

Faculté de Pharmacie

Année 2019

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

le 24 Janvier 2019 par

Camille CICCONE

Née le 6 avril 1989 à Soyaux

**Diagnostic des infections à Entérovirus au laboratoire de
virologie du CHU de Bordeaux : revue des cas de
Novembre 2016 à Octobre 2017**

Thèse dirigée par le Professeur Marie-Edith Lafon

Examineurs

Mme le Professeur Sylvie Rogez..... Présidente

Mr Le Professeur Didier Neau.....Juge

Mme le Professeur Véronique Dubois.....Juge

Mr le Professeur Thierry Lamireau.....Juge

Faculté de Pharmacie

Année 2019

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

le 24 Janvier 2019 par

Camille CICCONE

Née le 6 Avril 1989 à Soyaux

**Diagnostic des infections à Entérovirus au laboratoire de
virologie du CHU de Bordeaux : revue des cas de
Novembre 2016 à Octobre 2017**

Thèse dirigée par le Professeur Marie-Edith Lafon

Examineurs

Mme le Professeur Sylvie Rogez.....Présidente

Mr Le Professeur Didier Neau.....Juge

Mme le Professeur Véronique Dubois.....Juge

Mr le Professeur Thierry Lamireau.....Juge

Liste des enseignants

Le 1^{er} septembre 2017

PROFESSEURS :

| | |
|---------------------------|---|
| BATTU Serge | CHIMIE ANALYTIQUE |
| CARDOT Philippe | CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE |
| DESMOULIERE Alexis | PHYSIOLOGIE |
| DUROUX Jean-Luc | BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE |
| FAGNERE Catherine | CHIMIE THERAPEUTIQUE - CHIMIE ORGANIQUE |
| LIAGRE Bertrand | BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE |
| MAMBU Lengo | PHARMACOGNOSIE |
| ROUSSEAU Annick | BIOSTATISTIQUE |
| TROUILLAS Patrick | CHIMIE PHYSIQUE - PHYSIQUE |
| VIANA Marylène | PHARMACOTECHNIE |

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

| | |
|-----------------------------|----------------------------|
| PICARD Nicolas | PHARMACOLOGIE |
| ROGEZ Sylvie | BACTERIOLOGIE ET VIROLOGIE |
| SAINT-MARCOUX Franck | TOXICOLOGIE |

ASSISTANT HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

| | |
|-------------------------|---|
| CHAUZEIX Jasmine | HEMATOLOGIE (Renouvelé jusqu'au 1 ^{er} novembre 2018) |
| JOST Jérémy | PHARMACIE CLINIQUE (1 ^{er} novembre 2016 pour 2 ans) |

MAITRES DE CONFERENCES :

| | |
|-----------------------------|-----------------------------------|
| BASLY Jean-Philippe | CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE |
| BEAUBRUN-GIRY Karine | PHARMACOTECHNIE |

| | |
|---------------------------------|---|
| BILLET Fabrice | PHYSIOLOGIE |
| CALLISTE Claude | BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE |
| CHEMIN Guillaume | BIOCHIMIE FONDAMENTALE |
| CLEDAT Dominique | CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE |
| COMBY Francis | CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE |
| COURTIOUX Bertrand | PHARMACOLOGIE, PARASITOLOGIE |
| DELEBASSEE Sylvie | MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE |
| DEMIOT Claire-Elise | PHARMACOLOGIE |
| FROISSARD Didier | BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE |
| GRIMAUD Gaëlle | CHIMIE ANALYTIQUE ET CONTROLE DU MEDICAMENT |
| JAMBUT Anne-Catherine | CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE |
| LABROUSSE Pascal | BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE |
| LEGER David | BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE |
| MARION-THORE Sandrine | CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE |
| MARRE-FOURNIER Françoise | BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE |
| MERCIER Aurélien | PARASITOLOGIE |
| MILLOT Marion | PHARMACOGNOSIE |
| MOREAU Jeanne | MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE |
| MUSUAMBA TSHINANU Flora | PHARMACOLOGIE |
| PASCAUD Patricia | PHARMACIE GALENIQUE – BIOMATERIAUX CERAMIQUES |
| POUGET Christelle | CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE |
| VIGNOLES Philippe | BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE |

ATTACHE TEMPORAIRE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE :

BONNET Julien PHARMACOLOGIE
(01.10.2016 au 31.08.2018)

LAVERDET Betty (1.09.2016 au 31.08.2017)
PHARMACIE GALENIQUE

PROFESSEURS EMERITES :

BUXERAUD Jacques (jusqu'au 30/09/2019)

DREYFUSS Gilles (jusqu'au 30/09/2019)

MOESCH Christian (1^{er} janvier 2017 - 1^{er} janvier 2019)

Remerciements

Aux membres du jury :

A Madame Le Professeur Sylvie Rogez, de me faire l'honneur de présider ce jury et d'avoir eu la gentillesse de venir sur Bordeaux. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et de mon profond respect.

A Monsieur Le Professeur Didier Neau, vous me faites l'honneur d'apporter votre expérience à la critique de ce travail. Je vous prie de bien vouloir accepter ma respectueuse considération.

A Madame Le Professeur Véronique Dubois, vous avez très gentiment accepté de participer au jury. Veuillez trouver l'expression de mes sincères remerciements et de ma gratitude.

A Monsieur Le Professeur Thierry Lamireau, je vous remercie pour l'intérêt que vous avez porté à mon sujet. Croyez-en mes plus sincères remerciements.

A Madame Le Professeur Marie-Edith Lafon, merci d'avoir accepté de diriger ce travail de thèse. Je te remercie pour ta gentillesse, ta patience et tes innombrables conseils. Je te remercie également pour les semestres passés en virologie, pour ta bonne humeur permanente mais aussi pour ton soutien dans mes projets. C'est un réel plaisir et une chance de travailler au quotidien avec toi, merci pour tout ce que m'as apporté.

Je remercie tout particulièrement Isabelle, Pascale, Pantxika et Camille pour leur disponibilité et leur patience face à mes nombreuses questions durant les trois semestres passés au sein du laboratoire de virologie du CHU de Bordeaux.

Je remercie également l'ensemble de l'équipe du laboratoire de virologie et tout particulièrement Marie-Jose Granteral qui a participé à la concrétisation de ce travail et qui rend notre travail plus simple.

A Cécile, Jessica, Cécile L. et Hugo qui ont également réalisé des PCR pour ce travail de thèse.

A mes parents, je vous remercie infiniment pour tout, sans vous je n'en serais pas là. Le soutien durant les concours et les moments difficiles, votre aide dans les multiples déménagements durant mon internat, les bons petits plats, tous ces petits/grands éléments qui ont fait ma vie un peu plus douce durant toutes ces années, pour tout cela merci. En attendant, je vais continuer d'aller à l'école !

A mon frère, merci pour ton soutien dans la vie mais également tout au long de mon parcours étudiant. Je te remercie infiniment pour ta présence à mes côtés.

A Cécile, l'internat a débuté avec toi, tu étais ma « maman d'internat » et il n'aurait pas été le même sans toi, tu es devenue une de mes plus belles amitiés. Merci pour ta patience dans le travail durant nos stages passés ensemble et dans la vie, surtout ! Merci pour ton soutien perpétuel durant ce travail d'écriture de thèse et tes conseils qui, tout le temps, me rassurent et me permettent d'avancer (je t'entends déjà me répondre : « hehehe hohoho pas de ça entre nous, avec ton faux accent toulousain). Merci de me supporter dans mes moments de panique ou de questionnement sur tout et n'importe quoi. Je pense qu'il ne serait pas raisonnable de comptabiliser nos heures de téléphonie et nos fous rires. Ainsi, mon internat a débuté par un énorme coup de chance, celle de te rencontrer. Pour tout cela, merci.

A Jessica, notre rencontre à Limoges est inoubliable et les moments passés là-bas font partie de mes plus beaux souvenirs d'internat. Les week-ends à Limoges dans ton studio agrémenté de repas saucisse -lentilles (repas gastronomique du dimanche !), tes repas à base de thon et de riz (encore un mystère pour moi), nos ballades, nos péripéties en ville, nos fous rires (oui, je maintiens, l'Anios ne peluche pas sur les mains), nos voyages Bordeaux-Limoges en voiture et nos cafetières de café à 11h du soir... Nous sommes liées par une amitié profonde et sans toi mon internat n'aurait pas été le même.

A Audrey, nous nous sommes rencontrées à Limoges et notre amitié a été une évidence. Merci pour ton soutien durant mon internat, je te remercie pour tout ce que tu as pu m'apporter parmi nos interminables discussions. Nos « meeting » dans ma chambre d'internat autour d'un bol de quinoa resteront toujours dans ma mémoire. Je suis très heureuse de te compter parmi mes amis les plus chers.

A Charly, nous nous sommes rencontrés la première fois à Limoges devant les portes du CBRS et ce moment précis restera inoubliable. Notre semestre d'hématologie à Limoges où parfois, tu pouvais te retrouver nez à nez avec une porte à hublot, resteront gravés. Je garderai aussi en mémoire les dimanches passés à l'internat à Limoges à discuter dans ta chambre reconverte en véritable appartement multifonction ! Je te remercie pour ta gentillesse et ton amitié. C'est un plaisir de terminer mon internat à tes côtés.

A Kavish, je te remercie pour ton soutien durant mon internat. Je n'ai pas compté nos innombrables cafés à l'hôpital. Je suis très fière d'être ton amie mais je suis blonde vénitienne et pas rousse comme tu persistes à le croire.

A Julian, tu as été mon « mentor » de l'internat, nos discussions sur notre avenir professionnel ont jalonné notre parcours (golf ou pas) et m'ont fait beaucoup rire. Je garderai toujours le souvenir de ta première garde de bactériologie où tu me coachais ! J'ai pu également bénéficier d'une formation pointue au baby-foot à tes côtés durant l'internat, je pense qu'il reste beaucoup de travail ! C'est avec plaisir que je te compte parmi mes amis les plus proches.

A Petite Camille, cela a été un plaisir d'être ta co-interne en bactériologie et de partager nos déjeuners durant toute ton année recherche. Je te remercie pour tes conseils, ta gentillesse et surtout, ton amitié.

A tous mes co-internes tout au long de mes stages d'internat à Bordeaux, Toulouse et Limoges.

A Patrice, nous nous sommes rencontrés en deuxième année de pharmacie et nous sommes liés par une profonde amitié depuis. Je te remercie pour ta générosité et ta gentillesse.

A Mathilde, Pierre, Jean et Guillaume, pour tous les beaux moments que nous passons ensemble. Je suis heureuse de faire partie de votre famille.

A mon futur époux, Louis, je te remercie pour ta patience et ton soutien inaltérable durant l'écriture de cette thèse. Partager ma vie avec toi est un bonheur chaque jour. Aragon disait « Je suis plein du silence assourdissant d'aimer ». Je laisserai alors le silence parler.

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Table des matières

| | |
|---|----|
| Liste des enseignants..... | 4 |
| Remerciements..... | 7 |
| Droits d'auteurs..... | 10 |
| Table des matières..... | 11 |
| Table des illustrations..... | 13 |
| Table des tableaux..... | 15 |
| Abréviations..... | 16 |
| I. Introduction..... | 17 |
| I.1. Généralités..... | 17 |
| I.2. Structure..... | 18 |
| I.3. Physiopathologie des infections à entérovirus..... | 18 |
| I.3.1. Entrée virale- Récepteurs cellulaires..... | 18 |
| I.3.2. Tropisme et entrée des entérovirus dans le SNC..... | 19 |
| I.3.3. Diminution de la transcription cellulaire après l'infection par entérovirus..... | 20 |
| I.3.4. Autophagie..... | 20 |
| I.3.5. Réponse Immune aux entérovirus..... | 21 |
| I.3.6. Persistance des entérovirus..... | 21 |
| I.3.7. Conséquences potentielles à long terme d'une infection par entérovirus..... | 22 |
| I.3.8. Cycle cellulaire des entérovirus..... | 23 |
| I.4. Pouvoir pathogène des entérovirus..... | 24 |
| I.5. Les différents types d'entérovirus..... | 24 |
| I.5.1. Les Poliovirus :..... | 24 |
| I.5.2. Les Coxsackievirus..... | 25 |
| I.5.3. ECHOvirus (ECHO-Vs)..... | 25 |
| I.5.4. Sérotypes particuliers d'entérovirus..... | 26 |
| I.6. Diagnostic d'une infection à entérovirus non poliomyélitique..... | 29 |
| I.6.1. Analyse et prélèvement..... | 29 |
| I.6.2. Interprétation de la détection du génome viral par RT-PCR..... | 30 |
| I.6.3. Diagnostic différentiel..... | 30 |
| I.7. Vaccination contre les entérovirus..... | 30 |
| I.7.1. Le vaccin contre PV..... | 30 |
| I.7.2. Vaccins contre l'EV-A71..... | 31 |
| I.8. Diagnostic biologique d'une méningite..... | 31 |
| I.8.1. Définition..... | 31 |
| I.8.2. Le prélèvement du LCR..... | 31 |
| I.8.3. Examen microbiologique..... | 31 |
| I.8.4. Aspect macroscopique du LCR..... | 32 |
| I.8.5. Analyse cytologique du LCR..... | 32 |
| I.8.6. Biologie moléculaire du LCR dans les infections virales..... | 32 |
| I.9. Déclaration des cas positifs de méningites à entérovirus à l'ARS et envoi des souches au Centre national de référence..... | 33 |
| I.10. Surveillance des infections du SNC par entérovirus en France et en Europe..... | 33 |
| I.11. Objectif..... | 34 |
| II. Matériel et Méthode..... | 35 |

| | | |
|--------|--|----|
| II.1. | Réalisation de la PCR entérovirus au laboratoire de virologie | 35 |
| II.2. | Validation d'une série de PCR entérovirus : | 37 |
| II.3. | Caractéristiques des performances | 37 |
| II.4. | Génotypage des entérovirus | 38 |
| II.5. | Recueil des données biologiques et cliniques | 39 |
| II.6. | Analyse des résultats des données patients : | 39 |
| III. | Résultats..... | 40 |
| III.1. | Analyse du nombre de prélèvements et du pourcentage de positivité de la PCR EV 40 | 40 |
| III.2. | Age des patients touchés par une infection à entérovirus..... | 41 |
| III.3. | Nombre et types de prélèvements analysés | 42 |
| III.4. | Biologie des LCR positifs à la RT-PCR entérovirus | 43 |
| III.5. | Signes cliniques associés à une méningite à entérovirus et traitement d'entrée des patients à l'hôpital | 46 |
| III.6. | Délai de rendu du résultat de la RT-PCR entérovirus et durée de l'hospitalisation . | 48 |
| III.7. | Résultats de génotypage..... | 53 |
| III.8. | Transmission intra-familiale de l'infection | 55 |
| III.9. | Cas graves | 55 |
| IV. | Discussion | 57 |
| | Conclusion | 63 |
| | Références bibliographiques | 64 |

Table des illustrations

| | |
|---|----|
| Figure 1 : Génome d'un picornavirus | 18 |
| Figure 2 : Protéines issues de la polyprotéine virale et leurs principales fonctions..... | 20 |
| Figure 3 : Cycle cellulaire d'un entérovirus..... | 23 |
| Figure 4 : Distribution des syndromes-pieds-mains-bouche (A) et des isolats d'entérovirus A71(B) identifiés au Sarawak en Malaisie, de 1998 à 2009..... | 27 |
| Figure 5 : Principe du génotypage des entérovirus..... | 38 |
| Figure 6 : Nombre de demandes de PCR EV sur la période..... | 40 |
| Figure 7 : Fréquence de positivité de la RT-PCR entérovirus durant la période Novembre 2016-Octobre 2017 | 41 |
| Figure 8 : Nombre de cas d'infections à entérovirus par catégorie d'âge..... | 42 |
| Figure 9 : Nombre et types de prélèvements positifs à la RT-PCR entérovirus sur la période Novembre 2016 – Octobre 2017..... | 43 |
| Figure 10 : Nombre d'éléments dans les LCR positifs à entérovirus durant la période..... | 44 |
| Figure 11 : Nombre d'éléments dans les LCR positifs à entérovirus durant la période Novembre 2016-Octobre 2017 (nouveau-nés) | 44 |
| Figure 12 : Types de formules leucocytaires retrouvées pour les LCR positifs à entérovirus..... | 45 |
| Figure 13: Signes cliniques associés aux infections à entérovirus du LCR | 46 |
| Figure 14 : Types de traitements (symptomatiques ou antibiotiques) reçus par les patients présentant un LCR positif à entérovirus | 47 |
| Figure 15 : Evènements responsables de l'arrêt du traitement antibiotique chez les patients présentant un LCR positif à entérovirus | 48 |
| Figure 16 : Etude de la corrélation entre la durée d'hospitalisation et le délai de rendu du résultat de la RT-PCR EV, en jours, chez les adultes | 49 |
| Figure 17 : Etude de la corrélation entre la durée d'hospitalisation et le délai de rendu du résultat de la RT-PCR EV, en jours, chez les enfants..... | 50 |
| Figure 18 : Etude de la corrélation entre la durée d'hospitalisation et le délai de rendu du résultat de la RT-PCR EV, en jours, chez les nourrissons/nouveau-nés | 50 |
| Figure 19 : Délai de rendu du résultat de la RT-PCR EV durant la période Novembre 2016-Octobre 2017 | 51 |
| Figure 20 : Durée d'hospitalisation, en jours, des patients présentant un LCR positif à entérovirus..... | 52 |
| Figure 21 : Services prescripteurs des RT-PCR entérovirus positives | 53 |
| Figure 22 : Génotypages des souches virales d'entérovirus par le CNR..... | 54 |

| | |
|--|----|
| Figure 23: Passage aux urgences pour méningites à entérovirus, données Oscour/Santé Publique France, comparaison 2016-2017 (1^{er} janvier au 14 octobre 2018) | 60 |
| Figure 24 : Nombre de cas avec LCR positifs pour les EV par semaine depuis le 1^{er} janvier 2018, comparaison avec les années 2016-2017 (données provisoires au 16 octobre 2018) | 60 |

Table des tableaux

| | |
|--|-----------|
| Tableau 1 : Espèces d'entérovirus humain et sérotypes..... | 17 |
| Tableau 2 : Prélèvements à effectuer en cas de suspicion d'infection à entérovirus ... | 29 |
| Tableau 3 : Préparation du contrôle interne de la RT-PCR entérovirus | 35 |
| Tableau 4 : Préparation du mix réactionnel de la RT-PCR entérovirus | 36 |
| Tableau 5 : Les différentes étapes d'un cycle de la RT-PCR entérovirus | 37 |
| Tableau 6 : Cas graves d'infections à entérovirus durant la période Novembre 2016- Octobre 2017 | 56 |

Abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique
ARN : Acide ribonucléique
ARS : Agence régionale de santé
BHE : Barrière hémato-encéphalique
CHU : Centre hospitalier universitaire
CI : Contrôle interne
CMV : Cytomégalovirus
CNR : Centre national de référence
Ct : Cyclethreshold
CV : Coxsackievirus
DAF : Facteur accélérant le déclin
ECHOvirus: Enteric cytopathic Human Orphan virus
EEQ : Evaluation externe de la qualité
EV : Entérovirus
HAS : Haute autorité de santé
HPVR : Récepteur humain du poliovirus
HSV : Herpès simplex virus
IgM : Immunoglobulines de type M
InVS : Institut national de veille sanitaire
LCR : Liquide céphalo-rachidien
OMS : Organisation mondiale de la santé
PV: Poliovirus
QCMD: Quality control for molecular diagnostics
RT-PCR : Reverse transcriptase - polymerase chain reaction
SNC : Système nerveux central
SPP : Syndrome post-poliomyélite
VIH : Virus de l'immunodéficience humaine
VP : Protéine virale
VPI : Vaccin poliomyélitique injectable
VPO : Vaccin poliomyélitique oral

I. Introduction

I.1. Généralités

Les entérovirus (EV) humains appartiennent à la famille des *Picornaviridae* et sont classés en quatre familles selon leurs caractéristiques moléculaires et biologiques. Ainsi, on décrit les entérovirus humains de type A, B, C et D qui regroupent plus de 110 sérotypes (**Tableau 1**).

| Familles d'entérovirus humain | Sérotypes |
|-------------------------------|--|
| Entérovirus humain type A | Coxsackievirus A2-A8, A10, A12, A14, A16 Enterovirus 71, 76, 89-92, 114, 119, 120, 121 |
| Entérovirus humain type B | Coxsackievirus A9, B1-6 Echovirus 1-9, 11-21, 24-27, 29-33 Enterovirus 69, 73-75, 77-88, 93, 97, 98, 100, 101, 106, 107, 110 |
| Entérovirus humain type C | Coxsackievirus A1, A11, A13, A17, A19-A22, A24 Poliovirus 1-3 Enterovirus 95, 96, 99, 102, 104, 105, 109, 113, 116-118 |
| Entérovirus humain type D | Entérovirus 68, 70, 94, 111, 120 |

Tableau 1 : Espèces d'entérovirus humain et sérotypes

Source : Dunn et al, 2016

La classification originelle des EV comprenait quatre groupes : Les Poliovirus (PVs), les virus Coxsackie A (CVA), les virus Coxsackie B (CVB) et les ECHO (Enteric Cytopathic Human Orphan) virus. Cette taxonomie traditionnelle était basée sur les propriétés de répllication en culture et sur le type des symptômes cliniques(1). Grâce aux nouvelles techniques de séquençage, les espèces ECHOvirus 22 et 23 ont été reclassées au sein du genre Parechovirus et portent le nom de HPeV 1 et 2 respectivement. Les principaux virus de cette grande famille des EV sont ainsi représentés par les Poliovirus, les Coxsackievirus et les ECHOvirus et nous en décrivons également deux sérotypes particuliers : l'EV-A71 et l'EV D-68 dans le chapitre I.5.4, dans lequel les particularités de ces virus seront revues en détail.

I.2. Structure

Les EV sont de petits virus à capsid icosaédrique, non-enveloppés, d'environ 30nm de diamètre. Ils survivent généralement en milieu acide, ce qui permet leur passage à travers l'estomac et rend possible une transmission fécale-orale. La capsid virale contient un brin d'ARN de polarité positive d'environ 7,2 à 8,5 kb (**Figure 1**). On retrouve une séquence ouverte de lecture (ORF) codant approximativement pour 2185 acides aminés, flanquée aux extrémités 5' et 3' par deux régions non transcrites d'environ 750 et 100 nucléotides respectivement. Le génome code pour une longue protéine virale de 250 Kdaltons qui subit des maturations post-transcriptionnelles de clivage donnant ainsi des protéines virales matures. Parmi elles se trouvent les 4 protéines structurales virales : VP1-4 qui constituent notamment la capsid virale et 7 protéines non structurales (2A-C et 3A-D) qui représentent la polymérase virale 3D (ARN polymérase dépendante de l'ARN), les protéases et d'autres protéines nécessaires pour la réplication intracellulaire.

La protéine virale 3B (aussi connue sous le nom de VPg, pour protéine virale liée au génome) est attachée de façon covalente à l'extrémité 5' du génome viral. Cette protéine a un rôle essentiel durant la réplication virale car elle sert d'amorce dans la synthèse d'ARN(2,3)

Il faut préciser qu'au sein des EV, on parle de quasi-espèces virales ou de variants génotypiques de populations virales. En effet, cela est dû aux erreurs mutationnelles accumulées durant la réplication virale. Celles-ci sont le fruit d'une faible fidélité de l'ARN polymérase ARN dépendante(4).

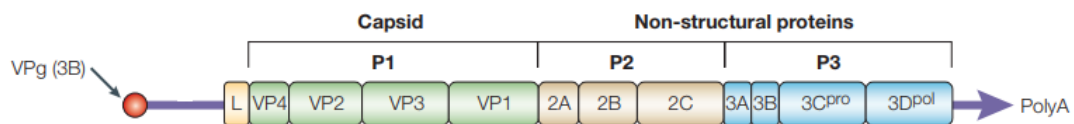


Figure 1 : Génome d'un picornavirus

Source : Whitton et al, 2005

I.3. Physiopathologie des infections à entérovirus

I.3.1. Entrée virale- Récepteurs cellulaires

Les EV utilisent de nombreux récepteurs et de nombreux mécanismes d'entrée afin d'envahir la cellule hôte. L'EV-71 utilise le ligand 1 de la glycoprotéine P –sélectine et le récepteur scavenger B2(5,6). Le CVB, quant à lui, utilise le facteur DAF (facteur accélérant le déclin aussi connu sous le nom de CD55) et le récepteur viral des CV et adénovirus (connu sous le nom de récepteur CAR). Dans les cellules polarisées, le CVB se lie au facteur DAF au pôle apical de la cellule, ce qui entraîne une liaison avec le récepteur CAR au sein des jonctions serrées(7,8).

De façon différente, les PV utilisent uniquement un récepteur, le CD155, qui est une molécule d'adhésion également connue sous le nom de récepteur humain du PV (HPVR). Ainsi, il semble très important de caractériser l'entrée des EV dans les multiples types cellulaires du système nerveux central (SNC) car des différences majeures semblent exister dans les différents modèles.

Une étude a montré un lien entre la diminution de l'expression de CAR dans les neurones primaires différenciés et la réduction de l'infection par CVB3(9). Par ailleurs, l'infection par PV semble largement restreinte par l'expression de HPVR dans le SNC de souris transgéniques pour ce récepteur. L'analyse de la distribution du récepteur HPVR chez ces animaux durant le développement a montré un haut niveau d'expression de la protéine dans les neurones moteurs de la corne antérieure de la moelle épinière qui sont connus pour permettre l'infection dans le SNC mature(10).

I.3.2. Tropisme et entrée des entérovirus dans le SNC

Les EV sont des virus possédant un tropisme préférentiel pour le SNC. Une étude a mis en évidence ce neurotropisme en examinant la localisation des virus PV et EV-A71 après l'injection intra-veineuse de virus à des singes cynomolgus. En ce qui concerne le PV, les auteurs ont identifié des lésions au sein du système pyramidal du SNC provoquant une perte totale des neurones moteurs dans la corne antérieure de la moelle épinière. L'EV-A71 induit des dommages limités dans le système pyramidal et extrapyramidal, laissant de nombreux neurones moteurs dans la corne antérieure de la moelle épinière intacts. Néanmoins, cette étude illustre le neurotropisme marqué du PV et de l'EV-A71 dans un modèle simien(11).

Des travaux concernant l'ECHOvirus de type 1 (ECHO-1-V) ont montré que ce virus pouvait provoquer des lésions nécrotiques dans le cortex cérébral d'un modèle de souris transgéniques pour un récepteur cellulaire de l'ECHO-1-V conduisant à une paralysie(12). Par ailleurs, une autre équipe a montré que le CVB3 était capable d'infecter les cellules progénitrices neurales de la zone subventriculaire dans un modèle murin(13).

De façon plus générale, il est important de comprendre comment l'EV circule de l'intestin au cerveau et cette compréhension de l'entrée du virus et de la dissémination virale est essentielle afin de développer des stratégies visant à limiter les infections par EV. Les études investiguant ce point ont été principalement menées avec les PV. Les deux principaux modèles de l'entrée des PV au sein du SNC proposent une virémie après une multiplication du virus dans les tissus lymphoïdes du tractus gastro-intestinal. Le premier modèle propose une entrée du virus à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE) d'une façon indépendante de HPVR(14) tandis que le deuxième modèle propose que le PV diffuse depuis le muscle jusqu'au SNC le long de voies neurales. Celles-ci sont plus clairement définies comme un transport axonal rétrograde du virus depuis des muscles endommagés jusqu'au SNC(15). Enfin, un troisième modèle émerge et introduit la notion de l'utilisation des cellules du système immunitaire infectées par les EV qui envahiraient le SNC, à l'image d'un cheval de Troie. Ce troisième modèle repose essentiellement sur le fait que les PV ont été montrés capables d'infecter les monocytes, macrophages et cellules dendritiques d'une façon dépendante de HPVR(16).

I.3.3. Diminution de la transcription cellulaire après l'infection par entérovirus

Une fois à l'intérieur de la cellule hôte, certaines protéines virales des EV jouent un rôle sur la transcription cellulaire (**Figure 2**). En effet, la protéase virale 3C est connue pour supprimer la transcription cellulaire de la cellule hôte(17). Les protéines virales 2B et 3A inhibent la sécrétion protéique cellulaire(18) et la protéine virale 2B (viroporine) est également capable d'induire une perméabilisation de la membrane cellulaire(19).

Les voies de signalisation activées durant l'infection dans la cellule semblent assez contradictoires selon les études car les EV induisent à la fois des effets anti-apoptotiques (via les protéines 3A et 2B) et des effets pro-apoptotiques (via les protéines VP2, 2A et 3C) au sein de la cellule hôte.

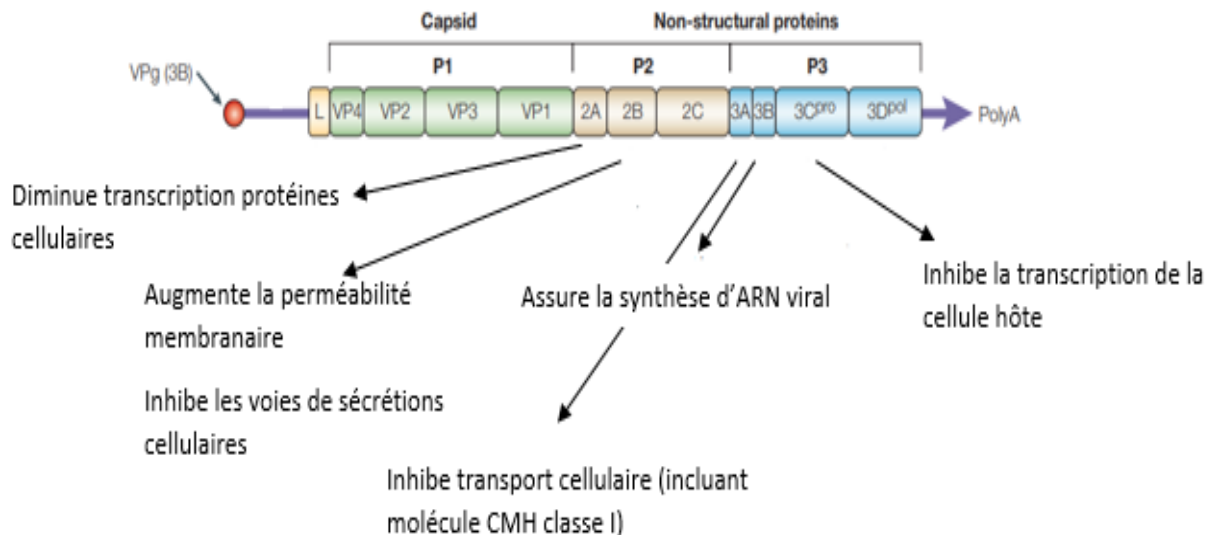


Figure 2 : Protéines issues de la polyprotéine virale et leurs principales fonctions

Source : Whitton et al, 2005

I.3.4. Autophagie

Certaines études rapportent que les EV induisent un processus de dégradation cellulaire connue sous le nom d'autophagie. Ce processus consiste en une séquestration d'organites ou de protéines aberrantes au sein de vésicules à double membrane destinées à une dégradation lysosomale. L'autophagie semble être un mécanisme protecteur vis-à-vis de certaines bactéries intracellulaires et virus mais il a été montré que ce processus serait détourné par les EV afin d'assurer leur réplication(20). Ainsi, un groupe de chercheurs a montré une augmentation de la réplication virale en lien avec l'induction de l'autophagie durant une infection par CV dans les neurones primaires de rat(21). Cependant, d'autres études

seraient nécessaires afin de vérifier si tous les types d'EV utilisent l'autophagie afin d'assurer la réplication virale dans tous les types cellulaires du SNC.

I.3.5. Réponse Immune aux entérovirus

Les infections virales représentent un véritable défi pour le système immunitaire qui doit tenter de contrôler l'infection et d'éliminer le pathogène. Dans le cas d'infection du SNC, la BHE représente un obstacle supplémentaire physique que les cellules et les molécules doivent tenter de contourner. Les réponses immunes innées et adaptatives s'effectuent via l'action de chimiokines (petites protéines de 8 à 10 KDa) et de l'interféron qui permettent le recrutement des leucocytes(22). La réponse immunitaire débute par la reconnaissance des EV via des « sensors » cytoplasmiques comme le Toll-like Receptor (TLR3), le récepteur RIG-I (retinoic acid inducible gene I) et le récepteur MDA-5 (Melanoma differentiation – associated gene 5). Le TLR3 est localisé sur la membrane des endosomes ou sur la membrane plasmique et reconnaît les ARN double brins, une structure généralement présente lors de la réplication de tous les virus à ARN(23).

La réponse immune innée joue un rôle dans la neuropathologie initiée par le virus. En effet, la sévérité des infections par EV dans le SNC a été associée avec des niveaux plus élevés de cytokines pro-inflammatoires comme l'Interleukine (IL) -6, l'IL-1 β et le Tumor necrosis factor (TNF) ce qui pourrait conduire à une destruction tissulaire(24). De plus, l'activation de la réponse inflammatoire par les CV montre une infiltration de leucocytes au sein du SNC causant des lésions inflammatoires et contribuant à la neuropathologie associée à ces virus(25).

La réponse immunitaire adaptative entraîne une production d'anticorps neutralisants au cours de l'infection mais les cellules T jouent également un rôle critique car les dommages suivant l'activation cellulaire T semblent significatifs. Un groupe de chercheurs a montré qu'il existait une infiltration de lymphocytes T CD4+ et CD8+ au sein du SNC suivant une infection par EV. Il faut cependant noter que l'activation de la réponse cellulaire T peut considérablement varier selon le type d'EV(26).

I.3.6. Persistance des entérovirus

La persistance des EV résulte d'un combat entre l'hôte et le virus. La persistance virale est le produit d'une incapacité de l'hôte à éliminer ou à supprimer la réplication virale et révèle la capacité du virus à rester intact dans un environnement cellulaire hostile.

Peu d'éléments sont connus concernant la persistance des EV, néanmoins, celle-ci a été démontrée cliniquement concernant l'EV-A71. Une étude a montré la détection continue du virus dans les sécrétions de patients jusqu'à 42 jours après la détection initiale de l'EV-A71. Même si ce virus cause parfois de sévères symptômes au niveau du SNC, ce-dernier n'est pas considéré comme étant un lieu de persistance du virus(27).

Concernant les PV, un groupe de chercheurs a démontré leur capacité de persistance dans des cellules de cultures neurales primaires(28). Cette persistance des PV et leur réactivation a été suspectée d'être la cause du syndrome post-poliomyélite (SPP). Le SPP affecte environ 15 à 20 millions de personnes dans le monde et peut survenir chez des personnes touchées par la poliomyélite dans le passé. La durée entre l'infection par PV et le SPP est variable et est caractérisée comme un intervalle de temps d'une ou plusieurs dizaines d'années durant

lesquelles les fonctions neurologiques restent stables. Les manifestations du SPP consistent en une fatigue, une atrophie ou faiblesse musculaire, des douleurs musculaires et d'autres symptômes pouvant affecter la respiration, le tractus digestif ou entraînant des troubles du sommeil. De nombreux modèles *in vitro* ont montré la persistance du virus et les cultures cellulaires infectées de façon persistantes par les PVs montraient des particularités : seulement un faible pourcentage de cellules exprimait les antigènes viraux et le taux de particules infectieuses virales relarguées dans le milieu de culture était en général très bas. D'autre part, des expériences *in vivo* chez la souris ont montré que le PV pouvait causer une infection persistante et une paralysie lors d'une immunosuppression. Ainsi, certains auteurs suggèrent que des personnes souffrant de déficit de l'immunité humorale ou d'une immunodéficience secondaire à une infection VIH par exemple, pourraient développer une infection chronique à PV. Dans les années 1990, l'hypothèse que l'infection persistante à PV pouvait être à l'origine du SPP a été appuyée par la découverte d'immunoglobulines M (IgM) oligoclonales anti-PV dans le LCR de patients atteints de SPP, absentes chez des patients contrôles. Ces résultats indiquaient la production intrathécale d'anticorps anti-PV et donc une infection continue au sein du SNC. Un autre groupe de chercheurs travailla sur une cohorte de patients atteints de SPP et démontra qu'un petit pourcentage de patients présentait une PCR EV positive conjointement avec la présence d'IgM oligoclonales dans le LCR. L'ensemble de ces résultats semblerait suggérer une infection persistante, au moins chez une partie des patients atteints de SPP. Malheureusement, il n'existe pas de test diagnostique ou de biomarqueurs spécifiques du SPP, le diagnostic s'appuyant uniquement sur un éventail de critères cliniques(29).

Concernant les CV, leur persistance dans le cœur a été le sujet de nombreuses investigations(25) et est associée à une myocardite chronique ou à une cardiomyopathie de dilatation. Dans ce cas, il a été montré que la réponse immune innée de l'hôte (Interféron de type I) est extrêmement importante pour le contrôle de l'infection(30). De plus, l'ARN de CVB3 a été détecté dans le SNC de souris après une infection néonatale jusqu'au 90-ème jour suivant l'infection ce qui permet de penser que ce virus persisterait également dans le SNC(25).

Le problème de la persistance et de la réactivation des EV chez les patients est particulièrement important, notamment dans le cas d'administration de médicaments immunosuppresseurs. L'immunosuppression peut potentiellement conduire à des réactivations ou des augmentations de la réplication des EV dans le SNC menant à des complications neurologiques(31).

1.3.7. Conséquences potentielles à long terme d'une infection par entérovirus

Un groupe de chercheurs a montré que l'infection du SNC par EV-A71 durant l'enfance pouvait être associée à des neuropathies à long terme incluant des retards neuro-développementaux et une diminution des capacités cognitives(32). Cependant, peu d'études ont été réalisées sur les conséquences à long terme d'une infection à EV. Ainsi, il demeure encore une grande zone d'ombre sur ce sujet et des études sur ce thème seraient nécessaires.

I.3.8. Cycle cellulaire des entérovirus

Après liaison avec son récepteur (**Figure 3**), le virus est internalisé dans la cellule par endocytose et la décapsidation virale libère dans le cytoplasme un ARN viral simple brin de polarité positive. Le génome viral se lie alors de façon covalente avec la protéine virale VPg qui est nécessaire à la réplication. La traduction du génome viral produit une polyprotéine qui subit un clivage protéolytique afin de libérer les protéines de réplication (2A-2C et 3A-3D) ainsi que les protéines de capsid (VP0, VP1 et VP3). La réplication du génome viral par l'ARN polymérase ARN dépendante virale (3D^{pol}) débute avec la synthèse d'un d'ARN simple brin de polarité négative qui sert de matrice pour la synthèse de nouvelles molécules d'ARN simple brin à polarité positive. La réplication des EV a lieu dans des structures membranaires induites par les virus nommées organites de réplication. Ces structures requièrent les protéines virales 2BC et 3A associées et des facteurs de l'hôte mais la composition et le mécanisme exact de formation de ces structures restent encore mal connus. Les molécules d'ARN nouvellement synthétisées peuvent soit servir de matrices à leur tour soit participer à la formation de nouveaux virions. Les protéines de la capsid virale s'assemblent en protomères puis en pentamères et il y a formation de provirions qui seront convertis en virions matures pouvant sortir de la cellule via un cycle non lytique ou via une lyse cellulaire(33).

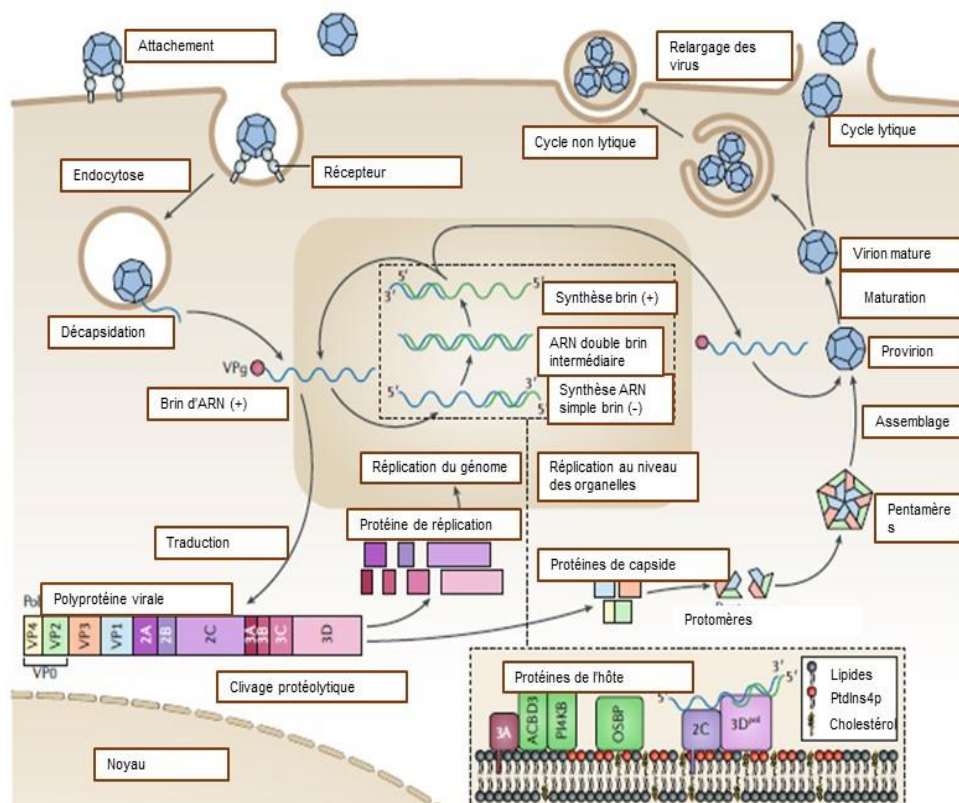


Figure 3 : Cycle cellulaire d'un entérovirus

Source : Baggen et al, 2018

I.4. Pouvoir pathogène des entérovirus

Le pouvoir pathogène des EV est vaste et de nombreuses manifestations cliniques peuvent être retrouvées lors d'une infection. Tout d'abord, on retrouve les PV qui sont responsables de la poliomyélite et qui peuvent engendrer une paralysie flasque aiguë. Il est important de préciser que cette maladie est éradiquée en France et en Europe depuis 2002.

Tous les autres virus de la famille des EV vont être regroupés sous le nom de virus « non poliomyélitiques » et évoluent sous forme épidémique (de mai à octobre), ils touchent particulièrement les enfants. Ces infections ont un large spectre de manifestations cliniques, on retrouve des infections pauci-symptomatiques ou bénignes (fièvre, éruptions, méningites, odynophagie) à des formes neurologiques sévères(34). A titre d'exemple, les EV peuvent causer des myocardites(35), pancréatites(36) ou des myopathies chroniques inflammatoires(37). Chez le nouveau-né, on peut observer des infections multiviscérales de mauvais pronostic. Ainsi, les formes cliniques classiques sont présentées ci-dessous :

- Les infections du système nerveux central :
 - o Méningite à liquide clair, à formule mixte le plus souvent, d'évolution rapidement bénigne. Les EV représentent 90% des méningites à liquide clair. Elles sont observées généralement toute l'année, cependant des épidémies d'intensité variable sont observées chaque année durant l'été et le début de l'automne(38).
 - o Encéphalite, paralysies flasques aiguës, syndromes de Guillain Barré, ataxies cérébelleuses
- Péricardites et myocardites aiguës
- Herpangine et syndrome pieds-mains-bouche
- Infections respiratoires hautes ou basses, sans particularité par rapport aux autres viroses du tractus respiratoire.
- Pleurodynie
- Conjonctivites, parfois hémorragiques à caractère épidémique, parfois associées à des paralysies
- Rares infections chroniques associées à une infection à EV persistante chez des patients immunodéprimés ou ayant un déficit immunitaire (déficit de l'immunité humorale ou déficit combiné) : méningites et méningo-encéphalites chroniques.

On peut noter que les infections à EV sont reliées à des pathologies auto-immunes comme le diabète, la myopathie chronique inflammatoire et les myocardites chroniques(23).

I.5. Les différents types d'entérovirus

I.5.1. Les Poliovirus :

Ce sont les EV les plus étudiés et les mieux caractérisés. Ces virus représentaient un des pathogènes les plus menaçants des pays industrialisés durant le XXème siècle. Les poliovirus sont les agents étiologiques de la poliomyélite antérieure aiguë qui cause une paralysie flasque aiguë chez 1 à 2% des patients infectés. Dans de rares cas, l'infection par ces virus peut engendrer des conséquences cliniques graves comme une paralysie des muscles laryngés et respiratoires. Il existe 3 sérotypes de poliovirus et, depuis sa découverte en 1908, le poliovirus

a été très étudié afin de mieux comprendre le cycle viral et d'être en mesure de trouver des moyens de contrôle de ce pathogène. Ainsi, le virus de la poliomyélite a été le premier virus animal à ARN dont le génome fut totalement séquencé et le premier virus humain dont la structure tridimensionnelle fut déterminée par cristallographie par rayons X. Cette pathologie bénéficie d'un vaccin qui a permis de considérablement diminuer l'incidence de cette maladie faisant passer le nombre de cas de 350 000 en 1988 à 416 cas en 2013. Trois pays dans le monde (Afghanistan, Pakistan et Nigéria) n'ont encore pas réussi à enrayer la transmission du virus. Cependant, les campagnes massives de vaccination à travers le monde ont montré leur efficacité notamment en Inde et en Asie du Sud-Est, région certifiée exempte de poliomyélite en Mars 2014(39).

I.5.2. Les Coxsackievirus

Ces virus sont communément répartis en 2 classes, Coxsackievirus (CV) A et B. Chez les adultes, ces virus donnent des symptômes discrets et ces infections sont généralement sous-diagnostiquées. L'expression clinique la plus commune est un état fébrile aigu. Cependant, des cas de myocardite et péricardite, pleurodynie (maladie de Bornholm), exanthème ou énanthème, syndrome pieds-mains-bouche, herpangine, conjonctivite hémorragique aiguë et quelques cas de méningites aseptiques ou d'encéphalites sont décrits.

Par ailleurs, les CV peuvent engendrer une morbi-mortalité sévère chez les nouveau-nés(23). La majorité des enfants présentant une infection à EV durant la période néonatale guérissent rapidement et il n'y a pas de complication. Cependant, certaines études montrent qu'une maladie à EV sévère durant la période néonatale est associée à certains sérotypes comme le CV B4 ou l'ECHOvirus 11. Les séquelles à long terme de ce genre d'infection sont relativement rares, on peut retrouver une dysfonction hépatique résiduelle chez les enfants ayant présenté une insuffisance hépatique aiguë notamment(1).

Par ailleurs, un lien entre infection à CV durant la grossesse et l'augmentation du nombre d'avortements spontanés, de myocardites fœtales(40) ou encore de retards neurodéveloppementaux chez les nouveau-nés(41) a été montré. D'autres études seraient nécessaires afin d'établir de façon certaine le lien entre infection à CV durant la grossesse et les symptômes cliniques retrouvés chez les fœtus et nouveau-nés.

I.5.3. ECHOvirus (ECHO-Vs)

Ces virus furent isolés pour la première fois des selles de patients asymptomatiques, ils sont dorénavant reconnus pour être associés à de nombreuses pathologies humaines notamment la méningite aseptique. Ils sont particulièrement infectieux et ciblent surtout les bébés et les jeunes enfants. Ils peuvent causer un état fébrile modéré non spécifique similaire aux CV(23).

I.5.4. Sérotypes particuliers d'entérovirus

I.5.4.1. Entérovirus -A71

L'EV-A71 a été isolé pour la première fois en Californie en 1969, il constitue un problème majeur de santé publique dans la région Asie-Pacifique où il sévit sous forme épidémique. Ce virus touche particulièrement les enfants et cause un syndrome pieds-mains–bouche accompagné de complications neurologiques et systémiques. Les manifestations neurologiques s'étendent de la méningite aseptique à la paralysie flasque aiguë ou à la rhombencéphalite, accompagnées de symptômes systémiques tels qu'un œdème pulmonaire et un choc cardiogénique. L'EV-A71 est transmis majoritairement par la voie fécale-orale et, à l'image des autres EV, la réplication initiale s'établit dans les tissus lymphoïdes donnant naissance à une virémie secondaire. La plupart des infections s'arrêtent à ce stade et restent asymptomatiques. Dans le cas de l'EV-A71, une dissémination aux organes du système réticuloendothélial (foie, rate, moelle osseuse et ganglions lymphatiques), cœur, poumons, pancréas, peau et SNC peut avoir lieu et engendrer des conséquences cliniques beaucoup plus graves pour le patient.

Les propriétés dermatotropiques de l'EV-A71 ont été reconnues pour la première fois lors d'épidémies de syndromes pieds-mains-bouche au Japon en 1973. Dans les années 1970, il y eut deux grandes épidémies en Europe, la première en Bulgarie et la deuxième en Hongrie trois ans plus tard. Cependant, la région Asie-Pacifique occupe une place majeure dans l'épidémiologie de l'EV-A71. En effet, au Sarawak (Etat de Malaisie) on dénombra 2618 cas de syndrome pieds-mains-bouche et il y eut 34 décès entre Mai et Juillet 1997. La **Figure 4** illustre, à titre d'exemple, la surveillance épidémiologique des infections à EV-A71 et des cas de SPMB en Malaisie entre 1998 et 2009.

L'épidémie de Taiwan en 1998 toucha environ 1,5 millions de personnes, 405 enfants furent hospitalisés pour complications neurologiques sévères et on dénombra 78 décès. Enfin, une épidémie se déroula en Chine en 2008 où l'on recensa environ 490 000 infections et 126 décès parmi les enfants(42).

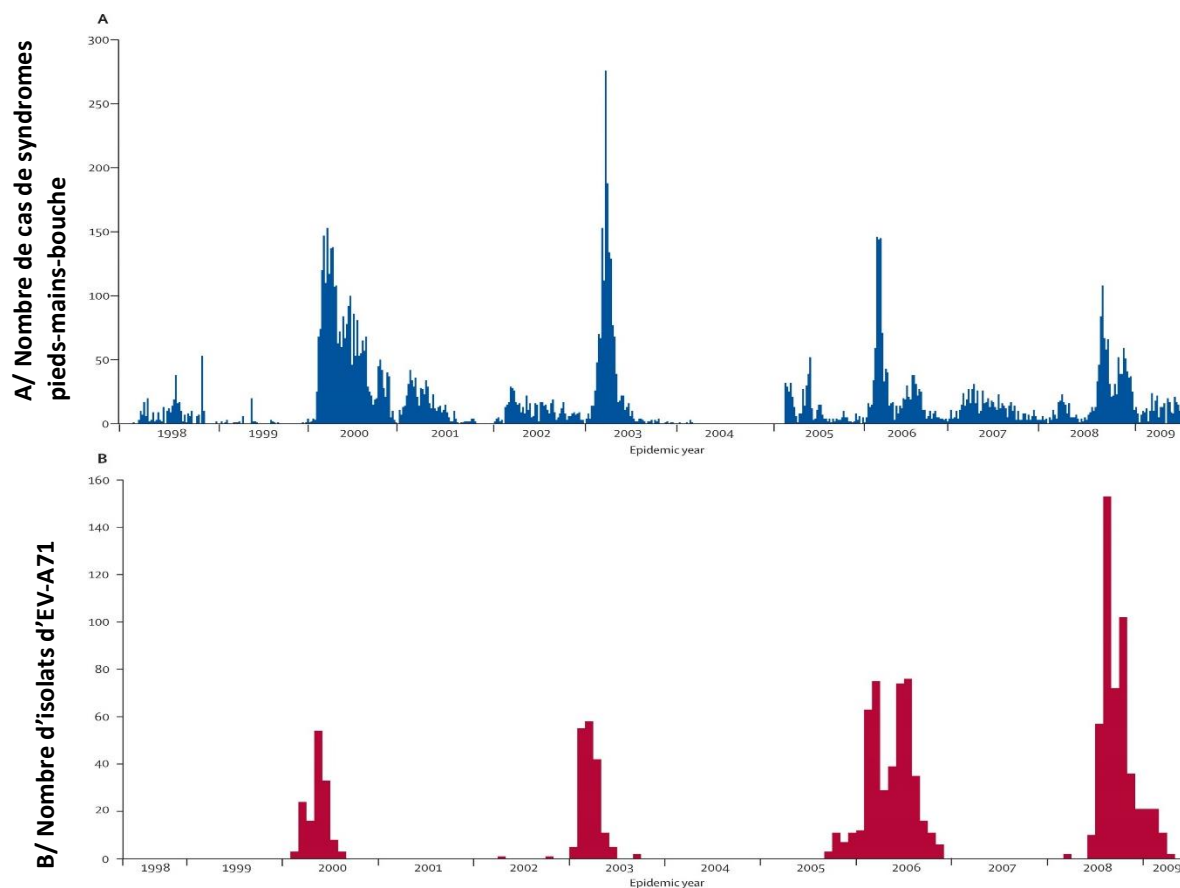


Figure 4 : Distribution des syndromes-pieds-mains-bouche (A) et des isolats d'entérovirus A71(B) identifiés au Sarawak en Malaisie, de 1998 à 2009.

Source : Solomon et al, 2010

En France, entre 1994 et 2009, les infections à EV-A71 furent majoritairement sporadiques à l'image des autres pays Européens. Les études phylogénétiques basées sur le gène 1D codant pour la protéine de capsid VP1 ont permis de déterminer trois génogroupes (A, B et C) et onze subgénogroupes (B0-B5 ; C1-C5). En France et dans les autres pays d'Europe, le génogroupe C circule majoritairement avec les subgénogroupes C1 et C2. On peut noter que l'épidémie de Taiwan fut largement associée au génogroupe C2 mais en France, la circulation des virus de génotype C n'est pas associée à des épidémies. Cela peut s'expliquer d'une part par le fait que le syndrome pieds-mains-bouche n'est pas une maladie sous surveillance en France et que par conséquent elle y est probablement sous-estimée, d'autant plus que le génotypage n'est pas systématique.

Les facteurs génétiques propres à l'hôte peuvent influencer la prévalence de l'infection à EV-A71 et la susceptibilité à développer une infection sévère. Les facteurs associés au virus peuvent affecter la transmission de l'EV-A71 notamment via les recombinaisons génétiques qui joueraient un rôle dans l'émergence de nouveaux subgénogroupes ou de nouveaux variants(43).

Néanmoins, un premier cas fatal d'infection à EV-A71 fut recensé en France en 2007 au CHU de Brest. Il s'agissait d'un patient de 17 mois présentant un œdème pulmonaire ainsi qu'une rhombencéphalite. Le virus a été identifié comme appartenant au subgroup C2(44). Plus récemment, un autre cas fatal d'infection à EV-A71 fut répertorié. Dans ce cas, il s'agissait d'un adulte en état d'immunodépression sous anticorps anti-CD20 (rituximab) âgé de 66 ans hospitalisé dans le service de neurologie du CHU de Bordeaux. Il avait développé une paralysie faciale, une aphasie et des troubles de la conscience conduisant à un transfert en unité de soins intensifs. Progressivement, l'état neurologique du patient s'est dégradé et il décéda d'une rhombencéphalite. Le virus associé a été identifié comme appartenant au subgroup C2. Les séquençages ont été effectués sur le gène 1D sur les échantillons de LCR et de selles et ils montraient une homologie nucléotidique comprise entre 95 et 97%(31).

I.5.4.2. Entérovirus D68

L'entérovirus D68 (EV-D68) a été identifié pour la première fois aux Etats-Unis en 1962 chez quatre patients pédiatriques présentant des infections respiratoires sévères aiguës. Jusqu'en 2014, seulement quelques cas sporadiques d'infections avec ce virus ou de petites épidémies ont été rapportées en Asie, en Europe et aux Etats-Unis. Les complications pouvaient être respiratoires et nécessitaient une prise en charge aux soins intensifs associée à une ventilation mécanique.

En 2014, aux Etats-Unis, une épidémie nationale s'est déclarée recensant 1 152 cas d'EV-D68. Elle toucha 49 états et concernait essentiellement des enfants hospitalisés présentant un asthme sévère ou une bronchiolite et plus sporadiquement des enfants présentant une myélite flasque aiguë(45). En France, la surveillance et le typage moléculaire effectués ont rapporté, fin septembre 2014, le cas d'un enfant ayant développé une paralysie flasque aiguë sévère suivie d'une pneumonie à EV-D68. Ainsi, une surveillance a été mise en place entre le 1^{er} Juillet et le 31 Décembre 2014. Cette étude recensa 6 229 échantillons respiratoires. Au total, 200 infections à EV-D68 ont été diagnostiquées (diagnostic effectué par RT-PCR ou par séquençage partiel de la protéine virale VP4-VP2), dans toutes les régions de participation des laboratoires ce qui suggère une circulation du virus à travers l'ensemble du territoire. Le taux de détection de l'EV-D68 durant cette période en France était similaire à celui observé en Europe. La plupart des cas ont été diagnostiqués chez les enfants, comme aux Etats-Unis. De plus, la majorité des enfants infectés par l'EV-D68 présentaient des symptômes respiratoires tels que de l'asthme et/ou une bronchiolite. Des signes neurologiques ont été identifiés chez quatre patients et un seul cas de paralysie flasque aiguë a été rapporté durant cette période de surveillance. Pour les trois cas restants, il s'agissait de méningites ou de crises d'épilepsie. Cependant, il n'est pas certain que ces symptômes soient exclusivement dus à l'EV-D68 car aucun EV-D68 n'a été détecté sur les 1 197 LCR testés. L'EV-D68 n'a pas provoqué d'augmentation des pathologies respiratoires sévères durant la période de surveillance en 2014 mais ce virus a eu un impact clinique dans le sens où 10,7% des patients pédiatriques et 14,3% des patients adultes infectés passèrent en unité de soins intensifs. Par conséquent, il paraît indispensable de maintenir une surveillance constante de ce virus et de prendre en compte ce diagnostic différentiel de patients présentant des symptômes respiratoires sévères y compris chez les adultes(46).

I.6. Diagnostic d'une infection à entérovirus non poliomyélitique

On procède au diagnostic de ce type d'infection uniquement devant les formes sévères ou suffisamment bruyantes pour entraîner l'hospitalisation, les atteintes méningées ou lorsqu'elles surviennent sur un terrain particulier (nouveau-né, patient immunodéprimé). Ainsi, on est amené à demander la recherche d'un EV dans les cas suivants :

- Méningite aiguë
- Infection néonatale ou materno-fœtale
- Syndrome pieds-mains-bouche sévère
- Lésions cutanées atypiques, en particulier chez l'immunodéprimé
- Conjonctivite hémorragique
- Myocardite/péricardite aiguë

I.6.1. Analyse et prélèvement

Il s'agit d'un diagnostic direct par recherche du virus par biologie moléculaire (RT-PCR). La réalisation d'une sérologie ne présente aucun intérêt et n'est, par conséquent, pas effectuée au laboratoire. Par ailleurs, la culture cellulaire est uniquement réalisée dans les laboratoires spécialisés car elle demande l'emploi de plusieurs lignées cellulaires qui sont difficiles à mettre en place en routine.

Les échantillons biologiques à prélever dépendent du tableau clinique et sont indiqués dans le **tableau 2** :

| Tableau clinique | Type de prélèvement |
|-----------------------------|--|
| Méningite | LCR |
| Lésions cutanées | Prélèvement des lésions cutanées ou des muqueuses (vésicules ou ulcérations), biopsies |
| Infection néo-ou périnatale | Sang, liquide amniotique, prélèvement conjonctival, sécrétions respiratoires, urines (chez le nouveau-né) |
| Conjonctivite | Écouvillon conjonctival |
| Myocardite | Prélèvement de sang (sérum ou plasma) en première intention, biopsie cardiaque (si disponible), selles et écouvillon pharyngé peuvent compléter le bilan (mais peu spécifique) |
| Péricardites | Liquide péricardique |

Tableau 2 : Prélèvements à effectuer en cas de suspicion d'infection à entérovirus

Source : Henquell et al, 2015

I.6.2. Interprétation de la détection du génome viral par RT-PCR

En cas de méningite ou de méningo-encéphalite, la détection d'un EV authentifie la cause de l'infection et permet l'arrêt d'éventuels traitements instaurés. Il est en de même avec la détection du virus dans les autres liquides/vésicules prélevés. Cependant, en dehors d'un contexte clinique évocateur, la détection isolée d'un EV à partir d'un prélèvement de gorge ou de selles détient une signification plus limitée car ce sont les portes d'entrée et d'élimination du virus. En effet, l'excrétion virale peut durer plusieurs semaines (1 à 2 semaines dans la gorge et 4 semaines minimum dans les selles). C'est pourquoi la détection d'un entérovirus à partir d'un prélèvement périphérique (gorge ou selles) permet de faire un diagnostic présomptif si la RT-PCR est négative sur le LCR, par exemple(34).

I.6.3. Diagnostic différentiel

Dans le cadre des méningo-encéphalites, les autres agents pathogènes retrouvés sont les *Herpesviridae*. Il peut également s'agir d'une méningite bactérienne décapitée, ou alors, dans le cas d'une femme enceinte ou d'un patient immunodéprimé, il est nécessaire d'envisager une fièvre éruptive (rubéole, rougeole, oreillons, CMV).

I.7. Vaccination contre les entérovirus

I.7.1. Le vaccin contre PV

L'histoire de la recherche du vaccin contre les EV débuta avec le développement de vaccins contre les virus de la poliomyélite, véritable fléau pour l'espèce humaine. Une forme inactivée du vaccin par la formaline a été développée par Jonas Salk et brevetée en 1955. Il s'agit du vaccin poliomyélitique inactivé injectable (VPI) qui contient les trois sérotypes de virus inactivés. Ce vaccin nécessite plusieurs injections et des rappels réguliers, il est totalement sûr mais son coût limite sa diffusion à certains pays développés. En 1963, une forme orale vivante atténuée du vaccin (VPO) contre les PV a été formulée par Albert Sabin. Le VPO contient les trois sérotypes de virus vivants, atténués à la suite de mutations. Le VPO possède de multiples avantages car il est facile à utiliser (ne nécessite pas d'injection) et il confère rapidement une bonne immunité générale et une immunité locale au niveau de l'intestin réduisant par conséquent la transmission du poliovirus sauvage (ce que fait bien moins efficacement le VPI). Enfin, le VPO a un coût très abordable ce qui facilite son emploi dans les pays en voie de développement. Les principaux inconvénients du VPO sont sa mauvaise conservation aux températures ambiantes et son instabilité génétique, cause possible de cas extrêmement rares de « poliomyélite paralytique associée au vaccin » apparaissant quelques jours après la vaccination chez les sujets vaccinés ou leurs proches non vaccinés. Ce phénomène est une conséquence directe de l'instabilité génétique du vaccin qui a eu pour conséquence une épidémie de poliomyélite en République Dominicaine et à Haïti dans les années 2000(23). Toutefois, les campagnes d'éradication coordonnées par l'OMS ont fait appel au vaccin vivant. Il faut retenir que l'usage de ces vaccins a permis de réduire de façon drastique l'incidence de la poliomyélite, bien que la maladie ne soit pas encore totalement éradiquée à travers le monde.

I.7.2. Vaccins contre l'EV-A71

Il n'existe pas aujourd'hui en Europe de vaccin contre l'EV-A71, néanmoins, plusieurs essais ont été développés. Ainsi, un virus entier inactivé par formaldéhyde a permis de protéger des souris d'encéphalomyélites causées par l'infection à EV-A71(47). D'autres études sur des souris transgéniques ont montré que l'administration de la protéine de capsid VP1 permettait d'obtenir une protection efficace grâce au développement d'anticorps. Enfin, un vaccin codant pour la protéine VP1 a aussi été développé mais celui-ci n'était que partiellement efficace et montrait un taux de survie à 40% chez les souris inoculées avec une dose létale d'EV-A71 après la vaccination(48).

I.8. Diagnostic biologique d'une méningite

I.8.1. Définition

La méningite est définie comme une inflammation de l'arachnoïde et de la pie-mère, les membranes enveloppant le cerveau et la moelle épinière. Ce type d'infection peut survenir de façon communautaire ou nosocomiale. Le diagnostic repose sur l'examen du LCR sauf s'il existe une contre-indication à effectuer le prélèvement.

I.8.2. Le prélèvement du LCR

Il doit être effectué au début de la maladie, avant administration de tout traitement anti-infectieux dans la mesure du possible. Les renseignements cliniques associés au prélèvement permettent de définir les techniques microbiologiques à mettre en œuvre. Ainsi, il est essentiel de renseigner l'âge du patient, son état immunitaire, la notion de purpura, de voyages, de piqûres, de cas dans l'entourage, d'actes de neurochirurgie ou encore de traumatisme crânien. Le LCR est recueilli dans 3 tubes stériles sans anticoagulant destinés à l'examen biochimique, bactériologique et cytologique. Chacun des tubes doit contenir 0,5mL au minimum pour les examens de routine. Le prélèvement doit être acheminé sans délai au laboratoire afin que les résultats cytologiques et biochimiques de routine ainsi que la coloration de Gram puissent être réalisés et communiqués très rapidement au service clinique.

I.8.3. Examen microbiologique

Il doit être réalisé le plus rapidement possible. L'examen microbiologique doit répondre à 4 objectifs :

- Orienter rapidement la thérapeutique et la prise en charge du patient en fonction des résultats rapidement disponibles (examen cytologique et microscopique, éventuellement amplification génique).

- Affirmer l'origine bactérienne, virale, parasitaire ou fongique par l'isolement des micro-organismes et/ou la détection de leurs composants (antigènes, ADN, ARN) ou des anticorps produits.
- Etablir le profil de sensibilité de la souche incriminée et permettre la réévaluation du traitement probabiliste préalablement institué, voire arrêter le traitement antibiotique si un diagnostic de certitude d'une méningite virale a été posé.
- Déclarer, si nécessaire, le cas auprès des autorités sanitaires afin de déclencher une enquête épidémiologique ou permettre la prise en charge des « cas contacts » (méningite à méningocoque par exemple).

I.8.4. Aspect macroscopique du LCR

Le LCR est normalement eau de roche mais lors d'une pathologie il peut se présenter sous différents aspects : hémorragique, citrin, xanthochromique, trouble, purulent « eau de riz ». Un trouble apparaît dès 200 leucocytes par mm³. Cependant, un aspect clair du LCR n'exclut pas la présence de bactéries, de virus ou de champignons.

I.8.5. Analyse cytologique du LCR

On effectue la numération des leucocytes et la détermination semi-quantitative des érythrocytes. Les résultats sont exprimés en nombre de cellules par mm³. Puis, on effectue la formule leucocytaire qui n'est réalisée qu'à partir de 10 éléments cellulaires par mm³. La présence de cellules atypiques doit être signalée. L'examen macroscopique, cytologique et biochimique du LCR identifie cinq grandes catégories (LCR normal, purulent, lymphocytaire, panaché ou hémorragique). Cette classification permet d'orienter vers une étiologie bactérienne, virale ou fongique (**Annexe1**). Les méningites virales ont classiquement une formule à prédominance lymphocytaire, cependant, dans le cas des méningites à EV, une prédominance de polynucléaires ou une formule panachée est très souvent observée.

I.8.6. Biologie moléculaire du LCR dans les infections virales

La technique d'amplification génique est la technique de référence afin d'effectuer la recherche de virus dans le LCR. Dans les cas de méningite avec faible suspicion de méningite bactérienne, la réalisation d'une RT-PCR à la recherche d'un EV est recommandée chez l'enfant et l'adulte quelle que soit la saison de l'année(49). En effet, cette étiologie est la première cause de méningite « à liquide clair ». Devant la suspicion d'une cause herpétique, il est recommandé d'effectuer une PCR HSV1-2 associée à un traitement probabiliste par aciclovir institué sans attendre le résultat de l'examen.

Le LCR normal contient moins de 5 leucocytes par mm³ (10 à 30 leucocytes par mm³ chez le nouveau-né) et est stérile. Tout résultat microbiologique positif doit être considéré comme témoin d'une infection. Il convient néanmoins d'évaluer la possibilité d'une contamination lors du prélèvement ou lors du processus analytique. Les examens microbiologiques peuvent rester négatifs bien que le LCR contienne un nombre important de leucocytes, il s'agit de la

« méningite aseptique » dont les EV constituent une étiologie fréquente(50,51) La méningite aseptique peut également être causée par :

- Une méningite bactérienne décapitée par un traitement antibiotique préalable
- Une méningite due à un micro-organisme fragile, difficile à mettre en évidence ou ne se développant pas sur les milieux usuels.
- Une authentique méningite aseptique observée dans des maladies inflammatoires ou après la prise de médicaments
- Une encéphalite limbique paranéoplasique
- Une réaction leucocytaire aspécifique destinée à phagocyter les érythrocytes après une hémorragie méningée ou une opération neurochirurgicale. Dans ce cas, on note la présence de cellules érythrophagocytaires(52).

I.9. Déclaration des cas positifs de méningites à entérovirus à l'ARS et envoi des souches au Centre national de référence

Les cas de méningites à EV sont déclarés par le laboratoire de virologie du CHU de Bordeaux auprès de l'ARS Nouvelle Aquitaine et du CNR des EV. De plus, l'éluat (extrait d'acides nucléiques) est envoyé au CNR ce qui permet d'obtenir le typage de la souche concernée.

I.10. Surveillance des infections du SNC par entérovirus en France et en Europe

En France, la surveillance des infections par EV est assurée par un réseau de laboratoires volontaires depuis les années 2000. Les données sont recueillies de façon mensuelle par le centre national de référence des entérovirus et parechovirus situé au laboratoire de virologie du CHU de Lyon et du CHU de Clermont-Ferrand. Parallèlement, une surveillance des passages aux urgences pour un diagnostic de méningite à EV est assurée par le réseau Oscour/Santé publique France. Les sérotypes d'EV circulant diffèrent selon l'année. Certaines années voient des sérotypes circuler de façon épidémique. On peut citer notamment l'épidémie de méningites aseptiques en 2005 dans le nord-est de la France. Cette année-là, le sérotype majoritaire circulant retrouvé était l'ECHOvirus-30(51).

Des chercheurs en Europe ont étudié le lien entre certains sérotypes d'EV et les symptômes cliniques des patients développant ces infections. Une étude en Espagne, effectuée sur une période de 4 ans, a rassemblé 21 832 échantillons collectés de Janvier 2010 à Décembre 2013. Les échantillons ont été analysés par technique de RT-PCR et le taux de positivité était de 6,5%. Beaucoup d'échantillons positifs pour EV ont pu être génotypés (1 153 échantillons soit 81%) et ils ont trouvé au total 34 types d'EV différents (26 espèces d'EV type B et 8 espèces de type A). Les 5 types les plus fréquents d'EV détectés étaient : l'ECHOvirus (E) - 30(18%), E-5(16%), E-6 (13%), E-11 (7%) et E-21 (6%). Ils ont noté que chaque année, les sérotypes d'EV changeaient et étaient remplacés par d'autres. Par exemple, en 2010, les sérotypes prédominants étaient E-6, E- 13 ou E-30, remplacés par E-5, E-21 et E-11 en 2011. Puis, E-5 est devenu le sérotype prédominant en 2012 et fut remplacé par E-30 en 2013.

De plus, le type d'EV prédominant dans chaque groupe n'était pas le même selon l'âge. Dans cette étude, les auteurs ont noté que les infections à CV-B étaient quasiment absentes chez les enfants de plus de 2 ans et chez les adultes. Par ailleurs, ils ont mis en évidence que des génotypes étaient clairement reliés à des syndromes spécifiques notamment CV-B et

myocardites. Les EV-A étaient la cause de 90% des rashes. Dans les sepsis, méningites et fièvre sans origine, aucun type de virus n'était spécifiquement associé mais les différents ECHOvirus étaient largement prédominants. Malheureusement, le nombre trop faible d'échantillons positifs à EV pour les infections respiratoires n'a pas permis de conclure quant à un lien entre certains types d'EV et une symptomatologie respiratoire(53).

I.11. Objectif

L'objectif de ce travail fut d'évaluer rétrospectivement l'activité de diagnostic d'infections à EV sur la période de Novembre 2016 à Octobre 2017 au laboratoire de virologie du CHU de Bordeaux.

Ce travail avait pour but d'évaluer différents critères de cette activité comme le nombre de demandes, le type de services demandeurs ou encore les caractéristiques cliniques des patients positifs à EV. Il s'agissait également de faire un point sur les sérotypes circulant durant cette période grâce au recueil des données de génotypage afin de pouvoir comparer nos données avec celles recueillies au niveau national. Le délai de rendu de résultat de la PCR par le laboratoire de virologie fut également calculé ainsi que la durée d'hospitalisation des patients au CHU de Bordeaux afin d'évaluer l'intérêt éventuel de la mise en place de la PCR EV de façon quotidienne au laboratoire de virologie.

II. Matériel et Méthode

Le diagnostic d'EV dans les échantillons est obtenu par une technique RT-PCR avec le kit SmartEV de la société Cepheid®. Il s'agit d'un test diagnostique *in vitro* conçu pour détecter la région 5'UTR des entérovirus dans des échantillons de LCR par une technique d'amplification de PCR en temps réel.

Ce test est exécuté sur le système SmartCycler II Dx qui est un thermocycleur en temps réel utilisé pour l'identification d'ADN ou d'ARN à partir d'échantillons biologiques. Cet instrument comprend 16 modules indépendants capables de détecter quatre signaux fluorimétriques (couleurs) distincts en temps réel. Il est intéressant de noter que les échantillons sont amplifiés et analysés dans des tubes réactionnels hermétiques exclusifs conçus afin d'optimiser la sensibilité optique et de réduire au minimum le risque de contamination par des produits d'amplification de PCR.

II.1. Réalisation de la PCR entérovirus au laboratoire de virologie

Les séries de PCR EV (fréquence de réalisation bi-hebdomadaire en général) comprennent 14 échantillons de patients ainsi qu'un contrôle positif et un contrôle négatif. L'extraction d'ARN viral est réalisée (extraction des acides nucléiques totaux, automate Magna96, Roche, Meylan, France) puis la PCR est effectuée dans un second temps. Les réactifs sont constitués de billes SmartEV TSR comprenant les amorces sens et anti-sens des EV ; des sondes EV marquées par les fluorochromes FAM et Alexa Fluor R 532 ainsi que des amorces sens et anti-sens pour le contrôle interne. Les billes SmartEV EZR comprennent la sonde marquée par le fluorochrome Texas Red pour le contrôle interne (CI), un inhibiteur de RNase, les enzymes transcriptase inverse M-MLV et la Taq, les désoxynucléotides tri-phosphate et des ions (chlorure de potassium et chlorure de magnésium) nécessaires au bon fonctionnement des enzymes. Le CI de la PCR est constitué par les billes SmartEV SPC avec de l'ARN poly A. Le CI de la PCR permet de signaler toute inhibition de la réaction de PCR et ainsi d'éviter des résultats faussement négatifs.

Le contrôle interne de la réaction est réalisé de la façon suivante (**Tableau 3**) :

| Nombre de réactions | 4 | 6 | 8 | 10 | 12 | 14 | 16 |
|---------------------|----|----|----|----|----|----|----|
| Billes EV SPC | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| Eau (µL) | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 |

Tableau 3 : Préparation du contrôle interne de la RT-PCR entérovirus

Les mélanges réactionnels étaient préparés selon le tableau ci-dessous (**Tableau 4**) :

| Nombre de réactions | 4 | 6 | 8 | 10 | 12 | 14 | 16 |
|--------------------------------------|----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Billes EV TSR | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| Billes EV EZR | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| Eau (µL) | 66 | 99 | 132 | 165 | 198 | 231 | 264 |
| Enzyme SSIII RT Platinum (µL) | 1 | 1,5 | 2 | 2,5 | 3 | 3,5 | 4 |

Tableau 4 : Préparation du mix réactionnel de la RT-PCR entérovirus

Il est à noter que la méthode comprend le rajout d'enzyme SuperScript III Platinum (SSIII) provenant du kit Invitrogen SuperScript III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR System®, ceci afin d'optimiser la réaction de PCR, selon les recommandations du CNR entérovirus.

Le contrôle négatif de la réaction de PCR est constitué d'eau PCR Grade Invitrogen™. Il permet de détecter une éventuelle contamination des réactifs ou du matériel.

La réalisation des mélanges réactionnels de PCR s'effectue dans la pièce prévue à cet effet nommée « pièces des mix ». Ensuite, les éluats sont déposés dans la « pièce des dépôts ». Ce respect du « sens » des pièces est présent dans tous les laboratoires de biologie moléculaire afin d'éviter une contamination des mix de réactions par des produits de PCR.

Pour mémoire, le témoin positif provient de l'extraction d'échantillons de patients positifs pour la PCR EV. Il est préparé de telle façon qu'il soit détecté positif entre 25 et 30 cycles de PCR (Cycle threshold Ct).

Une réaction de PCR dure environ une heure et trente minutes et le programme de PCR est indiqué dans le **tableau 5**.

| Étapes de la RT-PCR | Température (°C) | Durée |
|------------------------------|-------------------------|--------------|
| Reverse Transcription | 50 | 30 min |
| Dénaturation | 95 | 2 min |
| Amplification : | 95 | 15 s |
| 50 cycles | 55 | 15s |
| Elongation | 72 | 15s |

Tableau 5 : Les différentes étapes d'un cycle de la RT-PCR entérovirus

II.2. Validation d'une série de PCR entérovirus :

La série de PCR est validée si le contrôle interne de chaque échantillon (marqué par le fluorochrome Texas Red) est positif et si le contrôle négatif est détecté négatif par le système. Le marqueur Alexa 532 sert à l'analyse des échantillons et à la détection des patients positifs. Le seuil de positivité est caractérisé par le Ct. Enfin le marqueur FAM sert également à la détection de certains sérotypes d'EV.

Si un échantillon n'est pas positif pour le contrôle interne, l'éluat correspondant est repassé dans la série suivante de PCR pur et dilué au 1/10^{ème} afin d'éliminer un éventuel inhibiteur de PCR. En cas de non-résolution du problème, l'échantillon est extrait de nouveau.

II.3. Caractéristiques des performances

Les amorces et sondes de ce kit sont conçues pour détecter la région 5'UTR du génome des EV. L'analyse *in vitro* avec le test SmartEV a confirmé la détection d'entérovirus des sérotypes suivants : Entérovirus 68 à 71, Coxsackievirus A2, A3, A5, A6, A7 et A9 à A14, A17 à A22 et A24, Coxsackievirus B1, B3, B4, B5 et B6 et les ECHOvirus 1 à 6, 8, 11, 12, 14 à 21, 24 à 27 et 29 à 33.

Par ailleurs, nous nous assurons de la fiabilité de notre technique de diagnostic au laboratoire via l'emploi de contrôle externe de la qualité (EEQ) distribué par le programme Quality control for molecular diagnostics (QCMD). L'objectif est d'aider à contrôler et à améliorer la qualité au sein du laboratoire en évaluant sa capacité à utiliser une technique de diagnostic moléculaire. Concernant les EV, le programme QCMD envoie au laboratoire un panel d'échantillons à tester par RT-PCR EV. Ces échantillons peuvent être négatifs ou positifs pour différents types d'EV : Coxsackievirus ou ECHOvirus par exemple. Ces contrôles qualité sont testés dans la même série que des patients afin de subir le même traitement et d'obtenir ainsi le même rendu de résultat. Pour chaque EEQ testé, les deux résultats possibles sont négatif ou positif. Pour les années 2016 et 2017, QCMD proposait 10 EEQ à tester par an et les résultats du laboratoire étaient exacts dans 100% des cas pour ces deux années.

Concernant les interférences, cette technique peut tolérer des échantillons de LCR contenant une concentration jusqu'à 10 000 cellules/mm³, une concentration en protéines de 2 000 mg/dL ou des échantillons contenant 50% v/v de sang ou de plasma.

II.4. Génotypage des entérovirus

Lorsqu'un échantillon est détecté positif par la technique de RT-PCR mise en œuvre dans le laboratoire, le génotypage du virus est réalisé dans certains cas : infection grave, LCR positif avec un Ct inférieur à 35 (charge virale forte), décès du patient. Ce génotypage est réalisé par le CNR des EV. Notre laboratoire procède alors à l'envoi des éluats, accompagnés d'une fiche de renseignements cliniques concernant le patient (**Annexe 2**).

Le CNR assure le génotypage par amplification du génome de l'EV par RT-PCR et séquençage de la région 5' (300 -350 paires de bases) du gène 1D codant pour la protéine de capsid VP1 (**Figure 5**). Cette méthode permet l'amplification et le séquençage de tous les sérotypes d'entérovirus. Le sérotype est déterminé par comparaison de la séquence obtenue pour un EV donné avec les séquences d'EV contenues dans la base de données GenBank.

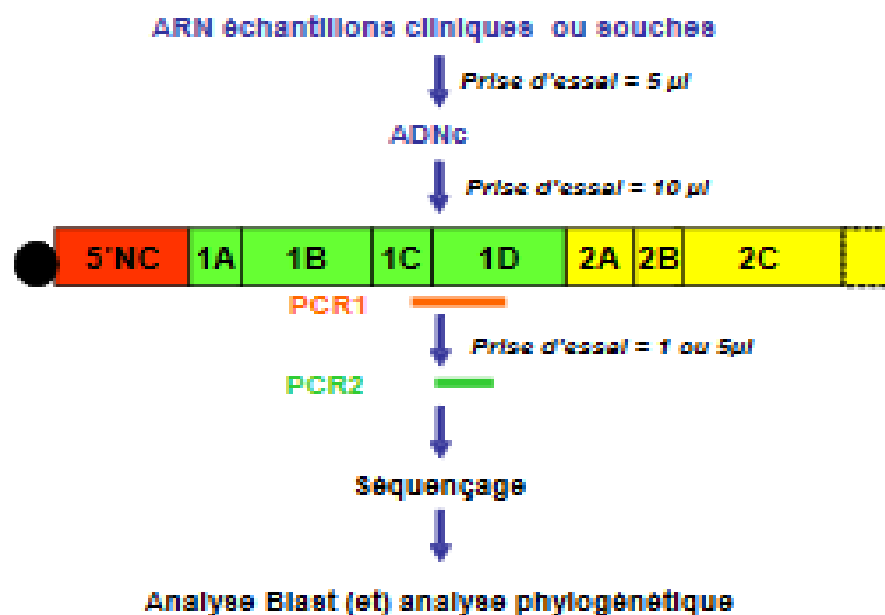


Figure 5 : Principe du génotypage des entérovirus

Source : CNR des entérovirus

Les réactions de PCR sont réalisées par le CNR. La purification et le séquençage des produits de PCR sont traités par la société Biofidal® à Vaulx-en-Velun ou la société Genoscreen®.

II.5. Recueil des données biologiques et cliniques

Tous les prélèvements positifs à la RT-PCR EV ont été recensés grâce aux feuilles de travail du laboratoire. Pour chaque cas, nous avons relevé les données biologiques du patient grâce au logiciel de laboratoire Synergy. Ainsi, lorsqu'un LCR était réalisé, la glycorachie, la protéinorachie, les lactates (lorsqu'ils étaient demandés), la numération, la formule (si le LCR contenait plus de 10 éléments/mm³) ainsi que le Ct de positivité de la PCR étaient notés. Les données cliniques ont été récupérées grâce au logiciel patient DxC@re. Nous avons relevé l'âge, le service clinique prescripteur de la PCR EV, la durée d'hospitalisation, la symptomatologie, le type de prélèvement effectué, le traitement initial du patient, l'élément déclenchant l'arrêt des antibiotiques (s'ils étaient prescrits) ainsi que la notion de contamination intra-familiale. Lorsque l'éluat était envoyé au CNR EV, le génotypage était archivé sous format papier au laboratoire et les données ont été récupérées dans le cadre de ce travail.

II.6. Analyse des résultats des données patients :

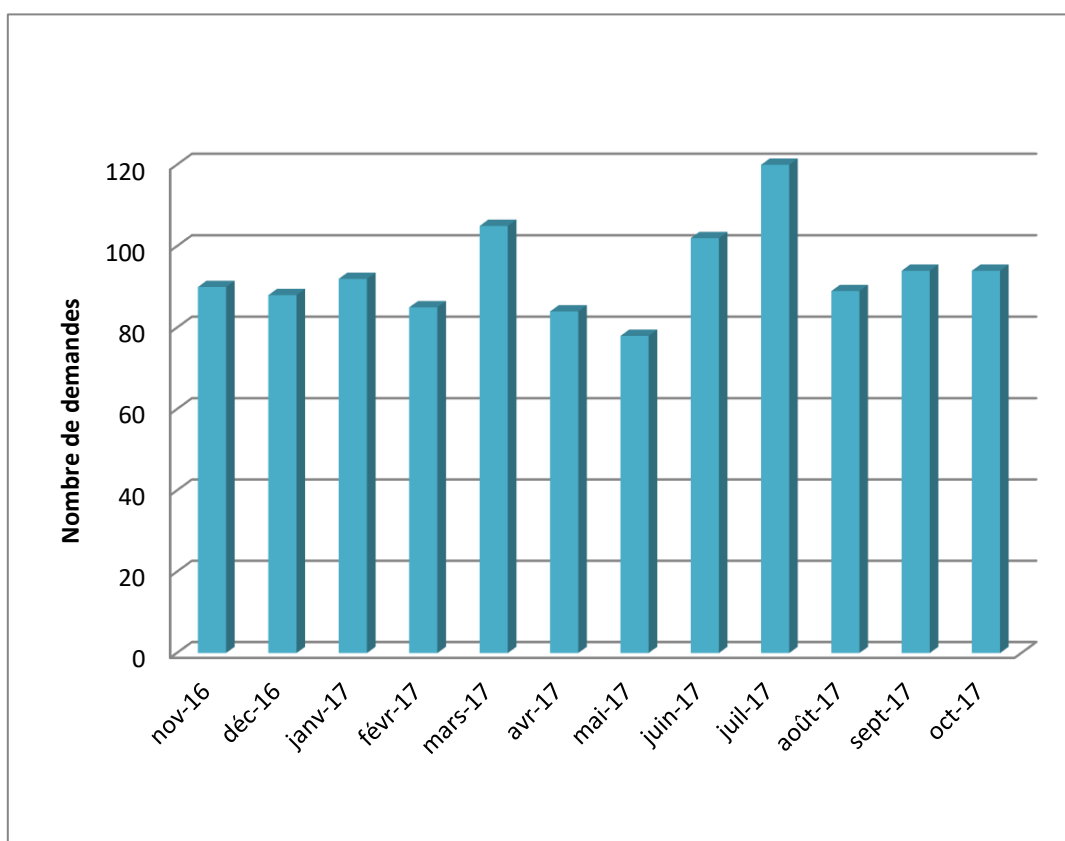
Les calculs et graphiques ont été réalisés à l'aide du logiciel Excel.

III. Résultats

Durant un an, nous avons collecté les données de tous les échantillons pour lesquels une demande de prescription d'EV était enregistrée et validée par le service de virologie, en prenant en compte les recommandations de prescription des PCR en neurovirologie notamment (**Annexe 3**). Les données relatives au traitement de l'échantillon au sein du laboratoire ont été recueillies ainsi que les données cliniques du patient et le séquençage du virus obtenu lorsque les informations étaient disponibles.

III.1. Analyse du nombre de prélèvements et du pourcentage de positivité de la PCR EV

Le nombre de recherches d'EV par technique de RT-PCR ainsi que le type d'échantillons ont été recueillis tous les mois pendant 1 an. La période d'étude s'est étendue de Novembre 2016 à Octobre 2017. Ainsi, nous avons constaté que le nombre de demandes de novembre 2016 à mars 2017 était stable aux environs de 90 par mois (**Figure 6**). Puis, ce nombre a augmenté à partir de la période estivale pour atteindre un maximum de 120 demandes durant le mois de Juillet 2017. Après ce pic, nous avons observé une diminution du nombre de demandes aux alentours de 90 par mois.



**Figure 6 : Nombre de demandes de PCR EV sur la période
Novembre 2016-Octobre 2017**

De façon plus remarquable, la fréquence de positivité de la RT-PCR EV (**Figure 7**) a augmenté durant la période estivale, passant de 13,3% en novembre 2016 à 39,1% durant le mois de juillet 2017. Le retour à une fréquence « basale » de positivité a été observé au mois de septembre 2017 aux alentours de 5%.

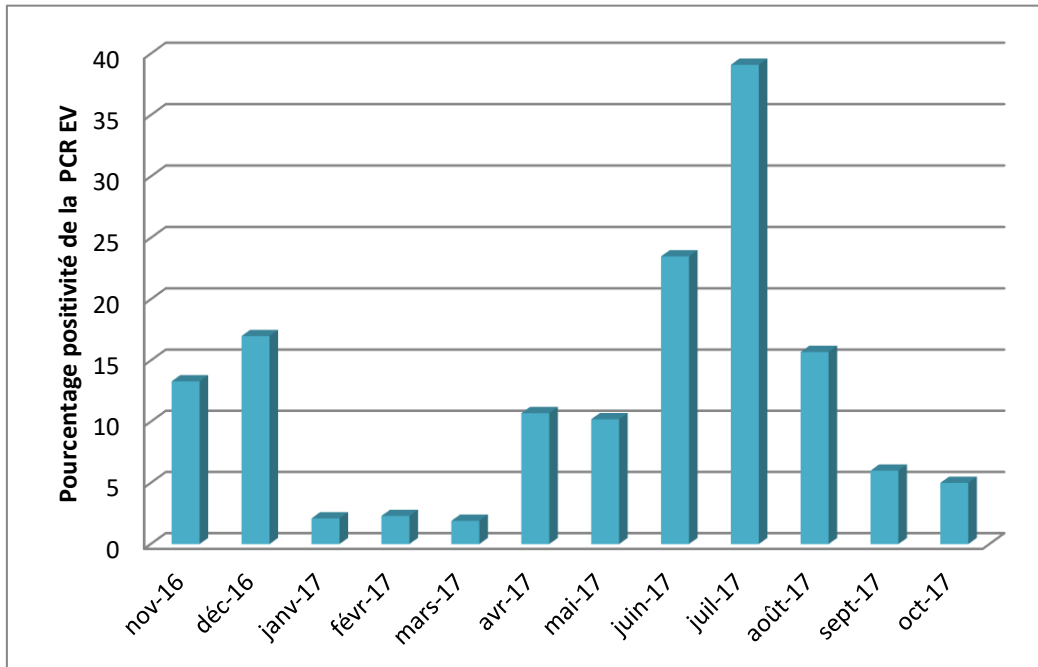


Figure 7 : Fréquence de positivité de la RT-PCR entérovirus durant la période Novembre 2016-Octobre 2017

III.2. Age des patients touchés par une infection à entérovirus

Au cours de l'étude, nous avons également relevé l'âge des patients touchés par une infection à EV (**Figure 8**). Nos résultats montrent qu'aucune catégorie d'âge n'est épargnée par une infection à EV. Si l'on s'attarde sur les résultats obtenus lors du pic estival, notamment sur le mois de juillet 2017, le nombre maximal de cas était observé chez les nourrissons (28 jours-2 ans) et les enfants dont l'âge était compris entre 2 et 18 ans. Cependant, cette supériorité du nombre de cas dans ces deux catégories d'âge ne constitue pas une généralité, car nous avons pu observer par exemple, que la catégorie des nouveau-nés (0-28 jours) arrivait en tête au côté de la catégorie enfant pour le mois d'août 2017. Cependant, lorsque l'on cumule les catégories des nouveau-nés et nourrissons sur l'ensemble de la période étudiée, nous constatons que ce groupe représente tout de même 50,7% de l'ensemble des cas d'infections à EV. Les catégories des enfants et des adultes constituent 28,8% et 20,5% des cas respectivement.

Par ailleurs, nous avons calculé un sexe ratio de 2,3 soit plus de deux hommes touchés pour une femme.

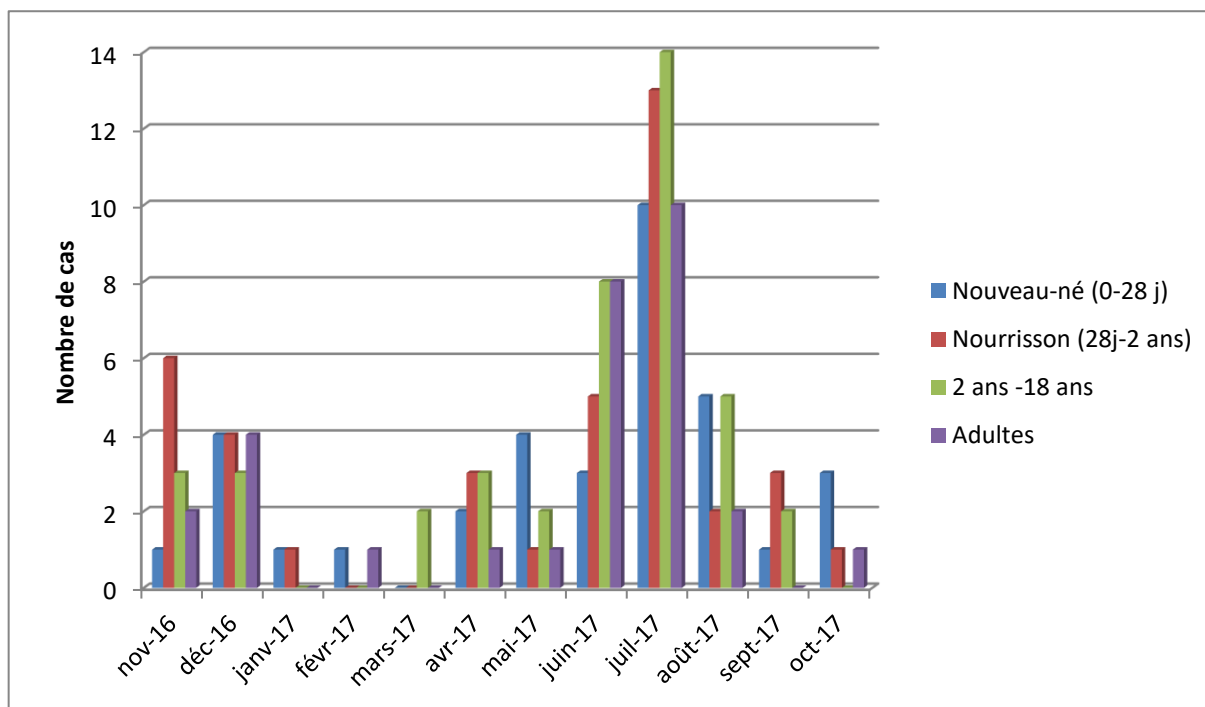


Figure 8 : Nombre de cas d'infections à entérovirus par catégorie d'âge

III.3. Nombre et types de prélèvements analysés

Les prélèvements pour lesquels une RT-PCR EV était demandée pouvaient être regroupés en 5 grandes catégories constituées par : le LCR, les selles, les écouvillons cutanéomuqueux, les écouvillons pharyngés et le plasma.

De façon globale, les LCR représentaient 75% des échantillons positifs à la RT-PCR EV ; le quart des échantillons positifs restant étant représenté par les selles, écouvillons cutanéomuqueux ou pharyngés et le plasma (**Figure 9**).

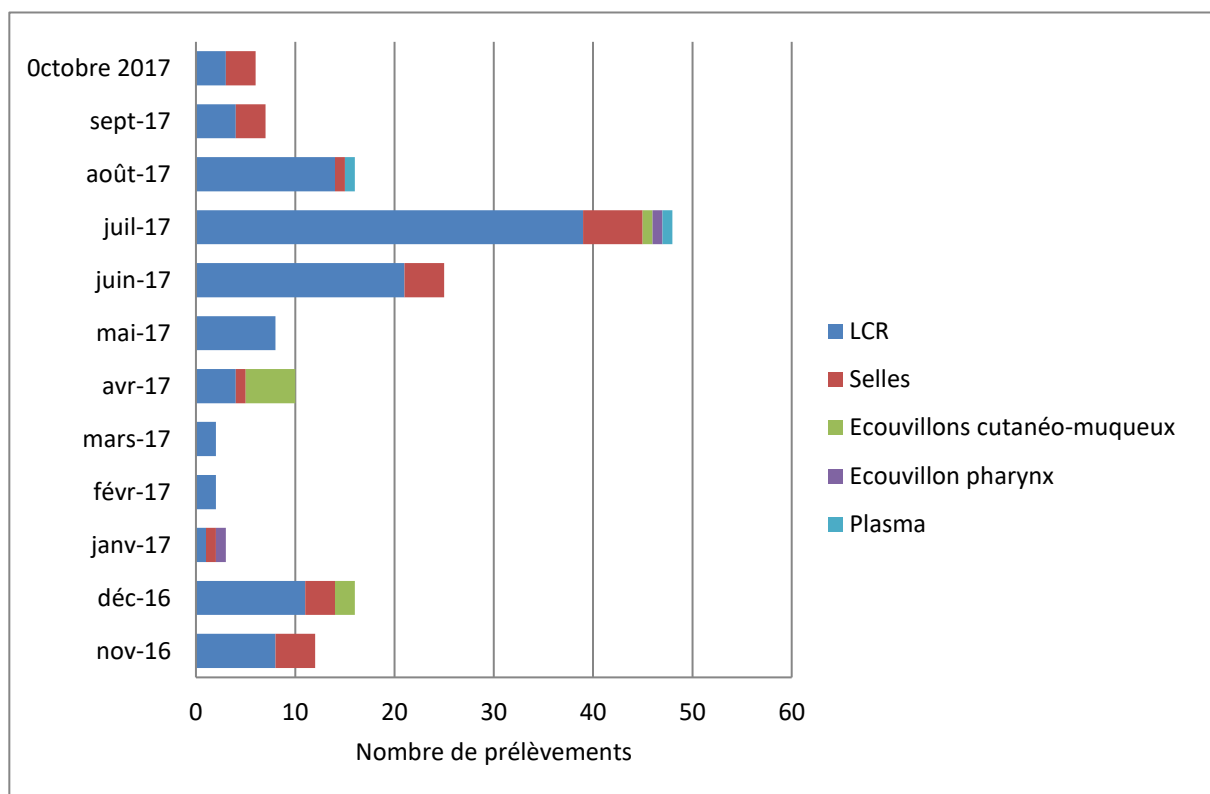


Figure 9 : Nombre et types de prélèvements positifs à la RT-PCR entérovirus sur la période Novembre 2016 – Octobre 2017

III.4. Biologie des LCR positifs à la RT-PCR entérovirus

Durant la période étudiée, nous avons examiné les caractéristiques biologiques des LCR positifs à EV et nous avons tout d'abord regardé le nombre d'éléments comptés lors de la numération leucocytaire, effectuée par le laboratoire de bactériologie. Nous avons étudié le nombre d'éléments dans le LCR des nouveau-nés d'une part et le nombre d'éléments dans le LCR dans les autres catégories d'âge d'autre part. En effet, cette distinction a été effectuée car un LCR de cellularité « normale » peut contenir jusqu'à 30 éléments pour un nouveau-né alors que cette limite est conventionnellement fixée à 5 éléments pour les autres catégories d'âge.

Ainsi, concernant la population totale de patients hors nouveau-nés (**Figure 10**), 18,75% des LCR positifs contenaient moins de 5 éléments (ceux-là ne montrant pas d'augmentation de la cellularité), 46,25% des LCR contenaient entre 5 et 100 éléments, 10% des LCR présentaient entre 100 et 200 éléments alors que 23,75% montraient un nombre d'éléments supérieur à 200. Enfin, 1,25% des LCR étaient coagulés et donc par conséquent incomptables.

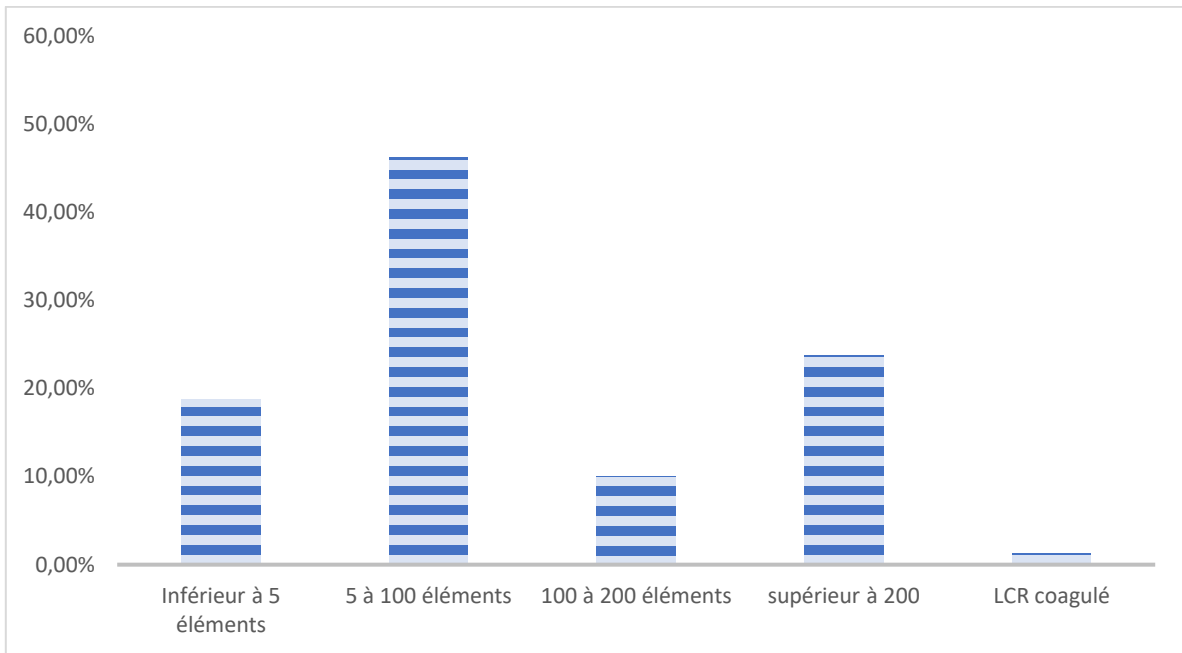


Figure 10 : Nombre d'éléments dans les LCR positifs à entérovirus durant la période Novembre 2016-Octobre 2017 (hors nouveau-nés)

Concernant la population de nouveau-nés (**Figure 11**), 52,77% des LCR présentaient une cellularité non augmentée avec moins de 30 éléments.

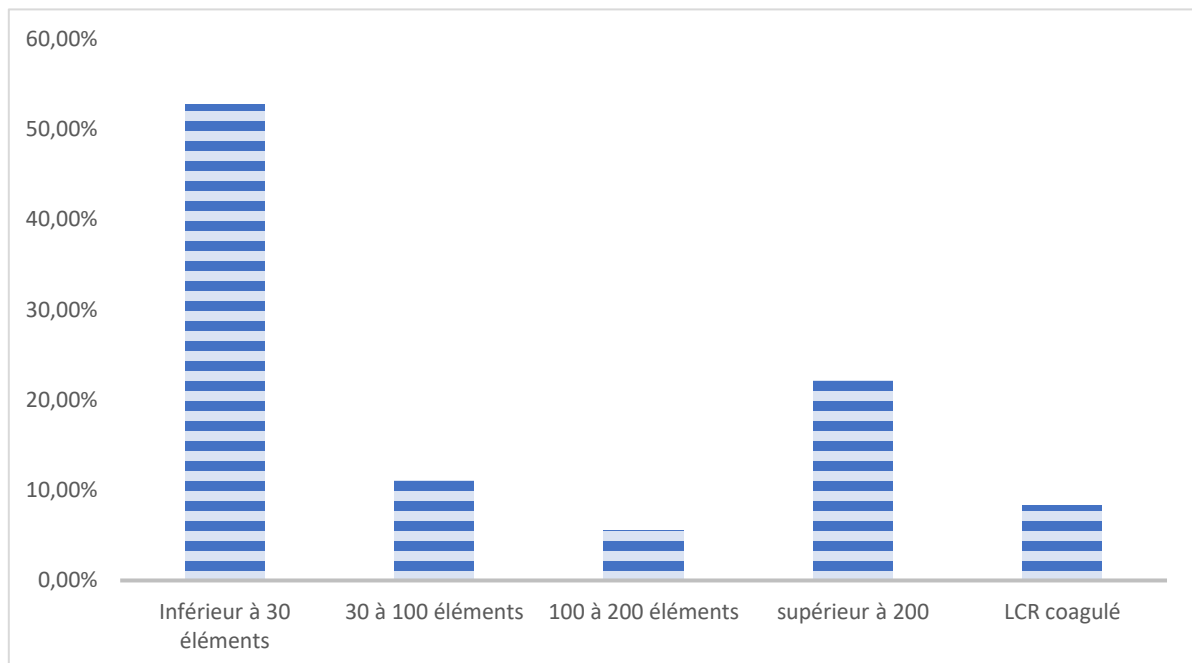


Figure 11 : Nombre d'éléments dans les LCR positifs à entérovirus durant la période Novembre 2016-Octobre 2017 (nouveau-nés)

De plus, pour les LCR présentant plus de 10 éléments, une formule a été effectuée (**Figure 12**). Nous avons constaté qu'il y avait autant de formules lymphocytaires que de formules à prédominance de polynucléaires (37% et 35% respectivement), les formules panachées représentaient 24% tandis que les formules à cellules « autres » (monocytes, cellules non différenciées) s'élevaient à 4%.

Nous avons également analysé pour ces prélèvements la protéinorachie, la glycorachie ainsi que les lactates dans le LCR lorsque ces paramètres avaient été dosés. Concernant le taux de protéines dans le LCR, nous avons observé que 49% des LCR se situaient dans la normale (0,15 à 0,55g/L) alors que 51% présentaient un taux de protéines supérieur à la normale, ces pourcentages ayant été obtenus sur un échantillon total de 113 LCR.

Nous avons ensuite analysé la glycorachie (dont la normale est située entre 2,2 et 2,8 mmol/L) et nous avons relevé que 86% des LCR présentaient une augmentation du taux de glucose alors que seulement 14% avaient une glycorachie comprise dans l'intervalle de normalité, ces pourcentages étant obtenus à partir d'un échantillon de 111 LCR. Enfin, concernant les lactates, 60% présentaient une augmentation de ce paramètre dans le LCR (valeurs normales comprises entre 1,2 à 1,9mmol/L) alors que pour 28% et 12% des LCR, nous observions des valeurs normales et diminuées respectivement.

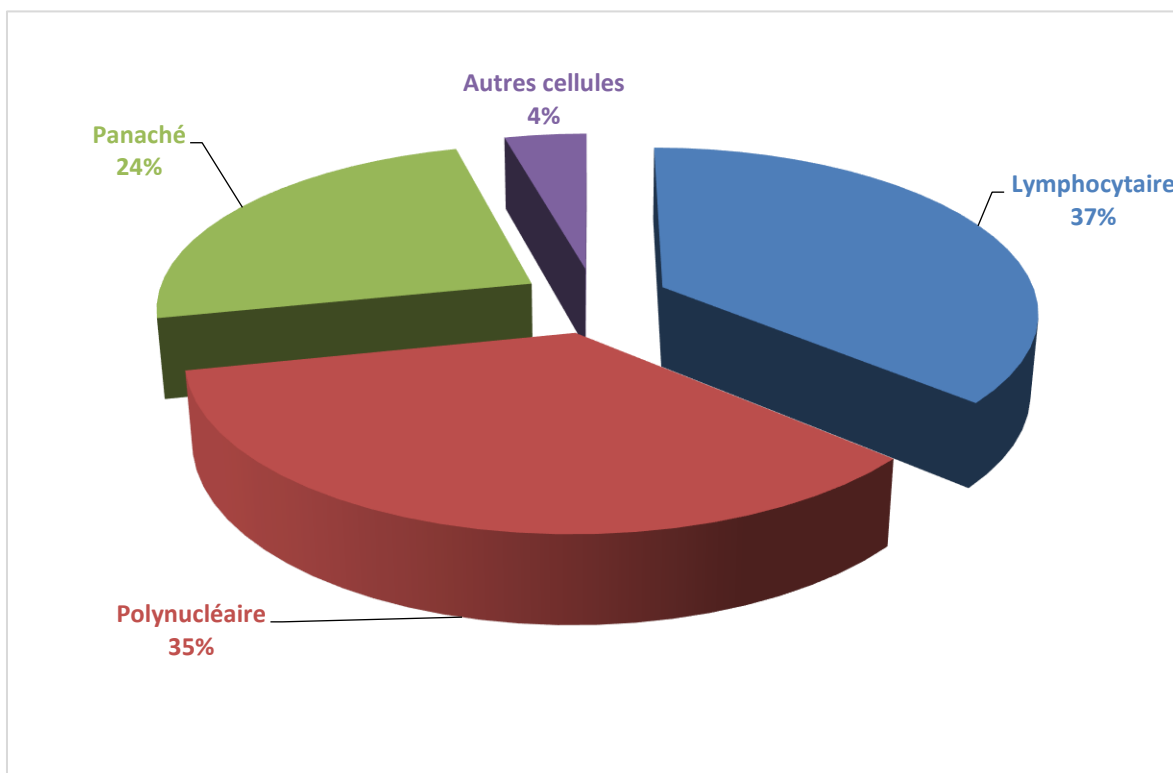


Figure 12 : Types de formules leucocytaires retrouvées pour les LCR positifs à entérovirus

III.5. Signes cliniques associés à une méningite à entérovirus et traitement d'entrée des patients à l'hôpital

Nous avons ensuite étudié la symptomatologie clinique de chaque patient présentant un LCR positif à EV. Nous avons relevé 7 grandes catégories de signes cliniques : présence de signes ophtalmiques, digestifs, cutanéomuqueux, cardio-vasculaires, respiratoires, neurologiques et fièvre. La **figure 13** récapitule l'ensemble de ces symptomatologies.

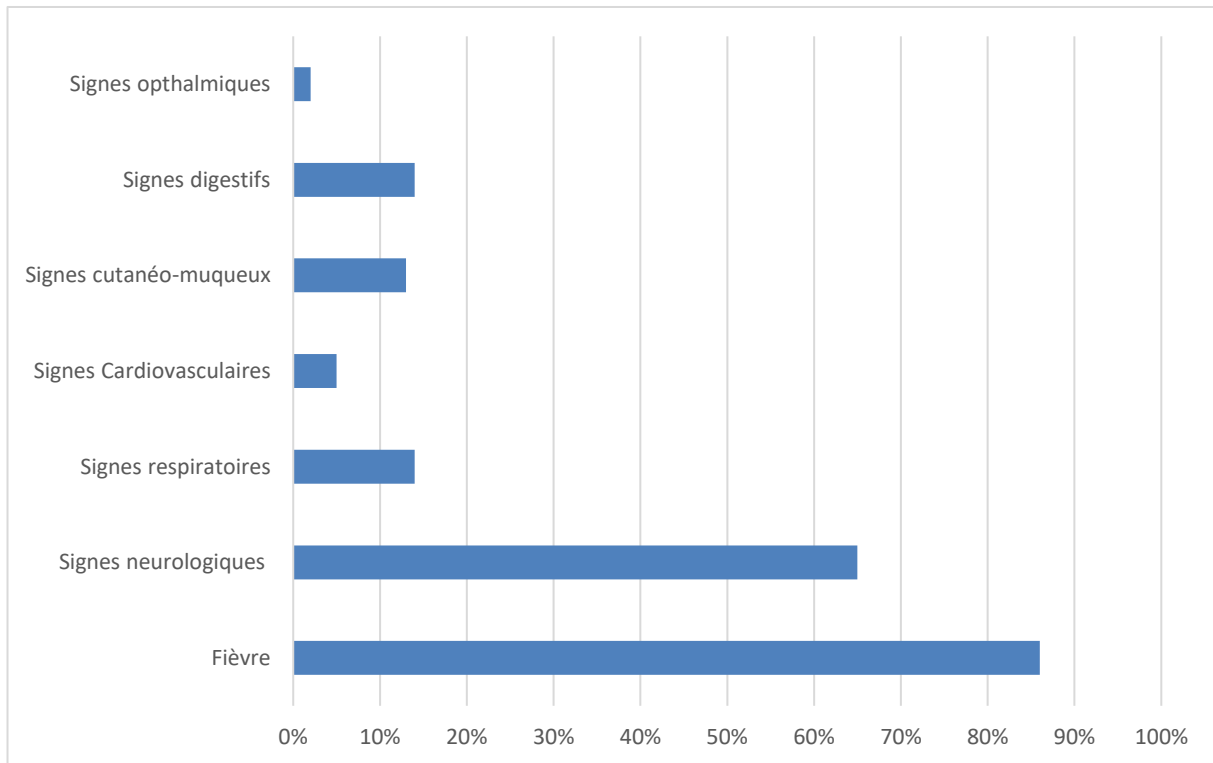


Figure 13: Signes cliniques associés aux infections à entérovirus du LCR

D'après ce graphique, la fièvre était présente dans 86% des cas suivie des signes neurologiques (dont syndrome méningé) dans 65% des cas. À une fréquence plus basse, nous pouvions également noter la présence de signes digestifs, respiratoires et cutanéomuqueux (14% pour les deux premières catégories et 13% pour la dernière). Les signes digestifs étaient représentés par les diarrhées/constipations/douleurs abdominales et étaient essentiellement retrouvés chez les nouveau-nés et nourrissons. Enfin, les signes cardiovasculaires et ophtalmiques furent très peu observés, à une fréquence de 5% et 2% respectivement. Aussi, il est important de noter que la fièvre peut constituer le seul signe clinique retrouvé chez les nouveau-nés et nourrissons.

Par la suite, nous avons examiné le type de traitement reçu par les patients dont la RT-PCR EV se révélait positive. Nous avons distingué trois populations de patients : Nouveau-nés et nourrissons, enfants et adultes pour lesquels nous avons regardé s'ils avaient reçu un traitement à base d'antibiotiques (céfotaxime, ceftriaxone ou gentamicine) accompagné ou non d'un antiviral, l'aciclovir ou encore un traitement symptomatique souvent basé sur du

paracétamol ou plus rarement de l'ibuprofène parfois accompagné d'une réhydratation. Les résultats figurent dans le graphique obtenu ci-dessous (**Figure 14**)

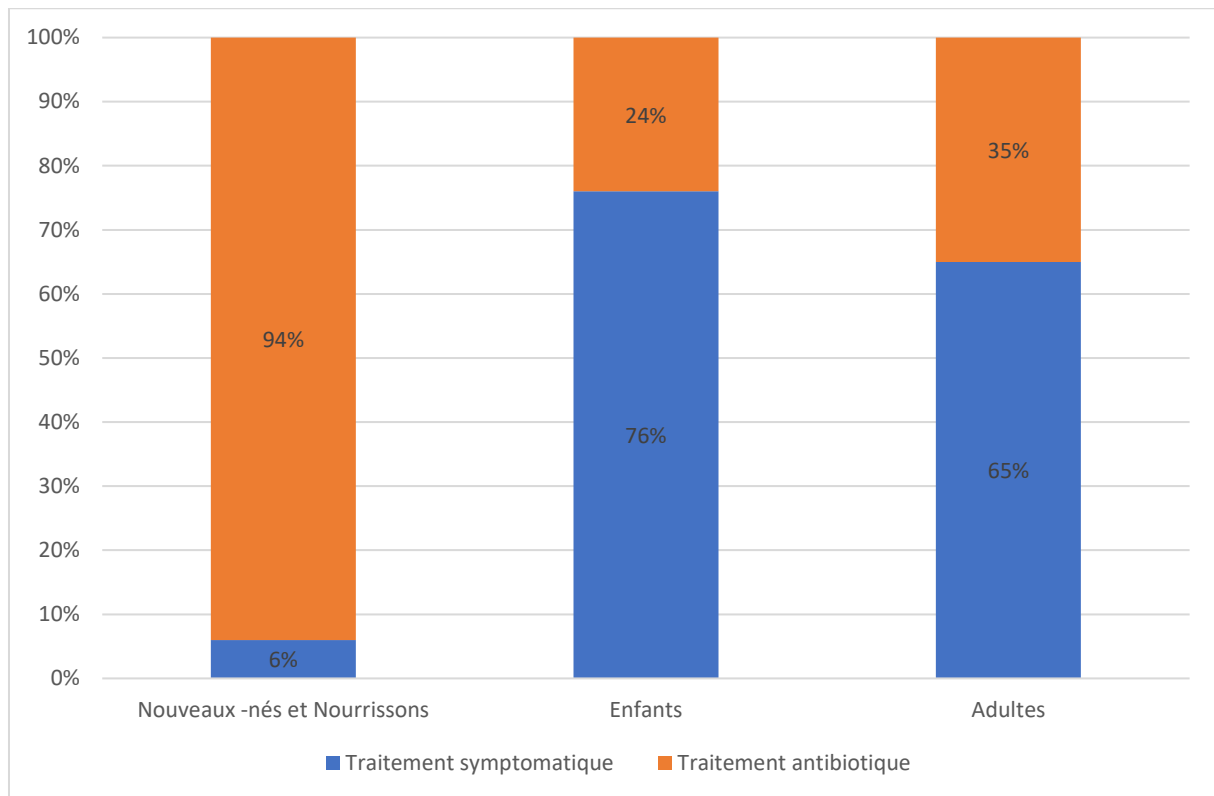


Figure 14 : Types de traitements (symptomatiques ou antibiotiques) reçus par les patients présentant un LCR positif à entérovirus

Les résultats obtenus montrent clairement que la catégorie des nouveau-nés/nourrissons a reçu dans une très large majorité (94%) un traitement antibiotique alors que ce rapport s'inverse lorsque l'on observe les catégories des enfants et des adultes. Nous avons également noté que l'aciclovir était présent dans 17% des cas dans le traitement initial.

Enfin, nous avons voulu évaluer l'impact du rendu du résultat biologique sur la prise en charge clinique. Pour cela, nous avons analysé pour tous les cas de LCR positif à EV et lorsque cette information était clairement exprimée dans le dossier informatisé du patient, l'élément entraînant l'arrêt de l'antibiothérapie mise en place (**Figure 15**). Nous avons identifié 4 facteurs pouvant lever cette antibiothérapie probabiliste qui sont : les résultats négatifs de la culture bactérienne du LCR, le résultat positif de la PCR EV, ces deux éléments réunis ou bien le fait que le patient soit apyrétique.

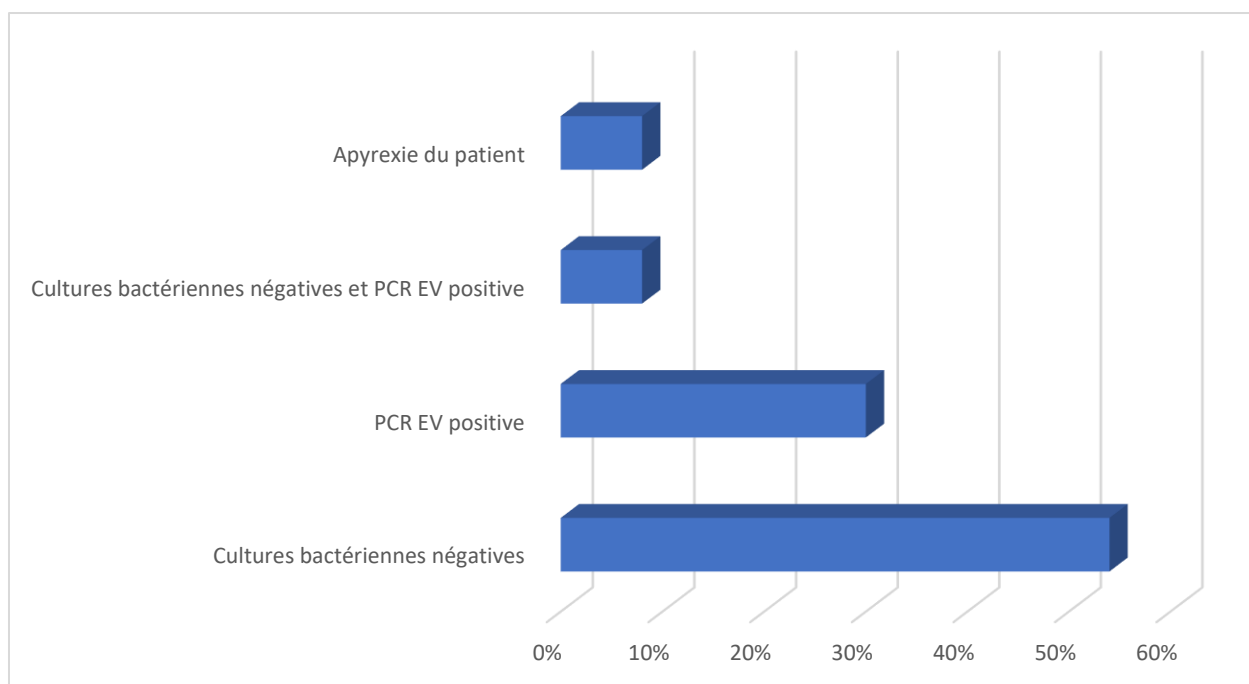


Figure 15 : Evènements responsables de l'arrêt du traitement antibiotique chez les patients présentant un LCR positif à entérovirus

D'après ces résultats, nous avons pu remarquer que l'arrêt des traitements antibiotiques faisait suite aux résultats de cultures bactériennes négatives du LCR dans 54% des cas, puis au résultat positif de la PCR EV dans 30% des cas et enfin, à part égale, à l'apyrexie du patient et à l'ensemble des résultats de bactériologie et de virologie (8% pour chacune de ces causes). Ainsi, le résultat de la PCR EV représentait la deuxième cause d'arrêt de l'antibiothérapie probabiliste durant la période étudiée.

III.6. Délai de rendu du résultat de la RT-PCR entérovirus et durée de l'hospitalisation

Le laboratoire de virologie effectue les PCR EV par série, généralement deux fois par semaine. Cette technique de biologie moléculaire impose que les prélèvements subissent au préalable une extraction des acides nucléiques sur un automate différent de celui utilisé pour effectuer la PCR en elle-même. L'utilisation des extracteurs par le service de virologie est généralement située sur les plages horaires matinales. Ces éléments (organisationnel et humain) permettent de comprendre le délai nécessaire à l'obtention d'un résultat.

Nous avons voulu examiner si la durée d'hospitalisation des patients était liée au délai du rendu des résultats pour les patients présentant une PCR EV positive dans le LCR. Nous avons catégorisé les patients de la même façon que précédemment : nouveau-nés et nourrissons, enfants et adultes.

Nos résultats montrent qu'il n'existe pas de corrélation entre le délai de rendu des résultats et la durée d'hospitalisation quelle que soit la catégorie de patients concernée (**Figures 16, 17, 18**). Le coefficient de détermination r^2 a été calculé pour chaque catégorie et démontre l'absence de corrélation linéaire entre les deux variables.

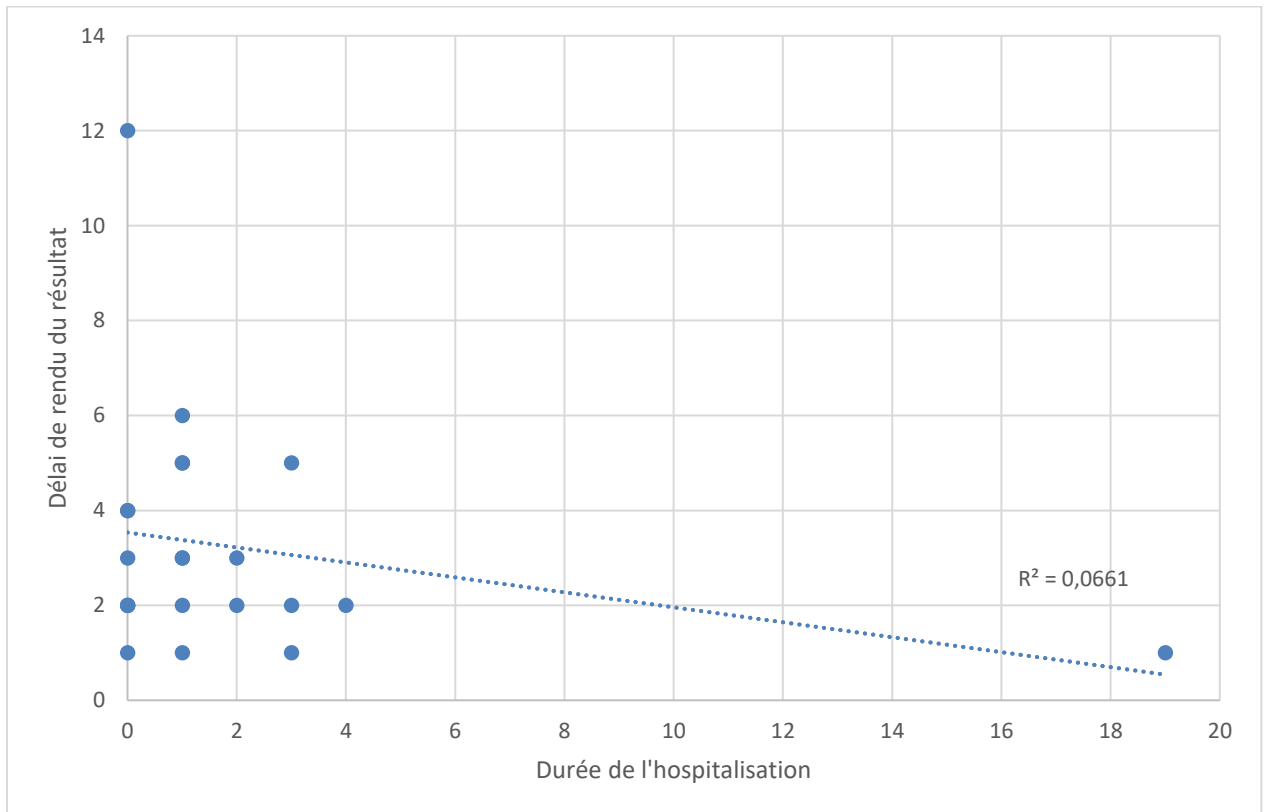


Figure 16 : Etude de la corrélation entre la durée d'hospitalisation et le délai de rendu du résultat de la RT-PCR EV, en jours, chez les adultes

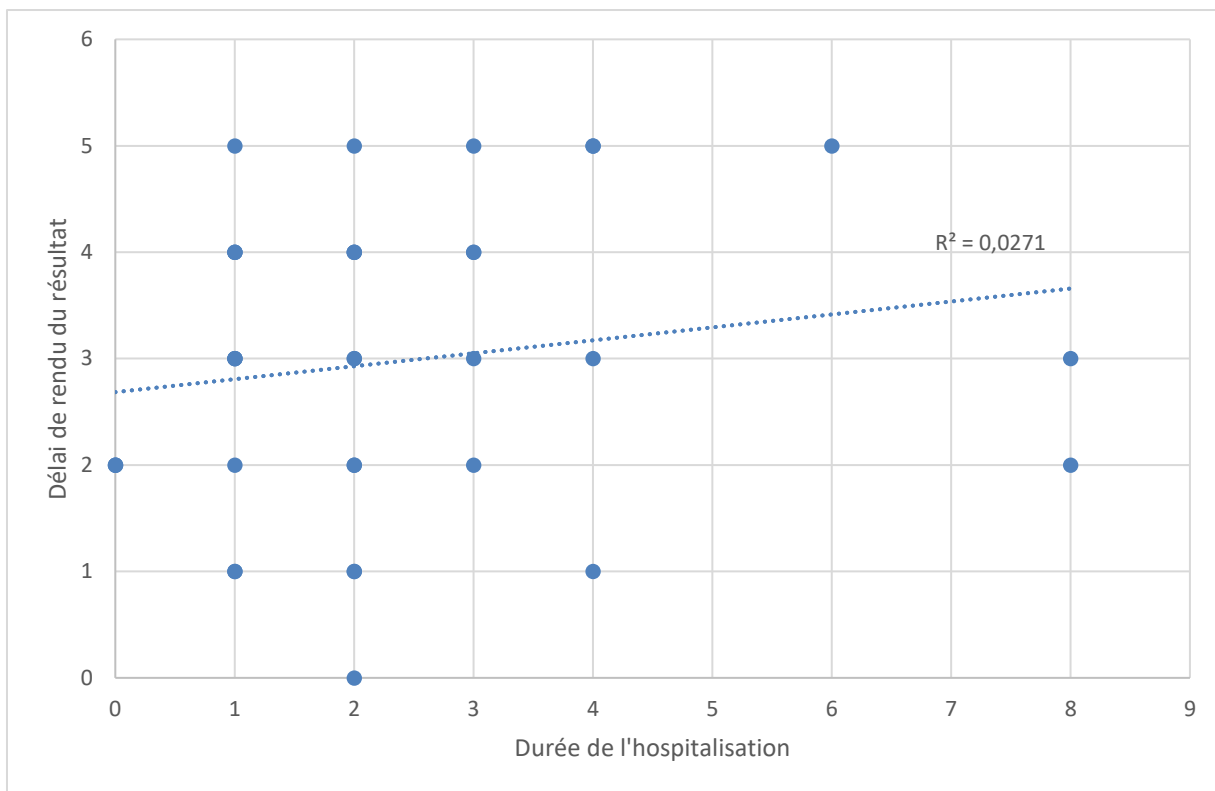


Figure 17 : Etude de la corrélation entre la durée d'hospitalisation et le délai de rendu du résultat de la RT-PCR EV, en jours, chez les enfants

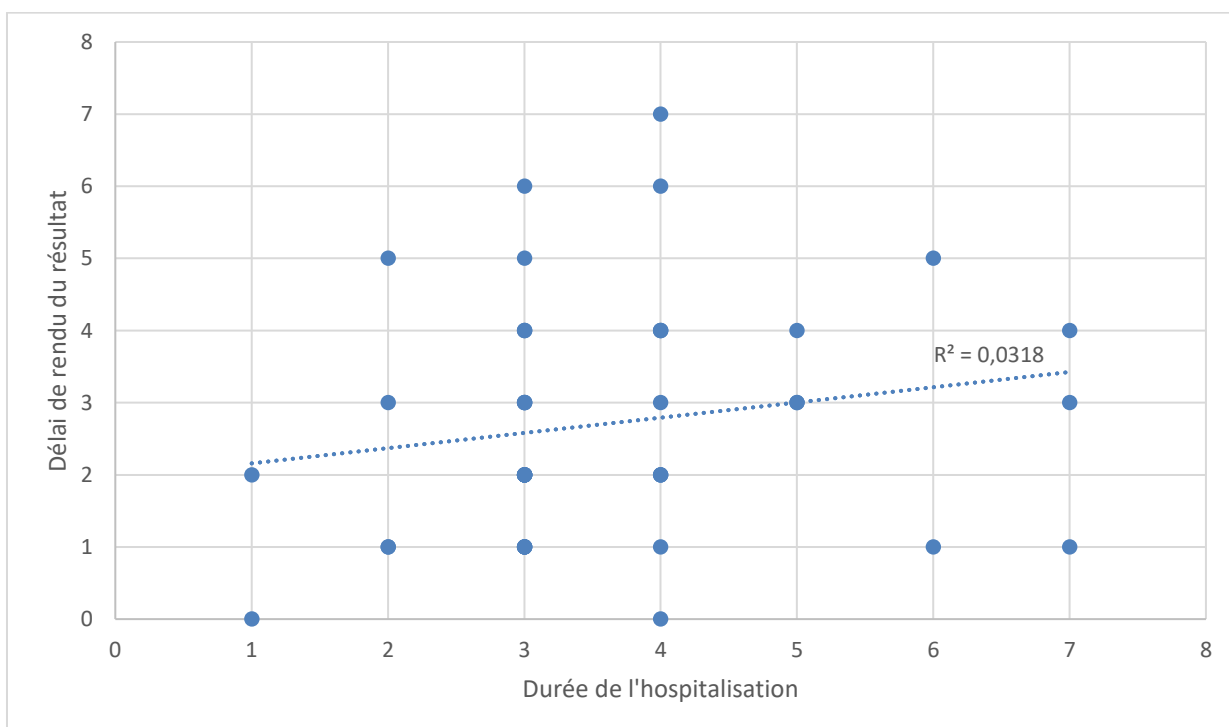


Figure 18 : Etude de la corrélation entre la durée d'hospitalisation et le délai de rendu du résultat de la RT-PCR EV, en jours, chez les nourrissons/nouveau-nés

Nous avons également étudié le délai de rendu de résultats moyen par mois. Les résultats obtenus montrent qu'il existe une faible variation dans ces délais. En effet, il varie entre 1,9 jours au plus faible (Novembre 2016) et 3,5 jours (Mars 2017). De plus, la réalisation de ces PCR en série contribue à l'homogénéité globale du délai de rendu des résultats comme l'atteste le graphique ci-dessous (pas de disparité majeure d'un mois sur l'autre, **Figure 19**)

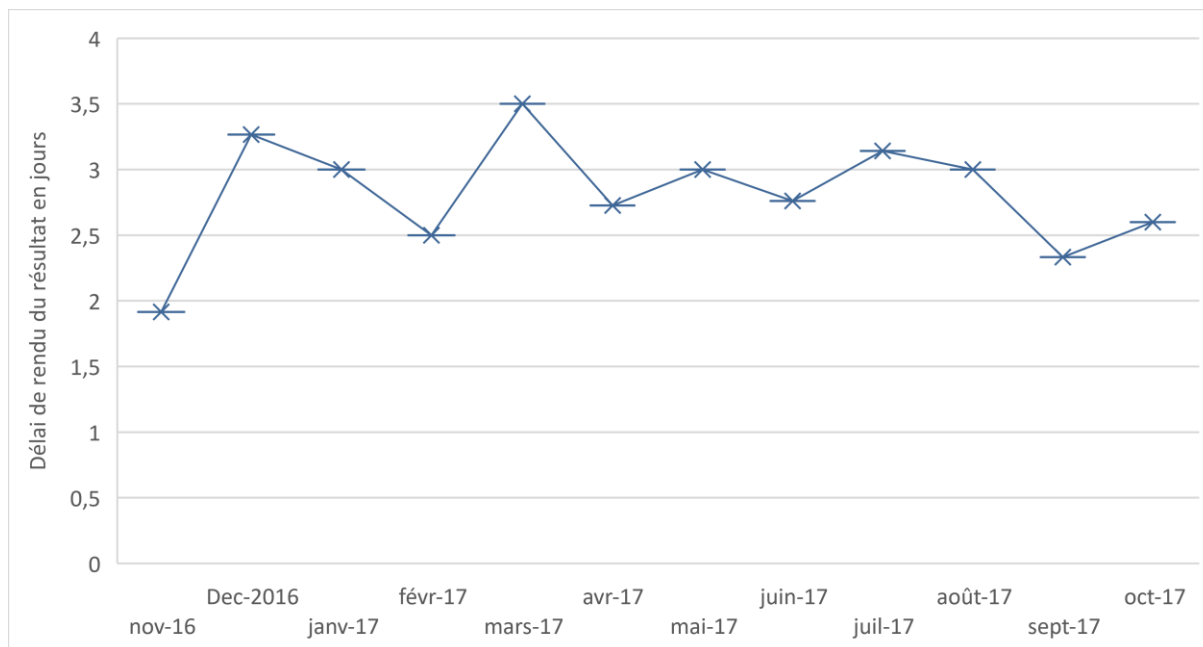


Figure 19 : Délai de rendu du résultat de la RT-PCR EV durant la période Novembre 2016- Octobre 2017

De façon plus simple, nous avons également étudié la durée d'hospitalisation des patients présentant un LCR positif à EV (**Figure 20**). Nous avons exclu toutes les durées d'hospitalisation des patients nécessitant une prise en charge au long cours (maladie auto-immune, cancers ou encore patients d'oncologie).

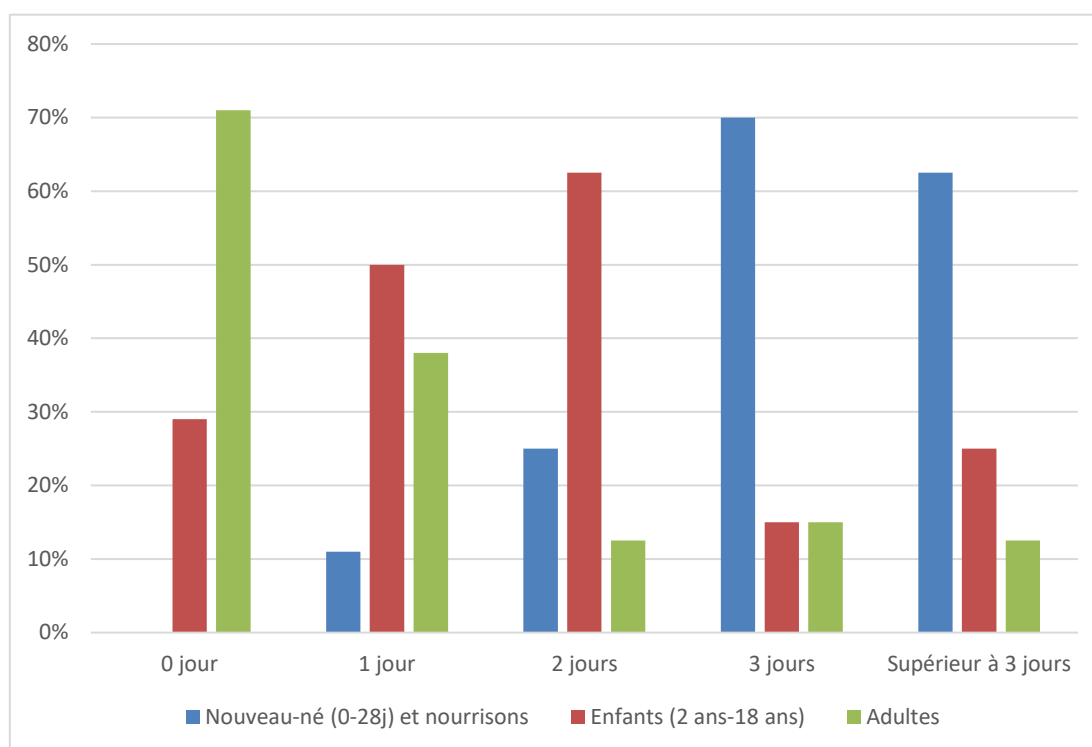


Figure 20 : Durée d'hospitalisation, en jours, des patients présentant un LCR positif à entérovirus

Nous avons analysé différentes durées d'hospitalisation : 0 jour soit aucune hospitalisation (comme un passage aux urgences par exemple), 1 jour, 2 jours, 3 jours ou une durée supérieure à 3 jours.

Les résultats montrent que la catégorie des nourrissons et nouveau-nés bénéficie toujours d'une hospitalisation d'au moins 1 jour et que les adultes constituent 70% des patients non hospitalisés. De plus, l'étude montre que plus la durée d'hospitalisation augmente plus la catégorie des nouveau-nés et nourrissons représente un fort pourcentage.

La durée d'hospitalisation moyenne des différentes catégories de patients était de 1,87 jours, 2,5 jours, 3,7 jours pour les adultes, enfants et nourrissons/nouveau-nés respectivement.

Par ailleurs, nous avons souhaité établir la cartographie des services prescripteurs des PCR EV. Nous avons obtenu le graphique suivant (**Figure 21**) où l'on peut observer que 68% des services prescripteurs sont des services de pédiatrie avec plus de la moitié des prescriptions effectuées dès le début du circuit de soin (urgences et post-urgences pédiatriques).

Concernant les adultes, la majorité des prescriptions étaient effectuées par le service des urgences adultes et 7% par les autres services de médecine (maladies infectieuses, neurologie, réanimation, médecine interne).

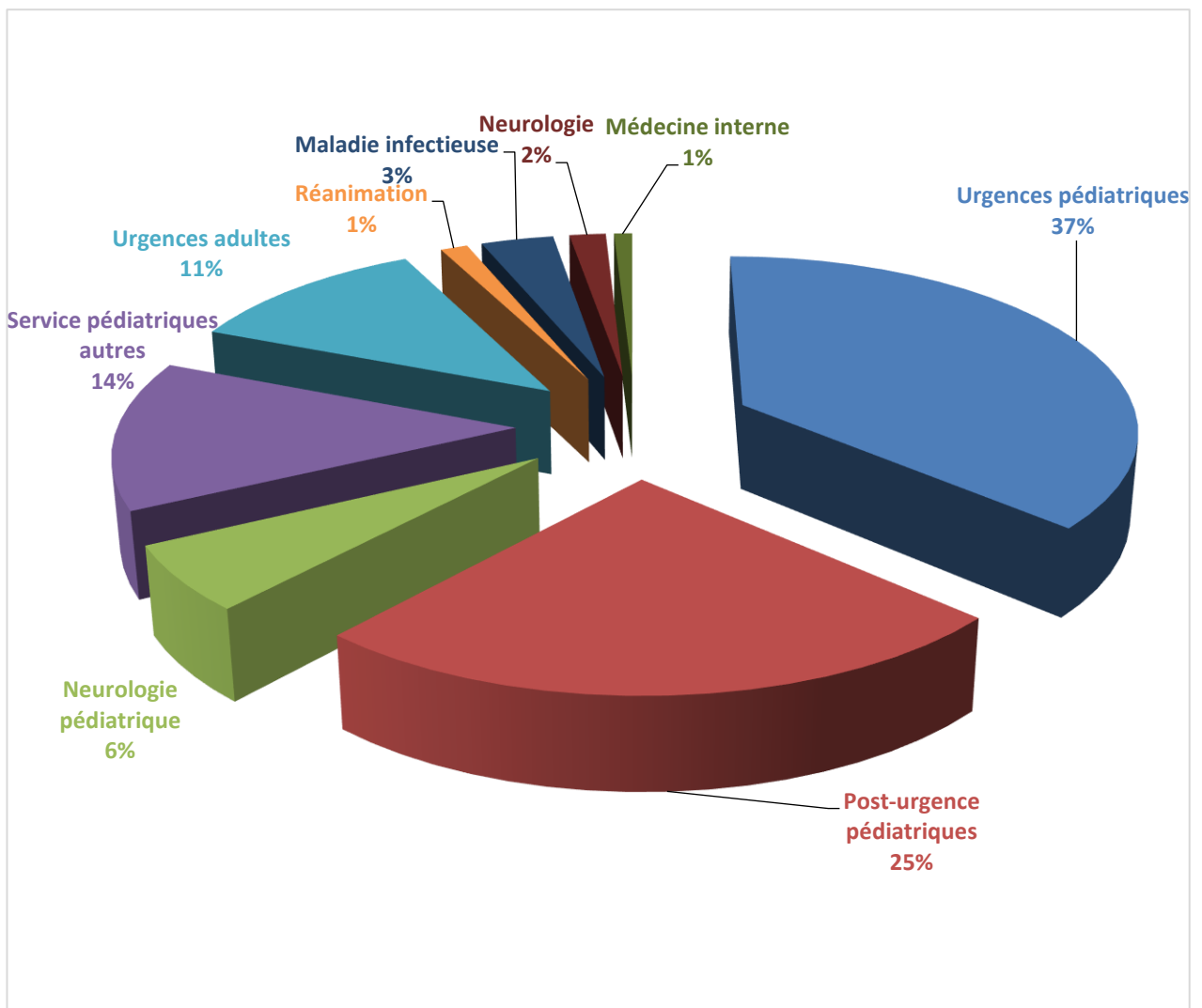


Figure 21 : Services prescripteurs des RT-PCR entérovirus positives durant la période Novembre 2016-Octobre 2017

III.7. Résultats de génotypage

Certains éluats répondant à l'un des critères suivants : cas grave, LCR positif avec un Ct inférieur à 35 ou décès du patient, étaient envoyés au CNR des EV afin d'effectuer le génotypage des souches.

Après avoir récupéré l'ensemble de ces résultats, nous avons pu étudier la circulation des souches d'EV durant cette période (**Figure 22**). Nous avons observé que 71% des souches circulant étaient des ECHOvirus et 17% des Coxsackievirus A et B. Parmi les ECHOvirus, les souches les plus souvent rencontrées étaient l'ECHOvirus 6 (26%), l'ECHOvirus 30 (17%) et

l'ECHOvirus 9 (10%). Les autres ECHOvirus rencontrés étaient représentés par les virus 18, 5, 25, 11 et 7 (8%, 7%, 4%, 1% et 1% respectivement). Concernant les Coxsackievirus, on retrouvait les virus B5 (8%), B3 (4%), A6 (4%) et enfin les virus A9 et B4 (1% chacun).

Sur l'ensemble de la période étudiée, nous n'avons eu qu'un seul cas d'EV-A71 appartenant au génogroupe C1. Ce virus a été retrouvé dans un LCR datant de novembre 2016 prélevé chez un nouveau-né de 24 jours dans le service des urgences pédiatriques.

L'infection a engendré un tableau clinique assez sévère avec présence d'une fièvre mal tolérée, une hypotension et une hypotonie. La durée d'hospitalisation de ce nouveau-né fut de 7 jours.

Enfin, nous n'avons pas recensé de cas d'infection à EV-D68 durant la période étudiée.

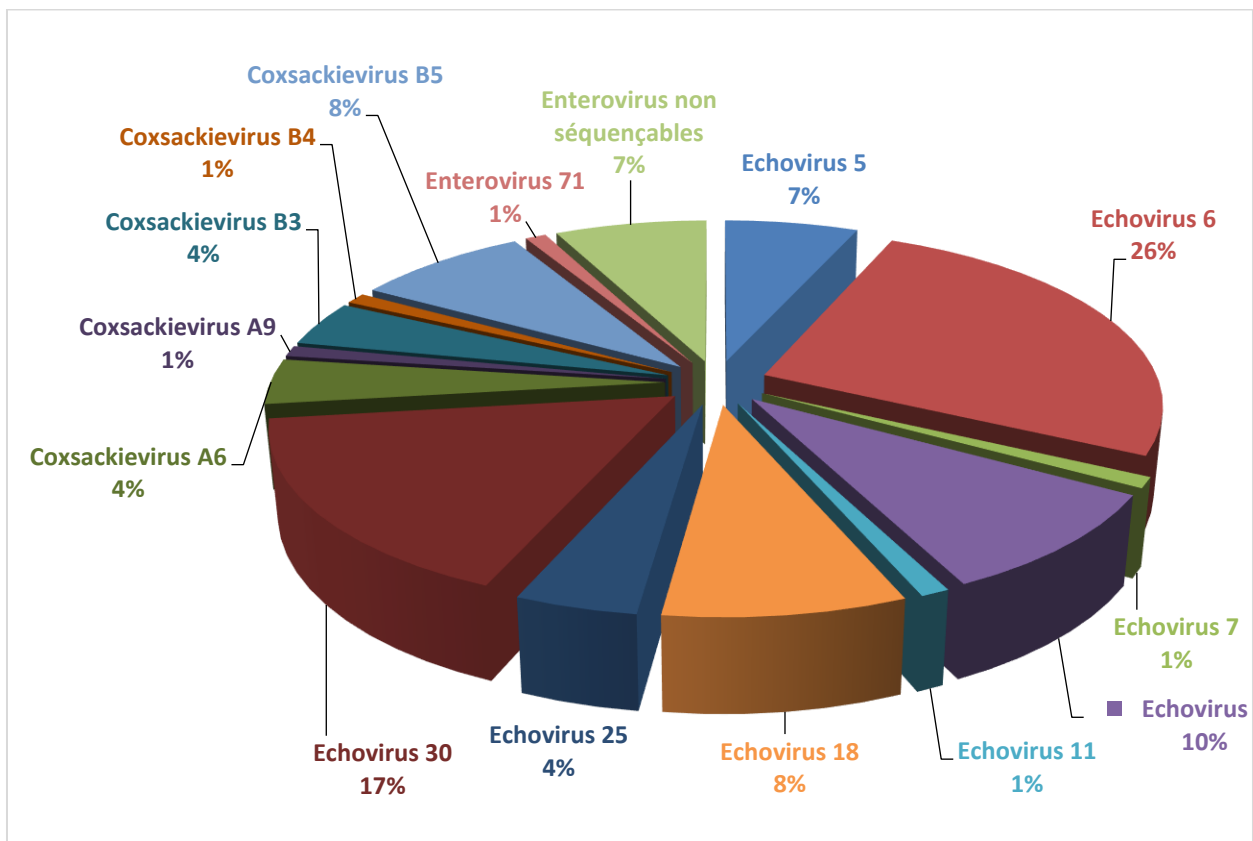


Figure 22 : Géotypages des souches virales d'entérovirus par le CNR

Dans 7% des cas, les EV n'étaient pas séquençables.

Nous nous sommes également attardés sur les patients qui avaient présenté un syndrome pieds-mains-bouche caractérisé, une éruption cutanée (exanthème) et/ou une éruption des muqueuses (éranthème). Nous avons remarqué que pour 44% des syndromes pieds-mains-bouche diagnostiqués, le Coxsackievirus A6 a été retrouvé, les autres virus retrouvés étant les Coxsackievirus B4 et B3. Concernant les patients présentant une symptomatologie à type d'érythème ou d'éranthème, plusieurs virus ont été retrouvés comme les ECHOvirus 9, 11, 18 et 30 ainsi que les Coxsackievirus A9 et B3.

III.8. Transmission intra-familiale de l'infection

La transmission des EV est principalement de type fécal-oral via les mains sales, des objets ou des aliments souillés par la salive ou les matières fécales. Par conséquent, il paraît intéressant de relever la présence de cas dans la famille autour du patient. Dans ce but, nous avons relevé, pour chaque patient présentant une PCR EV positive, s'il existait une notion de contagement familial. Nous avons observé que dans 19% des cas, il existait un contagement avec la fratrie ou les parents alors que dans 81% des cas, aucun contagement familial n'était signalé.

III.9. Cas graves

Dans cette dernière partie, nous nous sommes attardés sur les patients présentant une symptomatologie particulièrement bruyante dans le cadre d'une infection à EV. Ainsi, durant cette période, nous avons recensé des cas d'une gravité extrême avec, par exemple, un nourrisson de 3 mois décédé de mort subite et qui présentait une PCR EV positive à ECHOvirus 6 dans les selles.

Un autre cas de décès concerne un enfant de 3 ans victime d'un arrêt cardio-respiratoire à domicile, l'EV retrouvé dans le LCR n'ayant pu être séquencé à cause d'une charge virale trop faible.

Il paraît peu probable que les EV retrouvés chez ces deux patients soient à l'origine des décès mais il paraissait important de les relever d'un point de vue épidémiologique.

Par contre, plusieurs cas graves ont été mis en évidence au CHU de Bordeaux durant la période Novembre 2016-Octobre 2017. En effet, nous avons relevé 9 cas graves dont 4 cas retrouvés chez des nourrissons, 4 autres chez des enfants et enfin 1 cas sévère chez un adulte. Les caractéristiques de ces infections sont synthétisées dans le **tableau 6** ci-dessous.

| Age | Symptômes | Passage en réanimation | Génotypage virale |
|------------------------|---|------------------------|--------------------------------------|
| Nouveau-né de 9 jours | Détresse respiratoire aiguë et hyperthermie | Oui | ECHOvirus 5 dans LCR |
| Nouveau-né de 13 jours | Insuffisance circulatoire et fièvre à 39°C | Oui | ECHOvirus 25 dans LCR |
| Nouveau-né de 14 jours | Fièvre mal tolérée, hypotonie et polypnée | Oui | Entérovirus non séquencé dans LCR |
| Nouveau-né de 24 jours | Forme sévère d'infection avec hypotonie et signes de choc septique | Non | EV-A71 génogroupe C1 dans le LCR |
| Enfant de 5 ans | Syndrome méningé sévère avec perte de contact brutal et aphasie durant 30 min, accompagné d'une éruption péri-buccale | Non | Entérovirus non séquencé dans le LCR |

| | | | |
|------------------|---|-----|--|
| Enfant de 6 ans | Symptômes mal tolérés : apathie, syndrome méningé, hyperthermie Hospitalisé pendant 8 jours | Non | ECHOvirus 6 dans le LCR |
| Enfant de 9 ans | Crises convulsives généralisées accompagnées d'une éruption vésiculeuse caractéristique d'un syndrome pieds-mains-bouche Hospitalisé pendant 10 jours. | Non | Coxsackievirus A6 dans le plasma |
| Enfant de 12 ans | Céphalées avec accès paroxystiques accompagnées d'hallucinations Hospitalisé durant 3 jours | Non | ECHOvirus 9 retrouvé dans le LCR |
| Adulte de 41 ans | Fièvre puis apparition de signes neurologiques déficitaires temporaires avec aphasie et atteinte des nerfs périphériques Diagnostic retenu de méningoencéphalite lymphocytaire à EV Hospitalisé durant 19 jours | Non | Enterovirus non séquencé dans le LCR |

Tableau 6 : Cas graves d'infections à entérovirus durant la période Novembre 2016-Octobre 2017

IV. Discussion

La détection des EV dans le LCR par RT-PCR est rentrée progressivement dans la prise en charge des méningites depuis une quinzaine d'années grâce à l'utilisation de troupes commerciales développées à cet effet. Depuis mai 2017, la recherche d'EV par amplification génique dans le LCR, dans le cadre d'un diagnostic de méningite aiguë d'étiologie indéterminée, après examen biochimique et microscopique du LCR, est remboursée par l'assurance maladie à hauteur d'une quarantaine d'euros (cotation de B 150 dans la nomenclature des actes de biologie médicale) (54).

Cette décision fait suite à un rapport de la HAS datant de 2014 qui avait pour objectif de s'assurer que la détection du génome des EV dans le LCR par RT-PCR était un outil diagnostique validé dans la prise en charge des cas de méningite. La HAS a conclu que la RT-PCR des EV dans le LCR pouvait être utilisée dans le cas de méningite aiguë tout en précisant que cet examen devait intervenir en 2ème ligne après examen direct du LCR et des résultats cytologique et biochimique. De plus, les recommandations indiquent que le délai de résultats devrait se situer entre 24h dans l'idéal et inférieur à 48 h suivant le prélèvement car ce délai conditionne l'impact de cet examen sur la prise en charge du patient(49).

Le laboratoire de virologie du CHU de Bordeaux a fixé dans le catalogue des examens de biologie et pathologie un délai moyen de rendu de résultat après réception au laboratoire de 5 jours, en raison des modalités organisationnelles actuelles. De ce point de vue, il serait pertinent d'améliorer notre délai de rendu de résultat afin d'être en conformité vis-à-vis des recommandations de la HAS et surtout d'augmenter l'impact du rendu de résultat de la PCR EV sur la prise en charge thérapeutique du patient.

Dans notre étude, nous n'avons pas observé de corrélation entre le délai de rendu du résultat et la durée d'hospitalisation quelle que soit la catégorie d'âge. Le délai de rendu du résultat d'une analyse PCR EV compris entre 1,9 jours et 3,5 jours, limitait fortement l'impact sur la durée d'hospitalisation moyenne, de 1,87 jours, 2,5 jours et 3,7 jours respectivement pour les adultes, enfants et nourrissons/nouveau-nés. En effet, ce délai ne permet pas au clinicien d'exclure la méningite à EV ou plus intéressant, de l'affirmer afin de pouvoir diminuer la durée d'hospitalisation du patient. Par conséquent, il semble pertinent d'augmenter la fréquence de réalisation des PCR EV dans notre laboratoire afin de rendre le résultat au clinicien plus tôt dans la prise en charge du patient.

Le CHU de Clermont-Ferrand a conduit une étude sur des patients suspectés de méningites entre le 1^{er} Janvier 2008 et le 31 Décembre 2009. Les 73 patients inclus dans cette étude étaient ceux pour lesquels un EV était retrouvé dans le LCR par technique de biologie moléculaire. La fréquence de réalisation des PCR EV était quotidienne, du lundi au vendredi. Sur la période 2008-2009, ceci leur a permis de rendre un résultat en 24h ou moins pour 92% des patients. Il est important de préciser que les auteurs ont inclus dans ces calculs 52 patients parmi les 73 du départ car ils ont uniquement pris en compte les demandes effectuées entre le lundi et le vendredi afin d'observer l'impact de la PCR EV sur la prise en charge du patient. Globalement, les auteurs rapportent que l'impact clinique d'une PCR positive à EV varie selon l'âge des patients que l'on étudie. Chez les enfants entre 2 et 16 ans, un résultat positif

mènerait à un arrêt des antibiotiques dans 43% des cas. Chez les adultes, ils ont trouvé une corrélation entre le délai d'exécution de l'analyse et la durée d'hospitalisation(55).

D'autres études mettent en évidence le fait qu'effectuer une PCR EV peut entraîner une diminution de la durée d'hospitalisation chez les enfants par exemple(56). Une étude s'intéressant à l'impact de la RT-PCR EV sur la prise en charge clinique d'enfants de moins de 60 jours a montré que les individus présentant une PCR EV positive bénéficiaient d'une diminution de 38% de la durée d'hospitalisation comparé aux individus présentant une PCR EV négative(57). De toute évidence, il est essentiel d'avoir à l'esprit que plus un résultat de PCR EV est rendu précocement au clinicien, plus le rendu de l'analyse peut avoir un impact sur la prise en charge clinique du patient notamment, dans le cas de la PCR EV, cela peut donner lieu à une diminution de la durée d'hospitalisation du patient. Il est également essentiel de garantir une bonne communication de ces résultats afin que le clinicien en prenne connaissance et puisse modifier sa prise en charge.

Le délai de rendu du résultat peut également modifier la prise en charge thérapeutique du patient et notamment la prescription d'antibiotiques effectués en probabiliste initialement. Le CHU de Lausanne a évalué l'impact d'une détection rapide de l'EV dans le LCR par une méthode complètement automatisée GeneXpert EV assay en comparaison avec un kit classique de PCR en temps réel consistant à effectuer une extraction de l'ARN dans un premier temps puis la PCR à proprement parler. Ils ont voulu calculer le coût de ces deux méthodes, ainsi, la méthode de « PCR maison » était estimée à 114\$ l'analyse (équipement, réactifs et temps technique inclus) et la méthode GeneXpert EV à 121\$ l'analyse. Il faut souligner que dans cette étude, la technique de PCR classique était réalisée 5 fois par semaine du lundi au vendredi en une seule série. La méthode par GeneXpert était réalisée de 8h du matin jusqu'à 18h, du lundi au samedi inclus. Dans cette étude, la durée du traitement antibiotique probabiliste et la durée d'hospitalisation étaient significativement plus courtes dans le groupe de patients diagnostiqué par la méthode automatisée. Ils ont également conclu à une forte diminution du coût d'hospitalisation des patients. Ainsi, cette étude laisse penser qu'une plus grande rapidité dans l'exécution de l'analyse permettrait une meilleure adaptation du traitement médicamenteux du patient, une diminution de la durée d'hospitalisation et par conséquent une diminution du coût pour l'hôpital. Cette étude, réalisée sur un échantillon de patients assez faible, présentait l'avantage d'analyser une population d'adultes(58). Il semblerait intéressant d'évaluer l'intérêt d'une méthode de PCR complètement automatisée et rapide durant les saisons épidémiques des EV car cela permettrait d'obtenir un résultat plus rapidement. Si ce-dernier s'avérait positif, le clinicien pourrait alors arrêter le traitement antibiotique (en tenant compte du tableau clinique global) et permettre au patient de retourner à son domicile plus tôt, limitant par la même occasion les coûts d'hospitalisation.

Dans un avenir proche, nous pourrions effectuer une démarche similaire en comparant notre technique de PCR actuelle (dont le coût est estimé à environ 82 euros) avec la nouvelle technique soumise à l'appel d'offre du plateau de biologie moléculaire.

Néanmoins, il est important de souligner qu'il est complexe de comparer différents CHU sur des critères comme le délai de rendu des résultats car l'acheminement et la périodicité des analyses ne sont pas comparables. En effet, l'organisation géographique des CHU n'étant pas similaires, cela peut entraîner des conséquences non négligeables sur le délai de rendu des résultats (avec un temps préanalytique pouvant considérablement varier).

D'autre part, nous avons voulu relever en pratique ce qui déclenchait l'arrêt du traitement antibiotique empirique, d'après les observations relevées dans le logiciel patient DxC@re. Dans 54% des cas, ce sont les résultats négatifs des cultures bactériennes qui permettent l'arrêt des antibiotiques alors qu'un résultat de PCR EV positif permet l'arrêt du traitement dans 30% des cas. Cela met en évidence l'importance de la réalisation d'un tel examen dans le cadre de la prise en charge du patient. Le nombre de demandes de PCR EV a dépassé plus de 1000 demandes sur la période Novembre 2016-Octobre 2017 (ce nombre étant stable pour la période novembre 2017-Octobre 2018), ainsi il semblerait intéressant de valoriser davantage cet examen en optimisant sa réalisation au sein du laboratoire.

De façon originale et très intéressante, l'équipe du CNR de Clermont-Ferrand a mené une étude sur l'intérêt d'effectuer une PCR EV sanguine dans les populations pédiatriques. A travers cette étude, ces auteurs ont testé la PCR EV sur le LCR et le sang total sur des populations d'enfants âgés de moins de 2 ans et sur des enfants dont l'âge était compris entre 2 ans et 16 ans. Ils ont observé que la PCR EV était plus sensible sur les échantillons sanguins que sur les LCR des nouveau-nés et nourrissons présentant une fièvre sans étiologie. Par contre, ce n'était pas le cas chez les enfants de 2 à 16 ans présentant des symptômes de méningites. Cette étude comporte un intérêt dans la mesure où les données ont été récupérées au niveau de 5 CHU et semblerait indiquer que l'on pourrait effectuer les PCR EV sur le sang plutôt que sur le LCR pour les enfants de moins de 2 ans admis pour fièvre sans point d'appel, ce qui est nettement moins invasif pour le patient(59). Il nous semble que ces résultats méritent une diffusion aux équipes de pédiatrie de notre CHU.

Par ailleurs, nos résultats montrent que 50 % et 20% des LCR chez les nouveau-nés et les nourrissons/enfant/adultes respectivement ont une cellularité normale ce qui indique que le résultat de la numération des éléments du LCR n'est pas un indicateur suffisant afin d'écartier la méningite à EV. De plus, les formules leucocytaires des LCR montrent que la prédominance de polynucléaires ou de lymphocytes ne constitue pas un indice suffisant pour exclure la méningite à EV même si les méningites à EV sont classées comme les méningites virales avec une formule à prédominance de polynucléaires(34).

Par conséquent, ces deux éléments, numération et formule leucocytaire du LCR, ne constituent pas des indices suffisants pour éliminer le diagnostic de méningite à EV.

Concernant les signes cliniques retrouvés lors des infections par EV, le dernier bilan disponible du CNR EV datant de 2017 montre que les données que nous avons recueillies au niveau local sont superposables à celles relevées au niveau national. On note la forte prédominance de la fièvre et des signes neurologiques (dont le syndrome méningé) dans les infections à EV. Puis, on retrouve en deuxième plan les signes digestifs, cutanéomuqueux et respiratoires et enfin, en dernier, arrivent les signes cardio-vasculaires et ophtalmologiques.

Une surveillance des passages aux urgences pour un diagnostic de méningite à EV est assurée par le réseau Oscour/Santé publique France. Ce réseau couvre actuellement plus de 90% des services d'urgences adultes et pédiatriques au niveau national et permet une détection précoce de toute augmentation d'incidence de ces méningites. Il nous fournit des informations précieuses sur un rythme hebdomadaire tous les ans. Ainsi, nous pouvons constater que le nombre de cas durant l'épidémie estivale de l'année 2017 surpasse les années 2016 et 2018 (**Figures 23 et 24**).

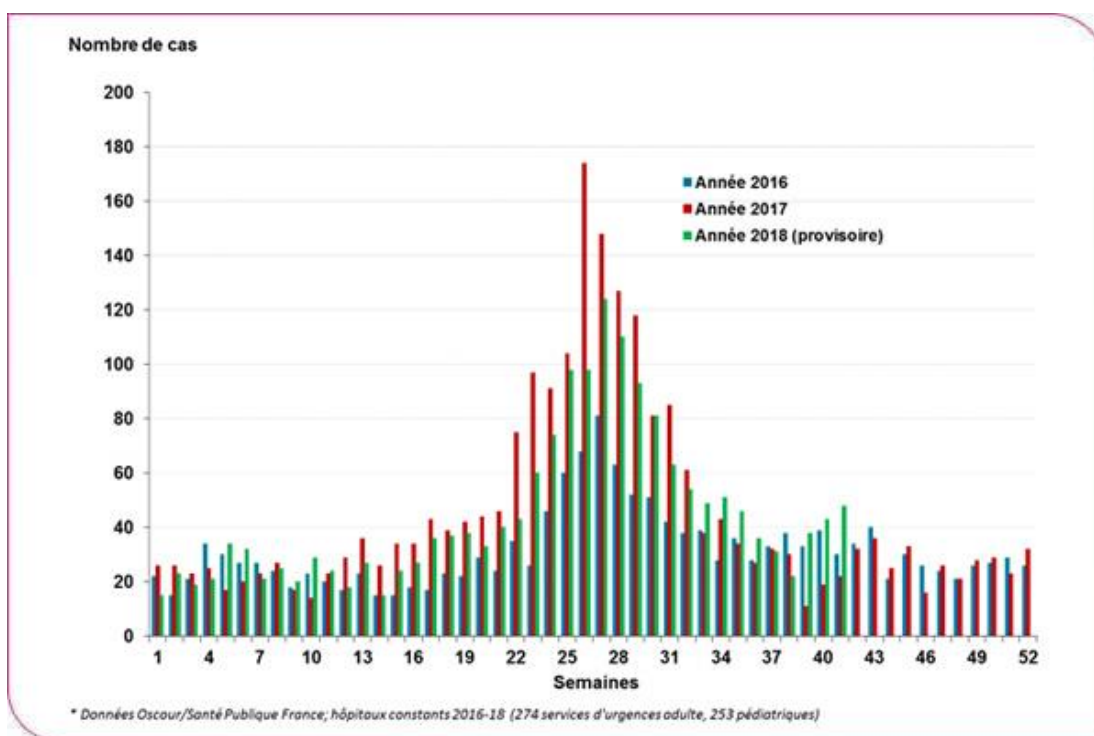


Figure 23: Passage aux urgences pour méningites à entérovirus, données Oscour/Santé Publique France, comparaison 2016-2017 (1^{er} janvier au 14 octobre 2018)

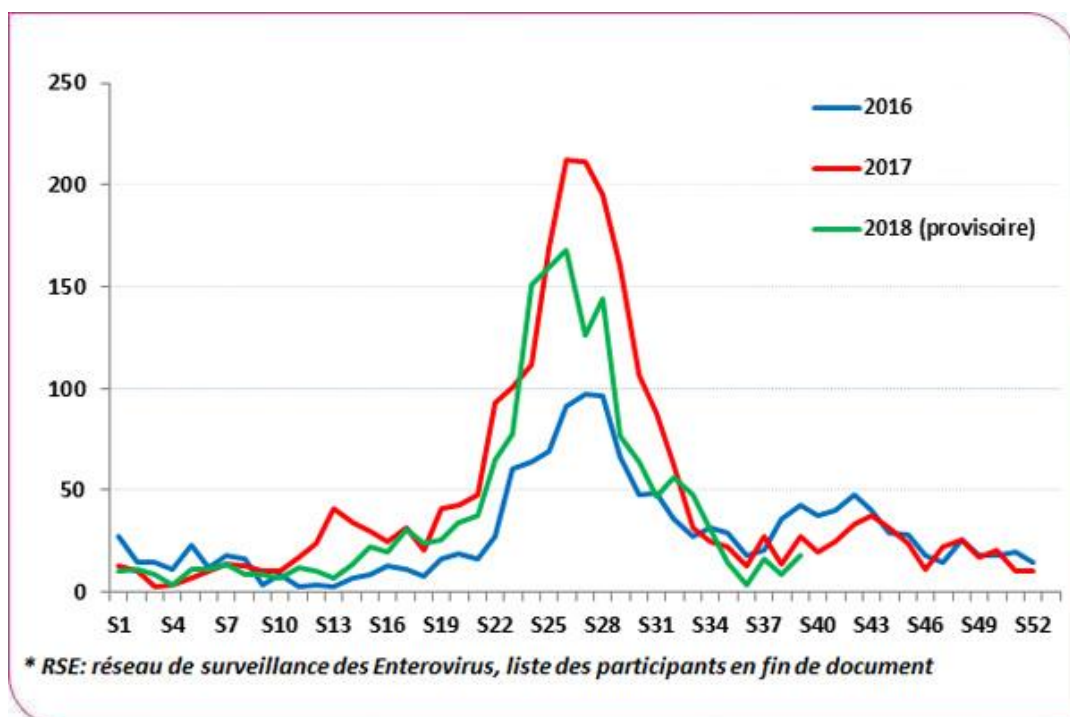


Figure 24 : Nombre de cas avec LCR positifs pour les EV par semaine depuis le 1^{er} janvier 2018, comparaison avec les années 2016-2017 (données provisoires au 16 octobre 2018)

D'un point de vue épidémiologique, l'épidémie estivale 2017 de méningites à EV a été de grande ampleur à l'échelle nationale et se présente comme la plus forte épidémie depuis 5 ans. En 2017, le nombre d'infections avec détection positive de l'EV dans le LCR s'élève à 1693 cas en France et, dans 89,5% des cas, l'identification des EV fut possible par le CNR. Ainsi, l'ECHOvirus 6 a été retrouvé dans 41% des cas, le Coxsackievirus B5 dans 15% des cas et enfin l'ECHOvirus 5 et l'ECHOvirus 18 ont été retrouvés dans 10% et 9% des cas respectivement.

L'année 2016 était dominée à part quasiment égale par les ECHOvirus 30, 6, 5 et 9 (Données InVS Octobre 2018)

À Bordeaux, nous avons retrouvé l'ECHOvirus 6 dans 26% des cas, puis l'ECHOvirus 30 (17% des cas) et enfin l'ECHOvirus 9 (10% des cas). L'ECHOvirus 18 regroupait 8% des cas tout comme le Coxsackievirus B5 ; l'ECHOvirus 5 représentait quant à lui, 7% des cas. Ces éléments montrent que nos résultats sont assez similaires aux données retrouvées sur un plan national à l'exception de l'ECHOvirus 30 qui a persisté au niveau bordelais mais qui a régressé au niveau national alors qu'il était prédominant durant l'année 2016.

Il faut souligner qu'en 2016, en France, une recrudescence inhabituelle de formes neurologiques graves a été enregistrée, impliquant en majorité l'EV-A71 et l'EV-D68. Les patients hospitalisés étaient principalement des enfants présentant des atteintes neurologiques de type encéphalite, rhombencéphalite et paralysie flasque aiguë. Aucun autre épisode de ce type n'avait été jusqu'alors signalé en France.

En 2017, 22 cas d'infections à EV-A71 ont été détectés (contre 144 en 2016) dont 7 associés à des atteintes neurologiques sévères. Dans notre étude, nous avons recensé un cas d'un nouveau-né de 24 jours qui avait présenté une forme sévère d'infection à EV-A71 génogroupe C1. Sur l'année 2018, douze infections à EV-A71 ont été rapportées dont 8 chez des enfants ayant présenté un syndrome pieds-mains-bouche.

Les infections à EV-A71 représentent un problème de santé publique majeur dans les pays du sud-est de l'Asie et en Chine avec de grandes épidémies de syndromes pieds-mains-bouche parfois associées à des complications neurologiques potentiellement mortelles. En France, la surveillance des infections à EV-A71 repose sur la détection des EV chez les patients hospitalisés d'une part et par la surveillance spécifique du syndrome pieds-mains-bouche par un réseau de pédiatres libéraux d'autre part. En 2016, la surveillance de ces virus s'est accrue à cause d'une alerte lancée en Juin par l'Espagne concernant une épidémie d'infections en Catalogne à EV-A71 avec une présentation neurologique sévère(60) mais également grâce à la notification par l'hôpital Necker d'une recrudescence d'atteintes neurologiques sévères (encéphalite, myélite et cérébellite) en juillet 2016.

Concernant les infections à EV-D68, le laboratoire du CHU de Bordeaux n'a recensé aucun cas d'infection respiratoire à EV-D68 sur la période étudiée (Novembre 2016-Octobre 2017). En 2018, une circulation accrue d'EV-D68 a été constatée en France depuis fin août alors qu'aucune infection n'avait été observée en 2017. Les patients atteints présentaient des signes respiratoires et des atteintes neurologiques ont été rapportées chez 3 patients : 2 enfants avec rhombencéphalite +/- myélite et un adulte avec déficit du membre supérieur droit et aphasie. Aucun décès n'a été rapporté.

L'épidémie d'EV de l'année 2018 a été de moins grande ampleur que celle observée en 2017. Aucune augmentation du nombre de formes cliniques sévères, en particulier neurologique, n'a été signalée. Par contre, une augmentation de la circulation de l'EV-D68 a été observée depuis fin août 2018, principalement associée à des tableaux respiratoires. L'EV-A71 n'a été détecté que de manière sporadique autant en 2017 qu'en 2018 (Données InVS Octobre 2018). Cependant, le virus reste sous surveillance car l'EV-A71 circule encore activement dans la région Asie Pacifique et notamment en Chine. Par conséquent, il paraît indispensable de réaliser la surveillance de cet EV en France(61). Enfin, nous pouvons préciser qu'aucun cas de poliovirus n'a été rapporté en France.

Conclusion

La revue des cas d'infections à entérovirus sur la période Novembre 2016 – Octobre 2017 a permis dans un premier temps d'analyser l'activité de PCR entérovirus au laboratoire de virologie, poste diagnostique régulier qui mérite une évaluation. Le nombre de demandes faites au laboratoire est relativement stable, avec une augmentation lors du pic épidémique estival. Le délai de rendu du résultat de la PCR EV ne permet pas de diminuer la durée du séjour d'hospitalisation du patient, probablement parce qu'il est trop long par rapport à la durée de résolution d'une infection à EV non compliquée. En revanche, nous avons pu mettre en évidence que le fait de rendre une PCR EV positive permettait dans un tiers des cas l'arrêt de l'antibiothérapie probabiliste mise en place en traitement initial à l'hôpital. Ces deux derniers éléments semblent particulièrement importants car la PCR EV pourrait amener de précieux bénéfices pour le patient (diminution de la durée d'hospitalisation) et pour l'hôpital (diminution du coût de la prise en charge avec un retour à domicile du patient plus précoce).

L'InVS rappelle que les méningites aiguës communautaires sont causées par une grande variété d'organismes principalement viraux et que plus de 85% des méningites virales sont la conséquence d'infections à EV. Ainsi, ces méningites représentent une dépense de santé publique importante en termes d'hospitalisation et il apparaît important de diagnostiquer cette infection de la façon la plus précoce possible afin d'améliorer la prise en charge du patient et de faire en sorte de limiter la durée d'hospitalisation.

En 2014, la HAS a émis un rapport qui conclut que la PCR EV dans le LCR apporte un bénéfice en termes d'hospitalisation et de prise en charge thérapeutique pour le patient d'où la décision de son remboursement par la Sécurité sociale.

Ainsi, il semble important à l'avenir que le laboratoire de virologie mette en place une PCR EV quotidienne afin de raccourcir le délai de rendu du résultat et de permettre une suppression plus rapide de l'antibiothérapie probabiliste. En adoptant un nouveau rythme de réalisation des PCR EV dans le futur, nous pourrions comparer nos résultats sur deux périodes (ancienne technique vs nouvelle technique) afin de conclure sur l'impact clinique éventuel que pourrait avoir une nouvelle organisation concernant cette analyse.

Par ailleurs, ce travail a également permis de mettre en lumière que les EV pouvaient occasionner une symptomatologie bruyante chez certains patients et des passages en réanimation, en dehors des sérotypes bien connus comme l'EV-D68 et l'EV-A71.

Enfin, ce travail a permis de faire le point sur les sérotypes d'EV circulant et surtout, de comparer la circulation de l'EV-A71 et de l'EV-D68 au CHU de Bordeaux avec les données nationales. En effet, sur l'année 2017, alors que 22 cas d'infections à EV-A71 ont été détectés dont 7 associés à des atteintes neurologiques sévères en France, aucun n'émane du CHU de Bordeaux. Les infections à EV demeurent pour la grande majorité bénigne, bien que pouvant engendrer plus rarement des atteintes neurologiques graves. Ces infections sont à l'origine d'un grand nombre d'hospitalisations et par conséquent, d'une dépense non négligeable pour l'hôpital. Il semble important d'optimiser la prise en charge du patient dans son intérêt et celui de l'hôpital. Dans ce contexte, la récente démonstration par l'équipe de Clermont Ferrand de l'intérêt de la PCR dans le sang chez le tout petit présente un intérêt médical majeur.

Références bibliographiques

1. Tebruegge M, Curtis N. Enterovirus infections in neonates. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*. août 2009;14(4):222-7.
2. DUNN JJ. Enteroviruses and Parechoviruses. 2018;22.
3. Whitton JL, Cornell CT, Feuer R. Host and virus determinants of picornavirus pathogenesis and tropism. *Nature reviews Microbiology*. 2005;3(10):765.
4. Ward CD, Flanagan JB. Determination of the poliovirus RNA polymerase error frequency at eight sites in the viral genome. *Journal of virology*. 1992;66(6):3784–3793.
5. Nishimura Y, Shimojima M, Tano Y, Miyamura T, Wakita T, Shimizu H. Human P-selectin glycoprotein ligand-1 is a functional receptor for enterovirus 71. *Nature Medicine*. juill 2009;15(7):794-7.
6. Yamayoshi S, Yamashita Y, Li J, Hanagata N, Minowa T, Takemura T, et al. Scavenger receptor B2 is a cellular receptor for enterovirus 71. *Nature Medicine*. juill 2009;15(7):798-801.
7. Coyne CB, Bergelson JM. Virus-Induced Abl and Fyn Kinase Signals Permit Coxsackievirus Entry through Epithelial Tight Junctions. *Cell*. janv 2006;124(1):119-31.
8. Patel KP, Coyne CB, Bergelson JM. Dynamin- and Lipid Raft-Dependent Entry of Decay-Accelerating Factor (DAF)-Binding and Non-DAF-Binding Coxsackieviruses into Nonpolarized Cells. *J Virol*. nov 2009;83(21):11064-77.
9. Ahn J, Jee Y, Seo I, Yoon SY, Kim D, Kim YK, et al. Primary neurons become less susceptible to coxsackievirus B5 following maturation: The correlation with the decreased level of CAR expression on cell surface. *Journal of Medical Virology*. mars 2008;80(3):434-40.
10. Gromeier M, Solecki D, Patel DD, Wimmer E. Expression of the Human Poliovirus Receptor/CD155 Gene during Development of the Central Nervous System: Implications for the Pathogenesis of Poliomyelitis. *Virology*. août 2000;273(2):248-57.
11. Nagata N. Differential localization of neurons susceptible to enterovirus 71 and poliovirus type 1 in the central nervous system of cynomolgus monkeys after intravenous inoculation. *Journal of General Virology*. 1 oct 2004;85(10):2981-9.
12. Hughes SA, Thaker HM, Racaniello VR. Transgenic mouse model for echovirus myocarditis and paralysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003;100(26):15906–15911.
13. Feuer R. Coxsackievirus Targets Proliferating Neuronal Progenitor Cells in the Neonatal CNS. *Journal of Neuroscience*. 2 mars 2005;25(9):2434-44.
14. Yang W-X, 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):421–428.
15. Gromeier M, Wimmer E. Mechanism of injury-provoked poliomyelitis. *Journal of virology*. 1998;72(6):5056–5060.

16. Wahid R, Cannon MJ, Chow M. Dendritic Cells and Macrophages Are Productively Infected by Poliovirus. *Journal of Virology*. 1 janv 2005;79(1):401-9.
17. Sharma R, Raychaudhuri S, Dasgupta A. Nuclear entry of poliovirus protease-polymerase precursor 3CD: implications for host cell transcription shut-off. *Virology*. mars 2004;320(2):195-205.
18. Doedens JR, Kirkegaard K. Inhibition of cellular protein secretion by poliovirus proteins 2B and 3A. *EMBO J*. 1 mars 1995;14(5):894-907.
19. Madan V, Redondo N, Carrasco L. Cell permeabilization by poliovirus 2B viroporin triggers bystander permeabilization in neighbouring cells through a mechanism involving gap junctions: Permeabilization of neighbouring cells by viroporins. *Cellular Microbiology*. août 2010;12(8):1144-57.
20. Wong J, Zhang J, Si X, Gao G, Mao I, McManus BM, et al. Autophagosome Supports Coxsackievirus B3 Replication in Host Cells. *Journal of Virology*. 15 sept 2008;82(18):9143-53.
21. Yoon SY, Ha YE, Choi JE, Ahn J, Lee H, Kweon H-S, et al. Coxsackievirus B4 Uses Autophagy for Replication after Calpain Activation in Rat Primary Neurons. *Journal of Virology*. 1 déc 2008;82(23):11976-8.
22. Hosking MP, Lane TE. The role of chemokines during viral infection of the CNS. *PLoS pathogens*. 2010;6(7):e1000937.
23. Rhoades RE, Tabor-Godwin JM, Tsueng G, Feuer R. Enterovirus Infections of the Central Nervous System Review. *Virology*. 15 mars 2011;411(2):288-305.
24. 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(5):241–246.
25. Feuer R, Ruller CM, An N, Tabor-Godwin JM, Rhoades RE, Maciejewski S, et al. Viral Persistence and Chronic Immunopathology in the Adult Central Nervous System following Coxsackievirus Infection during the Neonatal Period. *Journal of Virology*. 15 sept 2009;83(18):9356-69.
26. Lin Y-W, Chang K-C, Kao C-M, Chang S-P, Tung Y-Y, Chen S-H. Lymphocyte and Antibody Responses Reduce Enterovirus 71 Lethality in Mice by Decreasing Tissue Viral Loads. *Journal of Virology*. 1 juill 2009;83(13):6477-83.
27. Han J, Ma X-J, Wan J-F, Liu Y-H, Han Y-L, Chen C, et al. Long persistence of EV71 specific nucleotides in respiratory and feces samples of the patients with Hand-Foot-Mouth Disease after recovery. *BMC Infectious Diseases*. 2010;10(1):178.
28. Colbere-Garapin F, Christodoulou C, Crainic R, Pelletier I. Persistent poliovirus infection of human neuroblastoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1 oct 1989;86(19):7590-4.
29. Baj A, Colombo M, Headley JL, McFarlane JR, Liethof M, Toniolo A. Post-poliomyelitis syndrome as a possible viral disease. *International Journal of Infectious Diseases*. juin 2015;35:107-16.

30. Deonarain R. Protective Role for Interferon- in Coxsackievirus B3 Infection. *Circulation*. 7 déc 2004;110(23):3540-3.
31. Kassab S, Boyer A, Lafon M-E, Gruson D, Lina K, Fleury H. Fatal Case of Enterovirus 71 Infection and Rituximab Therapy, France, 2012. *Veterinary Microbiology*. avr 2013;163(1-2):54-61.
32. 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. *New England Journal of Medicine*. 2007;356(12):1226–1234.
33. Baggen J, Thibaut HJ, Strating JRPM, van Kuppeveld FJM. The life cycle of non-polio enteroviruses and how to target it. *Nature Reviews Microbiology*. juin 2018;16(6):368-81.
34. Henquell C, Lina B. Enterovirus. In: *Remic 52. Société française de microbiologie*.
35. Klingel K, Hohenadl C, Canu A, Albrecht M, Seemann M, Mall G, et al. Ongoing enterovirus-induced myocarditis is associated with persistent heart muscle infection: quantitative analysis of virus replication, tissue damage, and inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1992;89(1):314–318.
36. Huber S, Ramsingh AI. Coxsackievirus-induced pancreatitis. *Viral immunology*. 2004;17(3):358–369.
37. Tam PE, Messner RP. Molecular Mechanisms of Coxsackievirus Persistence in Chronic Inflammatory Myopathy: Viral RNA Persists through Formation of a Double-Stranded Complex without Associated Genomic Mutations or Evolution. *J Virol*. 12 janv 1999;73(12):10113-21.
38. Dalwai A, Ahmad S, Al-Nakib W. Echoviruses are a major cause of aseptic meningitis in infants and young children in Kuwait. *Virology journal*. 2010;7(1):236.
39. Lévêque N, Semler BL. A 21st Century Perspective of Poliovirus Replication. Spindler KR, éditeur. *PLOS Pathogens*. 4 juin 2015;11(6):e1004825.
40. Ornoy A, Tenenbaum A. Pregnancy outcome following infections by coxsackie, echo, measles, mumps, hepatitis, polio and encephalitis viruses. *Reproductive Toxicology*. mai 2006;21(4):446-57.
41. Euscher E, Davis J, Holzman I, Nuovo GJ. Coxsackie virus infection of the placenta associated with neurodevelopmental delays in the newborn. *Obstetrics & Gynecology*. 2001;98(6):1019–1026.
42. Solomon T, Lewthwaite P, Perera D, Cardoso MJ, McMinn P, Ooi MH. Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of enterovirus 71. *The Lancet infectious diseases*. 2010;10(11):778–790.
43. Schuffenecker I, Mirand A, Antona D, Henquell C, Chomel J-J, Archimbaud C, et al. Epidemiology of human enterovirus 71 infections in France, 2000–2009. *Journal of Clinical Virology*. janv 2011;50(1):50-6.
44. Vallet S, Legrand-Quillien M-C, Dailland T, Podeur G, Gouriou S, Schuffenecker I, et al. Fatal Case of Enterovirus 71 Infection, France, 2007. *Emerging Infectious Diseases*. nov 2009;15(11):1837-40.

45. Greninger AL, Naccache SN, Messacar K, Clayton A, Yu G, Somasekar S, et al. A novel outbreak enterovirus D68 strain associated with acute flaccid myelitis cases in the USA (2012–14): a retrospective cohort study. *The Lancet Infectious Diseases*. juin 2015;15(6):671-82.
46. 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. *Eurosurveillance* [Internet]. 12 mai 2016 [cité 14 mars 2018];21(19). Disponible sur: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=22472>
47. Ong KC, Devi S, Cardoso MJ, Wong KT. Formaldehyde-inactivated whole-virus vaccine protects a murine model of enterovirus 71 encephalomyelitis against disease. *Journal of virology*. 2010;84(1):661–665.
48. Wu C-N, Lin Y-C, Fann C, Liao N-S, Shih S-R, Ho M-S. Protection against lethal enterovirus 71 infection in newborn mice by passive immunization with subunit VP1 vaccines and inactivated virus. *Vaccine*. 2001;20(5-6):895–904.
49. Rapport HAS d'évaluation technologique -Détection du génome des entérovirus dans le liquide céphalorachidien par amplification génique dans les méningites. 2014.
50. King RL, Lorch SA, Cohen DM, Hodinka RL, Cohn KA, Shah SS. Routine Cerebrospinal Fluid Enterovirus Polymerase Chain Reaction Testing Reduces Hospitalization and Antibiotic Use for Infants 90 Days of Age or Younger. *PEDIATRICS*. 1 sept 2007;120(3):489-96.
51. Brunel D, Lévêque N, Jacques J, Renois F, Motte J, Andréoletti L. Clinical and virological features of an aseptic meningitis outbreak in North-Eastern France, 2005. *Journal of Clinical Virology*. juin 2008;42(2):225-8.
52. Dupouy Camet J, Peigue-Lafeuille H, Riegel P, Rozenberg F, Wallon M. Les infections du système nerveux central. In: *Remic 2015. 5ème édition 2015 5.1. Société française de microbiologie; (Infection du système nerveux central)*.
53. Cabrerizo M, Díaz-Cerio M, Muñoz-Almagro C, Rabella N, Tarragó D, Romero MP, et al. Molecular epidemiology of enterovirus and parechovirus infections according to patient age over a 4-year period in Spain: EV and HPeV Infections, Spain. *Journal of Medical Virology*. mars 2017;89(3):435-42.
54. Journal officiel de la République Française. Recherche d'Entérovirus par amplification génique dans le liquide cérébrospinal. *Option/Bio*. mars 2018;29(575-576):26-8.
55. 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. *Jhaveri R, éditeur. PLoS ONE*. 11 juill 2013;8(7):e68571.
56. Dewan M, Zorc JJ, Hodinka RL, Shah SS. Cerebrospinal Fluid Enterovirus Testing in Infants 56 Days or Younger. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine* [Internet]. 1 sept 2010 [cité 19 nov 2018];164(9). Disponible sur: <http://archpedi.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archpediatrics.2010.153>

57. Aronson PL, Lyons TW, Cruz AT, Freedman SB, Okada PJ, Fleming AH, et al. Impact of Enteroviral Polymerase Chain Reaction Testing on Length of Stay for Infants 60 Days Old or Younger. *The Journal of Pediatrics*. oct 2017;189:169-174.e2.
58. Giulieri SG, Chapuis-Taillard C, Manuel O, Hugli O, Pinget C, Wasserfallen J-B, et al. Rapid detection of enterovirus in cerebrospinal fluid by a fully-automated PCR assay is associated with improved management of aseptic meningitis in adult patients. *Journal of Clinical Virology*. janv 2015;62:58-62.
59. Lafolie J, Labbé A, L'Honneur AS, Madhi F, Pereira B, Decobert M, et al. 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. *The Lancet Infectious Diseases*. déc 2018;18(12):1385-96.
60. Casas-Alba D, de Sevilla MF, Valero-Rello A, Fortuny C, García-García J-J, Ortez C, et al. Outbreak of brainstem encephalitis associated with enterovirus-A71 in Catalonia, Spain (2016): a clinical observational study in a children's reference centre in Catalonia. *Clinical Microbiology and Infection*. nov 2017;23(11):874-81.
61. Schuffenecker I, Josset L, Lina B, Mirand A, Peigue-Lafeuille H, Henquell C. Rapport d'activité 2016 du CNR Entérovirus. 2016;92.

Annexes

| | |
|---|-----------|
| Annexe 1 : Biologie du LCR au cours des méningites | 70 |
| Annexe 2 : Fiche de renseignements cliniques du CNR entérovirus | 71 |
| Annexe 3 : Recommandations de prescription des PCR en neurovirologie | 72 |

Annexe 1 : Biologie du LCR au cours des méningites

| Paramètres | LCR normal | LCR « purulent » | LCR lymphocytaire | LCR « panaché » | LCR hémorragique sans méningite |
|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---|---|---|
| Aspect | Clair, eau de roche | Trouble, « eau de riz, purulent | Clair | Clair ou trouble | Trouble, rosé ou sanglant |
| Leucocyte/mm³ | <5 (10 à 30 chez le nouveau-né) | >200 | 100-500 | >100 | 1 leucocyte pour 700 hématies |
| Formule leucocytaire | Lymphocytaire | Polynucléaires | Lymphocytaire | Augmentée | Identique à la formule sanguine |
| Protéïnorachie | 0,15-0,45g/L | Augmentée | Normale ou augmentée | Augmentée | Environ 0,01g/L pour 1000 hématies |
| Glycorachie/ glycémie | 2/3 de la glycémie | Basse | Normale (sauf méningite tuberculeuse) | Normale ou basse | Augmentée |
| Orientations | Pas de signe d'infection | Méningite bactérienne | Méningite virale Méningite tuberculeuse Cryptococcose | Méningite à Listeria Méningite débutante Empyème cérébral | Ponction traumatique (éclaircissement sur 3 tubes) Hémorragie méningée |

Annexe 2 : Fiche de renseignements cliniques du CNR entérovirus

FICHE DE RENSEIGNEMENTS CLINIQUES GENOTYPAGE DES ENTEROVIRUS – PARECHOVIRUS - RHINOVIRUS

| | |
|--|--|
| HOPITAL : Service : Médecin : Téléphone / Fax : | <p style="text-align: center;">PATIENT</p> NOM : Prénom : Date de naissance :/...../..... Sexe : F <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> |
|--|--|

DEMANDE DE RECHERCHE (détection génomique, culture cellulaire) ou CONFIRMATION

ENTEROVIRUS PARECHOVIRUS RHINOVIRUS

DEMANDE DE GENOTYPAGE (identification):

ENTEROVIRUS PARECHOVIRUS RHINOVIRUS

PRELEVEMENT(S) * Technique de détection génomique :

| | | | | | | | |
|-----------|--------------------------|--------|------|--------------|--------------------------|--------|------|
| LCR | <input type="checkbox"/> | Date : | Ct : | Sang | <input type="checkbox"/> | Date : | Ct : |
| Gorge | <input type="checkbox"/> | Date : | Ct : | Asp. Nasoph. | <input type="checkbox"/> | Date : | Ct : |
| Selles | <input type="checkbox"/> | Date : | Ct : | Autres | <input type="checkbox"/> | Date : | Ct : |
| Vésicules | <input type="checkbox"/> | Date : | Ct : | Préciser : | | | |

* Pour un même patient, une seule feuille de renseignements cliniques est suffisante

HISTOIRE DE LA MALADIE ET DATE DE DEBUT DES SIGNES CLINIQUES


| | | |
|--|---|---|
| Hospitalisation <input type="checkbox"/> Réanimation <input type="checkbox"/> Infection sévère <input type="checkbox"/> Fièvre <input type="checkbox"/> <u>Signes Neurologiques</u> Syndrome méningé <input type="checkbox"/> Céphalées <input type="checkbox"/> Convulsions <input type="checkbox"/> Hypotonie <input type="checkbox"/> Encéphalite <input type="checkbox"/> Paralyse <input type="checkbox"/> Polyradiculonévrite <input type="checkbox"/> Ataxie <input type="checkbox"/> <u>Signes Respiratoires</u> Rhinite <input type="checkbox"/> Toux <input type="checkbox"/> Bronchite/bronchiolite <input type="checkbox"/> Pharyngite <input type="checkbox"/> Pneumopathie <input type="checkbox"/> Détresse respiratoire <input type="checkbox"/> Asthme <input type="checkbox"/> | <u>Signes Cardio-vasculaires</u> Myocardite <input type="checkbox"/> Péricardite <input type="checkbox"/> Syndrome de choc <input type="checkbox"/> <u>Signes Cutané-muqueux</u> Synd Pied-Main-Bouche <input type="checkbox"/> Herpangine <input type="checkbox"/> Vésicules buccales <input type="checkbox"/> Exanthème/ rash <input type="checkbox"/> Purpura <input type="checkbox"/> Eruption vésiculeuse <input type="checkbox"/> <u>Signes digestifs</u> Vomissements <input type="checkbox"/> Diarrhée <input type="checkbox"/> Douleurs abdominales <input type="checkbox"/> Hépatite <input type="checkbox"/> <u>Signes Opthalmologiques</u> Conjonctivite <input type="checkbox"/> Conjonctivite hémorragique <input type="checkbox"/> | <u>Enfants < 2 ans</u> Infection néonatale <input type="checkbox"/> Mort subite du nourrisson <input type="checkbox"/> Sepsis <input type="checkbox"/> <u>Décès</u> <input type="checkbox"/> <u>Consultation adoption</u> <input type="checkbox"/> Pays origine..... Date arrivée en France : <u>Epidémiologie</u> Contexte épidémique Intrafamilial <input type="checkbox"/> Communautaire <input type="checkbox"/> Nosocomial <input type="checkbox"/> Voyage <input type="checkbox"/> Si oui, lieu et date séjour..... <u>Autres (Préciser) :</u> |
|--|---|---|



Centre National de référence des entérovirus et parechovirus – Laboratoire associé
Pr C. Henquell
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

Avril 2016

Annexe 3 : Recommandations de prescription des PCR en neurovirologie

| | | |
|---|--|----------------------------|
|  | Entité d'application : PBP - --- - Emetteur : PBP - P1A - VIR | IN_LAB_16_3357 Ind : 01 |
| | INSTRUCTION | |
| RECOMMANDATIONS DE PRESCRIPTION DES PCR EN NEUROVIROLOGIE | | |

La recherche de virus par PCR dans le contexte d'une affection neurologique doit respecter les recommandations suivantes, en première intention.

1. Contexte infectieux et caractère récent (1 semaine) : sérologies VIH et oreillons

| | |
|---|---|
| méningite aiguë | PCR LCR : entérovirus + HSV + VZV et Selles (ou écouvillon Virocult anal) : entérovirus |
| encéphalite aiguë chez l'adulte immunocompétent, ADEM | PCR LCR : HSV + VZV |
| encéphalite aiguë chez l'immunodéprimé : | PCR LCR : HSV + VZV+ CMV + EBV + HHV8 + entérovirus + JCV (selon contexte, PCR quantitative depuis juin 2012) |
| myélite aiguë : | PCR LCR : HSV + VZV+ CMV + EBV + HHV8 + entérovirus PCR Selles : entérovirus + adénovirus |
| Syndrome de Guillain Barré | PCR Sang total (tube EDTA) : CMV, PCR écouvillon ORL : grippe |
| Vascularite aiguë | PCR LCR : HSV + VZV + CMV |
| Enfant | PCR LCR : HSV + VZV + entérovirus + HHV8 PCR Selles (ou écouvillon Virocult anal) : entérovirus |

2. Affections « anciennes » (> 1 semaine) et pathologies non infectieuses, avec cellularité > 10 /µL* :

| | |
|--|-----------------------------------|
| SEP, neuropathies périphériques chroniques, AVC, démence, céphalées chroniques, vascularites chroniques... | Pas d'examen virologique indiqué. |
| Myélite chronique | sérologie HTLV dans le sang |

* En cas de forte suspicion d'une étiologie virale, des PCR peuvent être réalisées après concertation entre neurologue et virologue

3. Si LCR envoyé sans renseignements suffisants seule une PCR HSV sera réalisée.

4. Si voyage ou suspicion d'arboviroses, veuillez contacter le laboratoire de virologie et/ou le service de médecine tropicale.

Date d'application : 14/11/2016

| TABLEAU D'APPROBATION | | | | | |
|-----------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------------------|--------------|
| | POUR LE GROUPE D'ELABORATION | VALIDATION (fonction qualité) | AVIS EXPERT (facultatif) | APPROBATION (responsable d'activité) | |
| Nom : | LAFON MARIE-EDITH | CHAUZIT EMMANUELLE | | POMMIERS SYLVIE | FLEURY HERVE |
| Signature : | DOCUMENT VALIDE NUMERIQUEMENT | | | | |

SEULE LA VERSION ELECTRONIQUE FAIT FOI, ASSUREZ-VOUS DE LA BONNE VERSION EN VIGUEUR

Serment De Galien

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.

Diagnostic des infections à entérovirus au laboratoire de virologie du CHU de Bordeaux : revue des cas de novembre 2016 à Octobre 2017

Les entérovirus (EV) non poliomyélitiques possèdent un large spectre de manifestations cliniques allant de formes bénignes à des formes neurologiques sévères. Leur diagnostic virologique spécifique repose sur la détection de l'ARN des entérovirus dans le LCR, les selles et d'autres liquides biologiques. Notre objectif fut d'évaluer l'activité de diagnostic des infections à EV au laboratoire de virologie du CHU de Bordeaux durant la période Novembre 2016 – Octobre 2017. L'intérêt de ce travail était d'effectuer une revue de tous les cas positifs en EV et d'analyser différents critères cliniques et biologiques. Les résultats de ce travail montrent que la fréquence de positivité de la PCR EV est passée de 2,1% en janvier 2017 à 39,1% au mois de Juillet 2017 au pic de l'épidémie estivale. Concernant les populations touchées, la catégorie des nouveau-nés et des nourrissons représentait 50,7% des cas d'infections. Nous avons également mis en évidence que le prélèvement le plus fréquemment positif était le liquide céphalo-rachidien dans 75% des cas. D'un point de vue clinique, les patients présentaient dans 86% et 65% des cas de la fièvre et des signes neurologiques respectivement. Concernant la prise en charge thérapeutique, nous avons constaté que 94% des nouveau-nés et nourrissons avec un LCR positif à EV avaient reçu un traitement initial comprenant des antibiotiques. D'autre part, l'arrêt de ce traitement était la conséquence, dans 30% des cas, du résultat positif de la PCR EV toutes catégories d'âge confondues. Enfin, nous avons relevé 9 cas d'infections sévères à EV durant cette période dont 1 cas d'EV-A71. Ce travail indique qu'un changement organisationnel au sein du laboratoire bénéficierait grandement à cette activité diagnostique.

Mots-clés : entérovirus, méningite, polymerase chain reaction,

Diagnosis of enterovirus infections in the virology laboratory of the Bordeaux University Hospital: review of cases from November 2016 to October 2017

Non-polio enteroviruses (EVs) have a broad spectrum of clinical manifestations, ranging from benign to severe neurological forms. Specific virological diagnosis relies on the detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid, stools, and other biological compartments. Our objective was to evaluate the diagnosis of EV infections in the virology laboratory of Bordeaux University Hospital during the November 2016 - October 2017 period. All EV-positive cases were reviewed and clinical and biological criteria analyzed. Our results showed that the frequency of positivity of EV PCR increased from 2.1% in January 2017 to 39.1% in July 2017 at the peak of the summer epidemics. Newborns and infants represented 50.7% of infections. The most frequently positive sample was cerebrospinal fluid (75%). Clinically, 86% and 65% of patients had fever and neurological signs, respectively. Regarding treatment, 94% of newborns and infants with an EV-positive CSF had received initial antibiotics. On the other hand, this treatment was discontinued, in 30% of the cases, because of the positive result of the PCR EV in all age categories. Finally, we found 9 cases of severe EV infections during this period, including 1 case of EV-A71. This work indicates that the material organization of enterovirus PCR should be modified in our laboratory.

Keywords : enterovirus, meningitis, polymerase chain reaction