires de virologie/microbiologie (Cochin, Versailles, Meaux, Rennes et Clermont-Ferrand) ont participé à cette étude. Au total, 16 centres hospitaliers incluant 35 services de pédiatrie ont été sollicités. Le choix de ces centres a été motivé pour 2 raisons :

- (1) Les laboratoires de virologie de Cochin, Meaux, Versailles, et Rennes font partie des laboratoires du réseau RSE (Réseau de surveillance des entérovirus) fortement impliqués dans la surveillance des infections à entérovirus/parechovirus (EV/HPeV). Ces laboratoires ont déjà en place tous les outils nécessaires pour le diagnostic moléculaire des EV et réalisent le diagnostic virologique des EV dans les 24 à 48 h suivant la réception des échantillons du lundi au vendredi. Lorsque la détection d'un

EV est positive, ces laboratoires participants envoient les échantillons au CNR des entérovirus/parechovirus, laboratoire associé, à Clermont-Ferrand pour génotypage.

- (2) Ces centres hospitaliers recrutent une population pédiatrique importante avec un taux de détection des infections à EV estimé entre 20 à 25% en fonction des années.

### **3. Article portant sur l'étude**

**Article publié dans la revue « Lancet Infectious Diseases » le 30/10/2018.**



# Assessment of blood enterovirus PCR testing in paediatric populations with fever without source, sepsis-like disease, or suspected meningitis: a prospective, multicentre, observational cohort study

Jérémy Lafolie, André Labbé\*, Anne Sophie L'Honneur\*, Fouad Madhi, Bruno Pereira, Marion Decobert, Marie Noelle Adam, François Gouraud, Frédéric Faibis, François Arditty, Stéphanie Marque-Juillet, Marie Aline Guitteny, Gisele Lagathu, Matthieu Verdan, Flore Rozenberg, Audrey Mirand, Hélène Peigue-Lafeuille, Cécile Henquell†, Jean-Luc Bailly†, Christine Archimbaud, on behalf of the Blood Enterovirus Diagnosis Infection (BLEDI) in paediatric population study team‡

## Summary

**Background** Enteroviruses are the most frequent cause of acute meningitis and are seen increasingly in sepsis-like disease and fever without source in the paediatric population. Detection of enterovirus in cerebrospinal fluid (CSF) specimens by PCR is the gold standard diagnostic test. Our aim was to assess a method of detecting enterovirus in blood specimens by PCR.

**Methods** We did a prospective, multicentre, observational study at 35 French paediatric and emergency departments in 16 hospitals. We recruited newborn babies (aged  $\leq 28$  days) and infants (aged  $>28$  days to  $\leq 2$  years) with fever without source, sepsis-like disease, or suspected meningitis, and children (aged  $>2$  years to  $\leq 16$  years) with suspected meningitis, who were admitted to a participating hospital. We used a standardised form to obtain demographic, clinical, and laboratory data, which were anonymised. Enterovirus PCR testing was done in blood and CSF specimens.

**Findings** Between June 1, 2015, and Oct 31, 2015, and between June 1, 2016, and Oct 31, 2016, we enrolled 822 patients, of whom 672 had enterovirus PCR testing done in blood and CSF specimens. Enterovirus was detected in 317 (47%) patients in either blood or CSF, or both (71 newborn babies, 83 infants, and 163 children). Detection of enterovirus was more frequent in blood samples than in CSF specimens of newborn babies (70 [99%] of 71 vs 62 [87%] of 71;  $p=0.011$ ) and infants (76 [92%] of 83 vs 62 [75%] of 83;  $p=0.008$ ), and was less frequent in blood samples than in CSF specimens of children (90 [55%] of 163 vs 148 [91%] of 163;  $p<0.0001$ ). Detection of enterovirus was more frequent in blood samples than in CSF specimens of infants aged 2 years or younger with fever without source (55 [100%] of 55 vs 41 [75%] of 55;  $p=0.0002$ ) or with sepsis-like disease (16 [100%] of 16 vs nine [56%] of 16;  $p=0.008$ ). Detection of enterovirus was less frequent in blood than in CSF of patients with suspected meningitis (165 [67%] of 246 vs 222 [90%] of 246;  $p<0.0001$ ).

**Interpretation** Testing for enterovirus in blood by PCR should be an integral part of clinical practice guidelines for infants aged 2 years or younger. This testing could decrease the length of hospital stay and reduce exposure to antibiotics for low-risk patients admitted to the emergency department with febrile illness.

**Funding** University Hospital Clermont-Ferrand.

**Copyright** © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## Introduction

Enteroviruses are the most frequent cause of paediatric aseptic meningitis and are attributed to more than 75% of viral meningitis cases in which a microorganism is identified.<sup>1,2</sup> Detection of enterovirus by RT-PCR from cerebrospinal fluid (CSF) specimens is recommended for diagnosis of meningitis caused by enterovirus.<sup>3-5</sup> Paediatricians are also confronted frequently with young infants with fever without source or sepsis-like diseases. These febrile illnesses account for 3.4–13.6% of cases seen in emergency departments.<sup>6</sup> Symptoms can result either from severe bacterial infection requiring admission to

hospital and empirical antibiotic treatments or, most typically, from benign and spontaneously resolving viral infection; therefore, diagnosis is a challenge. Additional molecular tests are needed to speed up diagnosis of conditions associated with enterovirus infections.<sup>3</sup> Several studies have evaluated testing blood specimens,<sup>7-12</sup> but as yet no assessment has been done in a large cohort of paediatric patients.

The aim of our multicentre study was to assess detection of enterovirus by PCR in blood specimens of newborn babies, infants, and children with fever without source, sepsis-like disease, or suspected meningitis.

**Lancet Infect Dis 2018**

Published Online  
October 30, 2018  
[http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30479-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30479-1)

See Online/Comment  
[http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30492-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30492-4)

\*Contributed equally

†Contributed equally

‡Members listed at the end of the Article

Université Clermont Auvergne, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Laboratory Microorganisms: Genome and Environment (LMGE), Clermont-Ferrand, France (J Lafolie PharmD, A Mirand PhD, Prof H Peigue-Lafeuille PhD, Prof C Henquell PhD, J-L Bailly PhD, C Archimbaud PhD); Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Clermont-Ferrand, Laboratoire de Virologie, Centre National de Référence Entérovirus Parechovirus (J Lafolie, A Mirand, Prof H Peigue-Lafeuille, Prof C Henquell, C Archimbaud), Service de Pédiatrie (Prof A Labbé PhD, M Verdan MD), and Délégation Recherche Clinique and Innovation, Méthodologie, Biostatistique, Data-management (B Pereira PhD), Clermont-Ferrand, France; Hôpital Cochin, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Service de Virologie, Paris, France (A S L'Honneur PharmD, Prof F Rozenberg PhD); Centre Hospitalier Intercommunal Créteil, Service de Pédiatrie Générale, Créteil, France (F Madhi MD); Groupe Hospitalier Nord Essonne,

Service de Pédiatrie et Néonatalogie, Orsay, France (M Decobert MD); Centre Hospitalier Sud Francilien, Laboratoire de Microbiologie, Corbeil Essonnes, France (M N Adam PhD); Grand Hôpital de l'Est Francilien, Service de Pédiatrie (F Gouraud MD) and Laboratoire de Microbiologie-Immunologie (F Faibis PhD), Meaux, France; Centre Hospitalier de Versailles André Mignot, Service de Pédiatrie (F Arditty MD) and Service Biologie, Unité de Microbiologie (S Marque-Juillet PhD), Le Chesnay, France; and Hôpital Sud, CHU de Rennes, Service de Pédiatrie (M A Guitteny PhD) and Laboratoire de Virologie (G Lagathu PhD), Rennes, France

Correspondence to: Dr Christine Archimbaud, CHU Clermont-Ferrand, Laboratoire de Virologie, Centre National de Référence Entérovirus Parechovirus, Clermont-Ferrand 63003, France  
carchimbaud@chu-clermontferrand.fr

## Research in context

### Evidence before this study

We searched PubMed up to Feb 7, 2018, for papers reporting paediatric enterovirus diseases and enterovirus PCR testing or molecular detection of viruses in cerebrospinal fluid (CSF) or blood specimens of patients with aseptic meningitis, sepsis and sepsis-like disease, or fever without source. We used the search terms "enterovirus", "nonpolio enterovirus", "meningitis", "viral meningitis", "aseptic meningitis", "enterovirus meningitis", "acute meningitis", "sepsis", "sepsis-like disease", "fever", "fever without source", "genome detection", "enterovirus detection", "enterovirus RT-PCR", "molecular detection", "viremia", "viremic", "virus load", "blood", "plasma", and "cerebrospinal fluid". We also reviewed references from relevant articles not identified in the original search. Our search identified 12 studies in which enterovirus detection was reported in blood and CSF. Most studies were retrospective, the number of patients recruited varied between 11 and 34, and blood samples were not obtained in all patients whose CSF was tested. Two studies of 80 and 122 patients aged 90 days or younger with enterovirus infection were referenced to discuss our enterovirus detection frequency in the blood and CSF of febrile infants. In a study of 75 patients aged 16 years or younger with aseptic meningitis, 76% had enterovirus detected in blood samples by PCR. However, in that study, age groups were not analysed separately. In all these studies, symptom duration before lumbar puncture or venepuncture, and time between CSF and blood collection, were not recorded.

### Added value of this study

Our study of 360 patients with laboratory findings of enterovirus infection is, as far as we are aware, the largest prospective, multicentre, observational study to assess PCR testing for enterovirus in both blood and CSF samples from

newborn babies (aged  $\leq 28$  days) and infants (aged  $> 28$  days to  $\leq 2$  years) with fever without source, sepsis-like disease, or suspected meningitis, and children (aged  $> 2$  years to  $\leq 16$  years) with suspected meningitis. To our knowledge, our study is the first to show that sensitivity of enterovirus detection in blood samples is related to patients' age and clinical presentation. Detection of enterovirus was more frequent in blood samples than in CSF specimens of newborn babies and infants with fever without source or sepsis-like diseases, and it was less frequent in blood samples of patients with suspected meningitis. Furthermore, our study showed that enterovirus positivity in blood was related inversely to patient's age with meningitis.

### Implications of all the available evidence

At present, blood samples from febrile patients in the paediatric emergency department are not sent routinely for enterovirus PCR testing, and only CSF samples are sent for infants younger than 90 days or for patients with suspected meningitis. Guidelines for biological management of patients aged 2 years or younger with febrile illness in the emergency department need to be reconsidered. When blood is sampled for a complete blood count, an additional blood tube should be obtained for enterovirus PCR testing, which can now be done sufficiently rapidly to have a real effect on infection management. PCR testing of blood samples done in routine practice could result in a more accurate assessment of the actual number of positive cases in patients with suspected meningitis, sepsis-like diseases, and fever without source. A positive enterovirus diagnosis could affect beneficially decisions about a patient's management, by reducing antibiotic or antiviral therapy, avoiding ancillary tests, lowering hospital-related costs, and allowing earlier discharge.

## Methods

### Study design and patients

We did a prospective, multicentre, observational study at 35 paediatric and emergency departments in 16 French hospitals. We restricted enrolment of patients to the seasonal period of increased enterovirus circulation in countries with a temperate climate.<sup>13</sup>

We enrolled newborn babies (aged  $\leq 28$  days) and infants (aged  $> 28$  days to  $\leq 2$  years) with fever without source, sepsis-like disease, or suspected meningitis, and children (aged  $> 2$  years to  $\leq 16$  years) with suspected meningitis. All participants were admitted to one of the participating hospitals. We required an EDTA blood sample (plasma) obtained by venepuncture for participation. We also did lumbar puncture when clinically indicated.

We defined fever without source as a body temperature of  $38^{\circ}\text{C}$  or higher for less than 7 days in a child whose medical history and physical examination did not reveal the cause of the fever.<sup>14</sup> We defined sepsis as suspected or proven infection and at least two of another four criteria,

one of which had to be abnormal temperature ( $> 38.5^{\circ}\text{C}$  or  $< 36^{\circ}\text{C}$ ) or abnormal white-blood-cell count (elevated [ $> 20\,000 \times 10^9$  per L] or depressed [ $< 4000 \times 10^9$  per L] for age), and the other criterion could be either tachycardia or bradycardia, or tachypnoea. Further criteria for sepsis were a platelet count lower than  $100\,000 \times 10^9$  per L and C-reactive protein greater than 15 mg/L.<sup>15</sup> We defined meningitis as either the presence of age-specific pleocytosis or the presence of at least two of these neurological signs or symptoms: headache, nuchal rigidity, photophobia, bulging fontanelle, irritability, lethargy, nausea, vomiting, or positive Kernig's or Brudzinsky's signs. We defined pleocytosis as a white-blood-cell count in the CSF of more than 19 per  $\mu\text{L}$  for newborn babies (aged  $\leq 28$  days), ten per  $\mu\text{L}$  or more for infants (aged 29–56 days), and five per  $\mu\text{L}$  or more for older children (aged  $> 56$  days).<sup>16</sup>

Exclusion criteria were refusal of consent from parents, absence of or insufficient blood samples, and bacterial or other viral infections in blood or CSF specimens. We also excluded patients (at a later stage) who were diagnosed

with infections in other biological specimens (eg, urine, nasopharyngeal aspirate, or stool).

The study was approved by the French ethics committee (AU1180), under the Institutional Review Board number 00008526. We obtained verbal consent for use of clinical samples for research from parents or guardians of children aged 8 years or younger and from children older than 8 years.

### Procedures

Within 24 h of admission, a doctor completed a standardised questionnaire for every patient, with details of the nature and duration of preadmission symptoms and signs and the results of a physical examination done at the time of admission. Laboratory findings comprised the date and time at which biological specimens were taken, CSF and full blood count characteristics, C-reactive protein assay, and the results of other bacteriological and virological testing of samples recorded by biologists. Symptom duration was the interval between onset of symptoms and venepuncture (and lumbar puncture, if indicated). We estimated the onset of symptoms as either 8 am, 2 pm, 8 pm, or 2 am when symptoms were recorded in the morning, afternoon, evening, and night, respectively. CSF protein concentration was classified as normal if it was 0.9 g/L or lower for newborn babies (aged  $\leq 28$  days) and 0.45 g/L or lower for older children (aged  $> 28$  days). Investigation for urinary-tract infection in febrile patients was done with urine dipsticks and confirmed by culture of specimens obtained from urethral catheters. A urinary-tract infection was diagnosed as leucocytosis ( $\geq 10^4$  cells per mL) and clinically significant bacteria ( $\geq 10^5$  colony-forming units per mL) in urine culture. All samples were submitted for routine bacteriological and virological investigations at every participating hospital, according to local practice. A senior paediatrician and the study team reviewed the final diagnosis at discharge.

We did PCR testing for enterovirus in blood and CSF specimens at microbiology laboratories of five participating hospitals: Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Clermont-Ferrand (Clermont-Ferrand), Cochin Hospital (Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris), Grand Hôpital de l'Est Francilien, site de Meaux (Meaux), Centre Hospitalier de Versailles André Mignot (Versailles), and CHU de Rennes (Rennes). We used commercial (Xpert EV, Cepheid, Sunnyvale, CA, USA [only used with CSF samples]; Enterovirus R-GENE, bioMérieux, Marcy l'Etoile, France; and O-DiaENT, Diagenode, Seraing, Belgium) or in-house<sup>17</sup> RT-PCR assays. A diagnosis of enterovirus was established with positive PCR findings in either plasma or CSF, or both. For specimens negative for enterovirus on PCR testing, and if the volume of sample remaining was sufficient, we did a specific RT-PCR parechovirus assay in blood and CSF (Parechovirus R-GENE, bioMérieux). We typed enterovirus-positive specimens at the National Reference

Centre for Enteroviruses and Parechoviruses (Clermont-Ferrand, France) by amplification and sequencing of the VP1 capsid protein.<sup>18</sup>

### Statistical analysis

We did statistical analyses with Stata 13. Statistical tests were two-sided with a type I error set at an  $\alpha$  of 0.05. We presented continuous data as median (IQR) for every age group (newborn babies, infants, and children). We estimated  $\kappa$  coefficients and sensitivity, specificity, and predictive values (with 95% CIs) for blood enterovirus PCR testing and compared these with values in CSF to ascertain validity. We judged  $\kappa$  values according to recommendations: less than 0.2 (negligible), 0.2–0.4 (low or weak consistency), 0.4–0.6 (moderate agreement), 0.6–0.8 (substantial or good agreement), and greater than 0.8 (excellent agreement).<sup>19</sup>

For comparisons between groups, we used  $\chi^2$  or Fisher's exact tests for categorical variables, then (when appropriate) we did Marascuilo's procedure. For quantitative parameters, we used Student's *t* test or the Mann-Whitney test when assumptions of the *t* test were not met. We did a regression model for newborn babies and infants to identify factors that were associated independently with viraemia, using a stepwise (backward and forward) approach. We ascertained covariates according to univariate results (entry at  $p=0.15$ ) and relevant biological and clinical variables—eg, CSF white-blood-cell count, duration of symptoms, tachycardia, hypotonia, irritability, and seizure (adjustment factors). We paid attention to multicollinearity. We expressed results as odds ratios (ORs) and 95% CIs, and we represented findings using forest plots.

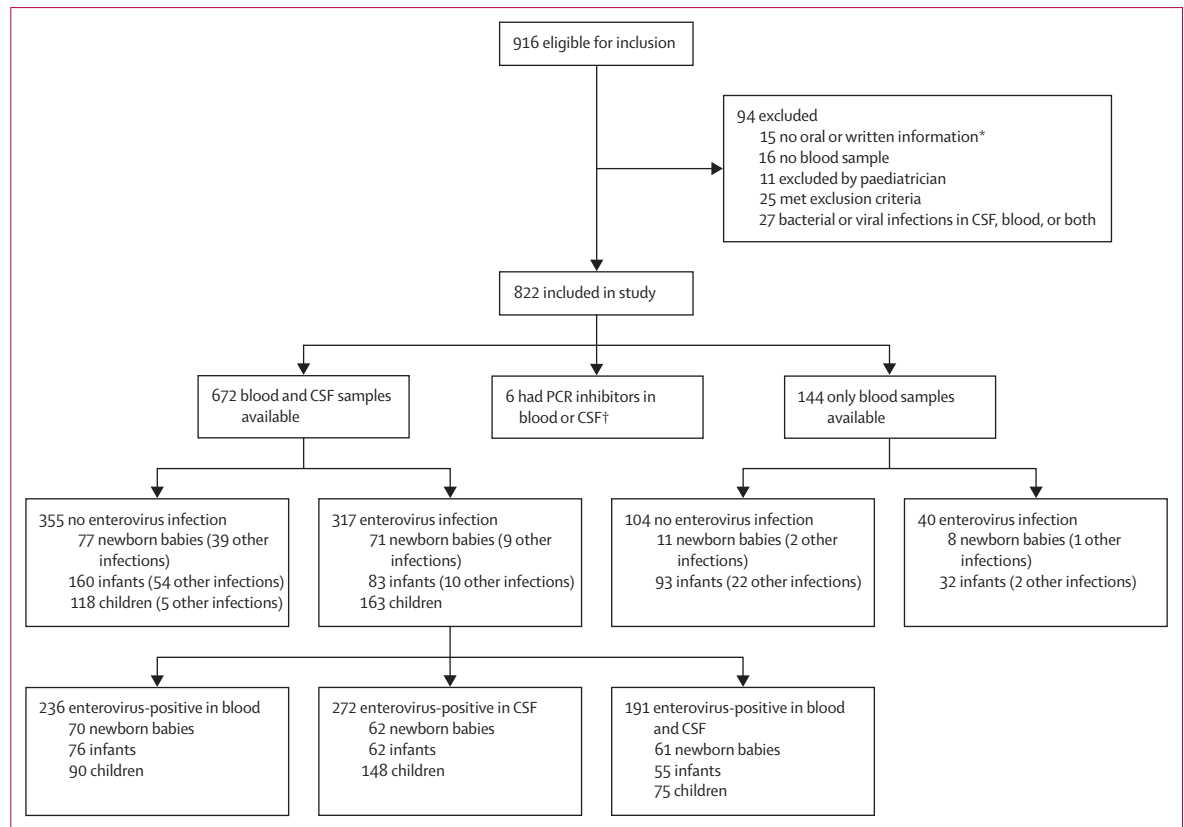
We did a sensitivity analysis for multivariate analysis, which we applied to all groups. We also did a sensitivity analysis to assess the effect of any inaccurate dates or times of symptom onset recorded by parents.

### Role of the funding source

The funder had no role in study design, data collection, data analysis, data interpretation, or writing of the report. CA and AL had full access to all data in the study and had final responsibility for the decision to submit for publication.

### Results

Between June 1, 2015, and Oct 31, 2015, and between June 1, 2016, and Oct 31, 2016, we obtained data for 916 eligible patients, of whom 822 were included (figure 1). 169 participants were newborn babies (median age 19 days [IQR 13–25]), 371 were infants (age 68 days [44–135]), and 282 were children (age 6 years [4.8–9.1]). 94 (56%) newborn babies and 229 (62%) infants had fever without source, 36 (21%) newborn babies and 52 (14%) infants had sepsis-like disease, and 39 (23%) newborn babies, 90 (24%) infants, and 282 (100%) children had suspected meningitis.



**Figure 1: Flow of enrolled patients**

CSF=cerebrospinal fluid. \*Parents did not agree to participation of their child after reading the information leaflet. †PCR inhibitors were present either in blood (n=3) or in CSF (n=3) samples. Of those with PCR inhibitors in blood, two had negative CSF (one infant and one child) and one had positive CSF (newborn baby). Of those with PCR inhibitors in CSF, one had negative blood (infant) and two had positive blood (newborn baby and infant). Three patients had enterovirus infection. All six patients were excluded from the analysis.

Blood samples were obtained by venepuncture from 822 patients (169 newborn babies, 371 infants, and 282 children), and CSF specimens were obtained by lumbar puncture from 675 patients (149 newborn babies, 244 infants, and 282 children). Enterovirus was detected in CSF or blood, or both samples, in 360 (44%) of 822 patients, comprising 81 (48%) newborn babies, 116 (31%) infants, and 163 (58%) children. Bacterial or viral infections other than enterovirus were diagnosed during the clinical course in 144 (18%) of 822 patients. Bacterial infections were detected in 83 patients. Urinary-tract infections were detected in 76 patients (*Escherichia coli*, n=62; *Enterococcus* spp, five; *Klebsiella* spp, four; *Proteus mirabilis*, two; *Citrobacter koseri*, one; *Staphylococcus haemolyticus*, one; and *Staphylococcus aureus*, one) and gastrointestinal infections in seven (*Salmonella* spp, four; *Campylobacter* spp, three). Viruses other than enterovirus were detected in 61 patients. Human parechovirus infection was detected in blood, CSF, or both, of 35 patients, 17 patients had respiratory-tract infection detected in nasopharyngeal swabs (rhinovirus, ten; respiratory syncytial virus, four; coronavirus, one; parainfluenzae virus, one; bocavirus, one), four patients had gastroenteritis viruses in stool

samples (rotavirus, two; adenovirus, two), and other viruses were detected in five patients (cytomegalovirus, two; human herpesvirus 6, three). 22 (6%) of 360 patients had co-infections consisting of enterovirus and bacterial infections (mostly febrile urinary-tract infections). No pathogen was identified in 340 (41%) of 822 patients.

317 patients with enterovirus infection had both blood and CSF specimens available for PCR testing (table 1; appendix p 1). PCR was positive for enterovirus in blood samples from 236 (74%) patients and was the only PCR-positive specimen in 45 (14%) patients. PCR was positive for enterovirus in CSF samples from 272 (86%) patients and was the only positive specimen in 81 (26%). Both specimens tested positive in 191 (60%) patients.

Detection of enterovirus in blood and CSF samples differed by age (table 1; appendix p 1). Enterovirus was detected more frequently in blood samples than in CSF specimens from newborn babies (70 [99%] of 71 vs 62 [87%] of 71;  $p=0.011$ ) and infants (76 [92%] of 83 vs 62 [75%] of 83;  $p=0.008$ ). Enterovirus was detected less frequently in blood samples than in CSF specimens from children (90 [55%] of 163 vs 148 [91%] of 163;  $p<0.0001$ ).

See Online for appendix



	Total enterovirus infections (n)	Positive blood detection	Positive CSF detection	p value	Blood+/CSF-	Blood+/CSF+	Blood-/CSF+	Time between onset of symptoms and venepuncture (h)	Time between onset of symptoms and lumbar puncture (h)	p value
<b>All patients</b>										
Total	317	236 (74%)	272 (86%)	0.001	45 (14%)	191 (60%)	81 (26%)	20 (11–36)	18 (9–32)	0.025
Newborn babies	71	70 (99%)	62 (87%)	0.011	9 (13%)	61 (86%)	1 (1%)	12 (6–25)	9 (5–22)	0.984
Infants	83	76 (92%)	62 (75%)	0.008	21 (25%)	55 (66%)	7 (9%)	16 (8–29)	14 (8–25)	0.131
Children	163	90 (55%)	148 (91%)	<0.0001	15 (9%)	75 (46%)	73 (45%)	25 (15–49)*	24 (16–48)*	0.066
<b>Fever without source</b>										
Total	55	55 (100%)	41 (75%)	0.0002	14 (25%)	41 (75%)	0	13 (7–27)	12 (7–25)	0.011
Newborn babies	31	31 (100%)	27 (87%)	0.046	4 (13%)	27 (87%)	0	12 (7–23)	10 (5–22)	0.209
Infants	24	24 (100%)	14 (58%)	0.002	10 (42%)	14 (58%)	0	16 (9–33)	15 (10–29)†	0.012
<b>Sepsis-like disease</b>										
Total	16	16 (100%)	9 (56%)	0.008	7 (44%)	9 (56%)	0	6 (4–15)	6 (4–9)	0.623
Newborn babies	9	9 (100%)	7 (78%)	0.157	2 (22%)	7 (78%)	0	6 (4–13)	6 (4–7)	0.553
Infants	7	7 (100%)	2 (29%)	0.025	5 (71%)	2 (29%)	0	8 (3–26)	8 (4–9)	0.866
<b>Suspected meningitis</b>										
Total	246	165 (67%)	222 (90%)	<0.0001	24 (10%)	141 (57%)	81 (33%)	23 (13–43)	21 (12–41)	0.266
Newborn babies	31	30 (97%)	28 (90%)	0.317	3 (10%)	27 (87%)	1 (3%)	14 (5–36)	9 (6–25)	0.106
Infants	52	45 (87%)	46 (89%)	0.782	6 (12%)	39 (75%)	7 (13%)	20 (8–32)	15 (8–25)	0.774
Children	163	90 (55%)	148 (91%)	<0.0001	15 (9%)	75 (46%)	73 (45%)	25 (15–49)*	24 (16–48)*	0.066

Data are n (%) or median (IQR), unless otherwise indicated. CSF=cerebrospinal fluid. +=enterovirus PCR positive. -=enterovirus PCR negative. \*Time between onset of symptoms and venepuncture or lumbar puncture was significant between children and infants and between children and newborn babies (p<0.0001). †Time between onset of symptoms and lumbar puncture was significant between infants and newborn babies (p=0.045).

**Table 1: Comparative detection of enterovirus in blood and CSF specimens**

	Patients (n)	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	PPV (95% CI)	NPV (95% CI)	Accuracy (%)	κ (95% CI)
Fever without source	165	100% (91–100)	91% (85–96)	78% (65–89)	100% (97–100)	93.3%	0.83 (0.74–0.93)
Sepsis-like disease	55	100% (66–100)	89% (76–96)	64% (35–87)	100% (91–100)	90.9%	0.73 (0.51–0.95)
Suspected meningitis	406	64% (57–70)	87% (81–92)	86% (79–91)	66% (60–72)	74.1%	0.49 (0.41–0.57)
Newborn babies	38	96% (82–100)	70% (35–93)	90% (74–98)	88% (47–99)	89.5%	0.71 (0.45–0.97)
Infants	87	85% (71–94)	85% (71–94)	87% (73–95)	83% (69–93)	85.1%	0.70 (0.55–0.85)
Children	281	51% (42–59)	89% (82–94)	83% (74–90)	62% (55–69)	68.7%	0.39 (0.29–0.48)

Performance was assessed in 626 patients with both CSF and blood specimens available. We excluded 46 infants (aged >3 months to <2 years) with fever without source and sepsis, since CSF enterovirus PCR is not the gold standard diagnosis test of these disease conditions. Performance of blood PCR testing was calculated with respect to the gold standard of CSF enterovirus PCR, in all patients with meningitis and in the youngest infants (aged ≤3 months) with fever without source and sepsis-like disease, for whom collection of CSF samples was integrated in routine practice. Concordance was studied by κ values and accuracy. CSF=cerebrospinal fluid. PPV=positive predictive value. NPV=negative predictive value.

**Table 2: Performance of enterovirus blood PCR diagnosis**

Detection of enterovirus varied by clinical presentation (table 1). Enterovirus was detected more frequently in blood samples than in CSF specimens of newborn babies and infants with fever without source (55 [100%] of 55 vs 41 [75%] of 55; p=0.0002) or sepsis-like disease (16 [100%] of 16 vs nine [56%] of 16; p=0.008). Detection of enterovirus was similar in blood and CSF specimens from newborn babies and infants with suspected meningitis (p=0.317 and p=0.782, respectively). Detection of enterovirus was less frequent in blood than in CSF samples from children with suspected meningitis (90 [55%] of 163 vs 148 [91%] of 163; p<0.0001). This lower frequency was associated with a longer time between onset of symptoms and venepuncture (median 25 h

[IQR 15–49]) than in infants (20 h [8–32]) and newborn babies (14 h [5–36]; p<0.0001).

In 144 patients (125 infants and 19 newborn babies), enterovirus PCR testing was done only in blood samples (figure 1). 124 (86%) of these patients were admitted to the emergency department with fever without source. PCR testing was positive for enterovirus in 40 (28%) patients (eight [42%] of 19 newborn babies and 32 [26%] of 125 infants).

The sensitivity, specificity, and accuracy of enterovirus PCR testing in blood samples were calculated with respect to the results of enterovirus PCR testing in CSF for the three clinical presentations (table 2). In this analysis, we excluded 46 infants (aged >3 months to

	Viraemia (n=125)*	No viraemia (n=135)†	p value
<b>Demographics</b>			
Newborn babies	61 (49%)	35 (26%)	<0.0001
Infants	64 (51%)	100 (74%)	<0.0001
Age (days)	28 (17–41)	55 (28–100)	<0.0001
Male sex	64 (51%)	70 (52%)	0.916
<b>Admission characteristics</b>			
Fever without source	49 (39%)	93 (69%)	<0.0001
Sepsis-like disease	12 (10%)	20 (15%)	<0.0001
Suspected meningitis	64 (51%)	22 (16%)	<0.0001
Time between onset of symptoms and lumbar puncture (h)	12 (7–24)	17 (7–31)	0.042
Time between onset of symptoms and venepuncture (h)	14 (7–26)	19 (7–31)	0.188
Exposure to a sick contact	58 (46%)	29 (22%)	<0.0001
<b>Clinical symptoms</b>			
Fever	125 (100%)	130 (96%)	0.061
Headache	1 (1%)	1 (1%)	>0.99
Photophobia	1 (1%)	1 (1%)	>0.99
Neck stiffness	3 (2%)	6 (4%)	0.503
Seizures	3 (2%)	13 (10%)	0.015
Rash	12 (10%)	19 (14%)	0.266
Bulging fontanelle	12 (10%)	10 (7%)	0.526
Tachycardia	62 (50%)	46 (34%)	0.011
Nausea or vomiting	12 (10%)	26 (19%)	0.028
Diarrhoea	18 (14%)	26 (19%)	0.296
Abdominal pain	6 (5%)	5 (4%)	0.661
Rhinitis or pharyngitis	29 (23%)	54 (40%)	0.004
Hypotonia	31 (25%)	24 (18%)	0.166
Irritability	85 (68%)	80 (59%)	0.144
Pallor or increased time for skin recolouring	27 (22%)	33 (24%)	0.587
Neurological symptoms	1 (1%)	7 (5%)	0.068
Poor feeding	37 (30%)	53 (39%)	0.102
<b>Blood characteristics</b>			
Glycaemia (mmol/L)	5.2 (4.6–5.8)	5.3 (4.7–5.8)	0.416
White-blood-cell count ( $\times 10^9$ per L)	8.8 (6.4–11.5)	10.6 (8.4–16.8)	<0.0001
Polynuclear neutrophils ( $\times 10^9$ per L)	3.9 (2.8–6.1)	4.9 (2.6–7.9)	0.059
Lymphocytes ( $\times 10^9$ per L)	3.3 (2.1–4.5)	4.6 (2.8–6.3)	<0.0001
Monocytes ( $\times 10^9$ per L)	0.9 (0.6–1.3)	1.2 (0.8–2.0)	0.019
Platelets ( $\times 10^9$ per L)	345 (274–434)	366 (290–447)	0.695
C-reactive protein >15 mg/L	23 (18%)	51 (38%)	0.001
<b>CSF characteristics</b>			
Pleocytosis	44/116 (38%)	17/125 (14%)	<0.0001
White-blood-cell count (per $\mu$ L)	5 (1–162)	2 (1–5)	0.0001
Elevated protein	51/120 (43%)	26/131 (20%)	<0.0001
Protein (g/L)	0.6 (0.4–0.8)	0.4 (0.2–0.5)	0.003
Glucose (mmol/L)	3.0 (2.7–3.3)	3.2 (2.9–3.6)	0.0001

Data are n (%) or median (IQR), unless otherwise indicated. Data obtained from 260 patients with both CSF and blood samples available for enterovirus PCR testing. We excluded 112 patients aged  $\leq 2$  years with bacterial or viral infections other than enterovirus infections and 19 other patients for whom the time between CSF collection and blood collection was  $\geq 24$  h. CSF=cerebrospinal fluid. \*Blood PCR-positive samples and CSF PCR-positive or CSF PCR-negative samples. †Blood PCR-negative samples and CSF PCR-negative samples.

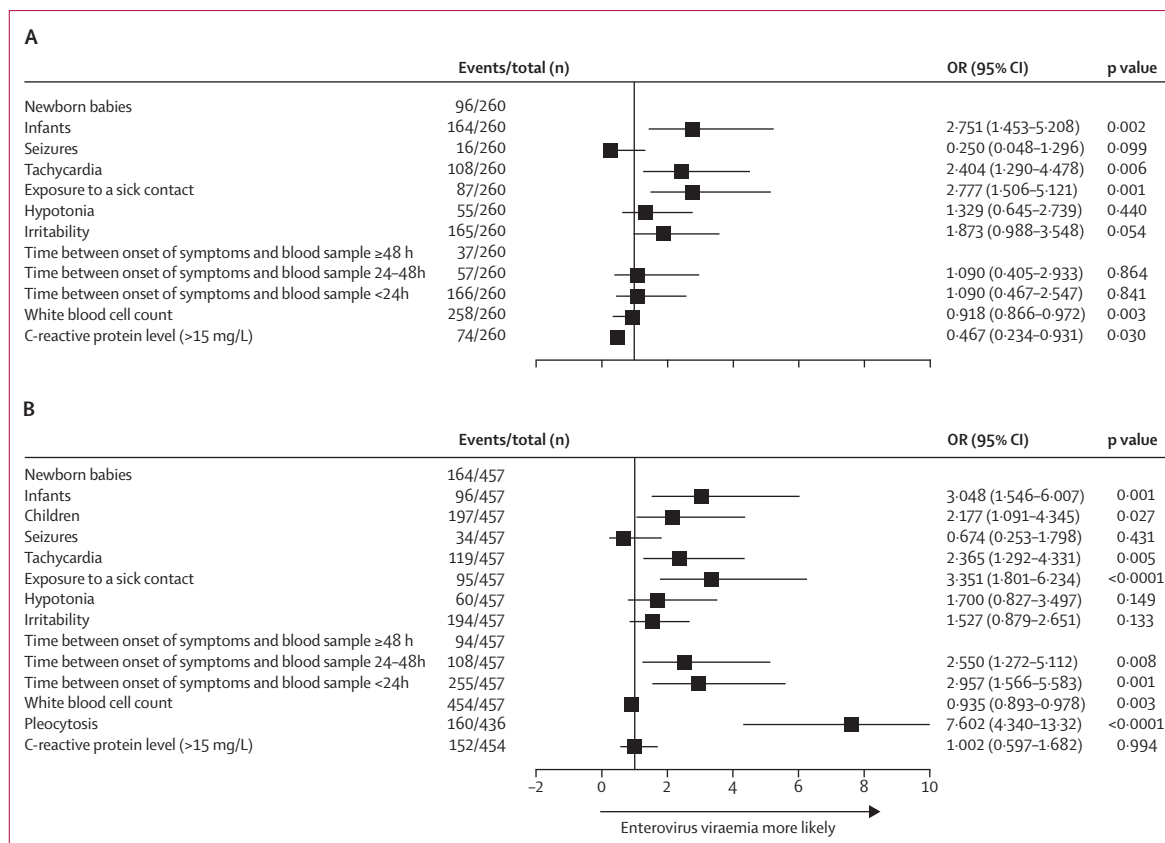
**Table 3: Univariate analysis of characteristics of infants aged 2 years or younger with and without enterovirus viraemia**

<2 years) with fever without source and sepsis because CSF enterovirus PCR is not the gold standard diagnosis test of these disease conditions. In 165 patients with fever without source, the sensitivity and specificity of enterovirus PCR testing in blood samples was 100% (IQR 91–100) and 91% (85–96), respectively. In 55 patients with sepsis-like disease, sensitivity was 100% (66–100) and specificity was 89% (76–96). In 406 patients with suspected meningitis, we recorded 64% (57–70) sensitivity and 87% (81–92) specificity.

Characteristics of patients aged 2 years or younger with and without enterovirus viraemia, who had both blood and CSF specimens available for analysis, were compared regardless of their clinical syndrome (table 3). For this analysis, we excluded 112 patients aged 2 years and younger with bacterial or viral infections other than enterovirus infections and 19 other patients for whom the time between CSF collection and blood collection was 24 h or longer. Tachycardia was the most frequent clinical symptom associated with viraemia, recorded in 62 (50%) of 125 patients with viraemia versus 46 (34%) of 135 without viraemia ( $p=0.011$ ). Exposure of a patient to a sick contact (parents and siblings with an infectious disease) was associated significantly with viraemia (58 [46%] of 125 with viraemia vs 29 [22%] of 135 without viraemia;  $p<0.0001$ ). Pleocytosis, white-blood-cell count in CSF, and amount of protein in CSF were significantly higher in patients with viraemia than in those without viraemia ( $p\leq 0.0001$ ). Few patients had pleocytosis (44 [38%] of 116 with viraemia vs 17 [14%] of 125 without viraemia).

A multivariate analysis that adjusted for age, duration of symptoms, hypotonia, irritability, and all factors judged significant in univariate analysis confirmed that patient's age, tachycardia, and exposure to a sick contact were associated significantly with viraemia in patients aged 2 years or younger (figure 2A). In a further multivariate analysis, including patients in all three age groups, the time between onset of symptoms and venepuncture (<24 h, OR 2.96, 95% CI 1.57–5.58;  $p=0.001$ ; 24 h to <48 h, 2.55, 1.27–5.11;  $p=0.008$ ) and pleocytosis (7.60, 4.34–13.32;  $p<0.0001$ ) were also associated with viraemia (figure 2B).

Data for patients in each age group with and without enterovirus infection, who had samples available for PCR testing, were compared for differences in symptoms and laboratory characteristics (table 4). For this analysis, we excluded 144 patients with bacterial or viral infections other than enterovirus infections. Newborn babies infected with enterovirus were significantly younger than were those without infection (median age 18 days [IQR 12–24] with enterovirus infection vs 21 days [14–26] without enterovirus infection;  $p=0.037$ ). Infants infected with enterovirus were significantly younger than those without infection (median age 51 days [IQR 40–86] vs 77 days [53–261];  $p=0.0001$ ). Children infected with enterovirus were more likely to have headache ( $p=0.015$ ), stiff neck



**Figure 2:** Forest plot of multivariate analyses of the relation between enterovirus viraemia and clinical and biological characteristics of patients. Analyses were done in patients (A) aged 2 years or younger and (B) aged 16 years or younger for whom both blood and CSF specimens were available. CSF=cerebrospinal fluid.

( $p=0.042$ ), hypotonia ( $p=0.012$ ), and nausea or vomiting ( $p<0.0001$ ) than were those without infection. Patients of all ages infected with enterovirus were more likely to have been exposed to a sick contact than were those without infection ( $p\leq 0.003$ ). Newborn babies infected with enterovirus were more likely to show symptoms of irritability ( $p=0.001$ ) and hypotonia ( $p=0.033$ ) compared with those testing negative for enterovirus. Tachycardia was more frequent in infants infected with enterovirus than in those not infected with enterovirus ( $p=0.005$ ). All patients recovered from the enterovirus infection.

Pleocytosis was recorded in 192 (66%) of 292 patients infected with enterovirus compared with 59 (24%) of 246 who were not infected ( $p=0.0001$ ). Pleocytosis increased with patient's age, with 20 (35%) of 58 newborn babies, 33 (47%) of 71 infants, and 139 (85%) of 163 children having pleocytosis. Amounts of protein in CSF were similar in patients infected and not with enterovirus. Blood lymphocyte counts were lower in patients of all ages infected with enterovirus than in those not infected ( $p\leq 0.044$ ).

Prospective enterovirus typing was done for 311 (86%) of 360 patients whose CSF or blood specimens, or both, were positive for enterovirus (appendix p 2).

Viral strains were assigned to 29 different types, eight within the enterovirus A species (29 patients) and 21 within the enterovirus B species (282 patients). The enterovirus genotypes E9, E25, E7, and CVB5 were more frequent in newborn babies than in infants and children; patients with suspected sepsis were more likely to be infected with E25 genotype than were patients with other clinical presentations; and those with suspected meningitis were more frequently infected with E30, E6, or CVB5 genotypes.

## Discussion

Our study shows that, in newborn babies and infants, the sensitivity of enterovirus PCR testing is higher in blood samples than in CSF specimens. This finding substantiates those of previous single-centre studies<sup>7-9</sup> and lends support to use of blood enterovirus testing as a diagnostic adjunct to rapidly identify newborn babies and infants admitted with fever without source, sepsis-like disease, or suspected meningitis whose antibiotic treatment can be discontinued and who are eligible for discharge. Our study also shows that blood enterovirus PCR testing in children with suspected meningitis has no additional benefit compared with PCR testing in CSF.

	Newborn babies (n=118)			Infants (n=283)			Children (n=277)			Interaction p value
	Enterovirus-positive (n=71)	Enterovirus-negative (n=47)	p value	Enterovirus-positive (n=104)	Enterovirus-negative (n=179)	p value	Enterovirus-positive (n=163)	Enterovirus-negative (n=114)	p value	
<b>Demographics</b>										
Age	18 days (12–24)	21 days (14–26)	0.037	51 days (40–86)	77 days (53–261)	0.0001	6.2 years (4.7–8.3)	6.4 years (4.9–10.1)	0.098	..
Male sex	39 (55%)	23 (49%)	0.52	61 (59%)	99 (55%)	0.58	118 (72%)	75 (66%)	0.24	..
<b>Admission characteristics</b>										
Fever without source	36 (51%)	34 (72%)	..	48 (46%)	135 (76%)	..	..	..	..	..
Sepsis-like disease	8 (11%)	9 (19%)	..	8 (8%)	20 (11%)	..	..	..	..	..
Suspected meningitis	27 (38%)	4 (9%)	..	48 (46%)	24 (13%)	..	163 (100%)	114 (100%)	..	..
Time between onset of symptoms and lumbar puncture (h)	10 (7–22)	12 (7–24)	0.189	14 (7–26)	19 (7–36)	0.240	24 (17–48)	29 (14–65)	0.225	..
Time between onset of symptoms and venepuncture (h)	12 (7–29)	19 (7–31)	0.197	17 (7–34)	22 (7–50)	0.103	24 (14–50)	29 (17–65)	0.195	..
Exposure to a sick contact	34 (48%)	10 (21%)	0.003	44 (42%)	39 (22%)	<0.0001	15 (9%)	1 (1%)	0.003	..
<b>Clinical symptoms</b>										
Fever	71 (100%)	44 (94%)	0.061	103 (99%)	177 (99%)	>0.99	155 (95%)	109 (96%)	0.840	0.086
Headache	..	..	..	..	..	..	148 (91%)	92(81%)	0.015	0.719
Photophobia	..	..	..	..	..	..	83 (51%)	48 (42%)	0.148	0.898
Neck stiffness	..	..	..	..	..	..	134 (82%)	82 (72%)	0.042	0.382
Seizures	0	0	>0.99	6 (6%)	16 (9%)	0.337	6 (4%)	13 (11%)	0.012	0.629
Rash	4 (6%)	8 (17%)	0.062	17 (16%)	26 (15%)	0.681	8 (5%)	11 (10%)	0.124	0.743
Bulging fontanelle	1 (2%)	6 (9%)	0.241	6 (6%)	10 (6%)	0.949	1 (1%)	0	1.000	0.502
Hypotonia	19 (27%)	5 (11%)	0.033	20 (19%)	29 (16%)	0.516	12 (7%)	1 (1%)	0.012	0.898
Tachycardia	24 (34%)	10 (21%)	0.141	57 (55%)	67 (37%)	0.005	7 (4%)	6 (5%)	0.708	0.302
Nausea or vomiting	6 (9%)	9 (19%)	0.088	14 (14%)	33 (18%)	0.278	122 (75%)	49 (43%)	<0.0001	<0.0001
Diarrhoea	7 (10%)	10 (21%)	0.084	19 (18%)	37 (21%)	0.625	2 (1%)	9 (8%)	0.009	0.617
Abdominal pain	..	..	..	..	..	..	43 (26%)	28 (25%)	0.733	0.609
Rhinitis or pharyngitis	10 (14%)	13 (28%)	0.068	32 (31%)	83 (46%)	0.010	33 (20%)	26 (23%)	0.608	0.099
Irritability	44 (62%)	14 (30%)	0.001	70 (67%)	111 (62%)	0.371	22 (14%)	18 (16%)	0.593	0.013
Pallor or increased time for skin recolouring	10 (14%)	10 (21%)	0.308	26 (25%)	38 (21%)	0.465	22 (14%)	11 (10%)	0.331	0.188
Poor feeding	20 (28%)	16 (34%)	0.498	34 (33%)	73 (41%)	0.176	34 (21%)	27 (24%)	0.577	0.624

(Table 4 continues on next page)

This lower sensitivity, compared with that recorded in newborn babies and infants, was attributable mainly to the long period between onset of symptoms and venepuncture.

To our knowledge, we report here the largest, prospective, multicentre, observational study to show that positive detection of enterovirus in blood is associated with patient’s age and clinical presentation. Detection of enterovirus was significantly higher in blood samples than in CSF specimens from newborn babies and infants and varied by clinical presentation, with detection higher in patients admitted with fever without source or sepsis-like diseases than in those with suspected meningitis. A positive result for enterovirus in blood samples from patients with suspected meningitis was related inversely to age, with higher detection in

newborn babies (97%), then infants (87%), then children (55%).

Compared with previous reports, enterovirus was detected in blood samples from newborn babies and infants more frequently in our study. In a study of 122 infants (aged ≤90 days) with fever who were infected with enterovirus, PCR yielded equally positive results in blood samples and CSF specimens (77% and 83%, respectively).<sup>7</sup> In another study of 80 infants with suspected sepsis, detection of enterovirus was similar in blood and CSF samples (69% vs 78%).<sup>8</sup>

Our study followed guidelines from the UK National Institute for Health and Care Excellence (NICE) for clinical management in emergency departments of newborn babies, infants, and children with febrile illness,<sup>20</sup> which include biological assessments—in

	Newborn babies (n=118)			Infants (n=283)			Children (n=277)			Interaction p value
	Enterovirus-positive (n=71)	Enterovirus-negative (n=47)	p value	Enterovirus-positive (n=104)	Enterovirus-negative (n=179)	p value	Enterovirus-positive (n=163)	Enterovirus-negative (n=114)	p value	
(Continued from previous page)										
<b>Blood characteristics</b>										
Glycaemia (mmol/L)	4.6 (4.2–5.2)	4.6 (4.4–5.4)	0.487	5.5 (5.0–6.1)	5.4 (4.9–6.1)	0.640	5.6 (5.1–6.3)	5.3 (4.7–6.3)	0.677	..
White-blood-cell count ( $\times 10^9$ per L)	8.8 (7.0–11.4)	9.7 (8.2–13.8)	0.020	8.8 (6.2–12.3)	11.0 (8.4–15.5)	0.0001	10.9 (8.5–13.4)	11.6 (8.8–15.5)	0.092	..
Polynuclear neutrophil ( $\times 10^9$ per L)	4.1 (2.9–6.3)	3.6 (2.0–4.9)	0.066	3.3 (2.4–5.8)	5.2 (2.5–7.9)	0.010	8.5 (6.5–10.8)	8.4 (5.4–12.8)	0.947	..
Lymphocytes ( $\times 10^9$ per L)	3.0 (2.1–4.5)	4.7 (3.4–6.6)	0.0005	3.8 (2.1–4.9)	4.3 (2.8–6.2)	0.044	1.4 (0.9–2.0)	1.7 (1.1–2.7)	0.004	..
Monocytes ( $\times 10^9$ per L)	0.8 (0.7–1.2)	1.2 (0.9–1.9)	0.092	0.9 (0.6–1.4)	1.2 (0.8–1.8)	0.037	0.7 (0.5–1.0)	0.9 (0.7–1.3)	0.0001	..
Platelet count ( $\times 10^9$ per L)	327 (250–420)	377 (273–461)	0.085	390 (309–445)	359 (282–450)	0.389	288 (245–348)	274 (230–339)	0.131	..
Thrombocytopenia	4/70 (6%)	1/47 (2%)	0.647	0/0 (0%)	3/177 (2%)	0.302	1/161 (1%)	3/113 (3%)	0.309	..
C-reactive protein >15 mg/L	9/71 (13%)	15/47 (32%)	0.011	21/104 (20%)	73/179 (41%)	<0.0001	50/161 (31%)	52/113 (46%)	0.012	..
C-reactive protein (mg/L)	8 (3–13)	11 (3–23)	0.171	8 (4–15)	15 (5–44)	0.0004	9 (4–20)	19 (7–62)	0.0001	..
<b>CSF characteristics</b>										
Pleocytosis	20/58 (35%)	4/33 (12%)	0.020	33/71 (47%)	17/101 (17%)	<0.0001	139/163 (85%)	38/112 (34%)	<0.0001	..
White-blood-cell count (per $\mu$ L)	7 (2–181)	4 (3–14)	0.276	7 (1–177)	2 (1–4)	0.0001	72 (19–218)	2 (1–34)	0.0001	..
Elevated protein	17/61 (28%)	5/36 (14%)	0.112	42/73 (58%)	27/106 (26%)	<0.0001	30/163 (18%)	17/110 (16%)	0.527	..
Protein level (g/L)	0.7 (0.5–1.0)	0.6 (0.5–0.7)	0.148	0.5 (0.3–0.7)	0.3 (0.2–0.5)	0.222	0.3 (0.2–0.4)	0.2 (0.2–0.3)	0.469	..
Glucose (mmol/L)	2.7 (2.5–3.1)	2.9 (2.6–3.4)	0.088	3.1 (2.8–3.5)	3.3 (3.0–3.7)	0.007	3.5 (3.2–3.9)	3.6 (3.2–4.0)	0.451	..
Data are n (%) or median (IQR), unless otherwise indicated. These results were obtained from 678 patients who had samples available for enterovirus PCR testing (excluding 144 patients with bacterial or viral infections other than enterovirus infections). CSF=cerebrospinal fluid.										
<b>Table 4: Characteristics of each age group of patients with and without enterovirus infection</b>										

particular full blood count, urine testing, and lumbar puncture, when clinically indicated. An additional blood tube was requested in our study for enterovirus PCR testing. The time between collection of the blood sample and collection of the CSF specimen was 2 h or sooner for most patients (472 [70%] of 672; data not shown). Concomitant collection of blood and CSF was important for overall interpretation of virological data. We found that sampling times for CSF and blood after onset of symptoms had major effects on detection of enterovirus: lumbar puncture done at an early stage in the infection course and late blood sampling (>3 days to  $\leq$ 4 days) can produce negative enterovirus results. In our study, of 317 patients infected with enterovirus who had both blood and CSF samples available, 45 (14%) were not identified by the CSF PCR assay. The time between onset of symptoms and lumbar puncture in these patients was short (median 15 h [IQR 8–23]), with 14 (31%) of these 45 patients having symptom duration of 8 h or less (data not shown). By contrast, in 81 (26%) of 317 patients with a positive CSF PCR assay and negative blood PCR, the time between symptom onset and venepuncture was longer (median 26 h [IQR 16–70]). These data suggest

that viraemia occurs early and is of short duration, a finding rarely noted in other reports and only with small patient populations.<sup>21,22</sup>

In some biological diagnostic practices, CSF PCR testing is done only in patients with pleocytosis. In our study, we did lumbar puncture in 675 patients, of whom 371 did not have pleocytosis (data not shown). In these patients, however, enterovirus was detected in CSF (n=70) and blood (n=98). Without detection of enterovirus in blood or CSF samples, these patients without pleocytosis would have been discharged without aetiological diagnosis. Thus, the diagnostic practice to do enterovirus testing solely in patients with pleocytosis can lead to enterovirus infections being missed. Moreover, 144 patients had enterovirus PCR testing done only in blood samples, of whom 40 (28%) had enterovirus infection—mostly newborn babies or infants with fever without source. Ahmad and colleagues detected enterovirus in blood samples from 34 (24%) of 139 neonates with sepsis-like illness.<sup>11</sup>

The diversity of prevailing enterovirus genotypes during the two seasons of the present study and differences in the distribution of genotypes among age

groups and clinical presentations are all factors that should be considered in enterovirus detection in blood samples. The proportion of enterovirus genotypes in patients admitted to hospital reflects global circulation patterns of virus strains across countries and within the general population of one country.<sup>23</sup> Harvala and colleagues<sup>24</sup> reported higher or similar viral loads in CSF compared with plasma in 11 children younger than 3 years with CNS disease. They found low or undetectable CSF viral loads and high plasma viral loads in 14 children with sepsis. A previous study by our group<sup>25</sup> showed that among 156 patients with acute meningitis, enterovirus viral loads in CSF were higher in newborn babies than in infants and adults and that genotypes were associated with different viral loads.

The analysis of clinical and biological characteristics in patients aged 2 years or younger showed that viraemia was detected more frequently in younger infants (median age 28 days [IQR 17–41]) with acute-stage disease, as suggested in earlier retrospective studies of smaller patient populations.<sup>21,22</sup> Clinically, tachycardia was present in 62 (50%) of 125 young patients with viraemia and fever without source, sepsis, or suspected meningitis. Other reports have cited fever, irritability, lethargy, and poor feeding in patients with enterovirus viraemia.<sup>11,21</sup> In our study, patients with enterovirus viraemia were also more likely to have been exposed to a sick contact.

All patients with viraemia in our study were febrile. Amounts of C-reactive protein in serum greater than 15 mg/L were detected more frequently in patients without viraemia. Pleocytosis was noted in 44 (38%) of 116 patients with enterovirus viraemia, mainly those with suspected meningitis (data not shown). Dagan and colleagues<sup>21</sup> reported an inverse relation between viraemia and pleocytosis. The number of lymphocytes and monocytes was significantly lower in patients with viraemia than in those without viraemia. This finding and earlier data<sup>21,26</sup> suggest a detrimental effect of enterovirus infection on populations of mononuclear leucocytes during viraemia. This effect can be caused by virus replication in mononuclear leucocytes, because some enterovirus genotypes can replicate *in vitro* in human peripheral blood mononuclear cells.<sup>27,28</sup> Accordingly, the concentrations of circulating mononuclear cells at different ages and the ability of enterovirus genotypes to replicate in these cells can affect the sensitivity of blood enterovirus detection.

Concomitant bacterial infections, mostly urinary-tract infections, occurred in a small proportion (22 [6%] of 360) of patients with fever and enterovirus infection. Amounts of C-reactive protein in serum greater than 15 mg/L were noted in five (23%) of these patients (data not shown). The frequency of concomitant enterovirus and bacterial infections was consistent with that in other studies.<sup>7,8,29</sup> No enterovirus and bacterial coinfections were identified in CSF of patients with

meningitis and in blood samples of patients with sepsis-like disease.

Our study has three limitations. First, the date and time of symptom onset were recorded less reliably by parents of children than by those of newborn babies and infants. A sensitivity analysis (data not shown) excluding the inaccurate dates and times of symptom onset for 190 (23%) of 822 patients did not affect our results. Second, virology management (including detection of viruses other than enterovirus) and bacteriology management varied between the 16 hospitals taking part. In 340 (41%) of 822 patients, no diagnosis was established, a figure similar to that reported by Ahmad and colleagues (43%).<sup>11</sup> Third, four different RT-PCR assays were used in our multicentre study. It is unlikely that this variability affected the overall results, because methods used are assessed annually by an external quality assessment programme, and all yielded correct results.

In conclusion, detection of enterovirus in blood improved diagnostic yield in newborn babies and infants admitted for fever without source, sepsis-like disease, or suspected meningitis, compared with detection in CSF. The high frequency of detection of enterovirus in blood samples from very young patients with fever without source and sepsis-like disease suggests that enterovirus febrile illnesses are underdiagnosed. It is important to reconsider the guidelines for biological management of patients aged 2 years or younger with febrile illness in emergency departments, to obtain—at the time of blood sampling—an additional tube for enterovirus PCR testing, which can be done sufficiently rapidly to have a real effect on management. A positive enterovirus blood diagnosis could beneficially affect patient management decisions by reducing antibiotic or antiviral therapy, avoiding ancillary tests, lowering hospital-related costs, and allowing earlier discharge. Blood enterovirus genome can also be used as an alternative biomarker in case of contraindications for CSF sampling and failure of lumbar puncture.

#### Contributors

AL and CA are principal investigators. ASLH, FM, BP, MD, MNA, FG, FF, FA, SM-J, MAG, GL, MV, FR, AM, HP-L, CH, J-LB are study investigators. CA, AL, and JL designed the study and oversaw conduct of the trial. CA and JL coordinated individual trial sites. AL, CA, and JL reviewed clinical files. ASLH and FR contributed to data collection and assembled data. CA, JL, J-LB, and CH analysed data and wrote the first draft. ASLH, FM, BP, MD, MNA, FG, FF, FA, SM-J, MAG, GL, MV, FR, AM, and HP-L critically reviewed the report and contributed to its content. All authors and members of the study team contributed to data collection and approved the final version before submission.

#### Blood Enterovirus Diagnosis Infection (BLEDI) in paediatric population study team

Anne Chace (Service de Pédiatrie et Néonatalogie, Centre Hospitalier Intercommunal Villeneuve Saint-Georges, Villeneuve Saint-Georges); Camille Corlouer (Laboratoire de microbiologie, Centre Hospitalier Intercommunal Villeneuve Saint-Georges, Villeneuve Saint-Georges); Jean-Christophe Mercier (Service de Pédiatrie générale et Urgences, Hôpital Louis Mourier [AP-HP], Colombes); Marie Cotillon (Service de Pédiatrie générale et Urgences, Hôpital Louis Mourier [AP-HP], Colombes); Fatma Magdoud El Alaoui (Laboratoire de

- Microbiologie, Hôpital Jean Verdier-HUPSSD, Bondy); Ralph Epaud (Service Urgences Pédiatriques, Centre Hospitalier Intercommunal Créteil, Créteil); Sylvie Nathanson (Service de Pédiatrie, Centre Hospitalier de Versailles André Mignot, Le Chesnay); Aymeric Coutard (Laboratoire de Microbiologie – Hygiène, Centre Hospitalier de Versailles André Mignot, Le Chesnay); Emmanuelle Rochette (Centre Hospitalier Universitaire Clermont-Ferrand, INSERM, CIC 1405, Clermont-Ferrand); Amélie Brebion (Laboratoire de Virologie, Centre Hospitalier Universitaire Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand); Martine Chambon (Laboratoire de Virologie, Centre Hospitalier Universitaire Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand); Christel Regagnon (Laboratoire de Virologie, Centre Hospitalier Universitaire Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand); Loïc De Pontual (Service de Pédiatrie, Hôpital Jean Verdier, AP-HP, Université Paris 13, Bondy); Etienne Carbonnelle (Service de Microbiologie Clinique des HUPSSD, Hôpital Jean-Verdier, Bobigny); Isabelle Poilane (Service de Microbiologie Clinique des HUPSSD, Hôpital Jean-Verdier, Bobigny); Grégoire Benoist (Service Pédiatrie Générale et Urgences Pédiatriques, CHU Ambroise-Paré-APHP, Boulogne-Billancourt); Elyanne Gault (Service de Microbiologie et Hygiène, Hôpitaux Universitaires Paris Ile-de-France Ouest, Site Ambroise Paré, Boulogne-Billancourt); Véronique Millet-Zerner (Service de Pédiatrie, Centre Hospitalier Henri Mondor, Aurillac); Mathieu Kuentz (Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier Henri Mondor, Aurillac); Serge Gallet (Service de Pédiatrie–Néonatalogie, Centre Hospitalier Montluçon, Montluçon); Valérie Macchi (Laboratoire, centre Hospitalier Montluçon, Montluçon); Sarah Ducrocq (Service de Pédiatrie, Groupe Hospitalier Nord Essonne, site de Longjumeau, Longjumeau); Serge Epelbaum (Service de Pédiatrie, Groupe Hospitalier Nord Essonne, site de Longjumeau, Longjumeau); Christine Lambert (Laboratoire de biologie médicale, Groupe Hospitalier Nord Essonne, site de Longjumeau, Longjumeau); Albert Faye (Service de Pédiatrie Générale, Hôpital Robert-Debré, Paris); Sophie Soudée (Service de Réanimation néonatale et de Néonatalogie, Hôpital Robert-Debré, Paris); Luigi Titomanlio (Service d'Accueil des Urgences Pédiatriques, Hôpital Robert-Debré, Paris); Stéphane Bonacorsi (Service de Microbiologie, Hôpital Robert-Debré, Paris); Aurélie Cointe (Service de Microbiologie, Hôpital Robert-Debré, Paris); Isabelle Cloix (Service de Pédiatrie, Centre Hospitalier Moulins-Yzeure, Moulins); Aina-Harintsoa Raobison (Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier Moulins-Yzeure, Moulins); Morgane Boutry (Service de Pédiatrie–Néonatalogie, Centre Hospitalier Jacques Lacarin, Vichy); and Fabienne Tavani (Laboratoire de Biologie Polyvalente, Centre Hospitalier Jacques Lacarin, Vichy).
- Declaration of interests**  
We declare no competing interests.
- Acknowledgments**  
This study was supported by a grant from the University Hospital of Clermont-Ferrand AOI (Appel d'Offre Interne) 2015. We gratefully acknowledge the Blood Enterovirus Diagnosis Infection (BLEDI) in paediatric population study team, who contributed to data collection from 16 French participating hospitals. We thank Emilie Leroy and Nathalie Rodde for assistance with virus genotyping; and Jeffrey Watts for help preparing the Article (funded with a grant from the University Hospital of Clermont-Ferrand AOI 2015).
- References**
- de Ory F, Avellón A, Echevarría JE, et al. Viral infections of the central nervous system in Spain: a prospective study. *J Med Virol* 2013; **85**: 554–62.
  - Martin NG, Iro MA, Sadarangani M, Goldacre R, Pollard AJ, Goldacre MJ. Hospital admissions for viral meningitis in children in England over five decades: a population-based observational study. *Lancet Infect Dis* 2016; **16**: 1279–87.
  - Archimbaud C, Chambon M, Bailly JL, et al. Impact of rapid enterovirus molecular diagnosis on the management of infants, children, and adults with aseptic meningitis. *J Med Virol* 2009; **81**: 42–48.
  - Archimbaud C, Ouchchane L, Mirand A, et al. Improvement of the management of infants, children and adults with a molecular diagnosis of enterovirus meningitis during two observational study periods. *PLoS One* 2013; **8**: e68571.
  - Harvala H, Broberg E, Benschop K, et al. Recommendations for enterovirus diagnostics and characterisation within and beyond Europe. *J Clin Virol* 2018; **101**: 11–17.
  - Alpern ER, Stanley RM, Gorelick MH, et al. Epidemiology of a pediatric emergency medicine research network: the PECARN Core Data Project. *Pediatr Emerg Care* 2006; **22**: 689–99.
  - Rittichier KR, Bryan PA, Bassett KE, et al. Diagnosis and outcomes of enterovirus infections in young infants. *Pediatr Infect Dis J* 2005; **24**: 546–50.
  - Byington CL, Taggart EW, Carroll KC, Hillyard DR. A polymerase chain reaction-based epidemiologic investigation of the incidence of nonpolio enteroviral infections in febrile and afebrile infants 90 days and younger. *Pediatrics* 1999; **103**: E27.
  - de Crom SC, Obihara CC, de Moor RA, Veldkamp EJ, van Furth AM, Rossen JW. Prospective comparison of the detection rates of human enterovirus and parechovirus RT-qPCR and viral culture in different pediatric specimens. *J Clin Virol* 2013; **58**: 449–54.
  - de Jong EP, van den Beuken MGA, van Elzakker EPM, et al. Epidemiology of sepsis-like illness in young infants: major role of enterovirus and human parechovirus. *Pediatr Infect Dis J* 2018; **37**: 113–18.
  - Ahmad S, Dalwai A, Al-Nakib W. Frequency of enterovirus detection in blood samples of neonates admitted to hospital with sepsis-like illness in Kuwait. *J Med Virol* 2013; **85**: 1280–85.
  - Cordey S, L'Huillier AG, Turin L, Gervais A, Posfay Barbe K, Kaiser L. Enterovirus and parechovirus viraemia in young children presenting to the emergency room: unrecognised and frequent. *J Clin Virol* 2015; **68**: 69–72.
  - Antona D, Lévêque N, Chomel JJ, Dubrou S, Lévy-Bruhl D, Lina B. Surveillance of enteroviruses in France, 2000–2004. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007; **26**: 403–12.
  - Baraff LJ. Management of fever without source in infants and children. *Ann Emerg Med* 2000; **36**: 602–14.
  - European Medicines Agency. Report on the Expert Meeting on neonatal and paediatric sepsis. Dec 16, 2010. [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Report/2010/12/WC5001001199.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2010/12/WC5001001199.pdf) (accessed Oct 24, 2017).
  - Kestenbaum LA, Ebberson J, Zorc JJ, Hodinka RL, Shah SS. Defining cerebrospinal fluid white blood cell count reference values in neonates and young infants. *Pediatrics* 2010; **125**: 257–64.
  - Dierssen U, Rehren F, Henke-Gendo C, Harste G, Heim A. Rapid routine detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid by a one-step real-time RT-PCR assay. *J Clin Virol* 2008; **42**: 58–64.
  - Mirand A, Henquell C, Archimbaud C, et al. Prospective identification of enteroviruses involved in meningitis in 2006 through direct genotyping in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 2008; **46**: 87–96.
  - Terwee CB, Bot SDM, de Boer MR, et al. Quality criteria were proposed for measurement properties of health status questionnaires. *J Clin Epidemiol* 2007; **60**: 34–42.
  - National Institute for Health and Care Excellence. Fever in under 5s: assessment and initial management—clinical guideline (CG160). August, 2017. <https://www.nice.org.uk/guidance/cg160> (accessed April 20, 2018).
  - Dagan R, Jenista JA, Prather SL, Powell KR, Menegus MA. Viremia in hospitalized children with enterovirus infections. *J Pediatr* 1985; **106**: 397–401.
  - Cheng H-Y, Huang Y-C, Yen T-Y, et al. The correlation between the presence of viremia and clinical severity in patients with enterovirus 71 infection: a multi-center cohort study. *BMC Infect Dis* 2014; **14**: 417.
  - Santé Publique France. Point sur les infections à entérovirus au 9 décembre 2016. Dec 9, 2016. <http://invs.santepubliquefrance.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Maladies-a-prevention-vaccinale/Poliomyelite/Points-de-situation/Point-sur-les-infections-a-enterovirus-au-9-decembre-2016> (accessed April 20, 2018).
  - Harvala H, Griffiths M, Solomon T, Simmonds P. Distinct systemic and central nervous system disease patterns in enterovirus and parechovirus infected children. *J Infect* 2014; **69**: 69–74.

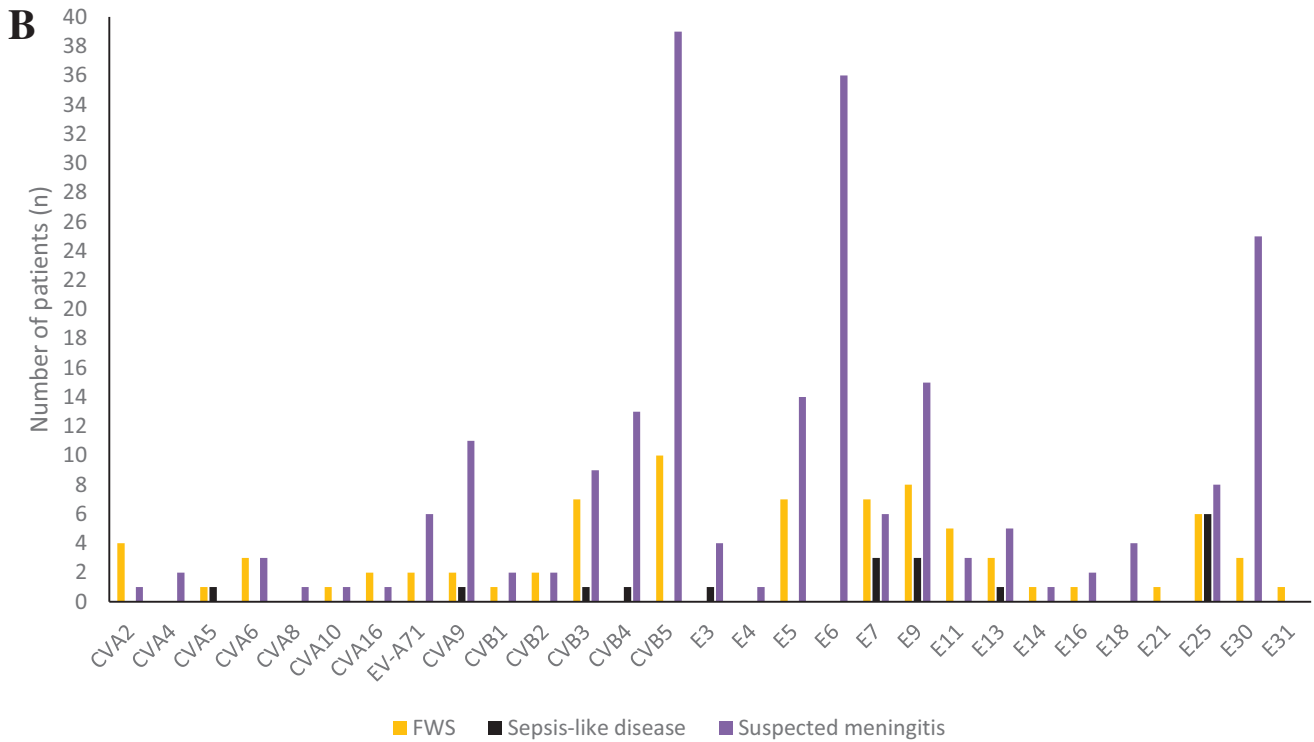
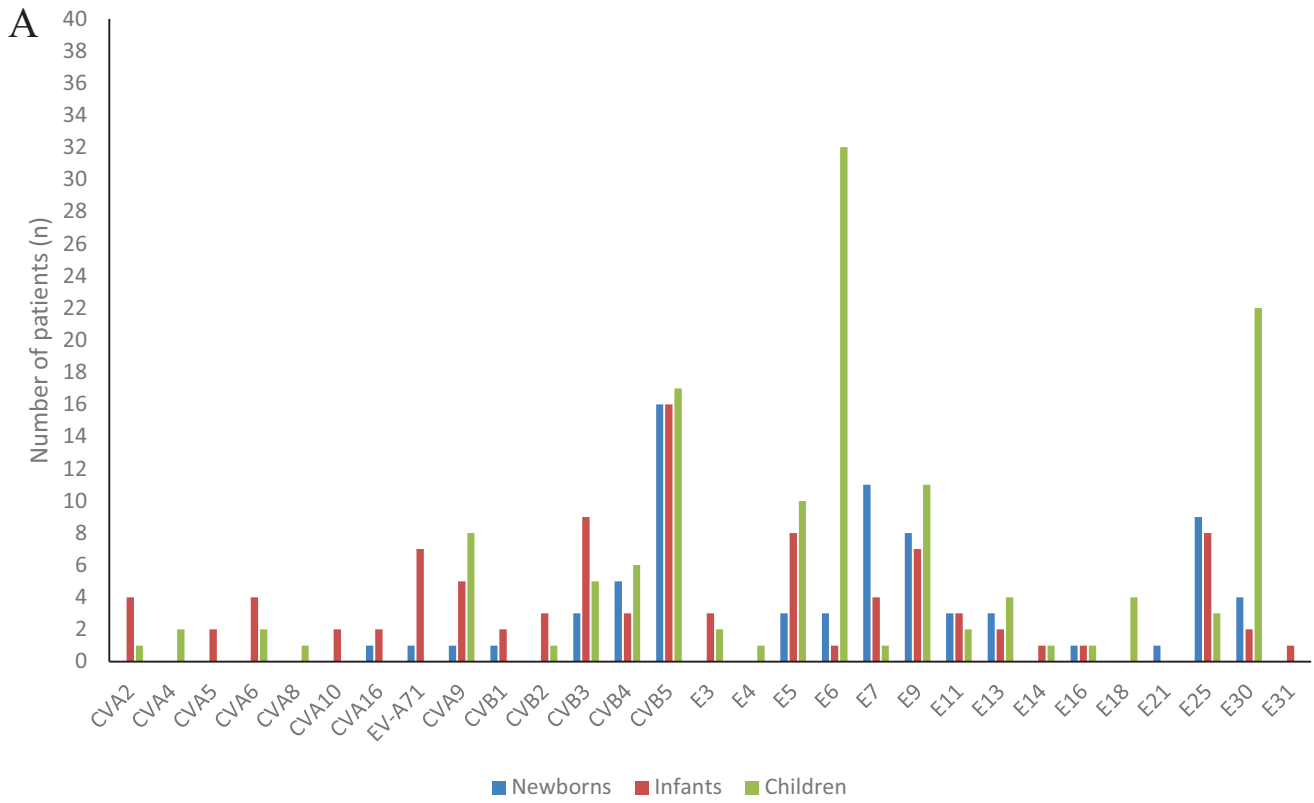
- 25 Volle R, Bailly J-L, Mirand A, et al. Variations in cerebrospinal fluid viral loads among enterovirus genotypes in patients hospitalized with laboratory-confirmed meningitis due to enterovirus. *J Infect Dis* 2014; **210**: 576–84.
- 26 Sharp J, Harrison CJ, Puckett K, et al. Characteristics of young infants in whom human parechovirus, enterovirus or neither were detected in cerebrospinal fluid during sepsis evaluations. *Pediatr Infect Dis J* 2013; **32**: 213–16.
- 27 Dagan R, Menegus MA. Replication of enteroviruses in human mononuclear cells. *Isr J Med Sci* 1992; **28**: 369–72.
- 28 Vuorinen T, Vainionpää R, Heino J, Hyypiä T. Enterovirus receptors and virus replication in human leukocytes. *J Gen Virol* 1999; **80**: 921–27.
- 29 Calvo C, Gallardo P, Torija P, et al. Enterovirus neurological disease and bacterial coinfection in very young infants with fever. *J Clin Virol* 2016; **85**: 37–39.



Appendix p1 – Comparative detection rate of EV in blood and CSF specimens.

	Total enterovirus infections (n)	Positive blood detection	Positive CSF detection	p value	Blood+/CSF-	Blood+/CSF+	Blood-/CSF+	Time between onset of symptoms and venepuncture (h)	Time between onset of symptoms and lumbar puncture (h)	p value
<b>All patients</b>										
≤16 years	317	236 (74%)	272 (86%)	0-001	45 (14%)	191 (60%)	81 (26%)	20 (11-36)	18 (9-32)	0-025
<b>Newborns babies</b>										
≤28 days	71	70 (99%)	62 (87%)	0-011	9 (13%)	61 (86%)	1 (1%)	12 (6-25)	9 (5-22)	0-984
<b>Infants</b>										
>28 days to ≤2 years	83	76 (92%)	62 (75%)	0-008	21 (25%)	55 (66%)	7 (9%)	16 (8-29)	14 (8-25)	0-131
>28 days to ≤2 months	57	55 (97%)	47 (83%)	0-021	10 (18%)	45 (79%)	2 (4%)	16 (8-29)	12 (7-21)	0-409
>28 days to ≤3 months	67	63 (94%)	54 (81%)	0-029	13 (19%)	50 (75%)	4 (6%)	16 (7-29)	13 (8-22)	0-105
>3 months to ≤6 months	7	6 (86%)	5 (71%)	0-564	2 (29%)	4 (57%)	1 (14%)	29 (12-41)	25 (14-42)	0-866
>6 months to ≤12 months	2	2 (100%)	1 (50%)	/	1 (50%)	1 (50%)	0	15 (12-18)	17 (14-19)	/
>1 year to ≤2 years	7	5 (71%)	2 (29%)	0-257	5 (71%)	0	2 (29%)	25 (4-27)	26 (6-27)	0-735
>28 days to ≤1 years	76	71 (93%)	60 (79%)	0-016	16 (21%)	55 (72%)	5 (7%)	16 (8-30)	14 (8-24)	0-100
<b>Children</b>										
>2 years to ≤16 years	163	90 (55%)	148 (91%)	<0-0001	15 (9%)	75 (46%)	73 (45%)	25 (15-49)	24 (16-48)	0-066
>2 years to ≤3 years	14	8 (57%)	9 (64%)	0-763	5 (36%)	3 (21%)	6 (43%)	21 (6-57)	19 (8-28)	0-571
>3 years to ≤4 years	18	8 (44%)	17 (94%)	0-007	1 (6%)	7 (39%)	10 (55%)	23 (14-65)	24 (16-65)	0-217
>4 years to ≤5 years	15	10 (67%)	12 (80%)	0-480	3 (20%)	7 (47%)	5 (33%)	27 (17-43)	21 (18-42)	0-230
>5 years to ≤7 years	51	28 (55%)	49 (96%)	<0-0001	2 (4%)	26 (51%)	23 (45%)	26 (15-47)	24 (16-48)	0-368
>7 years to ≤9 years	30	20 (67%)	26 (87%)	0-109	4 (13%)	16 (53%)	10 (34%)	22 (12-40)	22 (14-47)	0-405
>9 years to ≤11 years	17	5 (29%)	17 (100%)	0-0005	0	5 (29%)	12 (71%)	24 (17-32)	24 (17-32)	0-229
>11 years to ≤13 years	11	6 (55%)	11 (100%)	0-025	0	6 (55%)	5 (45%)	51 (22-121)	51 (23-111)	0-688
>13 years to ≤16 years	7	5 (71%)	7 (100%)	0-157	0	5 (71%)	2 (29%)	19 (9-52)	30 (21-53)	0-102

Data are n (%) or median (IQR), unless otherwise indicated. CSF=cerebrospinal fluid. + = enterovirus PCR positive. - = enterovirus PCR negative.



**Appendix p2 - Distribution of EV genotypes according to (A) patient age (children, infants and newborns) and (B) clinical presentations: fever without source (FWS), sepsis-like disease and suspected meningitis.**

Prospective EV typing was done for 311 of 360 (86%) of infected patients. Coxsackievirus B5 (CVB5) was the most frequent type among patients, being detected in 49 (16%) patients of the study population, followed by echovirus 6 (E6, 36 (12%)), E30 (28 (9%)), and E9 (26 (8%)). The diversity and distribution of EV types differed between age groups and clinical presentations.

#### 4. Commentaires de l'étude

L'originalité de cette étude tient au nombre de patients inclus (n=822), à son aspect prospectif, à la prise en compte de trois tranches d'âge (nouveau-nés, nourrissons et enfants) ainsi que de trois tableaux cliniques différents (fièvre isolée, suspicion de sepsis et de méningites) et surtout à l'obtention systématique d'un prélèvement de sang, pour chaque patient, point fort indéniable par rapport aux autres études publiées. Les résultats de l'apport du diagnostic moléculaire des EV dans le sang chez les nouveau-nés, et les nourrissons hospitalisés ouvrent les perspectives d'un nouvel algorithme diagnostique des fièvres inexplicables en Pédiatrie.

L'analyse des résultats de l'étude BLEDI a permis de distinguer 2 groupes de patients :

- un groupe de patients (n=144) dans lequel **seul le prélèvement de sang a été réalisé.**

Un EV a été détecté chez 28% de ces patients et il s'agissait majoritairement de nourrissons admis pour une fièvre isolée sans point d'appel. Ce taux de détection est important et souligne une sous estimation des EV dans ces infections dans cette population pédiatrique. Actuellement, le diagnostic des EV dans le sang (sérum ou plasma) n'est pas réalisé dans la pratique quotidienne des laboratoires. Or cette détection, en particulier durant la période de circulation des EV, devrait être incluse dans l'algorithme de prise en charge des jeunes nourrissons, afin de permettre une sortie anticipée des nourrissons de l'hôpital.

- un 2<sup>ème</sup> groupe de patients (n=678) pour lesquels **nous avons reçu à la fois un prélèvement de sang et de LCR.**

Les résultats ont montré que le taux de détection des EV dans le sang était corrélé à l'âge des patients. Ce taux était significativement plus élevé dans le sang que dans le LCR chez les nouveau-nés (99% vs 87%) et les nourrissons (92% vs 75%) par rapport aux enfants (55% vs 91%). De la même manière, nous avons montré que le taux de détection des EV variait avec le tableau clinique. Un taux de détection plus élevé dans le sang que dans le LCR a été observé chez les nourrissons ( $\leq 2$  ans) présentant un tableau de fièvre isolée (100% vs 75%) et de sepsis (100% vs 56%). Par contre, chez les enfants ( $> 2$  ans) présentant un syndrome méningé, la détection des EV dans le LCR reste plus sensible (90% [LCR] vs 67% [sang]). Chez les

nourrissons âgés de moins de 2 ans présentant une suspicion de méningite, un taux similaire de détection des EV dans les 2 compartiments biologiques (**Article, Tableau 1**) a été observé. Cependant, l'analyse plus détaillée de ces derniers résultats montre que le génome des EV a été détecté dans 75 échantillons de sang et dans 74 LCR. Pour 66 patients, la PCR était positive dans les 2 échantillons biologiques, pour 9 patients uniquement dans le sang et pour 8 patients uniquement dans le LCR. En tenant compte de ces résultats, il est donc recommandé de réaliser la détection combinée des EV dans le sang et dans le LCR afin d'augmenter la sensibilité du diagnostic des méningites à EV chez les enfants âgés de moins de 2 ans.

Dans notre étude, la détection génomique combinée des EV dans le sang et dans le LCR a permis d'améliorer la sensibilité du diagnostic des EV de 14%, suggérant une sous-estimation des EV notamment dans les tableaux de fièvre isolée et de sepsis. Nous avons rapporté des taux de détection des EV dans le sang parmi les plus élevés décrits dans la littérature (**Byington et al. 1999 ; Rittichier et al., 2005, De Crom et al., 2013**). Nos résultats diffèrent de ceux de 2 études réalisées chez des patients âgés  $\leq 3$  mois (admis pour un tableau de fièvre isolée ou une suspicion de sepsis) qui concluaient à une équivalence de la sensibilité de la PCR EV dans le sang et dans le LCR (**Byington et al., 1999 ; Rittichier et al., 2005**).

La détection plus élevée des EV dans le sang dans notre étude est due à différents facteurs :

1) Nous avons montré que le taux de détection plus élevé des EV dans le sang était corrélé à un délai plus court d'hospitalisation après l'apparition des premiers signes cliniques chez les nouveau-nés et les nourrissons comparé à celui des enfants. Cette hospitalisation plus rapide peut s'expliquer par une inquiétude plus importante des parents pour leur jeune bébé.

2) La méthodologie employée a eu un impact important dans notre étude. En effet, dans 70% des cas, le prélèvement de sang a été concomitant du prélèvement de LCR (moins de 24h). Or, dans les études publiées, l'intervalle de temps entre les 2 échantillons n'est jamais mentionné et/ou le diagnostic a souvent été réalisé en rétrospectif (**Byington et al., 1999 ; Rittichier et al., 2005**).

3) La distribution très variée des espèces et génotypes d'EV chez les nouveau-nés et les nourrissons par rapport aux enfants peut également expliquer un taux de détection plus élevé des EV chez les patients âgés de moins de 2 ans (**Article, Figure 1 complémentaire**). Dans notre étude, les EV de l'espèce EV-A ont été majoritairement retrouvés chez les nourrissons

(21 %) vs 3% chez les nouveau-nés et 4% chez les enfants ; les coxsackievirus B ont infecté plus fréquemment les nouveau-nés et les nourrissons (33%) vs 1% chez les enfants. Nous avons montré, dans une étude précédente, que la charge virale des EV dans le LCR variait avec le type d'EV (les CV-B et les E-30 étaient reliés à des charges virales plus élevées comparativement aux génotypes d'E11 et E6) (Volle et al., 2014).

4) Le nombre de cellules mononuclées (lymphocytes et monocytes) plus élevé chez les nourrissons ( $\leq 2$  ans) par rapport aux enfants peut constituer un facteur « favorisant » une plus grande détection des EV dans le sang si l'on considère que certains types d'EV ont un lymphotropisme marqué (Dagan et Menegus, 1992 ; Vuorinen et al., 1999, Mena et al., 1999).

Notre deuxième objectif a été de déterminer s'il existait chez les patients un lien entre la virémie et les paramètres cliniques et biologiques. Les résultats d'une analyse univariée ont montré que le jeune âge du patient, la notion d'un contact intrafamilial avec une personne malade et une tachycardie étaient plus fréquemment retrouvés chez les nourrissons virémiques à EV (Article, Figure 2). En intégrant les enfants plus âgés (2 à 16 ans), l'analyse multivariée a montré qu'un délai plus court d'hospitalisation après l'apparition des premiers signes cliniques et la présence d'une pléiocytose étaient également associés à la virémie. La corrélation entre la virémie et la pléiocytose était majoritairement observée chez les enfants présentant une méningite à EV (88%) et admis dans les 22h après le début des symptômes. Une absence de virémie (sang-/LCR+) chez les enfants a été observée 26h après le début des symptômes. Ces résultats soulignent une phase virémique très courte lors d'une infection à EV, comme l'ont suggéré de rares études (Dagan et al., 1985 ; Cheng et al., 2014).

Au total, 86 % (311/360) des souches d'EV ont été typées. L'absence de typage pour les autres souches s'explique principalement par une charge virale trop faible (nombre de cycles (Ct) d'amplification de PCR  $>35$  cycles). (Article, Figure 1 complémentaire). Une très grande diversité des types d'EV a été retrouvée sur les deux années de l'étude. Au total, 29 types d'EV ont été identifiés, appartenant aux espèces EV-A (8 types) et EV-B (21 types). Les cinq types les plus fréquemment détectés étaient le coxsackievirus B5 (CV-B5) (16%), suivi de l'échovirus 6 (E-6) (12%), de l'E-30 (9%), de l'E-9 (8%) et de l'E-25 (6%). La distribution de ces types était différente selon les années, l'âge des patients et le tableau clinique. Une

distribution similaire des types d'EV (responsables de méningites et d'infections néonatales) a été recensée par les CNR EV/HPeV au niveau national via le RSE en 2015 et 2016. Chaque année, plusieurs types d'EV co-circulent et se remplacent au cours du temps (**Khetsuriani et al., 2006 ; Peigue-Lafeuille et al., 2016**).

L'étude BLEDI a montré que le diagnostic des EV dans le sang a permis d'améliorer l'exhaustivité du diagnostic des méningites à EV chez les enfants âgés de 0 à 2 ans et d'élargir le diagnostic aux tableaux de fièvre inexplicée et de sepsis chez les nourrissons insuffisamment explorés actuellement en France. Cependant, une question se pose : est ce que la détection d'un EV dans le sang d'un patient permet d'affirmer de manière certaine son implication dans la pathologie observée ? Nous avons montré qu'une co-infection avait été observée chez 6% (22/360) des patients infectés par un EV. Il s'agissait uniquement d'infections urinaires bactériennes chez les enfants âgés de moins de 2 ans. Parmi ces 22 patients co-infectés, 19 ont eu un prélèvement de sang et de LCR. Un EV a été détecté à la fois dans le sang et dans le LCR chez 14 patients (dont 7 présentaient une pleiocytose dans le LCR), un EV a été retrouvé uniquement dans le sang chez 4 patients et uniquement dans le LCR chez 1 patient. Pour 3 patients, seul le sang avait été analysé et il était positif en EV. La présence d'EV dans le sang chez des patients asymptomatiques a été très peu documentée. Une étude réalisée chez des donneurs de sang écossais a montré que le taux de détection des EV dans le sang était annuellement de 0,029% soit 1/4000 donneurs et que ce taux variait avec le mois de collecte avec des taux plus élevés en été et en automne (0,055% en Juillet et 0,039% en Octobre) (**Welch et al., 2003**). Dans une étude américaine réalisée chez des enfants asymptomatiques âgés  $\leq 90$  jours et hospitalisés pour une chirurgie, un EV a été détecté dans le sang chez 3,5% (3/86) des patients (**Byington et al., 1999**). Il est important de noter également que dans notre étude, nous n'avons pas observé de co-infection dans le LCR (EV et bactéries ou EV et autres virus (HSV, ...)) dans les suspicions de méningite. D'ailleurs, la Société Française de Biologie Clinique (SFBC) a indiqué qu'elle n'a pas eu connaissance de co-infections dans le LCR rapportées dans la littérature (**HAS, 2014**).

Notre étude présente un certain nombre de biais. Une incertitude, concernant la date et l'heure précise du début des symptômes rapportées par les parents, a été identifiée chez 23% (190/822) des patients inclus, majoritairement dans le groupe des enfants. Une analyse de sensibilité excluant ces dates a montré que les résultats obtenus dans notre étude n'étaient pas modifiés (Tableau 8). Un autre biais concernait l'aspect multicentrique de notre étude : le taux

de détection des EV était –il variable en fonction des centres hospitaliers ? Des analyses multivariées ont été effectuées avec des modèles à effets aléatoires (c'est-à-dire des modèles mixtes linéaires généralisés) en considérant la variabilité entre et à l'intérieur des centres hospitaliers. Nous avons montré que l'implication des centres participants n'a eu aucun impact sur les résultats (coefficient de corrélation intra-centre proche de 0).

**Tableau 8 - Comparaison du taux de détection des entérovirus dans le sang et dans le LCR des patients infectés avec et sans les dates et/ou heures incertaines du début des symptômes.**

	Avec les dates et/ou heures incertaines du début des symptômes						Sans les dates et/ou heures incertaines du début des symptômes						
	Total d'infections à EV (n)	Détection positive sang	Détection positive LCR	p value	Temps entre symptômes-sang (heures)	Temps entre symptômes-LCR (heures)	Total d'infections à EV (n)	Détection positive sang	Détection positive LCR	p value	Temps entre symptômes-sang (heures)	Temps entre symptômes-LCR (heures)	p value
<b>Tous les patients</b>													
Total	317	236 (74%)	272 (86%)	0,001	20 (11-36)	18 (9-32)	243	186 (77%)	205 (84%)	0,051	18 (9-32)	17 (9-28)	0,016
Nouveau-nés	71	70 (99%)	62 (87%)	0,011	12 (6-25)	9 (5-22)	54	53 (98%)	46 (85%)	0,020	12 (6-25)	9 (4-18)	0,636
Nourrissons	83	76 (92%)	62 (75%)	0,008	16 (8-29)	14 (8-25)	70	64 (91%)	50 (71%)	0,006	16 (7-28)	13 (8-22)	0,103
Enfants	163	90 (55%)	148 (91%)	<0,0001	25 (15-49) <sup>a</sup>	24 (16-48) <sup>a</sup>	119	69 (58%)	109 (92%)	<0,0001	24 (14-45) <sup>b</sup>	21 (15-42) <sup>a</sup>	0,016
<b>Fievre isolée</b>													
Total	55	55 (100%)	41 (75%)	0,0002	13 (7-27)	12 (7-25)	43	43 (100%)	30 (70%)	0,0003	13 (7-27)	12 (7-26)	0,026
Nouveau-nés	31	31 (100%)	27 (87%)	0,046	12 (7-23)	10 (5-22)	23	23 (100%)	20 (87%)	0,083	12 (7-19)	10 (4-18)	0,280
Nourrissons	24	24 (100%)	14 (58%)	0,002	16 (9-33)	15 (10-29) <sup>c</sup>	20	20 (100%)	10 (50%)	0,002	15 (8-33)	14 (9-29) <sup>d</sup>	0,026
<b>Sepsis-like</b>													
Total	16	16 (100%)	9 (56%)	0,008	6 (4-15)	6 (4-9)	15	15 (100%)	8 (53%)	0,008	6 (3-17)	7 (4-9)	0,755
Nouveau-nés	9	9 (100%)	7 (78%)	0,157	6 (4-13)	6 (4-7)	8	8 (100%)	6 (75%)	0,157	6 (4-15)	6 (4-12)	0,726
Nourrissons	7	7 (100%)	2 (29%)	0,025	8 (3-26)	8 (4-9)	7	7 (100%)	2 (29%)	0,025	8 (3-26)	8 (4-9)	0,866
<b>Suspicion de méningite</b>													
Total	246	165 (67%)	222 (90%)	<0,0001	23 (13-43)	21 (12-41)	185	128 (69%)	167 (90%)	<0,0001	21 (12-38)	18 (11-31)	0,141
Nouveau-nés	31	30 (97%)	28 (90%)	0,317	14 (5-36)	9 (6-25)	23	22 (96%)	20 (87%)	0,317	14 (7-36)	9 (5-25)	0,057
Nourrissons	52	45 (87%)	46 (89%)	0,782	20 (8-32)	15 (8-25)	43	37 (86%)	38 (88%)	0,763	17 (7-28)	14 (7-22)	0,554
Enfants	163	90 (55%)	148 (91%)	<0,0001	25 (15-49) <sup>a</sup>	24 (16-48) <sup>a</sup>	119	69 (58%)	109 (92%)	<0,0001	24 (14-45) <sup>b</sup>	21 (15-42) <sup>a</sup>	0,016

<sup>a</sup> Temps entre « symptômes-sang » ou « symptômes-LCR » était significatif entre enfants et nourrissons et entre enfants et nouveau-nés (p<0,0001)

<sup>b</sup> Temps entre « symptômes-sang » était significatif entre enfants et nourrissons (p=0,001) et entre enfants et nouveau-nés (p<0,0001)

<sup>c</sup> Temps entre « symptômes-LCR » était significatif entre nourrissons et nouveau-nés (p=0,045)

<sup>d</sup> Temps entre « symptômes-LCR » n'était pas significatif entre nourrissons et nouveau-nés (p=0,088)

Abréviations: EV, entérovirus; LCR, liquide céphalo-rachidien



## 5. Résultats complémentaires

La fièvre sans point d'appel, les infections de type « sepsis » et les infections du système nerveux central sont des affections fréquentes des nourrissons (0-2 ans) qui peuvent être la conséquence d'une infection bactérienne ou virale notamment à EV ou à parechovirus (HPeV). Les HPeV sont à l'origine d'infections majoritairement observées au cours de la première année de vie des enfants. Nous avons voulu déterminer quelle était leur implication au sein de notre population pédiatrique, en incluant toutes les tranches d'âge (0 à 16 ans).

Le diagnostic retrospectif des HPeV a été effectué uniquement chez les patients non infectés par un EV et pour lesquels un volume suffisant de sang et/ou de LCR était disponible. Le diagnostic a été réalisé chez 92% (423/462) des patients non infectés. Au total, 35 infections à HPeV ont été diagnostiquées (32 en 2016 et 3 en 2015) soit une prévalence de 8,3% (35/423). Il s'agissait principalement d'infections à HPeV de type 3 (33 HPeV-3 et 2 HPeV-4) (Tableau 9). Ces infections ont été observées chez des patients, majoritairement de sexe masculin, âgés de 8 à 143 jours avec un âge médian de 33 jours (IQR 15-58 jours). Ces patients ont présenté des tableaux de fièvre isolée (49%), de sepsis (37%) et de suspicion de méningites (14%). Les signes cliniques les plus fréquemment retrouvés étaient de la fièvre associée à une irritabilité (83%), une tachycardie (60%) et une diminution de la prise alimentaire (49%). Une pléiocytose été retrouvée dans seulement 4% des cas, essentiellement chez des patients qui étaient hospitalisés pour une suspicion de méningite. Une infection urinaire concomitante a été observée chez 5 patients.

Ces résultats rejoignent les données de la littérature (**Schuffenecker et al., 2012 ; Aizawa et al., 2017 ; Olijve et al., 2018**). Les HPeV sont majoritairement observés dans la première année de vie des enfants notamment chez les nouveau-nés et les nourrissons âgés de moins de 3 mois. Actuellement, 19 types HPeV ont été décrits ([www.picornaviridae.com](http://www.picornaviridae.com)). HPeV-1 est le type le plus fréquemment retrouvé, suivi de l'HPeV-3 puis de l'HPeV-6. Les infections associées à HPeV-3 sont le plus souvent sévères avec des tableaux de sepsis ou d'infections du système nerveux central (méningites, encéphalites). Cette sévérité est due à un taux faible d'anticorps maternels transmis chez les nouveau-nés et les jeunes nourrissons. Les symptômes cliniques fréquemment observés dans les infections à HPeV-3 sont de la fièvre, une irritabilité, un rash, des difficultés alimentaires et une tachycardie. L'absence de pléiocytose dans le LCR est fréquente lors d'infections du SNC à HPeV-3. Une circulation biannuelle des HPeV (surtout pour le HPeV-3) a été observée en Europe.

**Tableau 9 - Caractéristiques des infections à parechovirus.**

Caractéristiques	HPeV (n=35)
Age (jours) <sup>a</sup>	33 (15-58)
Sexe mâle <sup>b</sup>	21 (60)
Infections à parechovirus en 2015	3 (9)
Infections à parechovirus en 2016	32 (91)
Fièvre isolée <sup>b</sup>	17 (49)
Sepsis <sup>b</sup>	13 (37)
Suspicion de méningite <sup>b</sup>	5 (14)
Délai entre début des symptômes et le LCR (heures) <sup>a</sup>	13 (5-26)
Délai entre début des symptômes et le sang (heures) <sup>a</sup>	15 (6-30)
Contexte intrafamilial	8 (23)
<b>Caractéristiques cliniques<sup>b</sup></b>	
Fièvre	35 (100)
Rash	3 (9)
Fontanelle bombée	4 (11)
Hypotonie	5 (14)
Tachycardie	21 (60)
Nausées/vomissements	0 (0)
Diarrhées	10 (29)
Rhinite/Pharyngite	10 (29)
Irritabilité	29 (83)
Pâleur/Augmentation du temps de recoloration cutanée	14 (40)
Diminution de la prise alimentaire	17 (49)
<b>Données biologiques</b>	
<i>Paramètres sanguins</i>	
Glycémie (mmol/L) <sup>a</sup>	5,3 (4,7-5,8)
Leucocytes (G/L) <sup>a</sup>	5,8 (4,6-7,2)
PNN (G/L) <sup>a</sup>	3,2 (2,1-3,9)
Lymphocytes (G/L) <sup>a</sup>	1,4 (1,0-2,2)
Monocytes (G/L) <sup>a</sup>	0,8 (0,6-1,2)
Plaquettes (G/L) <sup>a</sup>	319 (264-404)
CRP (mg/L) <sup>a</sup>	5 (3-12)
CRP élevé (> 15 mg/L) <sup>b</sup>	2/35 (6)
<i>Paramètres du LCR</i>	
Pléiocytose <sup>b</sup>	2/27 (7)
Leucocytes (cellules/mm <sup>3</sup> ) <sup>a</sup>	3 (1-6)
Protéïnorachie (g/L) <sup>a</sup>	0,5 (0,3-0,6)
Glycorachie (mmol/L) <sup>a</sup>	3,4 (3,0-3,6)
<b>Typage des parechovirus<sup>b</sup></b>	
HPeV type 3	33 (94)
HPeV type 4	2 (6)

<sup>a</sup> Valeur médiane (interquatile), <sup>b</sup> Nombre de patients (%)

Abréviations: HPeV= parechovirus; LCR=liquide céphalo-rachidien, PNN = polynucléaires neutrophiles, CRP= protéine C-réactive

Nous avons comparé les caractéristiques cliniques et biologiques des patients âgés de moins de 5 mois infectés par un HPeV à ceux infectés par un EV (Tableau 10). Les patients pour lesquels une co-infection a été documentée ont été exclus de cette analyse.

Les résultats principaux étaient les suivants :

- Une fréquence plus élevée de sepsis a été observée chez les patients infectés par un HPeV ( $p < 0,001$ ), alors que des tableaux de méningite étaient plus souvent observés chez les patients infectés par un EV ( $p = 0,002$ ).
- Les signes cliniques incluant une pâleur, l'augmentation du temps de recoloration cutanée et la diminution de la prise alimentaire étaient plus fréquemment signalés chez les patients infectés par un HPeV ( $p \leq 0,03$ ).
- Le nombre de lymphocytes sanguins était plus faible chez les patients infectés par un HPeV que chez les patients infectés par un EV ( $p < 0,001$ ).
- La présence d'une pléiocytose a été observée chez 43% des patients infectés par un EV vs 4% chez les patients infectés par un HPeV ( $p < 0,001$ ). La protéinorachie était significativement plus élevée chez les patients infectés par un EV ( $p = 0,003$ ).

Les rares études comparant les infections à EV par rapport aux infections à HPeV montrent que les méningites étaient plus souvent associées aux EV, et les tableaux de sepsis et de fièvre isolée aux HPeV (Verboon Maciolek *et al.*, 2008 ; Sharp *et al.*, 2013 ; Cabrerizo *et al.*, 2015 ; De jong *et al.*, 2018). Une fréquence cardiaque plus élevée et des signes intestinaux plus fréquents ont été observés majoritairement dans les infections à HPeV (Verboon Maciolek *et al.*, 2008 ; De Crom *et al.*, 2016 ; De jong *et al.*, 2018). Un taux plus faible de leucocytes dans le sang a été également observé chez des enfants âgés de moins de 6 mois infectés par des HPeV (Sharp *et al.*, 2013).

**Tableau 10 - Comparaison des infections à entérovirus et à parechovirus chez des nourrissons âgés de moins de 5 mois.**

Caractéristiques	HPeV (n=30)	EV (n=159)	p-value
Age (jours) <sup>a</sup>	30 (17-60)	34 (20-48)	0,69
Sexe mâle <sup>b</sup>	18 (60)	89 (56)	0,84
Infections diagnostiquées en 2015	3 (10)	58 (37)	/
Infections diagnostiquées en 2016	27 (90)	101 (64)	/
Fièvre isolée <sup>b</sup>	14 (47)	78 (49)	0,85
Sepsis <sup>b</sup>	12 (40)	13 (8)	<0,0001
Suspicion de méningite <sup>b</sup>	4 (13)	68 (43)	0,002
Délai entre début des symptômes et le LCR (heures) <sup>a</sup>	12 (5-26)	12 (7-22)	0,92
Délai entre début des symptômes et le sang (heures) <sup>a</sup>	11 (5-29)	16 (7-33)	0,50
Contexte intrafamilial	7 (23)	76 (48)	0,02
<b>Caractéristiques cliniques<sup>b</sup></b>			
Fièvre	30 (100)	158 (99)	1,00
Rash	2 (7)	19 (12)	0,54
Fontanelle bombée	4 (13)	12 (8)	0,29
Hypotonie	5 (17)	35 (22)	0,63
Tachycardie	19 (63)	72 (45)	0,08
Nausées/vomissements	0 (0)	15 (9)	0,13
Diarrhées	7 (23)	20 (13)	0,15
Rhinite/Pharyngite	10 (33)	31 (20)	0,10
Irritabilité	24 (80)	103 (65)	0,14
Pâleur/Augmentation du temps de recoloration cutanée	12 (40)	32 (20)	0,03
Diminution de la prise alimentaire	16 (53)	46 (29)	0,01
<b>Données biologiques</b>			
<i>Paramètres sanguins</i>			
Glycémie (mmol/L) <sup>a</sup>	5,5 (4,8-6,3)	5,1 (4,5-5,6)	0,11
Leucocytes (G/L) <sup>a</sup>	6,4 (4,6-7,2)	8,7 (6,4-11,4)	<0,0001
PNN (G/L) <sup>a</sup>	3,2 (2,2-4,0)	3,4 (2,6-5,1)	0,39
Lymphocytes (G/L) <sup>a</sup>	1,5 (1,0-2,2)	3,5 (2,2-4,9)	<0,0001
Monocytes (G/L) <sup>a</sup>	0,8 (0,6-1,2)	0,9 (0,6-1,3)	0,44
Plaquettes (G/L) <sup>a</sup>	323 (267-405)	360 (285-436)	0,32
CRP (mg/L) <sup>a</sup>	5 (4-14)	8 (3-13)	0,67
CRP élevé (> 15 mg/L) <sup>b</sup>	2/30 (7)	21/159 (13)	0,54
<i>Paramètres du LCR</i>			
Pléiocytose <sup>b</sup>	1/25 (4)	51/120 (43)	0,0001
Leucocytes (cellules/mm <sup>3</sup> ) <sup>a</sup>	3 (1-5)	9 (1-190)	0,005
Protéïnorachie (g/L) <sup>a</sup>	0,5 (0,3-0,6)	0,6 (0,4-0,8)	0,003
Glycorachie (mmol/L) <sup>a</sup>	3,4 (3,0-3,6)	2,9 (2,6-3,3)	0,0002

<sup>a</sup> Valeur médiane (interquartile), <sup>b</sup> Nombre de patients (%)

Abréviations: EV = entérovirus ; HPeV= parechovirus; LCR=liquide céphalo-rachidien, PNN = polynucléaires neutrophiles, CRP= protéine C-réactive

## 6. Conclusion

L'étude « BLEDI » a permis de **démontrer l'intérêt du diagnostic des EV dans le sang** chez les patients âgés de moins de 2 ans. Ces résultats s'appuient sur : 1) un grand nombre de patients infectés testés (n=360), 2) l'inclusion de 3 tranches d'âge de patients, 3) l'inclusion de trois tableaux cliniques et 4) la réalisation concomitante d'un prélèvement de sang et de LCR dans plus de 70% des cas.

Les résultats de cette étude ouvrent les perspectives d'un nouvel algorithme diagnostique des fièvres inexplicables en Pédiatrie. Ainsi, un diagnostic systématique des infections à EV devrait être envisagé chez les nourrissons. Un tube supplémentaire de sang lors de la ponction veineuse (pour la NFS) devrait être inclus dans la prise en charge biologique pour réaliser la PCR EV. Ce test moléculaire peut maintenant être effectué suffisamment rapidement pour avoir un impact réel sur la prise en charge du patient en réduisant les antibiotiques et/ou les antiviraux, en évitant les examens complémentaires, en réduisant les coûts liés à l'hospitalisation et en permettant un retour à domicile plus rapide.

Le diagnostic des EV dans le sang constitue donc une alternative intéressante à celui réalisé dans le LCR non seulement pour pallier les contre-indications ou les échecs à la ponction lombaire, mais également l'absence d'amplification des EV dans le LCR lorsque la ponction lombaire est réalisée très tôt après le début d'apparition des signes cliniques. Chez les enfants âgés de plus de 2 ans, la PCR dans le LCR reste la méthode de référence pour le diagnostic des méningites à EV.

## 7. Valorisation de l'étude

Cette étude a été valorisée sous la forme de 5 communications orales à des journées de rencontres régionales et nationales, et sous forme de posters à un congrès international. Suivant le contexte et le stade de l'étude, chaque présentation a permis de développer les aspects méthodologiques et les résultats préliminaires (année 2015) puis définitifs (2015-2016).

✓ 2016 :

- 4<sup>ème</sup> journée des doctorants du Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement (LMGE). « Optimisation du diagnostic des infections à enterovirus et étude de leur pouvoir pathogène » (communication orale). 7 Mars 2016. Clermont-Ferrand, France.

✓ 2017 :

- 14<sup>ème</sup> Rencontre des Microbiologistes du Pôle Clermontois. « Optimisation du diagnostic des infections à entérovirus dans la population pédiatrique » (communication orale). 11 Avril 2017. Clermont-Ferrand, France.
- 37<sup>ème</sup> Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. « Optimisation du diagnostic des infections à entérovirus dans la population pédiatrique » (communication orale). 18-19 Décembre 2017. Paris, France. Distinction scientifique : Prix RICAI « Virologie »

✓ 2018 :

- Congrès des Sociétés de Pédiatrie. « Optimisation du diagnostic des infections à entérovirus en pédiatrie » (communication orale). 24-26 Mai 2018. Lyon, France.
- Journées des doctorants de l'école doctorale Science de la Vie, Santé, Agronomie et Environnement. « Optimisation du diagnostic des infections à entérovirus et étude de leur pouvoir pathogène » (communication orale). 14-15 Juin 2018. Clermont-Ferrand, France.
- 21<sup>th</sup> Annual Meeting European Society for Clinical Virology. «Assessment of blood enterovirus PCR testing in paediatric populations with fever without source, sepsis-like disease, or suspected meningitis: a prospective, multicentre, observational study» (poster). 23-26 Septembre 2018. Athènes, Grèce.

## II. Etude de la charge virale des entérovirus dans le sang et dans le LCR chez des enfants infectés

### 1. Rationnel de l'étude

Actuellement, les données concernant la charge virale (CV) des EV dans le LCR sont partielles et reposent sur de faibles cohortes de patients. De plus, la quantification des EV dans le sang a été très peu explorée. Quelques études ont montré que les charges virales pouvaient varier en fonction de plusieurs facteurs : le tableau clinique, l'âge des patients et le type d'EV. Des charges virales dans le LCR similaires voire élevées par rapport au sang ont été observées chez des enfants âgés de moins de 3 ans présentant une méningite (n=11) alors que chez les enfants présentant un sepsis (n=14), les charges virales étaient très élevées dans le sang et faibles voire indétectables dans le LCR (**Harvala et al., 2014**). Dans une étude précédente réalisée chez des patients hospitalisés pour une méningite à EV (n=156), nous avons montré que 1) la charge virale dans le LCR était corrélée avec l'âge des patients, avec des charges virales plus élevées chez les nouveau-nés par rapport aux nourrissons et aux enfants, 2) la charge virale était corrélée aux types d'EV : les génotypes E-30 et CV-B étaient liés à des charges virales plus élevées dans le LCR par rapport aux génotypes E-6 et E-11 (**Volle et al., 2014**).

Une relation entre la charge virale et la sévérité de certaines infections à EV a été rapportée, cependant les résultats sont contradictoires selon les études. Yen et ses collègues ont montré, sur un nombre restreint de nouveau-nés (n=6) et de nourrissons (n=4) que la charge virale sanguine était plus élevée et plus longue (jusqu'à 2 mois après l'infection) chez les patients présentant une infection sévère à CV-B3 par rapport aux patients présentant une infection bénigne à CV-B3 (**Yen et al., 2007**). Dans une autre étude, réalisée chez 21 patients âgés de moins de 1 an hospitalisés pour une méningite à EV, aucune corrélation n'a été retrouvée entre la charge virale dans le LCR et la sévérité de l'infection (**Kawashima et al., 2008**). Récemment, Cheng et al., ont montré que lorsque la virémie était prolongée (>3 jours), elle était corrélée à une infection sévère chez les patients infectés par un EV-A71 (**Cheng et al., 2014**).

## 2. Objectif de l'étude

Le but de ce travail a été de réaliser prospectivement la quantification des EV dans le sang et le LCR des patients infectés, inclus dans l'étude BLEDI (2015-2016), afin d'améliorer notre compréhension des mécanismes physiopathologiques mis en œuvre lors de ces infections. Toutes les réactions de quantification ont été réalisées dans le laboratoire de virologie de Clermont-Ferrand. Les charges virales obtenues ont été analysées en fonction de 1) l'âge des patients (nouveau-nés, nourrissons et enfants), 2) du tableau clinique (fièvre isolée, sepsis et méningite), 3) du génotype d'EV (en incluant les génotypes les plus fréquemment rencontrés). La quantification des EV a été réalisée en prospectif à l'aide de la technique de RT-qPCR quantitative développée dans le laboratoire et publiée (Volle *et al.*, 2012).

## 3. Résultats préliminaires

### (1) Etude globale des charges virales EV dans le sang et dans le LCR

Les charges virales (CV) EV ont été déterminées dans le sang de 171 (62%) patients infectés (171/278) et dans le LCR de 190 (71%) patients (190/274). Globalement, la médiane des CV était dans le sang de 5,11 log<sub>10</sub> copies/mL (IQR 4,15-6,19) et dans le LCR de 4,82 log<sub>10</sub> copies/mL (IQR 4,18-5,67). Le délai médian entre le début des symptômes et la réalisation du prélèvement était de 15 heures (IQR 6-26) pour le sang et de 17 heures (IQR 9-27) pour le LCR. La charge virale dans le sang a pu être déterminée jusqu'à 3,8 jours après le début des symptômes vs 7 jours dans le LCR.

Au cours de notre étude prospective, nous avons exclu 59 patients, chez lesquels les charges virales dans le sang (n=28) et dans le LCR (n=31), étaient en dessous de la limite de quantification reproductible (1875 copies/ml). Ces CV sanguines détectables non quantifiables (DNQ) étaient associées à un délai plus long d'hospitalisation après l'apparition des premiers signes cliniques par rapport aux charges virales quantifiables (respectivement 25 heures (IQR 14-31) vs 15 heures (IQR 6-26) ; p = 0,02). Des résultats similaires ont été observés dans le LCR : 24 heures (IQR 11-90) pour les CV DNQ vs 17 heures (IQR 9-27) ; p=0,05) pour les CV quantifiables. A noter que le génotype n'a pas pu être identifié pour 12%



de ces CV DNQ. Par contre, les génotypes les plus représentés dans cette étude par ordre de fréquence étaient : le CV-B5 (17%), l'E-6 (14%) et l'E-7 (12%).

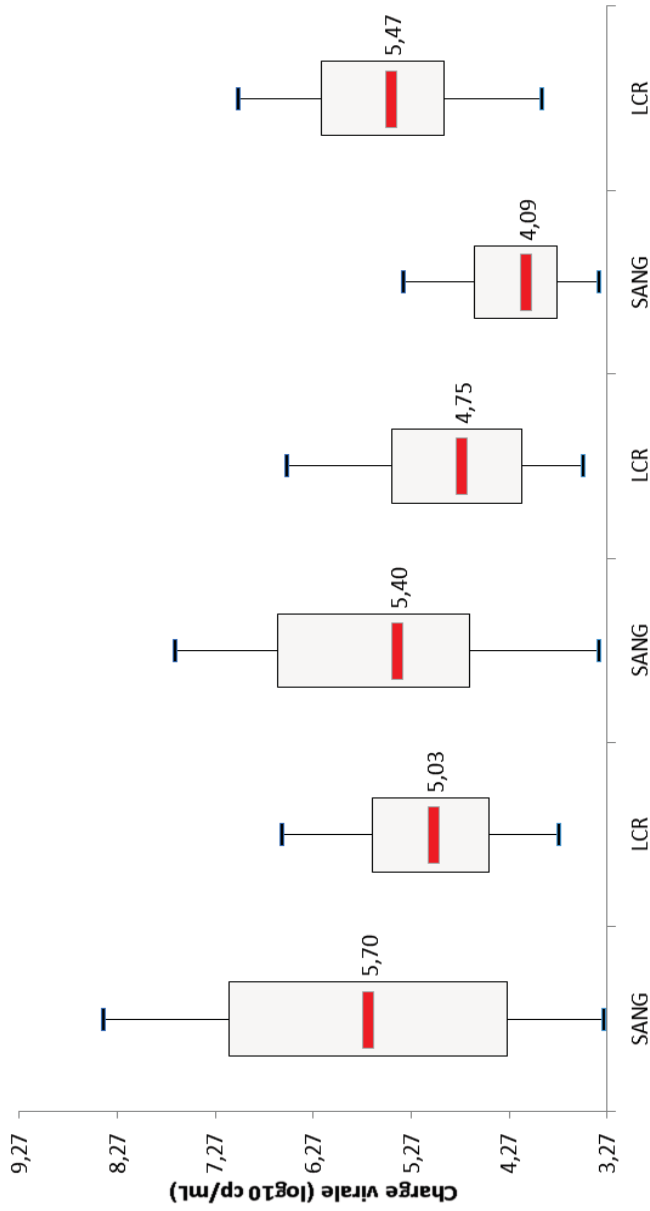
## (2) Quantifications combinées des EV dans les 2 compartiments biologiques

La comparaison des CV EV dans le sang et le LCR chez un même individu a été possible chez 95 patients (41 nouveau-nés, 31 nourrissons et 23 enfants).

L'exploitation des CV EV **en fonction de l'âge** des patients a montré que les charges virales médianes étaient significativement plus élevées dans le sang que dans le LCR chez les nouveau-nés (5,7 vs 5,0 log<sub>10</sub> cp/mL ; p=0,02) et les nourrissons (5,4 vs 4,8 log<sub>10</sub> cp/mL ; p=0,003) contrairement aux enfants (4,1 vs 5,5 log<sub>10</sub> cp/ml ; p<0,001) (Figure 20).

L'exploitation des CV **en fonction des tableaux cliniques** a montré une CV plus élevée dans le sang chez les patients présentant une fièvre isolée (6,3 vs 5,1 log<sub>10</sub> cp/mL ; p<0,001) et un sepsis (5,6 vs 4,5 log<sub>10</sub> cp/mL ; p=0,004). Par contre, chez les patients présentant une méningite, la CV était plus faible dans le sang que dans le LCR (4,6 vs 5,3 log<sub>10</sub> cp/mL ; p=0,05) (Figure 21).

L'exploitation des CV **en fonction des 6 génotypes d'EV** (les plus fréquemment retrouvés dans notre population pédiatrique (6 types d'EV isolés chez 64/95 patients)) a montré que les CV variaient avec le type d'EV dans les 2 compartiments biologiques. Les charges virales des souches de CV-B5 et de l'E-6 sont plus élevées dans le LCR que dans le sang (5,34 vs 4,30 log<sub>10</sub> cp/mL (p=0,003) pour le CV-B5 et 5,47 vs 3,42 log<sub>10</sub> cp/mL (p=0,04) pour l'E-6). A l'inverse, les charges virales des souches d'E-25 et d'E-5 sont plus élevées dans le sang que dans le LCR (6,41 vs 4,68 log<sub>10</sub> cp/mL (p=0,004) pour l'E-25 et 5,70 vs 5,07 log<sub>10</sub> cp/mL (delta > 0,5 log<sub>10</sub> cp/mL) pour l'E-5) (Figure 22).

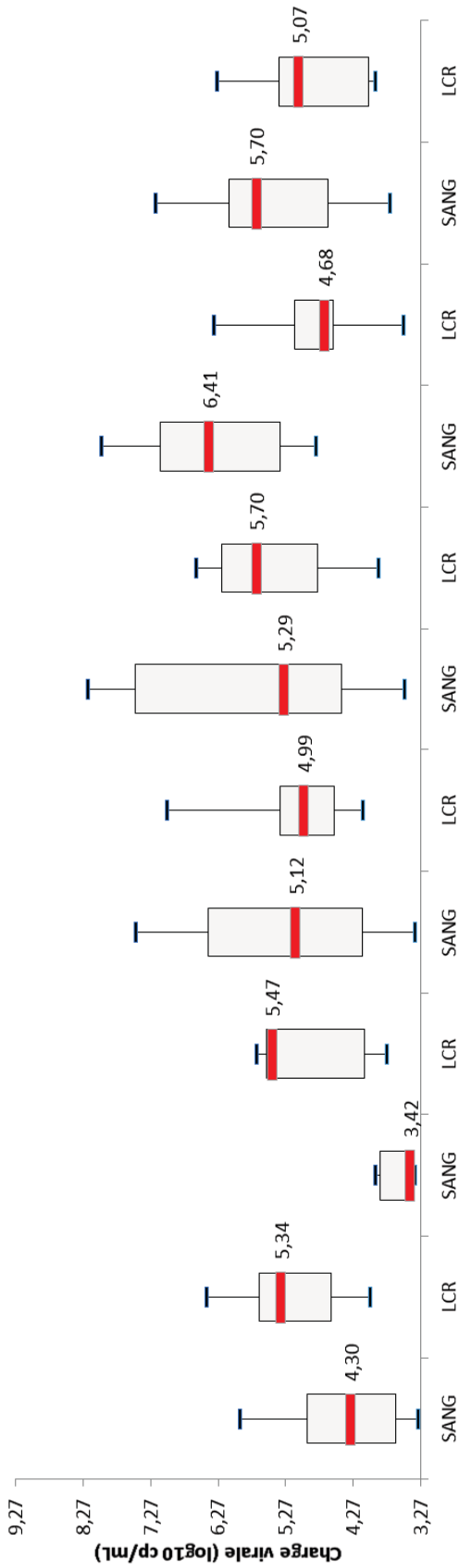


**Nouveau-nés                      Nourrissons                      Enfants**

	Nouveau-nés		Nourrissons		Enfants	
Nombre de patients	41		31		23	
Charges virales (log10 copies/mL) (médiane, IQR)	Sang 5,70 (4,29 ; 7,13)	LCR 5,03 (4,48 ; 5,67)	Sang 5,40 (4,68 ; 6,63)	LCR 4,75 (4,14 ; 5,46)	Sang 4,09 (3,79 ; 4,63)	LCR 5,47 (4,93 ; 6,19)
Délai symptômes-prélèvement (heures)	9 (4-19)	7 (4-18)	14 (6-27)	12 (7-18)	20 (13-25)	20 (14-26)
		p-value 0,02		p-value 0,003		p-value < 0,001
		0,29		0,22		0,15

**Figure 20 - Comparaison des charges virales dans le sang et dans le LCR en fonction de l'âge des patients.**





**CV-B5                      E-6                      E-9                      E-30                      E-25                      E-5**

	CV-B5		E-6		E-9		E-30		E-25		E-5	
	Sang	LCR	Sang	LCR	Sang	LCR	Sang	LCR	Sang	LCR	Sang	LCR
Nombre de patients	16		5		5		20		20		14	
Charges virales (log10 copies/mL) (médiane, IQR)	4,30 (3,65 ; 4,95)		5,34 (4,59 ; 5,67)		3,42 (3,40 ; 3,87)		5,47 (4,10 ; 5,55)		5,12 (4,14 ; 6,42)		4,99 (4,55 ; 5,35)	
Délai symptomés-prélèvement (h)	13 (6-22)		13 (6-20)		20 (13-28)		20 (13-22)		13 (8-19)		14 (8-21)	
	p-value		p-value		p-value		p-value		p-value		p-value	
	0,003		0,003		0,42		0,04		0,37		0,18	

	E-9		E-25		E-5	
	Sang	LCR	Sang	LCR	Sang	LCR
Nombre de patients	14		11		9	
Charges virales (log10 copies/mL) (médiane, IQR)	5,29 (4,44 ; 7,51)		6,41 (5,36 ; 7,13)		5,07 (4,04 ; 5,37)	
Délai symptomés-prélèvement (h)	9 (7-18)		4 (3-10)		12 (8-18)	
	p-value		p-value		p-value	
	0,58		0,004		0,24	
	0,88		0,23		0,64	

**Figure 22 - Comparaison des charges virales dans le sang et dans le LCR en fonction du type d'EV.**

La comparaison simultanée des CV dans le sang et dans le LCR nous a amené à distinguer 3 profils de cinétique d'infection à EV :

- Profil A (CV sang > CV LCR) correspond à des charges virales plus élevées ( $\geq 0,5 \log_{10}$  cp/mL) dans le sang que dans le LCR,
- Profil B (CV sang = CV LCR) correspond à des charges virales similaires dans les deux compartiments biologiques,
- Profil C (CV sang < CV LCR) correspond à des charges virales plus élevées ( $\geq 0,5 \log_{10}$  cp/mL) dans le LCR que dans le sang.

Les **données cliniques** ont été comparées chez les patients inclus dans les 3 profils d'infection en intégrant tous les patients (0-16 ans) pour lesquels on disposait d'une quantification des EV dans les 2 compartiments biologiques (Tableau 11).

Les résultats principaux sont les suivants :

- Les patients inclus dans les profils A et B étaient plus jeunes (28 et 29 jours) que les patients inclus dans le profil C (4 ans) ( $p < 0,0001$ ).
- Le délai entre le début des symptômes et la réalisation des prélèvements biologiques variait entre les profils avec un délai significativement plus court chez les patients inclus dans le profil A (8h) par rapport à ceux inclus dans le profil B (14h) et dans le profil C (18h) ( $p \leq 0,007$ ).
- Les signes ou symptômes cliniques incluant les céphalées, la photo-phonobie, la raideur de nuque et les nausées/vomissements (correspondant au syndrome méningé) étaient significativement plus fréquents chez les patients inclus dans le profil C par rapport aux 2 autres profils ( $p \leq 0,01$ ).
- La tachycardie, l'irritabilité, et la paleur/le temps de recoloration cutanée augmenté étaient majoritairement présents dans le profil A ( $p \leq 0,05$ ).

Les **données biologiques** ont été comparées uniquement chez les enfants âgés de moins de 2 ans (Tableau 11).

- Concernant la **numération de la formule sanguine**, le nombre de lymphocytes variait en fonction des profils d'infection, avec un nombre de lymphocytes plus faible chez les patients inclus dans le profil A (2,3 G/L), par rapport aux patients du profil B (4,0 G/L) et du profil C (4,3 G/L) ( $p = 0,005$ ).

- Concernant les données du **LCR**, un taux de pléiocytose plus élevé a été observé chez les patients inclus dans le profil C (92% (11/12)) par rapport à ceux du profil A (13% (4/31)) et du profil B (55% (6/11)).

Nous avons montré que la répartition des **génotypes d'EV** variait en fonction du profil d'infection : certains types d'EV (CV-B5, l'E-13, l'E-30, l'E-5 et l'E-9) ont été retrouvés dans les trois profils d'infection. Par contre, l'E-18 a été uniquement retrouvé dans le profil C, l'E-4 dans le profil B et le CV-A16, le CV-B1, le CV-B2, l'E-11 et l'E-21 dans le profil A (Figure 23).

**Tableau 11 - Caractéristiques cliniques et biologiques des patients inclus dans les 3 profils de cinétique d'infection à entérovirus.\***

	Patients ≤ 16 ans (n=95)			Patients ≤ 2 ans (n=59)†			p-value
	Profil A (n=39)	Profil B (n=24)	Profil C (n=32)	Profil A (n=32)	Profil B (n=15)	Profil C (n=12)	
Age <sup>a</sup>	28 jours (15-42)	29 jours (15-43)	3,7 ans (26j-6,8a)	27 jours (16-43)	25 jours (12-29)	23 jours (14-38)	0,34
Charges virales LCR (log10 cp/mL) <sup>b</sup>	4,58 (4,03-5,27)	4,78 (4,23-5,52)	5,65 (5,31-6,17)	4,56 (4,06-5,22)	5,09 (4,23-5,54)	5,57 (4,99-5,67)	0,01
Charges virales Sang (log10 cp/mL) <sup>b</sup>	6,50 (5,71-7,35)	4,62 (4,12-5,52)	4,11 (3,56-4,68)	6,93 (5,62-7,43)	4,82 (4,18-5,53)	4,26 (3,65-4,62)	<0,0001
Délai symptômes-LCR (heures) <sup>b</sup>	8 (5-14)	14 (5-36)	18 (10-23)	9 (4-15)	11 (5-46)	12 (8-23)	0,45
Délai symptômes-sang (heures) <sup>b</sup>	8 (4-16)	18 (7-31)	18 (11-25)	8 (4-15)	10 (4-43)	12 (7-23)	0,38
Fièvre	39 (100%)	23 (96%)	32 (100%)	32 (100%)	15 (100%)	12 (100%)	1,00
Céphalées	0 (0%)	7 (29%)	17 (53%)	/	/	/	/
Photophobie/Phonophobie	0 (0%)	2 (8%)	12 (38%)	/	/	/	/
Raideur de nuque	1 (3%)	5 (21%)	16 (50%)	/	/	/	/
Convulsions	0 (0%)	0 (0%)	1 (3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	/
Rash	3 (8%)	2 (8%)	2 (6%)	3 (9%)	0 (0%)	1 (8%)	0,48
Fontanelle bombée	3 (8%)	0 (0%)	2 (6%)	3 (9%)	0 (0%)	1 (8%)	0,48
Tachycardie	21 (54%)	6 (25%)	8 (25%)	19 (59%)	3 (20%)	7 (58%)	0,03
Nausées/Vomissements	3 (8%)	6 (25%)	12 (38%)	3 (9%)	1 (7%)	0 (0%)	0,55
Diarrhées	6 (15%)	2 (8%)	1 (3%)	5 (16%)	2 (13%)	1 (8%)	0,82
Douleurs abdominales	3 (8%)	2 (8%)	7 (22%)	/	/	/	/
Rhinite/Pharyngite	5 (13%)	4 (17%)	8 (25%)	4 (13%)	3 (20%)	4 (33%)	0,29
Hypotonie	10 (26%)	5 (21%)	4 (13%)	7 (22%)	0 (0%)	3 (25%)	0,13
Irritabilité	28 (72%)	13 (54%)	12 (38%)	22 (69%)	11 (73%)	9 (75%)	0,9
Pâleur/ Temps de recoloration cutanée augmentée	14 (36%)	3 (13%)	3 (9%)	12 (37%)	2 (13%)	1 (8%)	0,07
Diminution prise alimentaire	9 (23%)	9 (38%)	7 (22%)	8 (25%)	6 (40%)	4 (33%)	0,57

(Le tableau 11 continue sur la page suivante ...)

(... suite du tableau 11)

	Patients ≤ 16 ans (n=95)			Patients ≤ 2 ans (n=59)†				
	Profil A (n=39)	Profil B (n=24)	Profil C (n=32)	p-value	Profil A (n=32)	Profil B (n=15)	Profil C (n=12)	p-value
<u>Paramètres sanguins</u>								
CRP (mg/L) <sup>a</sup>	/	/	/	/	11 (5-14)	8 (3-11)	3 (2-6)	0,21
Glycémie (mmol/L) <sup>a</sup>	/	/	/	/	5,0 (4,3-5,7)	4,8 (4,5-5,2)	5,1 (4,4-6,9)	0,68
Plaquettes (G/L) <sup>a</sup>	/	/	/	/	308 (272-422)	333 (278-419)	407 (342-535)	0,16
Leucocytes (G/L) <sup>a</sup>	/	/	/	/	7,3 (5,6-9,3)	8,5 (6,9-12,0)	9,3 (7,5-12,7)	0,03
PNN (G/L) <sup>a</sup>	/	/	/	/	3,3 (2,6-5,7)	4,6 (2,2-5,1)	4,3 (2,9-7,0)	0,75
Lymphocytes (G/L) <sup>a</sup>	/	/	/	/	2,3 (1,9-3,2)	4,0 (2,8-5,4)	4,3 (2,9-5,3)	0,005
Monocytes (G/L) <sup>a</sup>	/	/	/	/	0,7 (0,5-0,9)	0,7 (0,6-1,5)	0,9 (0,7-1,3)	0,32
<u>Paramètres du LCR</u>								
Pléiocytose <sup>b</sup>	/	/	/	/	4/31 (13%)	6/11 (55%)	11/12 (92%)	<0,0001
Leucocytes (cellules/mm <sup>3</sup> ) <sup>a</sup>	/	/	/	/	2 (1-9)	45 (7-840)	570 (104-1235)	<0,0001
Protéinorachie (g/L) <sup>a</sup>	/	/	/	/	0,5 (0,4-0,7)	0,9 (0,7-1,2)	0,9 (0,8-1,3)	0,0004
Glycorachie (mmol/L) <sup>a</sup>	/	/	/	/	2,9 (2,7-3,3)	2,6 (2,3-3,1)	2,5 (2,3-3,2)	0,06

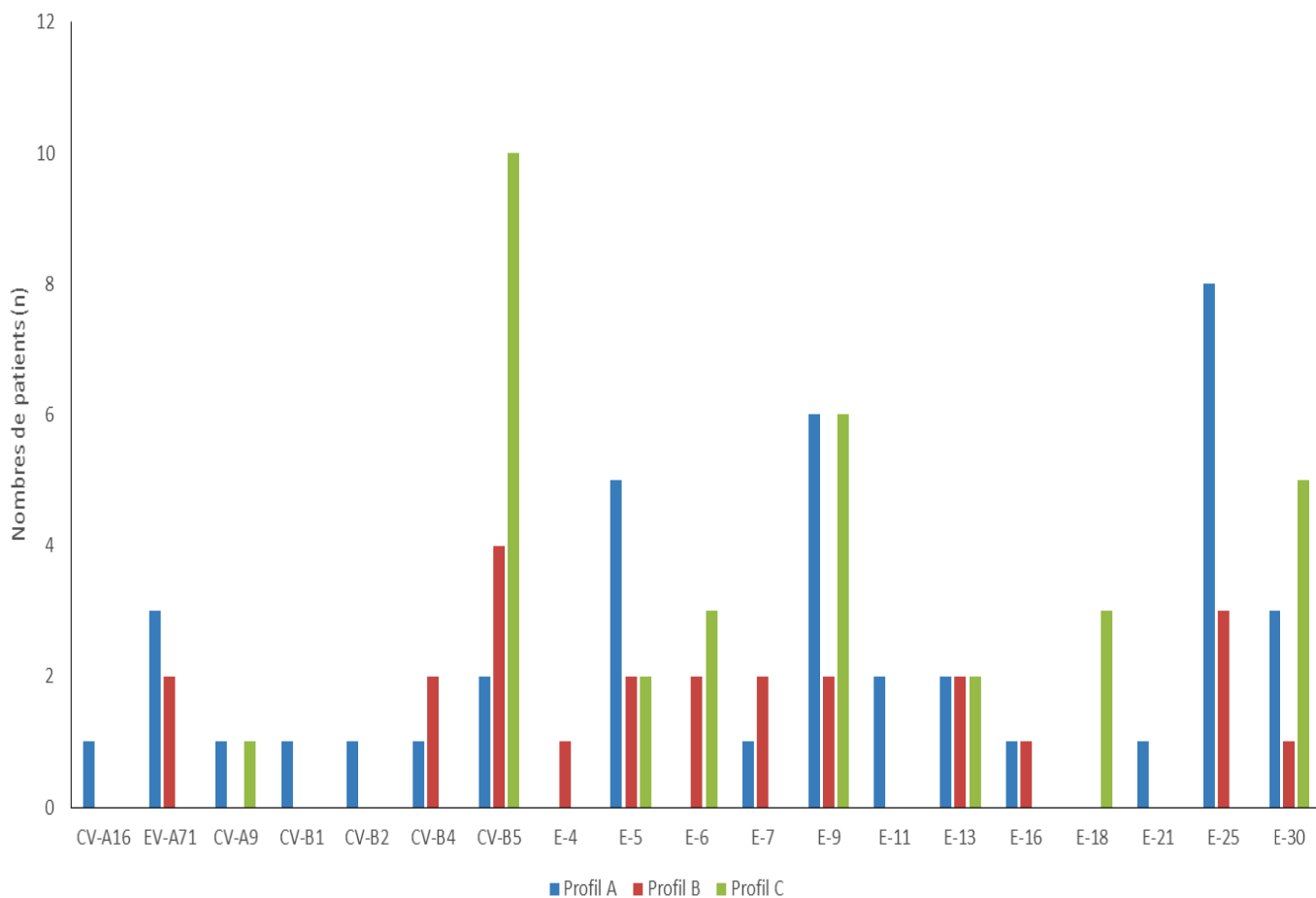
\* Les profils d'infection sont les suivants : profil A (charge virale sang > charge virale LCR), profil B (charge virale sang =charge virale LCR) et profil C (charge virale sang < charge virale LCR).

† Etude réalisée chez les patients âgés ≤2 ans avec un délai entre le sang et le LCR ≤4 heures.

<sup>a</sup>Valeur médiane (interquartile), <sup>b</sup> Nombre de patients (%)

Abréviations: cp=copies ; LCR=liquide céphalo-rachidien, PNN = polynucléaires neutrophiles.





**Figure 23 - Comparaison des 3 profils de cinétique d'infection en fonction des types d'entérovirus chez les patients âgés  $\leq 16$  ans.\***

\* Les profils d'infection sont les suivants : profil A (charge virale sang > charge virale LCR), profil B (charge virale sang = charge virale LCR) et profil C (charge virale sang < charge virale LCR).

#### 4. Commentaires de l'étude

L'originalité de notre travail tient à l'aspect prospectif de l'étude, à la présence de trois tranches d'âge (nouveau-né, nourrisson, enfant), de trois tableaux cliniques (fièvre isolée, sepsis, méningites) et à l'évaluation simultanée des charges virales dans les 2 compartiments biologiques (sang et LCR) chez un grand nombre de patients infectés par un EV (n=95). Cette étude a permis de confirmer, par rapport aux rares études publiées dans la littérature, que les charges virales dans le sang varient en fonction de l'âge des patients, du tableau clinique et du type d'EV. Les résultats innovants de ces travaux de quantification sont 1) l'existence d'une corrélation entre la charge virale EV dans le sang et les génotypes d'EV et 2) la distinction de 3 profils d'infection : précoce (CV sang > CV LCR), intermédiaire (CV sang = CV LCR), et plus tardive (CV sang < CV LCR), permettant d'envisager plusieurs mécanismes physiopathologiques.

Les résultats préliminaires de cette étude montrent que les charges virales dans le sang sont significativement plus élevées chez les nouveau-nés et les nourrissons par rapport aux enfants. Par contre, un résultat inversé est observé dans le LCR, avec des charges virales plus élevées chez les enfants par rapport aux nouveau-nés et aux nourrissons.

Si nous nous intéressons uniquement aux patients qui ont présenté une méningite à EV, nos résultats montrent une charge virale dans le LCR similaire quel que soit l'âge des patients (nouveau-nés : CV=4,77 log<sub>10</sub> cp/mL, nourrissons : CV=4,72 log<sub>10</sub> cp/mL et enfants : CV=4,96 log<sub>10</sub>cp/mL ; p≥0,45). Ces résultats sont différents de ceux obtenus lors de nos précédents travaux qui ont montré des CV plus élevées chez les nouveau-nés présentant une méningite à EV (Volle et al., 2014). Ces résultats sont difficilement comparables étant donné que la population étudiée n'est pas la même (inclusion de 33% d'adultes) et que les types d'EV qui ont circulé sont différents entre les 2 études.

Nous avons montré que les CV EV dans le sang varient avec le type d'EV. Les génotypes E-25 et E-5 sont reliés à des charges virales plus élevées, par rapport aux génotypes E-6, E-30 et CV-B5. Dans le LCR, le génotype CV-B5 et l'E-6 est relié à une charge virale plus importante par rapport aux génotypes E-5, E-25 et E-30. Cependant, comme précédemment, il est difficile de comparer ces résultats de CV à nos travaux antérieurs pour les mêmes raisons citées précédemment (Volle et al., 2014).

Nous avons distingué **3 profils de cinétique d'infection** en tenant compte des résultats de quantification dans les 2 compartiments biologiques : un profil d'infection **précoce** (CV sang > CV LCR), **intermédiaire** (CV sang = CV LCR) et enfin un profil plus **tardif** d'infection (CV sang = CV LCR).

L'analyse des paramètres biologiques chez les patients âgés de moins de 2 ans a montré que la charge virale élevée dans le sang (**profil A**) en début d'infection (8h) était corrélée à un nombre plus faible de lymphocytes sanguins par rapport à un profil d'infection plus tardive (profil C). Ces résultats suggèrent une réplication importante de ces virus dans les lymphocytes qui aboutirait à une lyse de ces cellules dans les premières heures de l'infection puis d'une libération de virions extracellulaires qui pourraient alors traverser la barrière hémato-méningée (présence de ces virus dans le LCR chez des patients présentant une faible pléiocytose (13%)). Ces résultats rejoignent de rares études qui ont montré que certains génotypes d'EV avaient un lymphotropisme marqué (**Vuorinen et al., 1999 ; Hwang et al., 2012**).

Lors de l'infection plus tardive (18h), la CV dans le sang a diminué, alors que celle du LCR a augmenté (**profil C**). Parallèlement, la pléiocytose et la protéinorachie (0,9 g/L) étaient plus élevées chez ces patients (92%). Les cytokines pro-inflammatoires, produites dans le LCR suite à l'infection, vont induire la migration et l'infiltration des leucocytes à travers la barrière hémato-méningée. La charge virale EV plus élevée dans le LCR peut être due: 1) soit à une réplication des virus dans les cellules endothéliales microvasculaires cérébrales, 2) soit à un transport des EV via les leucocytes à travers la barrière hémato-méningée (processus du « cheval de Troie »), impliqué pour de nombreux virus neurotropes (VIH, *Tick Borne Encephalitis virus*) (**Michalicová et al., 2017**).

Au cours de notre étude prospective, nous avons exclu 59 patients, pour lesquels les CV étaient détectables non quantifiables (DNQ) (c'est-à-dire positives mais en dessous de la limite de quantification reproductible (1875 copies/ml). Nous avons montré pour ces 59 patients que la charge virale était corrélée à un délai plus long entre le début des symptômes et la réalisation des prélèvements (sang et LCR) par rapport aux patients pour lesquels la CV était quantifiable (25h vs 15h pour le sang et 24h vs 17h pour le LCR). Une analyse statistique intégrant ces échantillons DNQ aux échantillons quantifiables est prévue prochainement.

## 5. Conclusion

Les résultats concernant l'étude des charges virales dans le sang et dans le LCR sont très **préliminaires** et seront consolidés par des tests statistiques plus appropriés (tests multivariés, en particulier pour les 3 profils d'infection). L'analyse comparative de ces résultats avec ceux de la réponse inflammatoire via le dosage des cytokines dans le sang et dans le LCR devrait nous aider à mieux comprendre la pathogénèse de ces infections.

### III. Etude du tropisme et de la réplication des entérovirus dans les différentes populations leucocytaires

#### 1. Rationnel de l'étude

Les EV pénètrent dans l'organisme par voie fécale-orale, ils se multiplient au niveau de l'oropharynx puis dans les organes lymphoïdes secondaires (amygdales et plaques de Peyer). L'infection se généralise ensuite à différents organes grâce à une **virémie**. La virémie est présente très tôt lors de l'infection, et disparaît dès l'apparition des anticorps. Cependant, de nombreuses interrogations persistent sur la phase virémie qui a été très peu explorée notamment sur la durée de la fenêtre virémique et sur le tropisme des EV pour les cellules leucocytaires du sang. De rares études ont permis de démontrer que les EV peuvent se répliquer dans certaines populations leucocytaires du sang mais que cette réplication intraleucocytaire varie en fonction du type d'EV (**Dagan et Menegus, 1992 ; Eberle et al., 1995 ; Mena et al., 1999 ; Vuorinen et al., 1999 ; Hwang et al., 2011**). Ces études ont été réalisées soit à partir de lignées cellulaires humaines continues d'origine hématopoïétique cultivées en laboratoire (exemple de la lignée cellulaire Raji (Lymphocyte B)), soit à partir des cellules mononuclées (PBMC) de donneurs de sang isolées après Ficoll.

Des études, réalisées *in vitro* sur les PBMC ont montré que les monocytes permettaient la réplication des poliovirus, les lymphocytes B celle du CV-B3 et les PBMC (incluant les lymphocytes, monocytes et cellules NK (natural killer)) celle des E-5 et E-11 (**Dagan et Menegus, 1992 ; Eberle et al., 1995 ; Mena et al., 1999**). Aucune réplication dans les PBMC n'a été observée pour les E-9 (**Dagan et Menegus, 1992**). Vuorinen et al., ont suggéré que le CV-B3 se répliquait mieux dans les lignées de cellules lymphocytaires B et T que dans la lignée de cellules monocytaires (**Vuorinen et al., 1999**). Récemment, les travaux de Hwang et al., ont montré que l'infection de lignées de cellules leucocytaires variait avec le type d'EV (**Hwang et al., 2011**). Ainsi, le CV-B3 se répliquait dans les lignées de lymphocytes B, T et les monocytes, le CV-A24 dans les lymphocytes B et dans les monocytes et que l'EV-D70 se répliquait uniquement dans les monocytes. Une corrélation a été observée entre la réplication de ces virus et leur cytotoxicité, à l'exception des monocytes infectés par le CV-B3 pour lesquels une réplication a été mise en évidence mais sans ECP visible. Les auteurs suggèrent que les cellules leucocytaires (sensibles aux EV) pourraient être responsables du transport de ces virus vers les différents organes.

Nous avons initié une nouvelle méthodologie qui permet à partir d'échantillons de sang de patients infectés par un EV, de trier et de récupérer prospectivement 4 fractions leucocytaires par cytométrie en flux. Parallèlement, le développement d'une technique d'amplification génique, ciblant le brin d'ARN négatif des EV (marqueur de réplication des EV) devrait permettre de quantifier les virus répliatifs dans les différentes fractions cellulaires.

## 2. Objectif de l'étude

L'objectif de l'étude était de déterminer s'il existe une **réplication des EV** dans les cellules leucocytaires du sang (monocytes, lymphocytes B et T et polynucléaires neutrophiles) lors de la phase virémique chez les patients infectés ou s'il s'agit uniquement de particules virales extracellulaires présentes dans le flux sanguin.

Pour explorer cet axe de recherche, nous avons sélectionné les patients pour lesquels la détection génomique des EV était positive dans le sang (patients inclus dans l'étude BLEDI). Nous avons mis au point un protocole permettant de récupérer et de trier 4 populations leucocytaires du sang. Puis sur chaque fraction leucocytaire, trois techniques d'amplification génique ont été utilisées :

- la technique quantitative EV « maison » (RT-qPCR) ciblant les brins d'ARN (+) et (-) des EV. Cette technique permet de quantifier soit les virus absorbés à la surface des leucocytes soit les virus intraleucocytaires (répliatifs ou non).
- une technique RT-PCR quantitative ciblant uniquement les brins d'ARN (-) des EV. Cette technique a été développée dans notre laboratoire afin de mettre en évidence les EV répliatifs.
- une technique de PCR quantitative ciblant un gène de ménage cellulaire qui permet de connaître la quantité de cellules présente dans chaque fraction leucocytaire et d'exprimer les résultats de quantification en copies d'ARN/cellule.

Si nous démontrons qu'il existe une réplication intraleucocytaire, les résultats seront analysés en tenant compte de l'âge des patients, du type d'EV ainsi que de la charge virale.

### 3. Etude de faisabilité

#### 3.1 Matériels et méthodes

Une étude de faisabilité a été réalisée avant la mise en place de l'étude BLEDI. Les échantillons sanguins (sang total) de 2 volontaires ont été infectés avec des souches d'EV :

- ✓ Volontaire 1 : échantillons de sang infectés avec 5 souches d'EV : la souche de référence d'E-30 Bastiani (titre =  $10^{7.2}$  TCID50/mL), une souche de CV-A9 ( $10^{6.70}$  TCID50/mL), une souche de CV-B5 ( $10^{6.44}$  TCID50/mL), une souche d'E-6 ( $10^{6.96}$  TCID50/mL) et une souche d'E-30 ( $10^{4.66}$  TCID50/mL).
- ✓ Volontaire 2 : échantillon de sang infecté uniquement avec la souche de référence d'E-30 Bastiani (titre =  $10^{7.2}$  TCID50/mL).

Les échantillons de sang ont été incubés pendant 24h avec la (ou les) souche(s) d'EV. Ces types d'EV ont été choisis car ils ont été les plus fréquemment identifiés en 2014 chez des patients présentant une méningite à EV (données du CNR EV/HPeV).

Les échantillons de sang infectés ont été mélangés à un milieu de conservation cellulaire (Streck Cell Preservative™) et conservés à température ambiante pendant 24h. Les leucocytes ont ensuite été marqués à l'aide d'anticorps monoclonaux ciblant 4 populations leucocytaires, puis triés par immunophénotypage par cytométrie en flux (BD FACSAria™ SORP (BD Biosciences)). Les acides nucléiques des différentes fractions leucocytaires ont été immédiatement extraits après le tri cellulaire, congelés, puis les analyses moléculaires ont été effectuées ultérieurement.

#### 3.2 Résultats

Les résultats d'amplification à l'aide de la technique **qPCR cellulaire** ont montré une quantification des cellules dans chacune des fractions leucocytaires testées pour les 2 volontaires (Tableau 12).

Les résultats d'amplification à l'aide de la technique **RT-qPCR EV « maison »** ont montré une quantification des EV dans toutes les fractions leucocytaires testées pour les 2 volontaires.

Les résultats de la **RT-qPCR EV « brin (-) »** ont montré que la répllication des EV dans les fractions leucocytaires variait en fonction du type d'EV et en fonction de l'individu :

✓ Volontaire 1 :

- La souche CV-A9 se réplique dans les polynucléaires neutrophiles (PNN) et dans les lymphocytes T
- La souche CV-B5 ne se réplique dans aucune fraction cellulaire
- La souche E-6 : répllication dans les PNN, les lymphocytes B et T
- La souche E-30 (isolée en 2007) : répllication uniquement dans les PNN
- La souche E-30 (Bastiani) : répllication dans les monocytes et PNN.

✓ Volontaire 2 :

La souche E-30 (Bastiani) se réplique dans les 4 fractions leucocytaires du sang.

La différence de quantification observée entre la RT-qPCR EV « maison » et la RT-qPCR ciblant uniquement les brins d'ARN (-) permet d'extrapoler la quantification théorique des brins d'ARN (+). La quantité de brins d'ARN (-) était dans la majorité des cas minoritaire par rapport aux brins d'ARN (+), excepté pour l'E-6 dans les polynucléaires neutrophiles et dans les lymphocytes T.



Tableau 12 - Etude du tropisme des entérovirus pour 4 fractions leucocytaires du sang (étude de faisabilité).

Souches d'EV	Types cellulaires	PCR cellulaire		RT-qPCREV		RT-qPCR brins d'ARN (-)	
		pg/µL	Quantité de cellules dans 5 µL éluat	cp/µL	cp/cellule	cp/µL	cp/cellule
<b>E-30 Bastiani</b>	Monocytes	7	3	33721	63588	5327	10045
	Polynucléaires neutrophiles	2907	1101	46971	213	2836	13
	Lymphocytes B	10	4	7256	9578	Indétectable	Indétectable
	Lymphocytes T	30	11	12568	5530	Indétectable	Indétectable
<b>CV-A9</b>	Monocytes	6	2	28832	63430	Indétectable	Indétectable
	Polynucléaires neutrophiles	1518	575	475733	4137	4005	35
	Lymphocytes B	47	18	32616	9160	Indétectable	Indétectable
	Lymphocytes T	78	30	49445	8368	1589	269
<b>CV-B5</b>	Monocytes	3	1	7833	34465	Indétectable	Indétectable
	Polynucléaires neutrophiles	710	269	92874	1727	Indétectable	Indétectable
	Lymphocytes B	34	13	12365	4801	Indétectable	Indétectable
	Lymphocytes T	65	25	22104	4489	Indétectable	Indétectable
<b>E-6</b>	Monocytes	8	3	287	474	Indétectable	Indétectable
	Polynucléaires neutrophiles	2185	828	6254	38	3844	23
	Lymphocytes B	11	4	3123	3748	1352	1622
	Lymphocytes T	32	12	2637	1088	2004	827
<b>E-30</b>	Monocytes	3	1	3171	13952	Indétectable	Indétectable
	Polynucléaires neutrophiles	3124	1183	48475	205	659	3
	Lymphocytes B	21	8	11610	7298	Indétectable	Indétectable
	Lymphocytes T	36	14	10980	4026	Indétectable	Indétectable
<b>E-30 Bastiani</b>	Monocytes	9	3	72110	105761	10494	15391
	Polynucléaires neutrophiles	7108	2692	39019	73	6133	11
	Lymphocytes B	2	1	10468	69089	1961	12943
	Lymphocytes T	9	3	21265	31189	784	1150

Abréviations : pg/µL : picogrammes d'ADN cellulaire par µL d'éluat ; cp/µL : copies de brins d'ARN par µL d'éluat ; cp/cellule : copies de brins d'ARN par cellule.

#### 4. Résultats préliminaires du tropisme des entérovirus chez les patients virémiques

Au cours de l'étude BLEDI réalisée en 2015, nous avons inclus 22 patients virémiques (6 patients admis au CH de Versailles et 16 patients au CHU de Clermont-Ferrand) pour lesquels nous avons effectué le tri des fractions leucocytaires (soit 88 échantillons). Ces fractions étaient congelées directement sans étape de centrifugation. Les amplifications géniques réalisées chez 4 des 22 patients inclus ont été toutes négatives. Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer la négativité de ces PCR :

- (1) une mauvaise conservation des acides nucléiques dans le tampon ayant servi à la récupération des différentes fractions leucocytaires
- (2) l'implication d'éventuelles RNases et/ou DNases au cours de la congélation
- (3) une prise d'essai trop faible (200µL) par rapport au volume cellulaire récupéré (2 voire 3 mL).

Afin de pallier ces problèmes, nous avons décidé pour les échantillons de l'étude BLEDI sur l'année 2016, de centrifuger les fractions leucocytaires après le tri cellulaire, et de reprendre le culot dans du tampon de lyse afin d'optimiser la quantité de cellules à extraire et d'inhiber les potentielles RNases et/ou DNases.

Au cours des années 2016 et 2017, nous avons inclus 34 patients virémiques admis au CHU de Clermont-Ferrand (n=27) et au CH de Versailles (n=7). Nous avons réalisé les analyses moléculaires (3 techniques d'amplification géniques) chez 6 patients (Tableau 13). Les résultats sont les suivants :

- Avec la technique **qPCR cellulaire**, les résultats d'amplification étaient quantifiables dans 20/24 fractions leucocytaires testées.
- Avec la technique **RT-qPCR « maison »**, aucune amplification n'a été détectée dans les fractions cellulaires testées (sauf dans les lymphocytes B du patient n°5).
- Avec la technique **RT-qPCR « brin (-) »** : une amplification a été détectée dans les polynucléaires neutrophiles du patient n°5 infecté par une souche d'E-25.

**Tableau 13 - Etude du tropisme des entérovirus pour les 4 fractions leucocytaires du sang pour 6 patients virémiques (étude BLEDI).**

N° de patients	Plasma		Délai entre prélèvement -tri cellulaire (jours)	Monocytes		Polynucléaires neutrophiles			Lymphocytes B			Lymphocytes T		
	RT-PCR EV (Ct)	RT-qPCR EV (log cp/mL)		qPCR cellulaire (pg/μL)	RT-qPCR EV (cp/μL)	RT-qPCR brins (-) (cp/μL)	qPCR cellulaire (pg/μL)	RT-qPCR EV (cp/μL)	RT-qPCR brins (-) (cp/μL)	qPCR cellulaire (pg/μL)	RT-qPCR EV (cp/μL)	RT-qPCR brins (-) (cp/μL)	qPCR cellulaire (pg/μL)	RT-qPCR EV (cp/μL)
1	38,45	IND	IMP	IND	IND	694,1	IND	IND	IND	IND	IND	10,7	IND	IND
2	35,52	IND	E-6	3968,8	IND	19992,9	IND	IND	IND	57	IND	3999,3	IND	IND
3	32,44	5,22	E-9	4763,9	IND	1566	IND	IND	IND	358,7	IND	643,5	IND	IND
4	ND	4,13	E-5	IND	IND	1595,9	IND	IND	IND	1,2	IND	IND	IND	IND
5	28,91	5,53	E-25	3611	IND	36375,3	IND	<b>51</b>	IND	433,9	<b>1</b>	855,2	IND	IND
6	24,64	6,18	CV-A6	6425,8	IND	39938,2	IND	IND	IND	63455,9	IND	76407,8	IND	IND

Abréviations : Ct : Cycle threshold, ND : Non disponible, IMP : typage impossible, IND : Indétectable.

## 5. Commentaires de l'étude

Le recours à la cytométrie en flux (tri et récupération des cellules triées) dans le but d'étudier le tropisme des EV chez des patients infectés est une approche innovante car aucune étude à ce jour n'a décrit la mise en œuvre d'une telle méthode. La prise de risque est donc importante car l'aspect technique employé ici n'est pas encore totalement maîtrisé. En effet, le milieu de conservation est optimal pour préserver les leucocytes sanguins mais pas le génome des EV. A cela s'ajoute la disponibilité du cytomètre en flux qui était limitée du fait de son utilisation par différents laboratoires de recherche.

### ➤ Etude de faisabilité

L'étude de faisabilité a montré que la méthodologie était satisfaisante pour étudier le tropisme des EV dans le sang des patients infectés. En effet, cette étude, bien que réalisée sur 5 souches d'EV, a permis de confirmer le peu de données disponibles démontrant que la réplication des EV dans le sang variait avec le type d'EV. Vuorinen et ses collègues ont montré une réplication importante du CV-B3 dans les lignées de lymphocytes B et T et plus faible dans les monocytes (**Vuorinen et al., 1999**). Plus récemment, une étude coréenne a retrouvé des résultats similaires pour le CV-B3, et a montré que le CV-A24 se répliquait dans les lymphocytes B et les monocytes et que l'EV-D70 se répliquait uniquement dans les monocytes (**Hwang et al., 2012**). D'autre part, une variation intratypique des souches virales peut également être à l'origine d'un tropisme différent pour les cellules leucocytaires (exemple des 2 souches d'E-30). La réplication des EV dans les différentes fractions leucocytaires du sang est en partie déterminée par la présence de récepteurs et corécepteurs cellulaires.

Dans notre étude, aucune réplication intraleucocytaire du CV-B5 n'a été observée. Néanmoins, la technique quantitative RT-qPCR « maison » a permis l'amplification du CV-B5 dans les 4 fractions cellulaires (détection des brins d'ARN (+)). Ces résultats, suggèrent la détection de virus adsorbés ou phagocytés/endocytés à l'intérieur des leucocytes. Les leucocytes pourraient jouer le rôle de transporteur pour certains EV. Une étude a montré que le CV-B3 pourrait être véhiculé dans le sang via les monocytes (**Vuorinen et al., 1999**).

Dans notre étude de faisabilité, nous avons montré que la réplication intraleucocytaire de l'E-30 (Bastiani) variait en fonction de l'individu. Des résultats similaires ont été observés dans la littérature : une variabilité individuelle de la permissivité des cellules mononuclées du sang

(PBMC) après infection par une même souche virale (CV-B3) a été observée chez différents donneurs de sang (**Vuorinen et al., 1999**). Cette variabilité interindividuelle peut éventuellement s'expliquer par la présence d'anticorps anti-EV qui faciliteraient la permissivité des cellules aux EV (**Jarasch-Altob et al., 2010**).

La principale limite à cette étude de faisabilité est qu'elle n'a été réalisée qu'une seule fois. Pour confirmer ces résultats préliminaires, nous avons envisagé une approche basée sur la microscopie confocale, en incubant les différentes fractions leucocytaires infectées avec des anticorps anti-EV de souris. Cette technique aurait permis de localiser si les virus étaient intraleucocytaires ou uniquement adsorbés à la surface des cellules. Cependant, une incompatibilité entre les anticorps de souris ayant servi au tri cellulaire et les anticorps de souris ciblant la protéine VP1 ne nous a pas permis de réaliser cette technique.

➤ Etude du tropisme et de la réplication des EV chez les patients virémiques

Peu de patients (n=34) ont été inclus dans cette étude pour plusieurs raisons :

- (1) Seuls les centres hospitaliers de Versailles et de Clermont-Ferrand ont participé à cette sous-étude de l'étude BLEDI pour des raisons liées au délai de transport des échantillons.
- (2) Le volume de sang (en particulier chez les nourrissons) n'était pas toujours suffisant pour réaliser à la fois le diagnostic des EV et l'étude du tropisme.
- (3) Le tri cellulaire sur le cytomètre en flux du service d'Hématologie (situé sur un autre site hospitalier, à l'Hôpital Estaing) n'a pas toujours été possible du fait de sa grande utilisation par d'autres équipes de recherche.
- (4) Le diagnostic des EV a été réalisé trop tardivement en particulier pour les patients hospitalisés le weekend.

Les résultats préliminaires, obtenus chez les 6 patients virémiques, amènent aux conclusions suivantes :

- **Point positif :** la technique **qPCR cellulaire** a permis la quantification des cellules dans 83% (20/24) des fractions cellulaires testées. Ces résultats sont encourageants car notre technique « revisitée » de récupération des cellules après le tri cellulaire semble être au point. Les 4 échantillons non amplifiés seront retestés lors des prochains essais.

- Points négatifs :

(1) Aucune amplification des EV n'a été détectée avec la technique **quantitative RT-qPCR** « **maison** » dans les 24 fractions leucocytaires testées. Différentes hypothèses ont été envisagées :

- ⇒ soit la quantité de génome viral dans ces fractions cellulaires est trop faible, en particulier pour les 3 premiers patients (Ct >32).
- ⇒ soit le délai entre la réalisation du prélèvement sanguin et le tri cellulaire est trop long (4 à 6 jours pour les patients n°1, 4 et 6), entraînant une perte/destruction des génomes viraux. Cette hypothèse a été vérifiée. Nous avons montré sur des échantillons de sang infectés par un EV et conservés dans le milieu de conservation cellulaire (Streck Cell Preservative™) que la charge virale diminuait au cours du temps alors que l'intégrité des cellules leucocytaires et l'expression des antigènes cellulaires étaient conservées pendant 6 jours.
- ⇒ soit l'enzyme (Taq polymérase) utilisée dans notre technique d'amplification « maison » est inhibée par des traces du tampon ayant servi au tri cellulaire. En effet, pour le patient n°5, il est surprenant d'observer la présence de brins d'ARN (-) alors qu'en parallèle, aucun brins d'ARN (+) et (-) n'ont été détecté par la RT-qPCR « maison ». L'étape prochaine consistera à changer l'enzyme dans notre technique pour vérifier cette hypothèse.

(2) Aucune amplification des EV dans les 23/24 fractions leucocytaires testées n'a été détectée avec la technique **quantitative RT-qPCR** « **brin (-)** ». Les mêmes hypothèses que précédemment peuvent être envisagées (charge virale à l'origine trop faible dans les échantillons sanguins ou délai trop long entre le prélèvement et le tri cellulaire). Une autre hypothèse serait que les EV testés ne se répliquent pas dans les cellules leucocytaires.

## 6. Conclusion

Le tri et la récupération des 4 fractions leucocytaires en cytométrie en flux est novateur car les essais réalisés à ce jour passent soit par l'utilisation de Ficoll qui permet la récupération des cellules mononuclées sans distinction des lymphocytes et des monocytes, soit par l'utilisation de lignées de cellules leucocytaires. D'autre part, de rares et anciennes publications se sont attachées à cette problématique sur un nombre restreint de type d'EV.

Ces travaux vont être poursuivis en janvier 2019 avec l'arrivée dans le laboratoire d'un étudiant en stage de Master 2. La méthodologie va être entièrement revue avant de réaliser cette étude sur les 28 autres patients. Il est prévu également de réaliser des tests *in vitro* d'infections avec plusieurs types d'EV à partir du sang de donneurs.

## **Conclusion générale et perspectives**



Cette thèse est le résultat de deux approches complémentaires : leur point commun est l'exploration des mécanismes physiopathologiques des infections à EV. Une première approche clinique plus appliquée, a permis de démontrer l'intérêt de la réalisation du diagnostic des EV dans le sang dans la pratique quotidienne des laboratoires. Dans une seconde approche plus fondamentale, l'étude des charges virales dans le sang comparativement à celles du LCR, ainsi que l'étude du tropisme et de la réplication des EV dans les différentes fractions leucocytaires du sang devraient nous apporter des informations concernant la cinétique de ces infections et concernant les mécanismes physiopathologiques mis en jeu dans la diffusion de ces virus vers le SNC.

Les processus pathogéniques des infections à EV sont complexes car ces virus se multiplient séquentiellement et/ou simultanément dans plusieurs tissus (épithélium de l'oropharynx et de l'intestin grêle, tissus lymphoïdes associés). L'existence d'une virémie au cours des infections à EV est connue depuis longtemps mais son rôle dans la dissémination intra individuelle du virus est mal connu. De même, l'existence d'une réplication des EV dans les différentes populations leucocytaires du sang a été très peu étudiée, une dizaine de génotypes ont été testés. L'entrée des EV dans le SNC, l'importance quantitative de la charge virale dans le sang et le LCR et leur corrélation éventuelle avec l'intensité du processus inflammatoire réactionnel sont des aspects également peu étudiés.

### **Optimisation du diagnostic des infections à EV dans la population pédiatrique.**

Dans une première approche de la pathogénie des infections à EV, nous avons initié, entre Juin et Octobre 2015 et 2016, en collaboration avec le Pr André Labbé, une **étude nationale multicentrique prospective** qui avait pour objectif d'évaluer l'apport du diagnostic moléculaire (RT-PCR) des EV dans le sang. Cette étude a été réalisée chez un nombre important de patients (n=822) et a montré que la détection des EV dans le sang améliorait l'exhaustivité du diagnostic de ces infections : 1) augmentation de 14% de la sensibilité du diagnostic (Sang+/LCR-) par rapport au LCR; 2) détection d'un EV chez 28% des patients ( $\leq 2$  ans) admis majoritairement pour une fièvre isolée et pour lesquels actuellement aucun diagnostic n'est réalisé. Cette étude a donc montré une sous-estimation des EV dans ces infections dans la population pédiatrique.

Les résultats de cette étude ouvrent les perspectives d'un nouvel algorithme diagnostique des fièvres inexpliquées chez les nourrissons (0 à 2 ans). La mise en place de cette technique dans la pratique quotidienne des laboratoires hospitaliers devrait avoir un impact sur la prise en charge des patients en termes de réduction de la durée de séjour, d'arrêt des antibiotiques et d'examens complémentaires.

Une des perspectives à cette étude serait de pouvoir définir avec les pédiatres un algorithme décisionnel pratique pour la prise en charge des nourrissons admis à l'hôpital pour une fièvre isolée, durant la période estivo-automnale. Après la mise en place de cet algorithme, il serait intéressant d'évaluer son impact dans la prise en charge des patients (étude médico - économique).

### **Etude de la charge virale des EV dans le sang et dans le LCR chez des enfants infectés.**

L'originalité de cette étude repose sur l'analyse combinée des charges virales EV dans le sang et dans le LCR chez un grand nombre de patients infectés (n=95). Les variations de charges virales observées au cours de notre étude sont probablement multifactorielles. 1) Une relation entre la charge virale et le génotype du virus a été mise en évidence dans le sang et le LCR, ces résultats confirment les données de nos travaux précédents réalisés dans le LCR (**Volle et al., 2014**). 2) Les charges virales dans le sang sont plus élevées chez les nouveau-nés et les nourrissons présentant un tableau de fièvre isolée ou de sepsis par rapport aux enfants présentant une méningite.

Une des perspectives de ces travaux sera de renforcer ces résultats en incluant les charges virales (dans le sang et le LCR) des patients admis au CHU de Clermont-Ferrand en 2017 et 2018 (accord de la prolongation de l'étude par le CPP). L'objectif est d'inclure les charges virales d'un plus grand nombre de patients, et de diversifier l'échantillonnage avec un plus grand panel de génotypes d'EV.

## **Etude du tropisme et de la réplication des EV dans les différentes populations leucocytaires du sang.**

Pour réaliser cette étude, nous avons utilisé une approche innovante qui repose : 1) sur le tri et la récupération des différentes fractions leucocytaires après immunophénotypage par cytométrie en flux ; 2) sur l'utilisation d'une technique d'amplification génique qui cible uniquement les virus réplicatifs (brins ARN négatifs).

**L'étude de faisabilité** réalisée à partir d'échantillons de sang infectés *in vitro* par différentes souches d'EV a montré des résultats tout à fait satisfaisants concernant la récupération des cellules (bonne quantification des cellules par qPCR cellulaire) et la réplication des EV qui varie dans les fractions leucocytaires en fonction du type d'EV. Une **étude *in vivo*** a été réalisée sur les échantillons de sang de 34 patients virémiques, inclus dans l'étude BLEDI, présentant une infection à EV. Les fractions leucocytaires (monocytes, lymphocytes B, lymphocytes T et les polynucléaires) ont été prospectivement triées, récupérées et congelées. La réplication des EV dans les différentes fractions leucocytaires de 6/34 patients a été explorée en réalisant 3 techniques d'amplification géniques (qPCR cellulaire, RT-qPCR EV « maison », et RT-qPCR « brins ARN négatifs »). La quantification des cellules a été possible dans la majorité des échantillons cellulaires testés, ce qui confirme une bonne conservation des échantillons cellulaires, par contre aucune amplification n'a été détectée avec la technique quantitative « maison ». Des améliorations techniques sont prévues afin optimiser les deux réactions d'amplification des EV (techniques « maison » et « brin négatif »). Ce travail d'optimisation et l'exploitation des autres échantillons sanguins (n=28) seront réalisés par un étudiant de Master 2 en janvier 2019.

Une des perspectives à cette étude, si nous mettons en évidence une réplication des EV dans les cellules leucocytaires, serait de pouvoir caractériser les mécanismes impliqués dans la permissivité des cellules pour les EV. La permissivité des cellules leucocytaires implique la présence de différents récepteurs ou co- récepteurs à la surface de ces cellules. Une étude récente s'est intéressée à la recherche par cytométrie en flux (à l'aide d'anticorps monoclonaux) de différents récepteurs cellulaires aux EV : le récepteur CAR a été localisé sur les lymphocytes B et les monocytes, le récepteur DAF sur les monocytes, les lymphocytes B et T, et les acides sialiques uniquement sur les lymphocytes T (**Hwang et al., 2012**). La

caractérisation de ces récepteurs cellulaires corrélée aux résultats du tropisme devrait permettre une meilleure compréhension des mécanismes d'entrée de ces virus dans les cellules leucocytaires.

### **Etude de la réponse inflammatoire dans le sang et dans le LCR.**

Lors de la réalisation de l'étude BLEDI, un des objectifs secondaires était de doser les cytokines dans le LCR et le sang de patients infectés par un EV afin d'étudier la réponse inflammatoire. Cette étude n'a pas pu être entreprise au cours de mon Doctorat par manque de temps, mais sera prochainement réalisé par un étudiant en Master 2. Ce travail sera mené en collaboration avec le Pr Pascale Gueirard du Laboratoire de Biologie cellulaire pour son expertise dans l'interprétation des résultats obtenus.

#### **- Etat des lieux**

L'étude de la réponse inflammatoire est essentielle dans la compréhension de la physiopathologie des infections à EV. De nombreux travaux ont été consacrés à l'étude des cytokines dans les infections à EV, et principalement dans les infections à EV-A71. Ces travaux avaient pour objectif de comparer les taux de cytokines produites au cours de différents tableaux cliniques : syndrome pieds–mains bouche, encéphalites et détresse cardio respiratoire (**Lin et al., 2002 ; Wang et al., 2007 ; Solomon et al., 2010 ; Zhang et al., 2015 ; Ye et al., 2015 ; Shao et al., 2017**).

#### **- Méthodologie**

Les échantillons de sang et de LCR de patients présentant une méningite à EV vont être sélectionnés. Cette étude inclura les trois catégories d'âge : nouveau-nés, nourrissons et enfants. En parallèle, un groupe contrôle, ne présentant aucune infection bactérienne ou virale (absence de pléiocytose dans le LCR) sera inclus. Un panel de 15 cytokines sera dosé dans les 2 compartiments biologiques. Le dosage de ces cytokines sera réalisé à l'aide d'une technique ELISA avec révélation des immuns-complexes par cytométrie en flux (Technologie Luminex).

- Interprétation des résultats

Les résultats du dosage des cytokines dans les 2 compartiments biologiques seront interprétés en tenant compte du type d'EV et de la charge virale. Nous déterminerons également s'il existe une corrélation entre la production de cytokines dans le LCR et la présence d'une pléiocytose.

En **conclusion**, l'ensemble de ces travaux devraient nous permettre de répondre à un certain nombre de questions :

- 1) Y-a-t-il un tropisme spécifique des EV pour certaines populations leucocytaires ? Est-il variable en fonction du type d'EV ? Existe-t-il une réplication des EV dans certaines fractions leucocytaires du sang ?
- 2) La concentration des cytokines dans le LCR et le sang est-elle corrélée au type d'EV ?

## **Références bibliographiques**

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S.** Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique. 5<sup>ème</sup> édition. Elsevier Masson. **2016**.
- Abedi GR, Watson JT, Pham H, Nix WA, Oberste MS, Gerber SI.** Enterovirus and Human Parechovirus Surveillance - United States, 2009-2013. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* **2015**; 64(34): 940–3.
- Abzug MJ, Michaels MG, Wald E, Jacobs RF, Romero JR, Sánchez PJ, et al.** A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of Pleconaril for the Treatment of Neonates With Enterovirus Sepsis. *J Pediatric Infect Dis Soc.* **2016**; 5(1):53–62.
- Abzug MJ, Loeffelholz M, Rotbart HA.** Diagnosis of neonatal enterovirus infection by polymerase chain reaction. *J Pediatr.* **1995**; 126(3): 447–50.
- Abzug MJ.** Prognosis for neonates with enterovirus hepatitis and coagulopathy. *Pediatr Infect Dis J.* **2001**; 20(8): 758–63.
- Afonso P-V, Ozden S, Cumont M-C, Seilhean D, Cartier L, Rezaie P, Mason S, et al.** Alteration of bloodbrain barrier integrity by retroviral infection. *PLoS Pathogens.* **2008**; 4(11).
- Agol VI, Belov GA, Bienz K, Egger D, Kolesnikova MS, Romanova LI, et al.** Competing death programs in poliovirus-infected cells: commitment switch in the middle of the infectious cycle. *J Virol.* **2000**; 74(12): 5534–41.
- Agrez MV, Shafren DR, Gu X, Cox K, Sheppard D, Barry RD.** Integrin alpha v beta 6 enhances coxsackievirus B1 lytic infection of human colon cancer cells. *Virology.* **1997**; 239(1): 71–7.
- Ahmad S, Dalwai A, Al-Nakib W.** Frequency of enterovirus detection in blood samples of neonates admitted to hospital with sepsis-like illness in Kuwait. *J Med Virol.* **2013**; 85(7): 1280–5.
- Ai J, Xie Z, Liu G, Chen Z, Yang Y, Li Y, et al.** Etiology and prognosis of acute viral encephalitis and meningitis in Chinese children: a multicentre prospective study. *BMC Infect Dis.* **2017**; 17(1): 494.
- Aizawa Y, Izumita R, Saitoh A.** Human parechovirus type 3 infection: An emerging infection in neonates and young infants. *J Infect Chemother.* **2017**; 23(7): 419–26.
- Akuzawa N, Harada N, Hatori T, Imai K, Kitahara Y, Sakurai S, et al.** Myocarditis, hepatitis, and pancreatitis in a patient with coxsackievirus A4 infection: a case report. *Virol J.* **2014**; 11: 3.
- Aliabadi N, Messacar K, Pastula DM, Robinson CC, Leshem E, Sejvar JJ, et al.** Enterovirus D68 Infection in Children with Acute Flaccid Myelitis, Colorado, USA, 2014. *Emerging Infect Dis.* **2016**; 22(8): 1387–94.
- Alidjinou EK, Lazrek M, Schuffenecker I, Pindi B, Lapeyre F, Kacet N, et al.** Necrotizing Enterocolitis Cases Associated with Nosocomial Enterovirus Transmission in a Neonatal Unit. *Pediatr Infect Dis J.* **2018**; 37(9): 954–7.
- Amdani SM, Kim HS, Orvedahl A, John AO, Said A, Simpson K.** Successful treatment of fulminant neonatal enteroviral myocarditis in monochorionic diamniotic twins with cardiopulmonary support, intravenous immunoglobulin and pocapavir. *BMJ Case Rep.* **2018**; 2018.
- Andino R, Rieckhof GE, Baltimore D.** A functional ribonucleoprotein complex forms around the 5' end of poliovirus RNA. *Cell.* **1990**; 63(2): 369–80.
- Andréoletti L, Lévêque N, Boulagnon C, Brasselet C, Fornes P.** Viral causes of human myocarditis. *Arch Cardiovasc Dis.* **2009**; 102(6–7): 559–68.
- Antona D, Lévêque N, Chomel JJ, Dubrou S, Lévy-Bruhl D, Lina B.** Surveillance of enteroviruses in France, 2000-2004. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **2007**; 26(6): 403–12.

- Antona D, Kossorotoff M, Schuffenecker I, Mirand A, Leruez-Ville M, Bassi C, et al.** Severe paediatric conditions linked with EV-A71 and EV-D68, France, May to October 2016. *Euro Surveill.* **2016**; 21(46).
- Archimbaud C, Mirand A, Chambon M, Regagnon C, Bailly J-L, Peigue-Lafeuille H, et al.** Improved diagnosis on a daily basis of enterovirus meningitis using a one-step real-time RT-PCR assay. *J Med Virol.* **2004**; 74(4): 604–11.
- Archimbaud C, Ouchchane L, Mirand A, Chambon M, Demeocq F, Labbé A, et al.** Improvement of the management of infants, children and adults with a molecular diagnosis of Enterovirus meningitis during two observational study periods. *PLoS ONE.* **2013**; 8(7): e68571.
- Arora R, Kaplan M, Nelson M.** Enterovirus-specific IgG in intravenous immunoglobulin preparations. *Ann Allergy Asthma Immunol.* **2011**; 106(6): 544–5.
- Asghar H, Diop OM, Weldegebriel G, Malik F, Shetty S, El Bassioni L, et al.** Environmental surveillance for polioviruses in the Global Polio Eradication Initiative. *J Infect Dis.* **2014**; 210 Suppl 1: S294-303.
- Aswathyraj S, Sabeena S, Bhat KG, Bharani KC, Sanjay R, Arunkumar G.** Coxsackievirus A6 (CV-A6) Encephalomyelitis in an immunocompromised child -A case report and brief review of the literature. *Jpn J Infect Dis.* **2018**; 71(5): 388-389.
- Attoh J, Obodai E, Adiku T, Odoom JK.** Prevalence of human enteroviruses among apparently healthy nursery school children in Accra. *Pan Afr Med J.* **2014**; 18: 66.
- Baboonian C, Treasure T.** Meta-analysis of the association of enteroviruses with human heart disease. *Heart.* **1997**; 78(6): 539–43.
- Baggen J, Thibaut HJ, Strating JRPM, van Kuppeveld FJM.** The life cycle of non-polio enteroviruses and how to target it. *Nat Rev Microbiol.* **2018**; 16(6): 368–81.
- Bailly JL, Béguet A, Chambon M, Henquell C, Peigue-Lafeuille H.** Nosocomial transmission of echovirus 30: molecular evidence by phylogenetic analysis of the VP1 encoding sequence. *J Clin Microbiol.* **2000**; 38(8): 2889–92.
- Bal A, Schuffenecker I, Casalegno J-S, Josset L, Valette M, Armand N, et al.** Enterovirus D68 nosocomial outbreak in elderly people, France, 2014. *Clin Microbiol Infect.* **2015**; 21(8): 61-62.
- Balvay L, Soto Rifo R, Ricci EP, Decimo D, Ohlmann T.** Structural and functional diversity of viral IRESes. *Biochim Biophys Acta.* **2009**; 1789(9–10): 542–57.
- Bandyopadhyay AS, Garon J, Seib K, Orenstein WA.** Polio vaccination: past, present and future. *Future Microbiol.* **2015**; 10(5): 791–808.
- Bang H, Suh JH, Lee SY, Kim K, Yang EJ, Jung SH, et al.** Post-polio syndrome and risk factors in Korean polio survivors: a baseline survey by telephone interview. *Ann Rehabil Med.* **2014**; 38(5): 637–47.
- Baraff LJ.** Management of infants and young children with fever without source. *Pediatr Ann.* **2008**; 37(10): 673–9.
- Basavappa R, Syed R, Flore O, Icenogle JP, Filman DJ, Hogle JM.** Role and mechanism of the maturation cleavage of VP0 in poliovirus assembly: structure of the empty capsid assembly intermediate at 2.9 Å resolution. *Protein Sci.* **1994**; 3(10): 1651–69.
- Bastos MS, Coelho-Dos-Reis JG, Zauli DAG, Naveca FG, Monte RL, Pimentel JP, et al.** Divergent cerebrospinal fluid cytokine network induced by non-viral and different viral infections on the central nervous system. *BMC Infect Dis.* **2015**; 15: 345.



- Bauer L, Lyoo H, van der Schaar HM, Strating JR, van Kuppeveld FJ.** Direct-acting antivirals and host-targeting strategies to combat enterovirus infections. *Curr Opin Virol.* **2017**; 24: 1–8.
- Begier EM, Oberste MS, Landry ML, Brennan T, Mlynarski D, Mshar PA, et al.** An outbreak of concurrent echovirus 30 and coxsackievirus A1 infections associated with sea swimming among a group of travelers to Mexico. *Clin Infect Dis.* **2008**; 47(5): 616–23.
- Bergamin CS, Dib SA.** Enterovirus and type 1 diabetes: What is the matter? *World J Diabetes.* **2015**; 6(6): 828–39.
- Bergelson JM, St John N, Kawaguchi S, Chan M, Studdal H, Modlin J, et al.** Infection by echoviruses 1 and 8 depends on the alpha 2 subunit of human VLA-2. *J Virol.* **1993**; 67(11): 6847–52.
- Bertolasi L, Acler M, dall’Ora E, Gajofatto A, Frasson E, Tocco P, et al.** Risk factors for post-polio syndrome among an Italian population: a case-control study. *Neurol Sci.* **2012**; 33(6): 1271–5.
- Bessaud M, Autret A, Jegouic S, Balanant J, Joffret M-L, Delpeyroux F.** Development of a Taqman RT-PCR assay for the detection and quantification of negatively stranded RNA of human enteroviruses: evidence for false-priming and improvement by tagged RT-PCR. *J Virol Methods.* **2008**; 153(2): 182–9.
- Betancourt S, Shulman L.** Polioviruses and other Enteroviruses [Internet]. Global Water Pathogen Project. **2015**. Available from: <http://www.waterpathogens.org/book/polioviruses-and-other-enteroviruses>
- Bisseux M, Colombet J, Mirand A, Roque-Afonso A-M, Abravanel F, Izopet J, et al.** Monitoring human enteric viruses in wastewater and relevance to infections encountered in the clinical setting: a one-year experiment in central France, 2014 to 2015. *Euro Surveill.* **2018**; 23(7).
- Blomqvist S, Klemola P, Kaijalainen S, Paananen A, Simonen M-L, Vuorinen T, et al.** Co-circulation of coxsackieviruses A6 and A10 in hand, foot and mouth disease outbreak in Finland. *J Clin Virol.* **2010**; 48(1): 49–54.
- Blomqvist S, Savolainen C, Råman L, Roivainen M, Hovi T.** Human rhinovirus 87 and enterovirus 68 represent a unique serotype with rhinovirus and enterovirus features. *J Clin Microbiol.* **2002**; 40(11): 4218–23.
- Blyn LB, Towner JS, Semler BL, Ehrenfeld E.** Requirement of poly(rC) binding protein 2 for translation of poliovirus RNA. *J Virol.* **1997**; 71(8): 6243–6.
- Bodian D.** Emerging concept of poliomyelitis infection. *Science.* **1955**; 122(3159): 105–8.
- Bouttier M, Goncalvès C, Journo C, Letienne J, Piña M, Vitour D.** Virus et interféron : mécanismes d’induction et stratégies d’échappement. *Virologie.* **2008**; 12(3): 159–73.
- Bowles NE, Ni J, Kearney DL, Pauschinger M, Schultheiss H-P, McCarthy R, et al.** Detection of viruses in myocardial tissues by polymerase chain reaction. evidence of adenovirus as a common cause of myocarditis in children and adults. *J Am Coll Cardiol.* **2003**; 42(3): 466–72.
- Bozym RA, Morosky SA, Kim KS, Cherry S, Coyne CB.** Release of intracellular calcium stores facilitates coxsackievirus entry into polarized endothelial cells. *PLoS Pathog.* **2010**; 6(10): e1001135.
- Brown DM, Hixon AM, Oldfield LM, Zhang Y, Novotny M, Wang W, et al.** Contemporary circulating enterovirus D68 strains show differential viral entry and replication in human neuronal cells. *bioRxiv.* **2018**; 3311-16.
- Buontempo PJ, Cox S, Wright-Minogue J, DeMartino JL, Skelton AM, Ferrari E, et al.** SCH 48973: a potent, broad-spectrum, anti-enterovirus compound. *Antimicrob Agents Chemother.* **1997**; 41(6): 1220–5.

- Byington CL, Taggart EW, Carroll KC, Hillyard DR.** A polymerase chain reaction-based epidemiologic investigation of the incidence of nonpolio enteroviral infections in febrile and afebrile infants 90 days and younger. *Pediatrics*. **1999**; 103(3): 27.
- Cabrerizo M, Trallero G, Pena MJ, Cilla A, Megias G, Muñoz-Almagro C, et al.** Comparison of epidemiology and clinical characteristics of infections by human parechovirus vs. those by enterovirus during the first month of life. *Eur J Pediatr*. **2015**; 174(11): 1511–6.
- Cao R-Y, Dong D-Y, Liu R-J, Han J-F, Wang G-C, Zhao H, et al.** Human IgG subclasses against enterovirus Type 71: neutralization versus antibody dependent enhancement of infection. *PLoS ONE*. **2013**; 8(5): e64024.
- Chambon M, Archimbaud C, Bailly JL, Henquell C, Regagnon C, Charbonné F, et al.** Circulation of enteroviruses and persistence of meningitis cases in the winter of 1999-2000. *J Med Virol*. **2001**; 65(2): 340–7.
- Chang L-Y, Huang L-M, Gau SS-F, Wu Y-Y, Hsia S-H, Fan T-Y, et al.** Neurodevelopment and cognition in children after enterovirus 71 infection. *N Engl J Med*. **2007**; 356(12): 1226–34.
- Chansaenroj J, Auphimai C, Puenpa J, Mauleekoonphairoj J, Wanlapakorn N, Vuthitanachot V, et al.** High prevalence of coxsackievirus A2 in children with herpangina in Thailand in 2015. *Virusdisease*. **2017**; 28(1): 111–4.
- Chapman NM, Tracy S, Gauntt CJ, Fortmueller U.** Molecular detection and identification of enteroviruses using enzymatic amplification and nucleic acid hybridization. *J Clin Microbiol*. **1990**; 28(5): 843–50.
- Chen C-S, Yao Y-C, Lin S-C, Lee Y-P, Wang Y-F, Wang J-R, et al.** Retrograde axonal transport: a major transmission route of enterovirus 71 in mice. *J Virol*. **2007**; 81(17): 8996–9003.
- Chen J, Tong J, Liu H, Liu Y, Su Z, Wang S, et al.** Increased frequency of Th17 cells in the peripheral blood of children infected with enterovirus 71. *J Med Virol*. **2012**; 84(5): 763–7.
- Chen Y-H, Lin H-C, Lin H-C.** Increased risk of adverse pregnancy outcomes among women affected by herpangina. *Am J Obstet Gynecol*. **2010**; 203(1): 49.e1-7.
- Cheng H-Y, Huang Y-C, Yen T-Y, Hsia S-H, Hsieh Y-C, Li C-C, et al.** The correlation between the presence of viremia and clinical severity in patients with enterovirus 71 infection: a multi-center cohort study. *BMC Infect Dis*. **2014**; 14: 417.
- Choe SS, Dodd DA, Kirkegaard K.** Inhibition of cellular protein secretion by picornaviral 3A proteins. *Virology*. **2005**; 337(1): 18–29.
- Chonmaitree T, Ford C, Sanders C, Lucia HL.** Comparison of cell cultures for rapid isolation of enteroviruses. *J Clin Microbiol*. **1988**; 26(12): 2576–80.
- Cilla A, Megias G, Suarez J, Ojeda E, Cabrerizo M, Arnaez J.** Human parechovirus and enterovirus in neonates: Distinct infections with overlapping features. *Early Hum Dev*. **2015**; 91(8): 475–8.
- Clementz GC, Mancini AJ.** Nail matrix arrest following hand-foot-mouth disease: a report of five children. *Pediatr Dermatol*. **2000**; 17(1): 7–11.
- Cochi SL, Freeman A, Guirguis S, Jafari H, Aylward B.** Global polio eradication initiative: lessons learned and legacy. *J Infect Dis*. **2014**; 210 Suppl 1: S540-546.
- Collett MS, Hincks JR, Benschop K, Duizer E, van der Avoort H, Rhoden E, et al.** Antiviral Activity of Pocopavir in a Randomized, Blinded, Placebo-Controlled Human Oral Poliovirus Vaccine Challenge Model. *J Infect Dis*. **2017**; 215(3): 335–43.

- Colston E, Racaniello VR.** Soluble receptor-resistant poliovirus mutants identify surface and internal capsid residues that control interaction with the cell receptor. *EMBO J.* **1994**; 13(24): 5855–62.
- Combelas N, Holmblat B, Joffret M-L, Colbère-Garapin F, Delpeyroux F.** Recombination between poliovirus and coxsackie A viruses of species C: a model of viral genetic plasticity and emergence. *Viruses.* **2011**; 3(8): 1460–84.
- Combes V, Guillemin G-J, Chan-Ling T, Hunt N-H, Grau G-E.** The crossroads of neuroinflammation in infectious diseases: endothelial cells and astrocytes. *Trends in Parasitology.* **2012**; 28(8): 311–9.
- Coyne CB, Shen L, Turner JR, Bergelson JM.** Coxsackievirus entry across epithelial tight junctions requires occludin and the small GTPases Rab34 and Rab5. *Cell Host Microbe.* **2007**; 2(3): 181–92.
- Cristanziano VD, Veronica DC, Böttcher S, Sindy B, Diedrich S, Sabine D, et al.** Detection and characterization of enteroviruses and parechoviruses in healthy people living in the South of Côte d’Ivoire. *J Clin Virol.* **2015**; 71: 40–3.
- Dagan R, Jenista JA, Prather SL, Powell KR, Menegus MA.** Viremia in hospitalized children with enterovirus infections. *J Pediatr.* **1985**; 106(3): 397–401.
- Dagan R, Menegus MA.** Replication of enteroviruses in human mononuclear cells. *Isr J Med Sci.* **1992**; 28(6): 369–72.
- Dave P, George B, Sharma DK, Das S.** Polypyrimidine tract-binding protein (PTB) and PTB-associated splicing factor in CVB3 infection: an ITAF for an ITAF. *Nucleic Acids Res.* **2017**; 45(15): 9068–84.
- De Crom SCM, Obihara CC, de Moor RA, Veldkamp EJM, van Furth AM, Rossen JWA.** Prospective comparison of the detection rates of human enterovirus and parechovirus RT-qPCR and viral culture in different pediatric specimens. *J Clin Virol.* **2013**; 58(2): 449–54.
- De Crom SCM, Rossen JWA, de Moor RA, Veldkamp EJM, van Furth AM, Obihara CC.** Prospective assessment of clinical symptoms associated with enterovirus and parechovirus genotypes in a multicenter study in Dutch children. *J Clin Virol.* **2016**; 77: 15–20.
- De Jong EP, van den Beuken MGA, van Elzakker EPM, Wolthers KC, Sprij AJ, Lopriore E, et al.** Epidemiology of Sepsis-like Illness in Young Infants: Major Role of Enterovirus and Human Parechovirus. *Pediatr Infect Dis J.* **2018**; 37(2): 113–8.
- De Ory F, Avellón A, Echevarría JE, Sánchez-Seco MP, Trallero G, Cabrerizo M, et al.** Viral infections of the central nervous system in Spain: a prospective study. *J Med Virol.* **2013**; 85(3): 554–62.
- De Palma AM, Pürstinger G, Wimmer E, Patick AK, Andries K, Rombaut B, et al.** Potential use of antiviral agents in polio eradication. *Emerging Infect Dis.* **2008**; 14(4): 545–51.
- Dierssen U, Rehren F, Henke-Gendo C, Harste G, Heim A.** Rapid routine detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid by a one-step real-time RT-PCR assay. *J Clin Virol.* **2008**; 42(1): 58–64.
- Dittmar S, Harms H, Runkler N, Maisner A, Kim K-S, Schneider-Schaulies J.** Measles virus induced block of transendothelial migration of T lymphocytes and infection-mediated virus spread across endothelial cell barriers. *Journal of Virology.* **2008**; 82(22): 11273–82.
- Domingo E, Martín V, Perales C, Escarmis C.** Coxsackieviruses and quasispecies theory: evolution of enteroviruses. *Curr Top Microbiol Immunol.* **2008**; 323: 3–32.
- Donbraye E, Olasunkanmi OI, Opabode BA, Ishola TR, Faleye TOC, Adewumi OM, et al.** Abundance of enterovirus C in RD-L20B cell culture-negative stool samples from acute flaccid paralysis cases in Nigeria is geographically defined. *J Med Microbiol.* **2018**; 67(6): 854–65.

**Eberle KE, Nguyen VT, Freistadt MS.** Low levels of poliovirus replication in primary human monocytes: possible interactions with lymphocytes. *Arch Virol.* **1995**; 140(12): 2135–50.

**European Medicines Agency** - News and Events - Expert meeting on neonatal and paediatric sepsis [Internet]. **2010**. Available from: [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/news\\_and\\_events/events/2010/12/event\\_detail\\_000393.jsp&mid=WC0b01ac058004d5c3&murl=menus/news\\_and\\_events/news\\_and\\_events.jsp](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/news_and_events/events/2010/12/event_detail_000393.jsp&mid=WC0b01ac058004d5c3&murl=menus/news_and_events/news_and_events.jsp).

**Farbu E.** Update on current and emerging treatment options for post-polio syndrome. *Ther Clin Risk Manag.* **2010**; 6: 307–13.

**Fernández-Miragall O, López de Quinto S, Martínez-Salas E.** Relevance of RNA structure for the activity of picornavirus IRES elements. *Virus Res.* **2009**; 139(2): 172–82.

**Freund MW, Kleinveld G, Krediet TG, van Loon AM, Verboon-Maciolek MA.** Prognosis for neonates with enterovirus myocarditis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* **2010**; 95(3): 206–212.

**Gamarnik AV, Andino R.** Switch from translation to RNA replication in a positive-stranded RNA virus. *Genes Dev.* **1998**; 12(15): 2293–304.

**Gan X, Zhang T.** Onychomadesis after hand-foot-and-mouth disease. *CMAJ.* **2017**; 189(7): 279.

**Garcia AG, Basso NG, Fonseca ME, Outani HN.** Congenital echo virus infection--morphological and virological study of fetal and placental tissue. *J Pathol.* **1990**; 160(2): 123–7.

**Glaser CA, Honarmand S, Anderson LJ, et al.** Beyond viruses: clinical profiles and etiologies associated with encephalitis. *Clin Infect Dis.* **2006**; 43:1565–77.

**Gmyl AP, Belousov EV, Maslova SV, Khitrina EV, Chetverin AB, Agol VI.** Nonreplicative RNA recombination in poliovirus. *J Virol.* **1999**; 73(11): 8958–65.

**Gradi A, Svitkin YV, Imataka H, Sonenberg N.** Proteolysis of human eukaryotic translation initiation factor eIF4GII, but not eIF4GI, coincides with the shutoff of host protein synthesis after poliovirus infection. *Proc Natl Acad Sci USA.* **1998**; 95(19): 11089–94.

**Halliday E, Winkelstein J, Webster ADB.** Enteroviral infections in primary immunodeficiency (PID): a survey of morbidity and mortality. *J Infect.* **2003**; 46(1): 1–8.

**Han J, Wang Y, Gan X, Song J, Sun P, Dong X-P.** Serum cytokine profiles of children with human enterovirus 71-associated hand, foot, and mouth disease. *J Med Virol.* **2014**; 86(8): 1377–85.

**Harris KG, Coyne CB.** Enter at your own risk: how enteroviruses navigate the dangerous world of pattern recognition receptor signaling. *Cytokine.* **2013**; 63(3): 230–6.

**Harvala H, Broberg E, Benschop K, Berginc N, Ladhani S, Susi P, et al.** Recommendations for enterovirus diagnostics and characterisation within and beyond Europe. *J Clin Virol.* **2018**; 101: 11–7.

**Harvala H, Griffiths M, Solomon T, Simmonds P.** Distinct systemic and central nervous system disease patterns in enterovirus and parechovirus infected children. *J Infect.* **2014**; 69(1): 69–74.

**Harvala H, Jasir A, Penttinen P, Pastore Celentano L, Greco D, Broberg E.** Surveillance and laboratory detection for non-polio enteroviruses in the European Union/European Economic Area, 2016. *Euro Surveill.* **2017**; 22(45).

**Hasebe R, Suzuki T, Makino Y, Igarashi M, Yamanouchi S, Maeda A, Horiuchi M, Sawa H, Kimura T.** Transcellular transport of West Nile virus-like particles across human endothelial cells depends on residues 156 and 159 of envelope protein. *BMC Microbiology.* **2010**; 10:165.

- Haute Autorité de Santé (HAS)** - Évaluation de la détection du génome des entérovirus dans le liquide céphalorachidien par amplification génique dans les méningites [Internet]. **2014**. Available from: [https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c\\_1739174/fr/evaluation-de-la-detection-du-genome-des-enterovirus-dans-le-liquide-cephalorachidien-par-amplification-genique-dans-les-meningites-rapport-d-evaluation](https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_1739174/fr/evaluation-de-la-detection-du-genome-des-enterovirus-dans-le-liquide-cephalorachidien-par-amplification-genique-dans-les-meningites-rapport-d-evaluation)
- Haute Autorité de Santé (HAS)** - Prise en charge de la fièvre chez l'enfant [Internet]. **2016**. Available from: [https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c\\_2674284/fr/prise-en-charge-de-la-fievre-chez-l-enfant](https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_2674284/fr/prise-en-charge-de-la-fievre-chez-l-enfant)
- Heikkilä O, Susi P, Stanway G, Hyypiä T.** Integrin alphaVbeta6 is a high-affinity receptor for coxsackievirus A9. *J Gen Virol.* **2009**; 90(Pt 1): 197–204.
- Henquell C, Mirand A, Deusebis A-L, Regagnon C, Archimbaud C, Chambon M, et al.** Prospective genotyping of human rhinoviruses in children and adults during the winter of 2009-2010. *J Clin Virol.* **2012**; 53(4): 280–4.
- Hixon AM, Yu G, Leser JS, Yagi S, Clarke P, Chiu CY, et al.** A mouse model of paralytic myelitis caused by enterovirus D68. *PLoS Pathog.* **2017**; 13(2): e1006199.
- Hogle JM.** Poliovirus cell entry: common structural themes in viral cell entry pathways. *Annu Rev Microbiol.* **2002**; 56: 677–702.
- Hogle JM, Chow M, Filman DJ.** Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution. *Science.* **1985**; 229(4720): 1358–65.
- Holm-Hansen CC, Midgley SE, Fischer TK.** Global emergence of enterovirus D68: a systematic review. *Lancet Infect Dis.* **2016**; 16(5): 64–75.
- Hu Y, Zeng G, Chu K, Zhang J, Han W, Zhang Y, et al.** Five-year immunity persistence following immunization with inactivated enterovirus 71 type (EV71) vaccine in healthy children: A further observation. *Hum Vaccin Immunother.* **2018**; 14(6): 1517–23.
- Huang W-T, Lee P-I, Chang L-Y, Kao C-L, Huang L-M, Lu C-Y, et al.** Epidemic pleurodynia caused by coxsackievirus B3 at a medical center in northern Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect.* **2010a**; 43(6): 515–8.
- Huang F-L, Chen C-H, Huang S-K, Chen P-Y.** An outbreak of enterovirus 71 in a nursery. *Scand J Infect Dis.* **2010b**; 42(8): 609–12.
- Hureaux J-M, Nicolas J-C, Agut H, Peigue-Lafeuille H.** *Traité de Virologie Médicale.* 1ère édition. ESTEM. **2003**.
- Hwang JY, Jun EJ, Seo I, Won M, Ahn J, Kim YK, et al.** Characterization of infections of human leukocytes by non-polio enteroviruses. *Intervirology.* **2012**; 55(5): 333–41.
- Hyypiä T, Auvinen P, Maaronen M.** Polymerase chain reaction for human picornaviruses. *J Gen Virol.* **1989**; 70 ( Pt 12): 3261–8.
- Ichiyama T, Maeba S, Suenaga N, Saito K, Matsubara T, Furukawa S.** Analysis of cytokine levels in cerebrospinal fluid in mumps meningitis: comparison with echovirus type 30 meningitis. *Cytokine.* **2005**; 30(5): 243–7.
- Ida-Hosonuma M, Iwasaki T, Yoshikawa T, Nagata N, Sato Y, Sata T, et al.** The alpha/beta interferon response controls tissue tropism and pathogenicity of poliovirus. *J Virol.* **2005**; 79(7): 4460–9.
- Institut de Veille Sanitaire (InVS).** Données épidémiologiques / Poliomyélite / Maladies à prévention vaccinale / Maladies infectieuses / Dossiers thématiques / Accueil [Internet]. **2016**. Available from: <http://invs.santepubliquefrance.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Maladies-a-prevention-vaccinale/Poliomyelite/Donnees-epidemiologiques>

- Israelsson S, Gullberg M, Jonsson N, Roivainen M, Edman K, Lindberg AM.** Studies of Echovirus 5 interactions with the cell surface: heparan sulfate mediates attachment to the host cell. *Virus Res.* **2010**; 151(2): 170–6.
- Jacobson MF, Baltimore D.** Morphogenesis of poliovirus. I. Association of the viral RNA with coat protein. *J Mol Biol.* **1968**; 33(2): 369–78.
- Jacques J, Moret H, Minette D, Lévêque N, Jovenin N, Deslée G, et al.** Epidemiological, molecular, and clinical features of enterovirus respiratory infections in French children between 1999 and 2005. *J Clin Microbiol.* **2008**; 46(1): 206–13.
- Jäidane H, Halouani A, Jmii H, Elmastour F, Mokni M, Aouni M.** Coxsackievirus B4 vertical transmission in a murine model. *Virology.* **2017**; 14(1): 16.
- Jarasch-Althof N, Wiesener N, Schmidtke M, Wutzler P, Henke A.** Antibody-dependent enhancement of coxsackievirus B3 infection of primary CD19+ B lymphocytes. *Viral Immunol.* **2010**; 23(4): 369–76.
- Jartti T, Lehtinen P, Vuorinen T, Osterback R, van den Hoogen B, Osterhaus ADME, et al.** Respiratory picornaviruses and respiratory syncytial virus as causative agents of acute expiratory wheezing in children. *Emerging Infect Dis.* **2004**; 10(6): 1095–101.
- Jenista JA, Powell KR, Menegus MA.** Epidemiology of neonatal enterovirus infection. *J Pediatr.* **1984**; 104(5): 685–90.
- Jorba J, Diop OM, Iber J, Henderson E, Sutter RW, Wassilak SGF, et al.** Update on Vaccine-Derived Polioviruses - Worldwide, January 2016-June 2017. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* **2017**; 66(43): 1185–91.
- Jordán I, Esteva C, Esteban E, Noguera A, García J-J, Muñoz-Almagro C.** Severe enterovirus disease in febrile neonates. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* **2009**; 27(7): 399–402.
- Jubelt B, Lipton HL.** Enterovirus/picornavirus infections. *Handb Clin Neurol.* **2014**; 123: 379–416.
- Kafasla P, Morgner N, Robinson CV, Jackson RJ.** Polypyrimidine tract-binding protein stimulates the poliovirus IRES by modulating eIF4G binding. *EMBO J.* **2010**; 29(21): 3710–22.
- Karjalainen M, Kakkonen E, Upla P, Paloranta H, Kankaanpää P, Liberali P, et al.** A Raft-derived, Pak1-regulated entry participates in alpha2beta1 integrin-dependent sorting to caveosomes. *Mol Biol Cell.* **2008**; 19(7): 2857–69.
- Karnauchow TM, Tolson DL, Harrison BA, Altman E, Lublin DM, Dimock K.** The HeLa cell receptor for enterovirus 70 is decay-accelerating factor (CD55). *J Virol.* **1996**; 70(8): 5143–52.
- Kawashima H, Ioi H, Ishii C, Hasegawa Y, Amaha M, Kashiwagi Y, et al.** Viral loads of cerebrospinal fluid in infants with enterovirus meningitis. *J Clin Lab Anal.* **2008**; 22(3): 216–9.
- Kempf BJ, Barton DJ.** Poliovirus 2A(Pro) increases viral mRNA and polysome stability coordinately in time with cleavage of eIF4G. *J Virol.* **2008a**; 82(12): 5847–59.
- Kempf BJ, Barton DJ.** Poly(rC) binding proteins and the 5' cloverleaf of uncapped poliovirus mRNA function during de novo assembly of polysomes. *J Virol.* **2008b**; 82(12): 5835–46.
- Kestenbaum LA, Ebberson J, Zorc JJ, Hodinka RL, Shah SS.** Defining Cerebrospinal Fluid White Blood Cell Count Reference Values in Neonates and Young Infants. *Pediatrics.* **2010**; 125(2): 257–64.
- Khetsuriani N, Lamonte-Fowlkes A, Oberst S, Pallansch MA, Centers for Disease Control and Prevention.** Enterovirus surveillance--United States, 1970-2005. *MMWR Surveill Summ.* **2006**; 55(8): 1–20.

- Kirkegaard K, Baltimore D.** The mechanism of RNA recombination in poliovirus. *Cell*. **1986**; 47(3): 433–43.
- Kitamura N, Semler BL, Rothberg PG, Larsen GR, Adler CJ, Dorner AJ, et al.** Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. *Nature*. **1981**; 291(5816): 547–53.
- Kok CC.** Therapeutic and prevention strategies against human enterovirus 71 infection. *World J Virol*. **2015**; 4(2): 78–95.
- Kyriakopoulou Z, Pliaka V, Amoutzias GD, Markoulatos P.** Recombination among human non-polio enteroviruses: implications for epidemiology and evolution. *Virus Genes*. **2015**; 50(2): 177–88.
- Lai JKF, Sam I-C, Chan YF.** The Autophagic Machinery in Enterovirus Infection. *Viruses*. **2016**; 8(2).
- Laitinen OH, Svedin E, Kapell S, Nurminen A, Hytönen VP, Flodström-Tullberg M.** Enteroviral proteases: structure, host interactions and pathogenicity. *Rev Med Virol*. **2016**; 26(4): 251–67.
- Lancaster KZ, Pfeiffer JK.** Limited trafficking of a neurotropic virus through inefficient retrograde axonal transport and the type I interferon response. *PLoS Pathog*. **2010**; 6(3): e1000791.
- La Rosa G, Fratini M, Della Libera S, Iaconelli M, Muscillo M.** Viral infections acquired indoors through airborne, droplet or contact transmission. *Ann Ist Super Sanita*. **2013**; 49(2): 124–32.
- Lauring AS, Frydman J, Andino R.** The role of mutational robustness in RNA virus evolution. *Nat Rev Microbiol*. **2013**; 11(5): 327–36.
- Lee S, Nguyen MT, Currier MG, Jenkins JB, Strobert EA, Kajon AE, et al.** A polyvalent inactivated rhinovirus vaccine is broadly immunogenic in rhesus macaques. *Nat Commun*. **2016**; 7: 128–38.
- Lei X, Xiao X, Wang J.** Innate Immunity Evasion by Enteroviruses: Insights into Virus-Host Interaction. *Viruses*. **2016**; 8(1).
- Lévêque N, Huguet P, Norder H, Chomel J-J.** [Enteroviruses responsible for acute hemorrhagic conjunctivitis]. *Med Mal Infect*. **2010**; 40(4): 212–8.
- Li W, Gao H-H, Zhang Q, Liu Y-J, Tao R, Cheng Y-P, et al.** Large outbreak of herpangina in children caused by enterovirus in summer of 2015 in Hangzhou, China. *Sci Rep*. **2016**; 6: 35388.
- Lim KA, Benyesh-Melnick M.** Typing of viruses by combinations of antiserum pools. Application to typing of enteroviruses (Coxsackie and ECHO). *J Immunol*. **1960**; 84: 309–17.
- Lin T-Y, Hsia S-H, Huang Y-C, Wu C-T, Chang L-Y.** Proinflammatory cytokine reactions in enterovirus 71 infections of the central nervous system. *Clin Infect Dis*. **2003a**; 36(3): 269–74.
- Lin T-Y, Kao H-T, Hsieh S-H, Huang Y-C, Chiu C-H, Chou Y-H, et al.** Neonatal enterovirus infections: emphasis on risk factors of severe and fatal infections. *Pediatr Infect Dis J*. **2003b**; 22(10): 889–94.
- Linsuwanon P, Payungporn S, Samransamruajkit R, Posuwan N, Makkoch J, Theanboonlers A, et al.** High prevalence of human rhinovirus C infection in Thai children with acute lower respiratory tract disease. *J Infect*. **2009**; 59(2): 115–21.
- Liu N-Q, Lossinsky A-S, Popik W, Li X, Gujuluva C, Kriederman B, Roberts J, Pushkarsky T, Bukrinsky M, Witte M, Weinand M, Fiala M.** Human immunodeficiency virus type 1 enters brain microvascular endothelia by macropinocytosis dependent on lipid rafts and the mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Journal of Virology*. **2002**; 76(13): 6689–700.
- Liu S-C, Lee P-I, Lee C-Y, Wang J-D, Chiang B-L, Chou M-C.** Different Cytokine Levels in Enterovirus Meningitis and Encephalitis. *Infectious Diseases in Clinical Practice*. **2005**; 13: 241–6.

- Liu Y, Wang C, Mueller S, Paul AV, Wimmer E, Jiang P.** Direct interaction between two viral proteins, the nonstructural protein 2C and the capsid protein VP3, is required for enterovirus morphogenesis. *PLoS Pathog.* **2010**; 6(8): e1001066.
- Liu Y, Sheng J, Baggen J, Meng G, Xiao C, Thibaut HJ, et al.** Sialic acid-dependent cell entry of human enterovirus D68. *Nat Commun.* **2015**; 6: 8865.
- Loring HS, Marton L, Schwerdt CE.** Electron microscopy of purified Lansing virus. *Proc Soc Exp Biol Med.* **1946**; 62(2): 291.
- Lukashev AN.** Role of recombination in evolution of enteroviruses. *Rev Med Virol.* **2005**; 15(3): 157–67.
- Lv X-Q, Qian L-H, Wu T, Yuan T-M.** Enterovirus infection in febrile neonates: A hospital-based prospective cohort study. *J Paediatr Child Health.* **2016**; 52(8): 837–41.
- Maes EF, Diop OM, Jorba J, Chavan S, Tangermann RH, Wassilak SGF.** Surveillance Systems to Track Progress Toward Polio Eradication - Worldwide, 2015-2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* **2017**; 66(13): 359–65.
- Makis A, Shipway D, Hatzimichael E, Galanakis E, Pshezhetskiy D, Chaliasos N, et al.** Cytokine and adhesion molecule expression evolves between the neutrophilic and lymphocytic phases of viral meningitis. *J Interferon Cytokine Res.* **2010**; 30(9): 661–5.
- Marlowe EM, Novak SM, Dunn JJ, Smith A, Cumpio J, Makalintal E, et al.** Performance of the GeneXpert enterovirus assay for detection of enteroviral RNA in cerebrospinal fluid. *J Clin Virol.* **2008**; 43(1): 110–3.
- Marque Juillet S, Lion M, Pilmis B, Tomini E, Dommergues M-A, Laporte S, et al.** [Value of polymerase chain reaction in serum for the diagnosis of enteroviral meningitis]. *Arch Pediatr.* **2013**; 20(6): 589–93.
- Martin JA, Messacar K, Yang ML, Maloney JA, Lindwall J, Carry T, et al.** Outcomes of Colorado children with acute flaccid myelitis at 1 year. *Neurology.* **2017**; 89(2): 129–37.
- Martin NG, Iro MA, Sadarangani M, Goldacre R, Pollard AJ, Goldacre MJ.** Hospital admissions for viral meningitis in children in England over five decades: a population-based observational study. *Lancet Infect Dis.* **2016**; 16(11): 1279–87.
- Martino TA, Petric M, Weingartl H, Bergelson JM, Opavsky MA, Richardson CD, et al.** The coxsackie-adenovirus receptor (CAR) is used by reference strains and clinical isolates representing all six serotypes of coxsackievirus group B and by swine vesicular disease virus. *Virology.* **2000**; 271(1): 99–108.
- Mathes EF, Oza V, Frieden IJ, Cordero KM, Yagi S, Howard R, et al.** ‘Eczema coxsackium’ and unusual cutaneous findings in an enterovirus outbreak. *Pediatrics.* **2013**; 132(1): e149-157.
- Mbaeyi C, Ryan MJ, Smith P, Mahamud A, Farag N, Haithami S, et al.** Response to a Large Polio Outbreak in a Setting of Conflict - Middle East, 2013-2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* **2017**; 66(8): 227–31.
- McMinn P, Stratov I, Nagarajan L, Davis S.** Neurological manifestations of enterovirus 71 infection in children during an outbreak of hand, foot, and mouth disease in Western Australia. *Clin Infect Dis.* **2001**; 32(2): 236–42.
- Melnick JL.** My role in the discovery and classification of the enteroviruses. *Annu Rev Microbiol.* **1996**; 50: 1–24.
- Mena I, Perry CM, Harkins S, Rodriguez F, Gebhard J, Whitton JL.** The role of B lymphocytes in coxsackievirus B3 infection. *Am J Pathol.* **1999**; 155(4): 1205–15.



- Mendelsohn CL, Wimmer E, Racaniello VR.** Cellular receptor for poliovirus: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. *Cell*. **1989**; 56(5): 855–65.
- Méreaux J, Picone O, Vauloup-Fellous C, Khediri Z, Benachi A, Mandelbrot L, et al.** [Enterovirus infection during pregnancy: Underestimated cause of fetal and neonatal complications?]. *Gynecol Obstet Fertil Senol*. **2017**; 45(4): 231–7.
- Messacar K, Asturias EJ, Hixon AM, Van Leer-Buter C, Niesters HGM, Tyler KL, et al.** Enterovirus D68 and acute flaccid myelitis-evaluating the evidence for causality. *Lancet Infect Dis*. **2018**; 18(8): e239–47.
- Michalicová A, Bhide K, Bhide M, Kováč A.** How viruses infiltrate the central nervous system. *Acta Virol*. **2017**; 61(4): 393–400.
- Midgley CM, Watson JT, Nix WA, Curns AT, Rogers SL, Brown BA, et al.** Severe respiratory illness associated with a nationwide outbreak of enterovirus D68 in the USA (2014): a descriptive epidemiological investigation. *Lancet Respir Med*. **2015**; 3(11): 879–87.
- Mirand A, Henquell C, Archimbaud C, Ughetto S, Antona D, Bailly J-L, et al.** Outbreak of hand, foot and mouth disease/herpangina associated with coxsackievirus A6 and A10 infections in 2010, France: a large citywide, prospective observational study. *Clin Microbiol Infect*. **2012**; 18(5): 110–118.
- Mirand A, Bailly J-L, Peigue-Lafeuille H, Henquell C.** Entérovirus D68 : un virus à haut potentiel pathogène et épidémique. *Virologie*. **2018**; 22(1): 41–53.
- Mirand A, Henquell C, Archimbaud C, Chambon M, Charbonne F, Peigue-Lafeuille H, et al.** Prospective identification of enteroviruses involved in meningitis in 2006 through direct genotyping in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol*. **2008**; 46(1): 87–96.
- Mirand A, le Sage FV, Pereira B, Cohen R, Levy C, Archimbaud C, et al.** Ambulatory Pediatric Surveillance of Hand, Foot and Mouth Disease as Signal of an Outbreak of Coxsackievirus A6 Infections, France, 2014–2015. *Emerging Infect Dis*. **2016**; 22(11): 1884–93.
- Mizutani T, Ishizaka A, Nihei C-I.** Transferrin Receptor 1 Facilitates Poliovirus Permeation of Mouse Brain Capillary Endothelial Cells. *J Biol Chem*. **2016**; 291(6):2829–36.
- Modlin JF.** Perinatal echovirus infection: insights from a literature review of 61 cases of serious infection and 16 outbreaks in nurseries. *Rev Infect Dis*. **1986**; 8(6): 918–26.
- Mohanty MC, Madkaikar MR, Desai M, Taur P, Nalavade UP, Sharma DK, et al.** Poliovirus Excretion in Children with Primary Immunodeficiency Disorders, India. *Emerging Infect Dis*. **2017**; 23(10): 1664–70.
- Molet L, Saloum K, Marque-Juillet S, Garbarg-Chenon A, Henquell C, Schuffenecker I, et al.** Enterovirus infections in hospitals of Ile de France region over 2013. *J Clin Virol*. **2016**; 74: 37–42.
- Monpoeho S, Coste-Burel M, Costa-Mattioli M, Besse B, Chomel JJ, Billaudel S, et al.** Application of a real-time polymerase chain reaction with internal positive control for detection and quantification of enterovirus in cerebrospinal fluid. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. **2002**; 21(7): 532–6.
- Moscufo N, Chow M.** Myristate-protein interactions in poliovirus: interactions of VP4 threonine 28 contribute to the structural conformation of assembly intermediates and the stability of assembled virions. *J Virol*. **1992**; 66(12): 6849–57.
- Neufeld KL, Richards OC, Ehrenfeld E.** Purification, characterization, and comparison of poliovirus RNA polymerase from native and recombinant sources. *J Biol Chem*. **1991**; 266(35): 24212–9.
- Newcombe NG, Andersson P, Johansson ES, Au GG, Lindberg AM, Barry RD, et al.** Cellular receptor interactions of C-cluster human group A coxsackieviruses. *J Gen Virol*. **2003**; 84(Pt 11): 3041–50.

- Nilsson EC, Jamshidi F, Johansson SMC, Oberste MS, Arnberg N.** Sialic acid is a cellular receptor for coxsackievirus A24 variant, an emerging virus with pandemic potential. *J Virol.* **2008**; 82(6): 3061–8.
- Nishimura Y, Shimizu H.** Cellular receptors for human enterovirus species a. *Front Microbiol.* **2012**; 3: 105.
- Nix WA, Maher K, Pallansch MA, Oberste MS.** Parechovirus typing in clinical specimens by nested or semi-nested PCR coupled with sequencing. *J Clin Virol.* **2010**; 48(3): 202–7.
- Nix WA, Oberste MS, Pallansch MA.** Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens. *J Clin Microbiol.* **2006**; 44(8): 2698–704.
- Nokhbeh MR, Hazra S, Alexander DA, Khan A, McAllister M, Suuronen EJ, et al.** Enterovirus 70 binds to different glycoconjugates containing alpha2,3-linked sialic acid on different cell lines. *J Virol.* **2005**; 79(11): 7087–94.
- Novak JE, Kirkegaard K.** Improved method for detecting poliovirus negative strands used to demonstrate specificity of positive-strand encapsidation and the ratio of positive to negative strands in infected cells. *J Virol.* **1991**; 65(6): 3384–7.
- Nugent CI, Johnson KL, Sarnow P, Kirkegaard K.** Functional coupling between replication and packaging of poliovirus replicon RNA. *J Virol.* **1999**; 73(1): 427–35.
- Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Flemister MR, Brown BA, Pallansch MA.** Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. *J Clin Microbiol.* **1999**; 37(5): 1288–93.
- Ohka S, Nihei C-I, Yamazaki M, Nomoto A.** Poliovirus trafficking toward central nervous system via human poliovirus receptor-dependent and -independent pathway. *Front Microbiol.* **2012**; 3: 147.
- Olijve L, Jennings L, Walls T.** Human Parechovirus: an Increasingly Recognized Cause of Sepsis-Like Illness in Young Infants. *Clin Microbiol Rev.* **2018**; 31(1).
- Ooi MH, Wong SC, Lewthwaite P, Cardoso MJ, Solomon T.** Clinical features, diagnosis, and management of enterovirus 71. *Lancet Neurol.* **2010**; 9(11): 1097–105.
- Organisation Mondiale de la Santé (OMS).** Rapport 2015 sur les progrès en matière d'assainissement et d'alimentation en eau: les principaux faits [Internet]. **2015.** Available from: [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/monitoring/jmp-2015-key-facts/fr/](http://www.who.int/water_sanitation_health/monitoring/jmp-2015-key-facts/fr/)
- Paananen A, Ylipaasto P, Rieder E, Hovi T, Galama J, Roivainen M.** Molecular and biological analysis of echovirus 9 strain isolated from a diabetic child. *J Med Virol.* **2003**; 69(4): 529–37.
- Palacios G, Oberste MS.** Enteroviruses as agents of emerging infectious diseases. *J Neurovirol.* **2005**; 11(5): 424–33.
- Palacios T, Bartelt L, Scheld W, Lopes MB, Kelting SM, Holland S, et al.** Fatal Coxsackie meningoencephalitis in a patient with B-cell lymphopenia and hypogammaglobulinemia following rituximab therapy. *Ann Allergy Asthma Immunol.* **2015**; 115(2): 148–50.
- Pallansch MA, Oberste MS, Whitton JL.** Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses, and Newer Enteroviruses. In: *Fields Virology*. 6<sup>th</sup> edition. **2013**. p. 490–530.
- Palmenberg AC.** In vitro synthesis and assembly of picornaviral capsid intermediate structures. *J Virol.* **1982**; 44(3): 900–6.
- Paul AV, van Boom JH, Filippov D, Wimmer E.** Protein-primed RNA synthesis by purified poliovirus RNA polymerase. *Nature.* **1998**; 393(6682): 280–4.

- Peigue-Lafeuille H, Mirand A, Bailly J-L, Henquell C.** Entérovirus et parechovirus. [Internet]. **2016**. Available from: <http://www.em-consulte.com/en/article/1078996>
- Pelkmans L, Helenius A.** Insider information: what viruses tell us about endocytosis. *Curr Opin Cell Biol.* **2003**; 15(4): 414–22.
- Pelletier J, Sonenberg N.** Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature.* **1988**; 334(6180): 320–5.
- Pilipenko EV, Poperechny KV, Maslova SV, Melchers WJ, Slot HJ, Agol VI.** Cis-element, oriR, involved in the initiation of (-) strand poliovirus RNA: a quasi-globular multi-domain RNA structure maintained by tertiary ('kissing') interactions. *EMBO J.* **1996**; 15(19): 5428–36.
- Piralla A, Mariani B, Stronati M, Marone P, Baldanti F.** Human enterovirus and parechovirus infections in newborns with sepsis-like illness and neurological disorders. *Early Hum Dev.* **2014**; 90 Suppl 1: S75-77.
- Platt LR, Estívariz CF, Sutter RW.** Vaccine-associated paralytic poliomyelitis: a review of the epidemiology and estimation of the global burden. *J Infect Dis.* **2014**; 210 Suppl 1: S380-389.
- Plevka P, Perera R, Cardoso J, Kuhn RJ, Rossmann MG.** Crystal structure of human enterovirus 71. *Science.* **2012**; 336(6086): 1274.
- Poller W, Kühl U, Tschoepe C, Pauschinger M, Fechner H, Schultheiss H-P.** Genome-environment interactions in the molecular pathogenesis of dilated cardiomyopathy. *J Mol Med.* **2005**; 83(8): 579–86.
- Pons-Salort M, Parker EPK, Grassly NC.** The epidemiology of non-polio enteroviruses: recent advances and outstanding questions. *Curr Opin Infect Dis.* **2015**; 28(5): 479–87.
- Popiel M, Perlejewski K, Bednarska A, Dzieciatkowski T, Paciorek M, Lipowski D, et al.** Viral etiologies in adult patients with encephalitis in Poland: A prospective single center study. *PLoS ONE.* **2017**; 12(6): e0178481.
- Powell RM, Schmitt V, Ward T, Goodfellow I, Evans DJ, Almond JW.** Characterization of echoviruses that bind decay accelerating factor (CD55): evidence that some haemagglutinating strains use more than one cellular receptor. *J Gen Virol.* **1998**; 79 ( Pt 7): 1707–13.
- Prim N, Rodríguez G, Margall N, Del Cuerpo M, Trallero G, Rabella N.** Combining cell lines to optimize isolation of human enterovirus from clinical specimens: report of 25 years of experience. *J Med Virol.* **2013**; 85(1): 116–20.
- Quartier P, Debré M, De Blic J, de Sauverzac R, Sayegh N, Jabado N, et al.** Early and prolonged intravenous immunoglobulin replacement therapy in childhood agammaglobulinemia: a retrospective survey of 31 patients. *J Pediatr.* **1999**; 134(5): 589–96.
- Racaniello VR.** One hundred years of poliovirus pathogenesis. *Virology.* **2006**; 344(1): 9–16.
- Racaniello VR.** Picornaviridae: The Viruses and Their Replication. In: *Fields Virology.* 6<sup>th</sup> edition. **2013.** p. 453–89.
- Renois F, Bouin A, Wehbe M, Leveque N, Androletti L.** Infections persistantes à entérovirus et pathologies humaines. *Virologie.* **2014**; 18(6): 306–24.
- Rittichier KR, Bryan PA, Bassett KE, Taggart EW, Enriquez FR, Hillyard DR, et al.** Diagnosis and outcomes of enterovirus infections in young infants. *Pediatr Infect Dis J.* **2005**; 24(6): 546–50.
- Robinson SM, Tsueng G, Sin J, Mangale V, Rahawi S, McIntyre LL, et al.** Coxsackievirus B exits the host cell in shed microvesicles displaying autophagosomal markers. *PLoS Pathog.* **2014**; 10(4): e1004045.

- Rossmann MG, He Y, Kuhn RJ.** Picornavirus-receptor interactions. *Trends Microbiol.* **2002**; 10(7): 324–31.
- Rotbart HA, McCracken GH, Whitley RJ, Modlin JF, Cascino M, Shah S, et al.** Clinical significance of enteroviruses in serious summer febrile illnesses of children. *Pediatr Infect Dis J.* **1999**; 18(10): 869–74.
- Rotbart HA, Webster AD, Pleconaril Treatment Registry Group.** Treatment of potentially life-threatening enterovirus infections with pleconaril. *Clin Infect Dis.* **2001**; 32(2): 228–35.
- Rotbart HA.** Enzymatic RNA amplification of the enteroviruses. *J Clin Microbiol.* **1990**; 28(3): 438–42.
- Rotbart HA.** Viral meningitis. *Semin Neurol.* **2000**; 20(3): 277–92.
- Royston L, Tapparel C.** Rhinoviruses and Respiratory Enteroviruses: Not as Simple as ABC. *Viruses.* **2016**; 8(1).
- Sabin AB.** Pathogenesis of poliomyelitis; reappraisal in the light of new data. *Science.* **1956**; 123(3209): 1151–7.
- Sabin AB.** Present position of immunization against poliomyelitis with live virus vaccines. *Br Med J.* **1959**; 1(5123): 663–80.
- Saijets S, Ylipaasto P, Vaarala O, Hovi T, Roivainen M.** Enterovirus infection and activation of human umbilical vein endothelial cells. *J Med Virol.* **2003**; 70(3): 430–9.
- Salk JE, Krech U, Youngner JS, Bennett BL, Lewis LJ, Bazeley PL.** Formaldehyde Treatment and Safety Testing of Experimental Poliomyelitis Vaccines. *Am J Public Health Nations Health.* **1954**; 44(5): 563–70.
- Salur L, Oikarinen S, Tauriainen S, Mandel M, Hyöty H, Uibo R.** Enterovirus infections in young infants: are children still protected by maternal antibodies? *Hum Vaccin.* **2011**; 7(9): 966–71.
- Sato M, Hosoya M, Honzumi K, Watanabe M, Ninomiya N, Shigeta S, et al.** Cytokine and cellular inflammatory sequence in enteroviral meningitis. *Pediatrics.* **2003**; 112(5): 1103–7.
- 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.* **2002**; 83(Pt 2): 333–40.
- Schuffenecker I, Javouhey E, Gillet Y, Kugener B, Billaud G, Floret D, et al.** Human parechovirus infections, Lyon, France, 2008–10: evidence for severe cases. *J Clin Virol.* **2012**; 54(4): 337–41.
- Schuffenecker I, Josset L, Lina B, Mirand A, Peigue-Lafeuille H, Henquell C.** Centre National de Référence Des Entérovirus et Parechovirus - Rapport d'activités 2017 [Internet]. **2018.** Available from: <https://cnr.chu-clermontferrand.fr/CNR/Pages/Activit%C3%A9CNR.aspx>
- Schuffenecker I, Mirand A, Josset L, Henquell C, Hecquet D, Pilorgé L, et al.** Epidemiological and clinical characteristics of patients infected with enterovirus D68, France, July to December 2014. *Euro Surveill.* **2016**; 21(19).
- Sedmak G, Bina D, MacDonald J.** Assessment of an enterovirus sewage surveillance system by comparison of clinical isolates with sewage isolates from milwaukee, wisconsin, collected august 1994 to december 2002. *Appl Environ Microbiol.* **2003**; 69(12): 7181–7.
- Senior K.** FDA panel rejects common cold treatment. *Lancet Infect Dis.* **2002**; 2(5): 264.
- Shafren DR, Dorahy DJ, Ingham RA, Burns GF, Barry RD.** Coxsackievirus A21 binds to decay-accelerating factor but requires intercellular adhesion molecule 1 for cell entry. *J Virol.* **1997**; 71(6): 4736–43.
- Shang W, Qian S, Fang L, Han Y, Zheng C.** Association study of inflammatory cytokine and chemokine expression in hand foot and mouth disease. *Oncotarget.* **2017**; 8(45): 79425–32.

- Shao P, Wu X, Li H, Wu Z, Yang Z, Yao H.** Clinical significance of inflammatory cytokine and chemokine expression in hand, foot and mouth disease. *Mol Med Rep.* **2017**; 15(5): 2859–66.
- Sharp J, Harrison CJ, Puckett K, Selvaraju SB, Penaranda S, Nix WA, et al.** Characteristics of young infants in whom human parechovirus, enterovirus or neither were detected in cerebrospinal fluid during sepsis evaluations. *Pediatr Infect Dis J.* **2013**; 32(3): 213–6.
- Shukla D, Kumar A, Srivastava S, Idris MZ, Dhole TN.** Environmental surveillance of enterovirus in Northern India using an integrated shell vial culture with a semi-nested RT PCR and partial sequencing of the VP1 gene. *J Med Virol.* **2013**; 85(3): 505–11.
- Shulman LM, Gavrillin E, Jorba J, Martin J, Burns CC, Manor Y, et al.** Molecular epidemiology of silent introduction and sustained transmission of wild poliovirus type 1, Israel, 2013. *Euro Surveill.* **2014**; 19(7): 20709.
- Silvestri LS, Parilla JM, Morasco BJ, Ogram SA, Flanagan JB.** Relationship between poliovirus negative-strand RNA synthesis and the length of the 3' poly(A) tail. *Virology.* **2006**; 345(2): 509–19.
- Sin J, Mangale V, Thienphrapa W, Gottlieb RA, Feuer R.** Recent progress in understanding coxsackievirus replication, dissemination, and pathogenesis. *Virology.* **2015**; 484: 288-304.
- Smee DF, Evans WJ, Nicolaou KC, Tarbet EB, Day CW.** Susceptibilities of enterovirus D68, enterovirus 71, and rhinovirus 87 strains to various antiviral compounds. *Antiviral Res.* **2016**; 131: 61–5.
- Solomon T, Lewthwaite P, Perera D, Cardoso MJ, McMinn P, Ooi MH.** Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of enterovirus 71. *Lancet Infect Dis.* **2010**; 10(11): 778–90.
- Spindler K-R, Hsu T-H.** Viral disruption of the blood-brain barrier. *Trends in Microbiology.* **2012**; 20(6): 282-90.
- Sulik A, Kroten A, Wojtkowska M, Oldak E.** Increased levels of cytokines in cerebrospinal fluid of children with aseptic meningitis caused by mumps virus and echovirus 30. *Scand J Immunol.* **2014**; 79(1): 68–72.
- Sun D, Chen S, Cheng A, Wang M.** Roles of the Picornaviral 3C Proteinase in the Viral Life Cycle and Host Cells. *Viruses.* **2016**; 8(3): 82.
- Suresh S, Forgie S, Robinson J.** Non-polio Enterovirus detection with acute flaccid paralysis: A systematic review. *J Med Virol.* **2018**; 90(1): 3–7.
- Tan CW, Poh CL, Sam I-C, Chan YF.** Enterovirus 71 uses cell surface heparan sulfate glycosaminoglycan as an attachment receptor. *J Virol.* **2013**; 87(1): 611–20.
- Tan EL, Yong LLG, Quak SH, Yeo WCA, Chow VTK, Poh CL.** Rapid detection of enterovirus 71 by real-time TaqMan RT-PCR. *J Clin Virol.* **2008**; 42(2): 203–6.
- Terwee CB, Bot SDM, de Boer MR, van der Windt DAWM, Knol DL, Dekker J, et al.** Quality criteria were proposed for measurement properties of health status questionnaires. *J Clin Epidemiol.* **2007**; 60(1): 34–42.
- Thibaut HJ, De Palma AM, Neyts J.** Combating enterovirus replication: state-of-the-art on antiviral research. *Biochem Pharmacol.* **2012**; 83(2): 185–92.
- Thibaut HJ, van der Linden L, Jiang P, Thys B, Canela M-D, Aguado L, et al.** Binding of glutathione to enterovirus capsids is essential for virion morphogenesis. *PLoS Pathog.* **2014**; 10(4): e1004039.
- Too IHK, Yeo H, Sessions OM, Yan B, Libau EA, Howe JLC, et al.** Enterovirus 71 infection of motor neuron-like NSC-34 cells undergoes a non-lytic exit pathway. *Sci Rep.* **2016**; 6: 36983.

- Torres-Torres S, Myers AL, Klatte JM, Rhoden EE, Oberste MS, Collett MS, et al.** First use of investigational antiviral drug pocapavir (v-073) for treating neonatal enteroviral sepsis. *Pediatr Infect Dis J.* **2015**; 34(1): 52–4.
- Trabelsi A, Grattard F, Nejmeddine M, Aouni M, Bourlet T, Pozzetto B.** Evaluation of an enterovirus group-specific anti-VP1 monoclonal antibody, 5-D8/1, in comparison with neutralization and PCR for rapid identification of enteroviruses in cell culture. *J Clin Microbiol.* **1995**; 33(9): 2454–7.
- Tsai J-D, Tsai HJ, Lin T-H, Chang Y-Y, Yang S-H, Kuo H-T.** Comparison of the detection rates of RT-PCR and virus culture using a combination of specimens from multiple sites for enterovirus-associated encephalomyelitis during enterovirus 71 epidemic. *Jpn J Infect Dis.* **2014**; 67(5): 333–8.
- Van der Schaar HM, Dorobantu CM, Albuлесcu L, Strating JRPM, van Kuppeveld FJM.** Fat(al) attraction: Picornaviruses Usurp Lipid Transfer at Membrane Contact Sites to Create Replication Organelles. *Trends Microbiol.* **2016**; 24(7): 535–46.
- Van Doornum GJJ, Schutten M, Voermans J, Guldemeester GJJ, Niesters HGM.** Development and implementation of real-time nucleic acid amplification for the detection of enterovirus infections in comparison to rapid culture of various clinical specimens. *J Med Virol.* **2007**; 79(12): 1868–76.
- Van Haren K, Ayscue P, Waubant E, Clayton A, Sheriff H, Yagi S, et al.** Acute Flaccid Myelitis of Unknown Etiology in California, 2012–2015. *JAMA.* **2015**; 314(24): 2663–71.
- Van Kuppeveld FJ, Hoenderop JG, Smeets RL, Willems PH, Dijkman HB, Galama JM, et al.** Coxsackievirus protein 2B modifies endoplasmic reticulum membrane and plasma membrane permeability and facilitates virus release. *EMBO J.* **1997**; 16(12): 3519–32.
- Venkatesan A, Tunkel AR, Bloch KC, Lauring AS, Sejvar J, Bitnun A, et al.** Case definitions, diagnostic algorithms, and priorities in encephalitis: consensus statement of the international encephalitis consortium. *Clin Infect Dis.* **2013**; 57(8): 1114–28.
- Verboon-Maciolet MA, Groenendaal F, Cowan F, Govaert P, van Loon AM, de Vries LS.** White matter damage in neonatal enterovirus meningoencephalitis. *Neurology.* **2006**; 66(8): 1267–9.
- Verboon-Maciolet MA, Krediet TG, Gerards LJ, de Vries LS, Groenendaal F, van Loon AM.** Severe neonatal parechovirus infection and similarity with enterovirus infection. *Pediatr Infect Dis J.* **2008**; 27(3): 241–5.
- Verma S, Lo Y, Chapagain M, Lum S, Kumar M, Gurjav U, Luo H, Nakatsuka A, Nerurkar V-R.** West Nile virus infection modulates human brain microvascular endothelial cells tight junction proteins and cell adhesion molecules: Transmigration across the in vitro blood-brain barrier. *Virology.* **2009**; 385(2): 425–33.
- Virgen-Slane R, Rozovics JM, Fitzgerald KD, Ngo T, Chou W, van der Heden van Noort GJ, et al.** An RNA virus hijacks an incognito function of a DNA repair enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA.* **2012**; 109(36): 14634–9.
- Vogt DA, Andino R.** An RNA element at the 5'-end of the poliovirus genome functions as a general promoter for RNA synthesis. *PLoS Pathog.* **2010**; 6(6): e1000936.
- Volle R, Archimbaud C, Couraud P-O, Romero IA, Weksler B, Mirand A, et al.** Differential permissivity of human cerebrovascular endothelial cells to enterovirus infection and specificities of serotype EV-A71 in crossing an in vitro model of the human blood-brain barrier. *J Gen Virol.* **2015**; 96(Pt 7): 1682–95.
- Volle R, Bailly J-L, Mirand A, Pereira B, Marque-Juillet S, Chambon M, et al.** Variations in cerebrospinal fluid viral loads among enterovirus genotypes in patients hospitalized with laboratory-confirmed meningitis due to enterovirus. *J Infect Dis.* **2014**; 210(4): 576–84.

- Volle R, Nourrisson C, Mirand A, Regagnon C, Chambon M, Henquell C, et al.** Quantitative real-time RT-PCR assay for research studies on enterovirus infections in the central nervous system. *J Virol Methods*. **2012**; 185(1): 142–8.
- Vuorinen T, Vainionpää R, Heino J, Hyypiä T.** Enterovirus receptors and virus replication in human leukocytes. *J Gen Virol*. **1999**; 80 ( Pt 4): 921–7.
- Wadia NH, Wadia PN, Katrak SM, Misra VP.** A study of the neurological disorder associated with acute haemorrhagic conjunctivitis due to enterovirus 70. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. **1983**; 46(7): 599–610.
- Wang C, Jiang P, Sand C, Paul AV, Wimmer E.** Alanine scanning of poliovirus 2CATPase reveals new genetic evidence that capsid protein/2CATPase interactions are essential for morphogenesis. *J Virol*. **2012**; 86(18): 9964–75.
- Wang S-M, Lei H-Y, Yu C-K, Wang J-R, Su I-J, Liu C-C.** Acute chemokine response in the blood and cerebrospinal fluid of children with enterovirus 71-associated brainstem encephalitis. *J Infect Dis*. **2008a**; 198(7): 1002–6.
- Wang S-M, Ho T-S, Shen C-F, Liu C-C.** Enterovirus 71, one virus and many stories. *Pediatr Neonatol*. **2008b**; 49(4): 113–5.
- Wang S-M, Lei H-Y, Huang M-C, Su L-Y, Lin H-C, Yu C-K, et al.** Modulation of cytokine production by intravenous immunoglobulin in patients with enterovirus 71-associated brainstem encephalitis. *J Clin Virol*. **2006**; 37(1): 47–52.
- Wang S-M.** Milrinone in Enterovirus 71 Brain Stem Encephalitis. *Front Pharmacol*. **2016**; 7: 82.
- Wang S-M, Lei H-Y, Su L-Y, Wu J-M, Yu C-K, Wang J-R, et al.** Cerebrospinal fluid cytokines in enterovirus 71 brain stem encephalitis and echovirus meningitis infections of varying severity. *Clin Microbiol Infect*. **2007**; 13(7): 677–82.
- Ward CD, Stokes MA, Flanagan JB.** Direct measurement of the poliovirus RNA polymerase error frequency in vitro. *J Virol*. **1988**; 62(2): 558–62.
- Wei M, Meng F, Wang S, Li J, Zhang Y, Mao Q, et al.** 2-Year Efficacy, Immunogenicity, and Safety of Vigoo Enterovirus 71 Vaccine in Healthy Chinese Children: A Randomized Open-Label Study. *J Infect Dis*. **2017**; 215(1): 56–63.
- Wei W, Guo H, Chang J, Yu Y, Liu G, Zhang N, et al.** ICAM-5/Telencephalin Is a Functional Entry Receptor for Enterovirus D68. *Cell Host Microbe*. **2016**; 20(5): 631–41.
- Welch J, Maclaran K, Jordan T, Simmonds P.** Frequency, viral loads, and serotype identification of enterovirus infections in Scottish blood donors. *Transfusion*. **2003**; 43(8): 1060–6.
- Weng Y, Chen W, He W, Huang M, Zhu Y, Yan Y.** Serotyping and Genetic Characterization of Hand, Foot, and Mouth Disease (HFMD)-Associated Enteroviruses of No-EV71 and Non-CVA16 Circulating in Fujian, China, 2011-2015. *Med Sci Monit*. **2017**; 23: 2508–18.
- Wieczorek M, Kuryk Ł, Witek A, Diuwe A, Litwińska B.** The detection of enteroviruses in sewage using Caco-2 cells. *Pol J Microbiol*. **2013**; 62(1): 97–100.
- Wood DJ, Hull B.** L20B cells simplify culture of polioviruses from clinical samples. *J Med Virol*. **1999**; 58(2): 188–92.
- World Health Organization.** Polio Eradication & Endgame Strategic Plan 2013-2018 [Internet]. **2013**. Available from: <http://polioeradication.org/who-we-are/strategy/>

**World Health Organization.** Poliomyélite [Internet]. **2018.** Available from: <http://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/poliomyelitis>

**World Health Organization and Regional Office for Europe.** Enterovirus surveillance guidelines. Guidelines for enterovirus surveillance in support of the Polio Eradication Initiative [Internet]. **2015.** Available from: [http://www.euro.who.int/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0020/272810/EnterovirusSurveillanceGuidelines.pdf?ua=1](http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0020/272810/EnterovirusSurveillanceGuidelines.pdf?ua=1)

**World Health Organization-Western Pacific Region.** A Guide to Clinical Management and Public Health Response for Hand, Foot and Mouth Disease (HFMD) [Internet]. **2011.** Available from: <http://www.wpro.who.int/publications/docs/guidancefortheclinicalmanagementofhfmd.pdf?ua=1>

**World Health Organization-Western Pacific Region.** Hand, Foot and Mouth Disease (HFMD) [Internet]. **2018.** Available from: [http://www.wpro.who.int/emerging\\_diseases/HFMD/en/](http://www.wpro.who.int/emerging_diseases/HFMD/en/)

**Wu C-Y, Wang H-C, Wang K-T, Weng S-C, Chang W-H, Shih DY-C, et al.** Neutralization of five subgenotypes of Enterovirus 71 by Taiwanese human plasma and Taiwanese plasma derived intravenous immunoglobulin. *Biologicals.* **2013;** 41(3): 154–7.

**Wu Q, Fu X, Jiang L, Yang R, Cun J, Zhou X, et al.** Prevalence of enteroviruses in healthy populations and excretion of pathogens in patients with hand, foot, and mouth disease in a highly endemic area of southwest China. *PLoS ONE.* **2017;** 12(7): e0181234.

**Xing J, Liu D, Shen S, Su Z, Zhang L, Duan Y, et al.** Pathologic Studies of Fatal Encephalomyelitis in Children Caused by Enterovirus 71. *Am J Clin Pathol.* **2016;** 146(1): 95–106.

**Yamayoshi S, Iizuka S, Yamashita T, Minagawa H, Mizuta K, Okamoto M, et al.** Human SCARB2-dependent infection by coxsackievirus A7, A14, and A16 and enterovirus 71. *J Virol.* **2012;** 86(10): 5686–96.

**Yamayoshi S, Ohka S, Fujii K, Koike S.** Functional comparison of SCARB2 and PSGL1 as receptors for enterovirus 71. *J Virol.* **2013;** 87(6): 3335–47.

**Yang B, Chuang H, Yang KD.** Sialylated glycans as receptor and inhibitor of enterovirus 71 infection to DLD-1 intestinal cells. *Virology.* **2009;** 6: 141.

**Yang S-L, Chou Y-T, Wu C-N, Ho M-S.** Annexin II binds to capsid protein VP1 of enterovirus 71 and enhances viral infectivity. *J Virol.* **2011;** 85(22): 11809–20.

**Yang WX, Terasaki T, Shiroki K, Ohka S, Aoki J, Tanabe S, et al.** Efficient delivery of circulating poliovirus to the central nervous system independently of poliovirus receptor. *Virology.* **1997;** 229(2): 421–8.

**Ye N, Gong X, Pang L, Gao W, Zhang Y, Li X, et al.** Cytokine responses and correlations thereof with clinical profiles in children with enterovirus 71 infections. *BMC Infect Dis.* **2015;** 15: 225.

**Yee PTI, Laa Poh C.** Impact of genetic changes, pathogenicity and antigenicity on Enterovirus- A71 vaccine development. *Virology.* **2017;** 506: 121–9.

**Yen M-H, Huang Y-C, Chen M-C, Liu C-C, Chiu N-C, Lien R, et al.** Effect of intravenous immunoglobulin for neonates with severe enteroviral infections with emphasis on the timing of administration. *J Clin Virol.* **2015;** 64: 92–6.

**Yen M-H, Tsao K-C, Huang Y-C, Huang C-G, Huang Y-L, Lin R, et al.** Viral load in blood is correlated with disease severity of neonatal coxsackievirus B3 infection: early diagnosis and predicting disease severity is possible in severe neonatal enterovirus infection. *Clin Infect Dis.* **2007;** 44(10): 78-81.

**Yeung W-CG, Rawlinson WD, Craig ME.** Enterovirus infection and type 1 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis of observational molecular studies. *BMJ.* **2011;** 342: d35.



- Ylipaasto P, Eskelinen M, Salmela K, Hovi T, Roivainen M.** Vitronectin receptors, alpha v integrins, are recognized by several non-RGD-containing echoviruses in a continuous laboratory cell line and also in primary human Langerhans' islets and endothelial cells. *J Gen Virol.* **2010**; 91(Pt 1): 155–65.
- Ypma-Wong MF, Dewalt PG, Johnson VH, Lamb JG, Semler BL.** Protein 3CD is the major poliovirus proteinase responsible for cleavage of the P1 capsid precursor. *Virology.* **1988**; 166(1): 265–70.
- Zanone MM, Favaro E, Conaldi PG, Greening J, Bottelli A, Perin PC, et al.** Persistent infection of human microvascular endothelial cells by coxsackie B viruses induces increased expression of adhesion molecules. *J Immunol.* **2003**; 171(1): 438–46.
- Zautner AE, Jahn B, Hammerschmidt E, Wutzler P, Schmidtke M.** N- and 6-O-sulfated heparan sulfates mediate internalization of coxsackievirus B3 variant PD into CHO-K1 cells. *J Virol.* **2006**; 80(13): 6629–36.
- Zell R, Delwart E, Gorbalenya AE, Hovi T, King AMQ, Knowles NJ, et al.** ICTV Virus Taxonomy Profile: Picornaviridae. *J Gen Virol.* **2017**; 98(10): 2421–2.
- Zell R.** Picornaviridae-the ever-growing virus family. *Arch Virol.* **2018**; 163(2): 299–317.
- Zhang S-Y, Xu M-Y, Xu H-M, Li X-J, Ding S-J, Wang X-J, et al.** Immunologic Characterization of Cytokine Responses to Enterovirus 71 and Coxsackievirus A16 Infection in Children. *Medicine (Baltimore).* **2015**; 94(27): e1137.
- Zhang W, Dai W, Zhang C, Zhou Y, Xiong P, Wang S, et al.** A virus-like particle-based tetravalent vaccine for hand, foot, and mouth disease elicits broad and balanced protective immunity. *Emerg Microbes Infect.* **2018**; 7(1): 94.
- Zhang Y, Liu H, Wang L, Yang F, Hu Y, Ren X, et al.** Comparative study of the cytokine/chemokine response in children with differing disease severity in enterovirus 71-induced hand, foot, and mouth disease. *PLoS ONE.* **2013**; 8(6): e67430.
- Zhang Y-F, Deng H-L, Fu J, Zhang Y, Wei J-Q.** Pancreatitis in hand-foot-and-mouth disease caused by enterovirus 71. *World J Gastroenterol.* **2016a**; 22(6): 2149–52.
- Zhang Y, Sun Q, Cui H, Yan D, Fan Q, Song Y, et al.** Circulation of multiple serotypes of highly divergent enterovirus C in the Xinjiang Uighur Autonomous Region of China. *Sci Rep.* **2016b**; 6: 33595.
- Zheng X-Y, Xu Y-J, Guan W-J, Lin L-F.** Regional, age and respiratory-secretion-specific prevalence of respiratory viruses associated with asthma exacerbation: a literature review. *Arch Virol.* **2018**; 163(4): 845–53.
- Zhuge J, Vail E, Bush JL, Singelakis L, Huang W, Nolan SM, et al.** Evaluation of a Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay for Detection of Enterovirus D68 in Clinical Samples from an Outbreak in New York State in 2014. *J Clin Microbiol.* **2015**; 53(6): 1915–20.
- Zoll J, Heus HA, van Kuppeveld FJM, Melchers WJG.** The structure-function relationship of the enterovirus 3'-UTR. *Virus Res.* **2009**; 139(2): 209–16.

# **Annexes**

# Annexe I



## NOTICE D'INFORMATION ET DE NON-OPPOSITION À LA CONSERVATION ET À L'UTILISATION D'ÉCHANTILLONS BIOLOGIQUES À FINALITÉ SCIENTIFIQUE DESTINÉE AUX TITULAIRES DE L'AUTORITÉ PARENTALE

Version v2 18 03 2015

### **Etude BLEDI\* : Intérêt de la détection génomique des entérovirus dans le sang d'enfants admis à l'hôpital pour suspicion d'infection méningée, de fièvre isolée ou de sepsis**

**Coordonnateur de la recherche :** Pr. André Labbé, Service de Pédiatrie, Hôpital Estaing, place Lucie et Raymond Aubrac, 63100 Clermont-Ferrand

**Coordonnateur de la collection biologique :** Dr Christine Archimbaud, Laboratoire de Virologie, CNR Entérovirus/Parechovirus-laboratoire associé, CHU Clermont-Ferrand

**Lieu de constitution de la collection :** Laboratoire de Virologie, CNR Entérovirus/Parechovirus, Pr Hélène Peigue-Lafeuille, Centre de Biologie, CHU Gabriel Montpied, 58 rue Montalembert, 63003 Clermont-Ferrand

**\*BLEDI : Blood Enterovirus Diagnosis Infection**

*Ce document est remis aux titulaires de l'autorité parentale du patient, avec un duplicata dans son dossier. Il n'a pas à être signé par les titulaires de l'autorité parentale*

Madame, Monsieur,

Le docteur.....propose à votre enfant de participer à l'étude BLEDI intitulée « Intérêt de la détection génomique des entérovirus dans le sang d'enfants admis à l'hôpital pour suspicion d'infection méningée, de fièvre isolée ou de sepsis ».

Il est important de lire attentivement cette notice d'information afin de comprendre pourquoi cette recherche est menée et ce qu'elle implique.

En cas d'incompréhension ou si vous désirez avoir d'autres informations, faites-en part au médecin du service où votre enfant est hospitalisé.

La participation de votre enfant doit être libre et volontaire. Votre décision n'affectera en rien sa prise en charge thérapeutique.

Vous pourrez, à tout moment et sans contrainte, exprimer votre opposition et demander la destruction de ses échantillons conservés. Quelle que soit votre décision, sa prise en charge médicale ne sera pas modifiée.

### **1- Cadre général et objectifs de la recherche**

**Votre enfant va être soumis, dans le cadre de la prise en charge de sa maladie, à des examens médicaux comprenant en outre la réalisation d'une prise de sang, et c'est pour cette raison que nous vous sollicitons pour que votre enfant participe à cette recherche.**

**Les infections à entérovirus sont fréquentes, particulièrement chez les enfants de moins de 15 ans.** La transmission du virus se fait par contact de personne à personne à partir des virus présents dans les selles et au niveau du rhino-pharynx (sécrétions nasales, salive). Pour la grande majorité des personnes infectées, l'infection est inapparente ou sans aucune gravité.

**Les formes nécessitant une hospitalisation sont majoritairement des méningites bénignes,** caractérisées par de la fièvre, des maux de tête, des nausées et des vomissements. Le diagnostic de ces infections est réalisable rapidement, par la recherche du virus dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) prélevé par une ponction lombaire.

Les entérovirus peuvent également être responsables chez les nourrissons de **fièvre inexplicite** ou d'un **tableau dit septique** (fièvre chez de jeunes enfants 'geignards', grognons et sans appétit).

**L'objectif de l'étude BLEDI** dans laquelle nous vous proposons d'inclure votre enfant est de rechercher systématiquement la présence des entérovirus dans le sang, dans le but :

Formulaire validé par le CPP 07/05/2015



1/ d'améliorer le diagnostic des méningites, en particulier quand la ponction lombaire est faite très rapidement après le début des signes cliniques (virus pas encore présents dans le LCR),

2/ et d'élargir le diagnostic aux tableaux de fièvre inexpliquée (recherche non systématique actuellement).

Cette étude est proposée dans 4 centres hospitaliers. Réalisée sur un grand nombre d'enfants, elle permettra d'une part de savoir si le diagnostic des infections à entérovirus peut être amélioré, et d'autre part de mieux comprendre la diffusion de ces virus dans l'organisme à partir du sang, grâce à des analyses virologiques complémentaires.

Aucun test génétique ne sera réalisé sur ces prélèvements.

## **2- Déroulement de la recherche**

Au cours de l'hospitalisation de votre enfant, le médecin vous informera sur la nature et l'objectif de cette étude et répondra à vos questions. Si vous souhaitez vous opposer à l'utilisation des échantillons biologiques de votre enfant, vous pouvez le faire librement et sans conséquence pour sa prise en charge.

En pratique, la participation de votre enfant à l'étude sera intégrée dans la prise en charge habituelle de cette pathologie. La ponction veineuse et lombaire ne sont pas des actes supplémentaires, l'étude implique uniquement le prélèvement d'un volume supplémentaire de sang et la conservation de l'échantillon restant de LCR après réalisation des analyses nécessaires au diagnostic.

Le volume de sang prélevé pour cette étude sera de 3ml, voire un volume plus faible en fonction de l'âge et adapté au poids de l'enfant (pour ne pas excéder 1% de la masse sanguine totale).

Les échantillons de LCR et de sang seront envoyés au Laboratoire de Virologie de votre hôpital, qui réalisera la recherche des entérovirus dans les 24 à 48h. Les résultats seront communiqués aux médecins. Le reste des échantillons sera congelé jusqu'à ce que des analyses complémentaires soient centralisées et réalisées (à des fins de recherche) au Laboratoire de Virologie du CHU de Clermont-Ferrand.

## **3- Conservation des échantillons biologiques**

### 3.1 Identification des échantillons

La confidentialité des échantillons et des données sera assurée par l'assignation et l'utilisation d'un code spécifique. Ce code permettra de lier votre enfant à l'échantillon et aux données cliniques recueillies concernant votre enfant. Le décodage ne pourra s'effectuer que par le responsable scientifique ou une personne déléguée par ce dernier et soumise au secret professionnel.

### 3.2 Durée de conservation des échantillons

Les échantillons seront congelés et conservés dans la pièce des congélateurs du Centre de Biologie, Laboratoire de Biologie Médicale, CHU de Clermont-Ferrand sans limitation de durée. En cas d'opposition de votre part, ils seront détruits.

### 3.3 Autres recherches

Les échantillons (LCR et sang) recueillis pourront être utiles pour d'autres recherches virologiques, différentes de celles-ci mais portant également sur l'étude des infections à entérovirus. C'est pourquoi nous souhaitons, sauf opposition de votre part, utiliser de façon anonyme les échantillons sanguins et de LCR de votre enfant pour d'autres projets de recherche en Virologie.

## **4- Risques prévisibles et bénéfices attendus**

- Les analyses réalisées n'influencent pas la prise en charge de votre enfant. Sa participation n'implique aucune disposition particulière de sa part. Il n'existe aucun risque pour sa santé lié au prélèvement de sang.

- Un avantage personnel peut être attendu pour votre enfant dans le cas de la détection positive d'entérovirus dans le sang. En effet, en fonction de l'état clinique de votre enfant et de la décision du médecin, ce diagnostic pourra éventuellement éviter des examens complémentaires, permettre d'arrêter un traitement antibiotique, ou encore diminuer la durée d'hospitalisation.



- Le bénéfice attendu est l'amélioration du diagnostic des infections à entérovirus en recherchant les virus à la fois dans le sang et le LCR. Si la détection des virus dans le sang permet d'identifier une infection chez un plus grand nombre d'enfants, elle fera l'objet d'une recommandation dans la prise en charge des enfants hospitalisés présentant une méningite, une fièvre isolée ou un tableau septique.

**5- Confidentialité**

Tous les renseignements obtenus sur votre enfant *via* son dossier médical (données administratives, biométriques, et biologiques) et les résultats de la recherche sur le sang (et le LCR) feront l'objet d'un traitement informatisé. Vous acceptez que ces données anonymisées soient traitées par les membres du projet BLEDI en sachant qu'à tout moment, vous pouvez exercer votre droit d'accès, de rectification et d'opposition à ces informations, conformément à la loi (loi du 6 août 2004 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés)

Toutes ces opérations seront réalisées par des personnes tenues au secret médical et professionnel. Ces données ne seront utilisées qu'aux seules fins de recherche en santé.

**6- Communication des résultats**

- La détection des entérovirus dans le sang sera réalisée dans les 24 à 48h après réception des échantillons par les Laboratoires de Virologie participant à l'étude. Les résultats seront communiqués immédiatement au médecin en charge de votre enfant.

- Le résultat des analyses complémentaires ne vous sera pas communiqué, car les informations ainsi obtenues ne modifient en rien la prise en charge de votre enfant. Elles seront exploitées afin de faire progresser les connaissances sur le pouvoir pathogène des entérovirus.

- A l'issue de cette recherche, vous avez le droit d'être informés des résultats globaux de cette recherche. Les résultats de cette étude feront l'objet de publications à destination de la communauté scientifique. A aucun moment, les données personnelles concernant votre enfant n'apparaîtront lors de la publication des résultats des travaux de recherche ; elles seront anonymes.

**7- Aspects réglementaires**

Cette étude a reçu l'avis favorable du Comité de Protection Sud-Est VI le 07/05/2015 ainsi que l'autorisation préalable de l'autorité compétente de santé (Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, MESR) Conformément à la loi Informatique et Libertés, le dossier a été évalué par le Comité National Informatique et Libertés (CNIL) qui a donné son avis favorable le.....

**Vous pouvez librement et sans conséquence pour la prise en charge de votre enfant, vous opposer à l'utilisation de ses échantillons dans ce but de recherche.**

En cas d'acceptation, aucun examen de ses caractéristiques génétiques ne sera réalisé sans votre consentement écrit.

<b>Cadre réservé au service</b>	
Nom de l'enfant:	Prénom :
Nom du ou des titulaires de l'autorité parentale de l'enfant :	
Nom : _____	Prénom : _____
Nom : _____	Prénom : _____
Date d'information du(des) titulaire(s) de l'autorité parentale: __/__/__	
Opposition exprimée : <input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	
Nom et signature du responsable du service :	

Conformément à la loi (Art. 16-1 et 16-6 du code de la) ce prélevement ne pourra être classé à titre commercial, ni donner lieu à une rémunération à votre bénéfice. Il pourra être utilisé pour des recherches effectuées soit par les équipes de recherche du CHU de Clermont-Ferrand, soit en partenariat avec un ou plusieurs organismes publics ou privés soit après cession par un ou plusieurs organismes publics ou privés. Les données médicales associées au prélevement seront réunies dans un fichier informatique permettant leur traitement automatisé dans le cadre des recherches. Vous disposez à leur égard d'un droit d'accès, de rectification et d'opposition conformément à la loi (loi du 6 août 2004 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés) que vous pouvez exercer auprès du Centre de Ressources Biologiques Auvergne.

# Annexe II



## NOTICE D'INFORMATION ET DE NON-OPPOSITION À LA CONSERVATION ET À L'UTILISATION D'ÉCHANTILLONS BIOLOGIQUES À FINALITÉ SCIENTIFIQUE DESTINÉ AU PATIENT (8-12 ans)

Version v2 18 03 2015

### **Etude BLEDI\* : Intérêt de la détection génomique des entérovirus dans le sang d'enfants admis à l'hôpital pour suspicion d'infection méningée, de fièvre isolée ou de sepsis**

Coordonnateur de la recherche : Pr. André Labbé, Service de Pédiatrie, Hôpital Estaing, place Lucie et Raymond Aubrac, 63100 Clermont-Ferrand

Coordonnateur de la collection biologique : Dr Christine Archimbaud, Laboratoire de Virologie, CNR Entérovirus / Parechovirus-laboratoire associé, CHU Clermont-Ferrand

Lieu de constitution de la collection : Laboratoire de Virologie, CNR Entérovirus / Parechovirus, Pr Hélène Peigue-Lafeuille, Centre de Biologie, CHU Gabriel Montpied, 58 rue Montalembert, 63003 Clermont-Ferrand

*\*BLEDI : BLood Enterovirus Diagnosis Infection*

*Ce document est remis au patient, avec un duplicata dans son dossier. Il n'a pas à être signé par le patient*

Bonjour,

Le docteur.....te propose de participer à l'étude BLEDI qui a pour but de rechercher des virus dans ton sang suite à ton passage à l'hôpital.

Il est important de lire attentivement cette notice d'information afin de comprendre pourquoi cette recherche est menée et ce qu'elle implique.

Si tu ne comprends pas tout, tu peux poser toutes les questions que tu veux au médecin qui te prend en charge.

### **Pourquoi faisons-nous cette recherche ?**

Dans le cadre de la prise en charge de ta maladie, tu vas avoir une prise de sang et une ponction lombaire (c'est-à-dire un prélèvement du liquide situé dans la colonne vertébrale : liquide céphalo-rachidien). Ces examens sont réalisés pour ta prise en charge médicale et sont utiles pour savoir de quoi tu souffres. Dans le cadre de l'étude BLEDI tu n'auras pas de piqûres en plus, nous prendrons juste 3 ml de sang en plus.

Nous recherchons dans le sang ou le liquide céphalo-rachidien un virus qui s'appelle entérovirus. Il est très souvent présent chez les enfants de moins de 15 ans. Le plus souvent il ne cause pas de maladie mais quelques fois il donne des maux de tête, de la fièvre, des nausées et des vomissements qui te conduisent à consulter un médecin ou aller à l'hôpital.

L'**objectif** de l'étude BLEDI que nous te proposons est de rechercher la présence du virus « entérovirus » dans le sang, dans le but d'améliorer le diagnostic de ces infections.

### **Comment se déroule l'étude**

Au cours de ton hospitalisation, le médecin t'informera de cette étude et répondra à tes questions. Si tu ne souhaites pas qu'on utilise tes prélèvements pour l'étude BLEDI, tu peux le dire et c'est sans conséquence pour ta prise en charge médicale.

En pratique, si tu acceptes de participer, il n'y aura pas de piqûre en plus. Nous prendrons juste, lors de ton prélèvement de sang, un tube de sang (3 ml) en plus.



Les prélèvements de LCR et de sang seront envoyés au Laboratoire de Virologie de ton hôpital, qui réalisera la recherche des entérovirus dans les 24 à 48h. Les résultats seront communiqués aux médecins. Le reste des échantillons sera congelé jusqu'à ce que d'autres analyses soient réalisées au Laboratoire de Virologie du CHU de Clermont-Ferrand.

#### Quels sont tes droits ?

Le médecin doit te fournir toutes les explications nécessaires concernant cette recherche. Si tu ne veux plus participer à l'étude, à quel que moment que ce soit, et quel que soit le motif, tu pourras arrêter l'étude. Tu ne seras pas obligé de dire pourquoi.

Ton nom entier n'apparaîtra pas dans les résultats d'analyse, il y aura juste tes initiales ou un code.

A tout moment, tes parents pourront demander aux médecins de ne pas transmettre ton dossier à d'autres personnes

**Nous te remercions de ta participation.**

#### Aspects réglementaires

Cette étude a reçu l'avis favorable du Comité de Protection Sud-Est VI le 7/05/2015 ainsi que l'autorisation de l'autorité compétente de santé (Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, MESR)

Conformément à la loi Informatique et Libertés, le dossier a été évalué par le Comité National Informatique et Libertés (CNIL) qui a donné son avis favorable le.....

En cas d'acceptation, aucun examen de tes caractéristiques génétiques ne sera réalisé sans ton consentement écrit.

#### Cadre réservé au service

Nom du patient :

Prénom :

Date d'information du patient : \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Opposition exprimée :  OUI

NON

Nom et signature du responsable du service :

# Annexe III



## NOTICE D'INFORMATION ET DE NON-OPPOSITION À LA CONSERVATION ET À L'UTILISATION D'ÉCHANTILLONS BIOLOGIQUES À FINALITÉ SCIENTIFIQUE DESTINÉ AU PATIENT (13 - 16 ans)

Version v2 18 03 2015

### **Etude BLEDI\* : Intérêt de la détection génomique des entérovirus dans le sang d'enfants admis à l'hôpital pour suspicion d'infection méningée, de fièvre isolée ou de sepsis**

Coordonnateur de la recherche : Pr. André Labbé, Service de Pédiatrie, Hôpital Estaing, place Lucie et Raymond Aubrac, 63100 Clermont-Ferrand

Coordonnateur de la collection biologique: Dr Christine Archimbaud, Laboratoire de Virologie, CNR Entérovirus /Parechovirus-laboratoire associé, CHU Clermont-Ferrand

Lieu de constitution de la collection : Laboratoire de Virologie, CNR Entérovirus /Parechovirus, Pr Hélène Peigue-Lafeuille, Centre de Biologie, CHU Gabriel Montpied, 58 rue Montalembert, 63003 Clermont-Ferrand

\*BLEDI : *B*lood *E*nterovirus *D*iagnosis *I*nfection

*Ce document est remis au patient, avec un duplicata dans son dossier. Il n'a pas à être signé par le patient*

Bonjour,

Le docteur.....te propose de participer à l'étude BLEDI qui a pour but de rechercher des virus dans ton sang suite à ton passage à l'hôpital.

Il est important de lire attentivement cette notice d'information afin de comprendre pourquoi cette recherche est menée et ce qu'elle implique. Si tu ne comprends pas tout ou si tu désires avoir d'autres informations, fais-en part au médecin du service où tu es hospitalisé.

### **Pourquoi faisons-nous cette recherche ?**

Dans le cadre de la prise en charge de ta maladie, tu vas avoir une prise de sang et une ponction lombaire (c'est-à-dire un prélèvement du liquide situé dans la colonne vertébrale : liquide céphalo-rachidien). Ces examens sont réalisés pour ta prise en charge médicale et sont utiles pour savoir de quoi tu souffres. Dans le cadre de l'étude BLEDI tu n'auras pas de piqûres en plus, nous te prendrons juste 3 ml de sang supplémentaire.

Nous recherchons dans le sang ou le liquide céphalo-rachidien un virus qui s'appelle « entérovirus ». Il est très souvent présent chez les enfants de moins de 15 ans. Le plus souvent il ne cause pas de maladie mais quelques fois il donne des maux de tête, de la fièvre, des nausées et des vomissements qui te conduisent à consulter un médecin ou aller à l'hôpital.

**L'objectif** de l'étude BLEDI que nous te proposons est de rechercher la présence des entérovirus dans le sang, dans le but d'améliorer le diagnostic de ces infections.

### **Comment se déroule l'étude ?**

Au cours de ton hospitalisation, le médecin t'informera de cette étude et répondra à tes questions. Si tu ne souhaites pas qu'on utilise tes prélèvements pour l'étude BLEDI, tu peux le dire et c'est sans conséquence pour ta prise en charge médicale.

En pratique, si tu acceptes de participer, il n'y aura pas de piqûre en plus. L'étude implique uniquement le prélèvement d'un volume supplémentaire de sang (3ml) et la conservation de l'échantillon restant de LCR après réalisation des analyses nécessaires au diagnostic.

Formulaire validé par le CPP 07/05/2015





Les prélèvements de LCR et de sang seront envoyés au Laboratoire de Virologie de ton hôpital, qui réalisera la recherche des entérovirus dans les 24 à 48h. Les résultats seront communiqués aux médecins. Le reste des échantillons sera congelé jusqu'à ce que d'autres analyses soient réalisées au Laboratoire de Virologie du CHU de Clermont-Ferrand.

#### **L'étude présente-t-elle des risques ?**

Il n'existe aucun risque pour ta santé lié au prélèvement de sang.

Un avantage personnel peut être attendu pour toi dans le cas de la détection positive d'un entérovirus dans le sang. En effet, en fonction des signes cliniques et de la décision du médecin, une détection positive d'EV dans le sang pourra éventuellement t'éviter des examens complémentaires, arrêter des traitements antibiotiques et diminuer la durée de ton hospitalisation.

#### **Quels sont tes droits ?**

Le médecin doit te fournir toutes les explications nécessaires concernant cette recherche. Si tu ne veux plus participer à l'étude, à quel que moment que ce soit, et quel que soit le motif, tu pourras arrêter l'étude. Tu ne seras pas obligé de dire pourquoi.

Ton nom entier n'apparaîtra pas dans les résultats d'analyse, il y aura juste tes initiales ou un code.

A tout moment, tes parents pourront demander aux médecins de ne pas transmettre ton dossier à d'autres personnes

#### **Quel résultat de l'étude pouvons-nous attendre ?**

Le bénéfice attendu de cette étude est l'amélioration du diagnostic des infections à entérovirus en recherchant les virus à la fois dans le sang et le LCR. Si la détection des virus dans le sang permet d'identifier une infection chez un plus grand nombre d'enfants, alors cette analyse pourra être étendue à tous les hôpitaux accueillant les enfants pour une suspicion de méningite.

#### **Aspects réglementaires**

Cette étude a reçu l'avis favorable du Comité de Protection Sud-Est VI le 07/05/2015 ainsi que l'autorisation de l'autorité compétente de santé (Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, MESR)

Conformément à la loi Informatique et Libertés, le dossier a été évalué par le Comité National Informatique et Libertés (CNIL) qui a donné son avis favorable le.....

#### **Nous te remercions de ta participation.**

En cas d'acceptation, aucun examen de tes caractéristiques génétiques ne sera réalisé sans ton consentement écrit.

#### **Cadre réservé au service**

Nom du patient :

Prénom :

Date d'information du patient : \_\_/\_\_/\_\_

Opposition exprimée :  OUI

NON

Nom et signature du responsable du service :

# Annexe IV



## FICHE DE RENSEIGNEMENTS CLINIQUES

### Critères d'inclusion :

- Patients présentant un syndrome méningé fébrile (0 – 16 ans)
- Fièvre inexpliquée chez les moins de 3 mois
- Tableau septique/sepsis chez les nourrissons (0-2ans)

HOPITAL :  
 Service :  
 Médecin :  
 Téléphone / Fax :

PATIENT : NOM :  
 Prénom :  
 Date de naissance : ..... / ..... / .....  
 Sexe : F  M

### Deux prélèvements peuvent être réalisés (SANG OBLIGATOIRE) :

- LCR Date : .....Heure.....  
 Sang (sur tube EDTA) (bouchon violet, 3 ml) Date : .....Heure .....

### HISTOIRE DE LA MALADIE

**DATE (et heure approximative) DE DEBUT DES SIGNES CLINIQUES** : le ...../...../2016 à .....H.....

Fièvre <input type="checkbox"/>	<u>Sepsis / Etat septique</u>	<u>Signes Respiratoires</u>
<u>Signes méningés/ Neurologiques</u>	Fièvre <input type="checkbox"/>	Rhinite <input type="checkbox"/>
Fièvre <input type="checkbox"/>	Geignard <input type="checkbox"/>	Pharyngite <input type="checkbox"/>
Céphalées <input type="checkbox"/>	Grognon <input type="checkbox"/>	Pneumopathie <input type="checkbox"/>
Photophobie <input type="checkbox"/>	Diminution prise alimentaire <input type="checkbox"/>	
Phonophobie <input type="checkbox"/>	Pâleur <input type="checkbox"/>	<u>Signes cutanéomuqueux</u>
Raideur de nuque <input type="checkbox"/>	Tps recoloration cutanée ↗ <input type="checkbox"/>	Vésicules buccales <input type="checkbox"/>
Fontanelle bombée <input type="checkbox"/>	Tachycardie <input type="checkbox"/>	Exanthème/ rash <input type="checkbox"/>
Convulsions <input type="checkbox"/>	Hypotension <input type="checkbox"/>	Purpura <input type="checkbox"/>
Hypotonie <input type="checkbox"/>	<u>Signes digestifs</u>	<u>Epidémiologie</u>
Trouble de la conscience <input type="checkbox"/>	Vomissements <input type="checkbox"/>	Contexte épidémique
Paralysie/ataxie <input type="checkbox"/>	Diarrhée <input type="checkbox"/>	Intrafamilial <input type="checkbox"/>
Polyradiculonévrite <input type="checkbox"/>	Douleurs abdominales <input type="checkbox"/>	Communautaire <input type="checkbox"/>
Méningo-encéphalite <input type="checkbox"/>		
<u>Antibiotiques</u> : oui <input type="checkbox"/>	<u>Antiviraux (Zovirax)</u> : oui <input type="checkbox"/>	<u>Imagerie</u> : oui <input type="checkbox"/>
non <input type="checkbox"/>	non <input type="checkbox"/>	<u>IRM/ scanner crânien</u> non <input type="checkbox"/>

**POUR LE LABORATOIRE DU CENTRE HOSPITALIER**, merci de fournir les renseignements suivants :

LCR : Cytologie : Leucocytes : ..... /mm<sup>3</sup> dont .....% PNN et ..... % lymphocytes ; Hématies : ...../mm<sup>3</sup>  
 Biochimie : Protéïnorachie : .....g/l ; Glycorachie : .....mmol/l  
 Sang : CRP : .....g/l ; Glycémie : .....mmol/l, Plaquettes : .....G/L, Leucocytes : ..... G/L  
 dont PNN : .....G/L, Lymphocytes : .....G/L et Monocytes : ..... G/L



Centre National de référence des entérovirus et parechovirus – Laboratoire associé  
 Pr H. Peigue-Lafeuille  
 Laboratoire de Virologie - CHU Clermont-Ferrand -Centre de biologie, 5ème étage  
 58, rue Montalembert- 63003 Clermont-Ferrand cedex  
 Téléphone : 04 73 754 850 (secrétariat) / 04 73 754 854 (biologistes) - Fax : 04 73 754 851

## RESUME

### Optimisation du diagnostic des infections à entérovirus et étude de leur pouvoir pathogène

Les entérovirus humains (EV) représentent la première cause des **méningites** aseptiques dans la population pédiatrique. Le diagnostic de certitude repose sur la détection génomique des EV par RT-PCR dans le liquide céphalorachidien (LCR). La **fièvre sans point d'appel** et les **infections de type «sepsis»** sont également des affections fréquentes chez les nourrissons (0 à 2 ans) qui peuvent être la conséquence d'une infection virale notamment à EV. Or, actuellement le diagnostic des EV dans le sang est très peu réalisé dans la pratique courante. Les données concernant 1) l'existence d'une répllication des EV dans les cellules leucocytaires, 2) la charge virale (CV) dans le sang et le LCR, et sa corrélation éventuelle avec l'intensité du processus inflammatoire réactionnel sont fragmentaires. Le premier volet de cette thèse avait pour objectif d'évaluer la détection des EV dans le sang chez les nouveau-nés, nourrissons et enfants hospitalisés pour une fièvre isolée, un sepsis ou un syndrome méningé. Une étude multicentrique prospective nationale (étude BLEDI) a été initiée dans 35 services de pédiatrie durant la période estivo-automnale 2015-2016. Nos résultats ont montré que le taux de détection des EV dans le sang était significativement plus élevé par rapport au LCR chez les nouveau-nés et les nourrissons dans les tableaux de fièvre isolée et de sepsis. Ces données ouvrent les perspectives d'un nouvel algorithme diagnostique des fièvres inexplicables chez les enfants âgés de moins de 2 ans. Le second volet de cette thèse avait pour but d'étudier prospectivement la charge virale EV dans le sang et dans le LCR des patients infectés. Nos résultats ont montré que les CV dans le sang variaient avec l'âge des patients, le tableau clinique et le type d'EV. Trois profils de cinétique d'infection comparant la CV dans le sang et dans le LCR ont été envisagés et sont en cours d'étude. Enfin, le dernier axe était de déterminer s'il existait une répllication des EV dans les cellules leucocytaires du sang. Nous avons montré à partir d'échantillons de sang infectés *in vitro* par un EV que la répllication de ces virus variait avec le type d'EV.

Mots clefs : Entérovirus, population pédiatrique, diagnostic moléculaire, virémie, charge virale, tropisme, répllication.

## ABSTRACT

### Optimisation of diagnosis of enterovirus infection in the paediatric population and study of their pathogenic power

Human enteroviruses (EV) are the most frequent cause of paediatric aseptic **meningitis**. Detection of enterovirus by PCR in cerebrospinal fluid (CSF) specimens is recommended for diagnosis. **Fever without source** and **sepsis-like diseases** are frequent affections in infants (0 to 2 years) which can be the consequence of a viral infection in particular to EV. At present, the daily routine diagnosis of EV in the blood is rarely performed. The concerning data 1) existence of EV replication in the blood leukocytes, 2) the EV viral load level in blood and CSF specimens and its possible relation with the intensity of the associated inflammatory process are fragmented. In the first part of this PhD thesis, the aim was to assess detection of enterovirus by PCR in blood specimens of newborns, infants, and children with fever without source, sepsis-like disease or suspected meningitis. We did a prospective, multicentre, observational study (BLEDI study) at 35 paediatric departments during the seasonal period of increased EV circulation in 2015-2016. Our results showed that detection of EV was significantly higher in the blood than in the CSF from newborns and infants admitted with fever without source or sepsis-like disease. These data open up the perspectives for a new diagnostic algorithm of febrile illness in patients aged 2 years or younger. We also explored prospectively EV viral load in blood and in CSF specimens of infected patients. Our results showed that EV viral load in the blood varied by age group, clinical presentation and EV type. Three profiles of infection kinetics comparing EV viral load in the blood and the CSF have been considered and are under study. Finally, we explored the hypothesis of an EV replication in the blood leukocytes. We showed from blood samples infected *in vitro* by EV that the replication of these viruses varied by EV genotypes.

Keywords: Enterovirus, paediatric population, molecular diagnosis, viremia, viral load, tropism, replication.



## RESUME

### Optimisation du diagnostic des infections à entérovirus et étude de leur pouvoir pathogène

Les entérovirus humains (EV) représentent la première cause des **méningites** aseptiques dans la population pédiatrique. Le diagnostic de certitude repose sur la détection génomique des EV par RT-PCR dans le liquide céphalorachidien (LCR). La **fièvre sans point d'appel** et les **infections de type «sepsis»** sont également des affections fréquentes chez les nourrissons (0 à 2 ans) qui peuvent être la conséquence d'une infection virale notamment à EV. Or, actuellement le diagnostic des EV dans le sang est très peu réalisé dans la pratique courante. Les données concernant 1) l'existence d'une répllication des EV dans les cellules leucocytaires, 2) la charge virale (CV) dans le sang et le LCR, et sa corrélation éventuelle avec l'intensité du processus inflammatoire réactionnel sont fragmentaires. Le premier volet de cette thèse avait pour objectif d'évaluer la détection des EV dans le sang chez les nouveau-nés, nourrissons et enfants hospitalisés pour une fièvre isolée, un sepsis ou un syndrome méningé. Une étude multicentrique prospective nationale (étude BLEDI) a été initiée dans 35 services de pédiatrie durant la période estivo-automnale 2015-2016. Nos résultats ont montré que le taux de détection des EV dans le sang était significativement plus élevé par rapport au LCR chez les nouveau-nés et les nourrissons dans les tableaux de fièvre isolée et de sepsis. Ces données ouvrent les perspectives d'un nouvel algorithme diagnostique des fièvres inexplicables chez les enfants âgés de moins de 2 ans. Le second volet de cette thèse avait pour but d'étudier prospectivement la charge virale EV dans le sang et dans le LCR des patients infectés. Nos résultats ont montré que les CV dans le sang variaient avec l'âge des patients, le tableau clinique et le type d'EV. Trois profils de cinétique d'infection comparant la CV dans le sang et dans le LCR ont été envisagés et sont en cours d'étude. Enfin, le dernier axe était de déterminer s'il existait une répllication des EV dans les cellules leucocytaires du sang. Nous avons montré à partir d'échantillons de sang infectés *in vitro* par un EV que la répllication de ces virus variait avec le type d'EV.

Mots clefs : Entérovirus, population pédiatrique, diagnostic moléculaire, virémie, charge virale, tropisme, répllication.

## ABSTRACT

### Optimisation of diagnosis of enterovirus infection in the paediatric population and study of their pathogenic power

Human enteroviruses (EV) are the most frequent cause of paediatric aseptic **meningitis**. Detection of enterovirus by PCR in cerebrospinal fluid (CSF) specimens is recommended for diagnosis. **Fever without source** and **sepsis-like diseases** are frequent affections in infants (0 to 2 years) which can be the consequence of a viral infection in particular to EV. At present, the daily routine diagnosis of EV in the blood is rarely performed. The concerning data 1) existence of EV replication in the blood leukocytes, 2) the EV viral load level in blood and CSF specimens and its possible relation with the intensity of the associated inflammatory process are fragmented. In the first part of this PhD thesis, the aim was to assess detection of enterovirus by PCR in blood specimens of newborns, infants, and children with fever without source, sepsis-like disease or suspected meningitis. We did a prospective, multicentre, observational study (BLEDI study) at 35 paediatric departments during the seasonal period of increased EV circulation in 2015-2016. Our results showed that detection of EV was significantly higher in the blood than in the CSF from newborns and infants admitted with fever without source or sepsis-like disease. These data open up the perspectives for a new diagnostic algorithm of febrile illness in patients aged 2 years or younger. We also explored prospectively EV viral load in blood and in CSF specimens of infected patients. Our results showed that EV viral load in the blood varied by age group, clinical presentation and EV type. Three profiles of infection kinetics comparing EV viral load in the blood and the CSF have been considered and are under study. Finally, we explored the hypothesis of an EV replication in the blood leukocytes. We showed from blood samples infected *in vitro* by EV that the replication of these viruses varied by EV genotypes.

Keywords: Enterovirus, paediatric population, molecular diagnosis, viremia, viral load, tropism, replication.