

**THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**Soutenue publiquement le 11/04/2022
Par M. MERCIER Ambroise**

**Marqueurs virologiques d'infection
par les entérovirus**

Membres du jury :

Président :

Madame le Professeur M.-B. ROMOND
Professeur des Universités, Université de Lille

Directeur, conseiller de thèse :

Monsieur le Professeur D. HOBER
Professeur des Universités – Praticien Hospitalier
Université de Lille et Centre Hospitalier Universitaire de Lille

Assesseurs :

Monsieur le Docteur E.K. ALIDJINOU
Maitre de conférences des Universités – Praticien Hospitalier
Université de Lille et Centre Hospitalier Universitaire de Lille

Madame le Docteur M.-N. NOULARD
Praticien Hospitalier, Centre Hospitalier d'Arras

Faculté de Pharmacie de Lille
3 Rue du Professeur Laguesse – 59000 Lille
03 20 96 40 40
<https://pharmacie.univ-lille.fr>

Université de Lille

Président	Régis BORDET
Premier Vice-président	Etienne PEYRAT
Vice-présidente Formation	Christel BEAUCOURT
Vice-président Recherche	Olivier COLOT
Vice-présidente Réseaux internationaux et européens	Kathleen O'CONNOR
Vice-président Ressources humaines	Jérôme FONCEL
Directrice Générale des Services	Marie-Dominique SAVINA

UFR3S

Doyen	Dominique LACROIX
Premier Vice-Doyen	Guillaume PENEL
Vice-Doyen Recherche	Éric BOULANGER
Vice-Doyen Finances et Patrimoine	Damien CUNY
Vice-Doyen Coordination pluriprofessionnelle et Formations sanitaires	Sébastien D'HARANCY
Vice-Doyen RH, SI et Qualité	Hervé HUBERT
Vice-Doyenne Formation tout au long de la vie	Caroline LANIER
Vice-Doyen Territoires-Partenariats	Thomas MORGENROTH
Vice-Doyenne Vie de Campus	Claire PINÇON
Vice-Doyen International et Communication	Vincent SOBANSKI
Vice-Doyen étudiant	Dorian QUINZAIN

Faculté de Pharmacie

Doyen	Delphine ALLORGE
Premier Assesseur et Assesseur en charge des études	Benjamin BERTIN
Assesseur aux Ressources et Personnels	Stéphanie DELBAERE
Assesseur à la Santé et à l'Accompagnement	Anne GARAT
Assesseur à la Vie de la Faculté	Emmanuelle LIPKA
Responsable des Services	Cyrille PORTA
Représentant étudiant	Honoré GUISE

Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers (PU-PH)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie et Santé publique	81
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie	82
M.	DÉCAUDIN	Bertrand	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81
M.	DINE	Thierry	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie	82
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie - Virologie	82
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
M.	ODOU	Pascal	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
Mme	POULAIN	Stéphanie	Hématologie	82
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
M.	STAELS	Bart	Biologie cellulaire	82

Professeurs des Universités (PU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Biophysique - RMN	85
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle	85
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie	87
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	CHAVATTE	Philippe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences végétales et fongiques	87
M.	CUNY	Damien	Sciences végétales et fongiques	87
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Biophysique - RMN	85
Mme	DEPREZ	Rebecca	Chimie thérapeutique	86
M.	DEPREZ	Benoît	Chimie bioinorganique	85
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences végétales et fongiques	87

M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie	86
M.	ELATI	Mohamed	Biomathématiques	27
M.	FOLIGNÉ	Benoît	Bactériologie - Virologie	87
Mme	FOULON	Catherine	Chimie analytique	85
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie et Santé publique	86
M.	GOOSSENS	Jean-François	Chimie analytique	85
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie	86
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie thérapeutique	86
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques	26
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie cellulaire	87
Mme	LESTRELIN	Réjane	Biologie cellulaire	87
Mme	MELNYK	Patricia	Chimie physique	85
M.	MILLET	Régis	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
Mme	MUHR-TAILLEUX	Anne	Biochimie	87
Mme	PERROY	Anne-Catherine	Droit et Economie pharmaceutique	86
Mme	ROMOND	Marie-Bénédicte	Bactériologie - Virologie	87
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie	86
M.	SERGHERAERT	Éric	Droit et Economie pharmaceutique	86
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie industrielle	85
M.	WILLAND	Nicolas	Chimie organique	86

Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers (MCU-PH)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	BLONDIAUX	Nicolas	Bactériologie - Virologie	82
Mme	DEMARET	Julie	Immunologie	82
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie et Santé publique	81
Mme	GENAY	Stéphanie	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81
M.	LANNOY	Damien	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
Mme	ODOU	Marie-Françoise	Bactériologie - Virologie	82

Maîtres de Conférences des Universités (MCU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	AGOURIDAS	Laurence	Chimie thérapeutique	85
Mme	ALIOUAT	Cécile-Marie	Parasitologie - Biologie animale	87
M.	ANTHÉRIEU	Sébastien	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie	87
M.	BANTUBUNGI-BLUM	Kadiombo	Biologie cellulaire	87
Mme	BARTHELEMY	Christine	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	85
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie - Virologie	87
M.	BELARBI	Karim-Ali	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	BERTHET	Jérôme	Biophysique - RMN	85
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie	87
M.	BOCHU	Christophe	Biophysique - RMN	85
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie	86
M.	BOSC	Damien	Chimie thérapeutique	86
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie	87
Mme	CARON-HOUDE	Sandrine	Biologie cellulaire	87
Mme	CARRIÉ	Hélène	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	CHARTON	Julie	Chimie organique	86

M.	CHEVALIER	Dany	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	DANEL	Cécile	Chimie analytique	85
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques	85
M.	DHIFLI	Wajdi	Biomathématiques	27
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire	87
M.	EL BAKALI	Jamal	Chimie thérapeutique	86
M.	FARCE	Amaury	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	FLIPO	Marion	Chimie organique	86
M.	FURMAN	Christophe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie	87
Mme	GOOSSENS	Laurence	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie	87
M.	HAMONIER	Julien	Biomathématiques	26
Mme	HAMOUDI-BEN YELLES	Chérifa-Mounira	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie	86
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie	87
M.	KAMBIA KPAKPAGA	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	KARROUT	Younes	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie	87
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie analytique	85
Mme	LEHMANN	Hélène	Droit et Economie pharmaceutique	86
Mme	LELEU	Natascha	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie analytique	85
Mme	LOINGEVILLE	Florence	Biomathématiques	26

Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie	86
M.	MOREAU	Pierre-Arthur	Sciences végétales et fongiques	87
M.	MORGENROTH	Thomas	Droit et Economie pharmaceutique	86
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques	85
M.	PIVA	Frank	Biochimie	85
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie et Santé publique	86
M.	POURCET	Benoît	Biochimie	87
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques / Innovations pédagogiques	85
Mme	RAVEZ	Séverine	Chimie thérapeutique	86
Mme	RIVIÈRE	Céline	Pharmacognosie	86
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie	86
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie	87
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie - Virologie	87
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie - Biologie animale	87
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie	87
M.	VILLEMAGNE	Baptiste	Chimie organique	86
M.	WELTI	Stéphane	Sciences végétales et fongiques	87
M.	YOUS	Saïd	Chimie thérapeutique	86
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques	85

Professeurs certifiés

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement
Mme	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	HUGES	Dominique	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

Professeurs Associés

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	DAO PHAN	Haï Pascal	Chimie thérapeutique	86
M.	DHANANI	Alban	Droit et Economie pharmaceutique	86

Maîtres de Conférences Associés

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	CUCCHI	Malgorzata	Biomathématiques	85
M.	DUFOSSEZ	François	Biomathématiques	85
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	85
M.	GILLOT	François	Droit et Economie pharmaceutique	86
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	MITOUMBA	Fabrice	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	86
M.	PELLETIER	Franck	Droit et Economie pharmaceutique	86
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques	85

Assistants Hospitalo-Universitaire (AHU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	CUVELIER	Élodie	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
M.	GRZYCH	Guillaume	Biochimie	82
Mme	LENSKI	Marie	Toxicologie et Santé publique	81
Mme	HENRY	Héloïse	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
Mme	MASSE	Morgane	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81

Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche (ATER)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	GEORGE	Fanny	Bactériologie - Virologie / Immunologie	87
Mme	N'GUESSAN	Cécilia	Parasitologie - Biologie animale	87
M.	RUEZ	Richard	Hématologie	87
M.	SAIED	Tarak	Biophysique - RMN	85
M.	SIEROCKI	Pierre	Chimie bioinorganique	85

Enseignant contractuel

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement
M.	MARTIN MENA	Anthony	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière

Faculté de Pharmacie de Lille

3 Rue du Professeur Laguesse – 59000 Lille

03 20 96 40 40

<https://pharmacie.univ-lille.fr>

L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.

Remerciements

Au Président du jury,

Madame le Professeur Marie-Bénédicte ROMOND

Professeur des Universités, Université de Lille

Vos conseils au cours de mon Année-Recherche m'ont été précieux. Vous me faites l'honneur de présider ce jury, je vous en remercie vivement. Soyez assurée de mon profond respect.

À mon directeur de thèse,

Monsieur le Professeur Didier HOBER

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

Université de Lille et Centre Hospitalier Universitaire de Lille

Merci d'avoir encadré ce travail de thèse d'exercice. Vous m'avez permis de découvrir la Recherche en Virologie au cours de l'externat puis d'effectuer mon Année-Recherche dans votre laboratoire. Je vous en suis extrêmement reconnaissant et vous témoigne tout mon respect.

À mes assesseurs,

Monsieur le Docteur Enagnon Kazali ALIDJINOU

Maitre de conférences des Universités – Praticien Hospitalier

Université de Lille et Centre Hospitalier Universitaire de Lille

Merci d'avoir accepté d'évaluer ce travail et d'y apporter un regard virologique.
Sois assuré de mon respect et de ma reconnaissance.

Madame le Docteur Marie-Noëlle NOULARD

Praticien Hospitalier, Centre Hospitalier d'Arras

Merci Marie-Noëlle d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse et d'évaluer ce travail.
Je tiens également à te remercier pour les stages effectués au centre hospitalier d'Arras,
notamment celui de Microbiologie où nous travaillions ensemble avec Benoit. Je garderai
d'excellents souvenirs de mes deux semestres au cours desquels j'ai toujours pu
apprendre et travailler dans la joie et la bonne humeur.
Sois assurée de ma gratitude et de mon respect.

Je dédie cette thèse à :

Maman et Papa, que dire de plus que « merci pour tout » ? Merci à vous pour ce que vous avez toujours fait pour nous quatre et l'amour que vous nous avez donné. Il est clair que sans vous, mon parcours n'aurait pas été le même et je ne serais pas la personne que je suis aujourd'hui. J'espère vous rendre fiers. Merci pour tout.

Auguste tantôt petit, grand ou frère jumeau, nous avons toujours été ensemble notamment lors de notre cohabitation pendant l'intégralité de tes études ... J'espère que tu en garderas d'aussi bons souvenirs que moi.

Aubert et Aliénor, pour avoir supporté un tel grand frère ! Merci à vous deux pour tous les bons moments passés ensemble en famille aussi bien qu'entre nous ... Merci pour votre écoute et votre soutien lorsque j'en ai eu besoin.

Mes grands-parents. J'aurais tant aimé que vous soyez présents à mes côtés. Je pense à vous, je vous j'aime et ne vous oublie pas.

Jean. D'aussi loin que je me souviens, j'ai toujours voulu devenir pharmacien ... Merci de m'avoir fait m'intéresser à ce métier puis de m'avoir permis de faire mon stage de 3^{ème} dans ta pharmacie. Sans toi, je n'aurais probablement pas suivi ces études qui m'ont passionné.

Madame le Professeur Monique Capron, vous avez suivi mon parcours dès le début de la 2^{ème} année de Pharmacie et m'avez fait entrer dans le monde de la Recherche en m'ouvrant votre laboratoire. J'ai toujours eu beaucoup de plaisir à m'entretenir et à échanger avec vous. Soyez assurée de mon respect, ma gratitude et de toute ma considération.

Mes oncles, tantes, cousins et cousines pour toutes les réunions de famille et pour le reste.

À Gilles et Joan qui ont toujours été présents à nos côtés depuis l'enfance ... Avec toute mon affection.

Pierre-Luc, Aurélien, Jean et Yusuke pour votre amitié sans faille et pour avoir toujours été là pour moi ! Également pour les diverses escapades passées et à venir ...

Alice, de Galien à aujourd'hui en passant par la préparation au concours de l'internat et à la « Team prot » ... Tu es associée à toutes les étapes de mes études. Merci pour ton inestimable amitié.

Mathieu et Sébastien, l'équipe des MM ... Comme quoi, j'aurai réussi à placer le mot « baby-foot » dans ma thèse ... Il m'aura permis de rencontrer deux véritables amis. Merci à vous pour les excellents moments passés ensemble depuis notre rencontre et pour tous ceux qui viendront !

Thomas, merci pour ton amitié, ton humour et toutes les discussions plus ou moins sérieuses qu'on a pu avoir !

Mickaël, mon premier cointerne. Cointernes durant presque la moitié de nos semestres, ton sens de l'humour et ta bonne humeur en TOUTES circonstances ont été des alliés de taille.

David, pour tes évaluations, ta capacité à innover et à surprendre ainsi que pour les mètres de chatterton utilisés ... Je suis ravi d'avoir fait ta connaissance au cours de notre semestre en Parasito. J'en garderai d'excellents souvenirs.

Aux Amigos : Anna, Caroline, Clara, Ryane, Alexandr, Axel, Gatien (R2B), Maël, Quentin et Thibault pour tous les bons moments passés au cours de l'internat mais surtout pour l'Amigosité.

Aux Pharma : Claire, Clémence, Fanny, Marion X2, Mélissa, Pauline, Sana, Alexandre (depuis bien avant la Pharma !!), Corentin, Etienne, Grégoire et Kévin grâce à qui toutes ces années de fac ont été si agréables ...

Aux petits nouveaux du 3^{ème} : Anne-Claire, Axel, Rémi, Grégoire, Thomas ainsi qu'aux infectio Ava, Antoine, Nicolas et aux moins nouveaux Amélie et Alexandre sans qui ce semestre de rédaction de thèse n'aurait pas été le même.

Je tiens à remercier les membres du laboratoire de Virologie ULR3610 Université de Lille et CHU de Lille, notamment Delphine pour le suivi du projet et toute l'aide et conseils apportés au cours du travail.

À toutes les personnes qui ont contribué à ma formation en officine puis en laboratoire de diagnostic et de recherche, qui m'ont donné et me donnent l'envie et le plaisir de travailler.

Merci à tous ceux que je n'ai pas cités mais qui se reconnaîtront.

Sommaire

SOMMAIRE	15
TABLE DES FIGURES	17
TABLE DES TABLEAUX	18
LEXIQUE	19
INTRODUCTION	20
I) ENTEROVIRUS	21
1) <i>Taxonomie et classification</i>	21
2) <i>Structure et cycle viral</i>	24
3) <i>Épidémiologie</i>	26
4) <i>Physiopathologie des infections à entérovirus</i>	28
5) <i>Diagnostic des infections entérovirales</i>	31
6) <i>Prévention et prise en charge</i>	34
II) PATHOLOGIES	35
1) <i>Poliomyélite</i>	35
2) <i>Syndrome post-poliomyélite et sclérose latérale amyotrophique</i>	36
3) <i>Méningites et encéphalites</i>	36
4) <i>Cardiopathies</i>	37
5) <i>Pathologies musculaires</i>	38
6) <i>Atteintes oculaires</i>	38
7) <i>Infections respiratoires, Herpangines et syndrome Pied-Main-Bouche</i>	39
8) <i>Pathologies du nouveau-né et de l'enfant</i>	39
9) <i>CVB4 et DT1</i>	40
OBJECTIFS	42
MATERIEL ET METHODES	44
I) MATERIEL	45
1) <i>Lignées cellulaires</i>	45
2) <i>Virus</i>	45
3) <i>Infection chronique, production virale</i>	46
II) METHODES	47
1) <i>Détection de protéines virales par immunofluorescence indirecte</i>	47
2) <i>Extraction d'ARN</i>	48
3) <i>RT-q-PCR</i>	48
4) <i>RT-PCR sans extraction appliquée à une ou quelques cellules</i>	48
5) <i>Analyses statistiques</i>	50
RESULTATS	51
I) MARQUEURS DE L'INFECTION AIGUË A CVB4 IN VITRO	52
1) <i>Titre viral dans le surnageant de culture</i>	52
2) <i>Détection de protéines virales intracellulaires</i>	53
3) <i>Détection d'ARN viral intracellulaire</i>	54
4) <i>Détermination de la proportion de cellules hébergeant l'ARN viral</i>	55
5) <i>Proportion de cellules capables de transmettre le virus</i>	57

II) MARQUEURS DE L'INFECTION PERSISTANTE A CVB4 IN VITRO	59
1) <i>Titre viral dans le surnageant de culture</i>	59
2) <i>Détection de protéines virales intracellulaires</i>	59
3) <i>Détection d'ARN viral intracellulaire</i>	60
4) <i>Détermination de la proportion de cellules hébergeant l'ARN viral</i>	61
5) <i>Proportion de cellules capables de transmettre le virus</i>	62
DISCUSSION.....	64
CONCLUSION.....	72
BIBLIOGRAPHIE	74

Table des figures

Figure 1 : Place des coxsackievirus B dans le genre <i>Picornaviridae</i>	23
Figure 2 : Structure de la capside et du génome des entérovirus.....	25
Figure 3 Schéma résumant la pathogenèse de la poliomyélite	29
Figure 4 : Mécanismes présumés de la persistance de coxsackievirus B.....	31
Figure 5 : Infection aiguë de cellules HEp-2 par CVB4.....	53
Figure 6 : Détection de protéines virales par immunofluorescence indirecte dans des cellules HEp-2 infectées par CVB4 de manière aiguë	54
Figure 7 : Détection d'ARN viral par RT-q-PCR dans des cellules HEp-2 infectées par CVB4 de manière aiguë	55
Figure 8 : Recherche d'ARN viral par RT-PCR sans extraction dans des cellules HEp-2 infectées de manière aiguë.....	56
Figure 9 : Infection à CVB4 persistante de cellules pancréatiques 1.1B4	59
Figure 10 : Détection de protéines virales par immunofluorescence indirecte dans des cellules 1.1B4 infectées par CVB4 de manière persistante récupérées 180 jours post-infection.....	60
Figure 11 : Détection d'ARN viral par RT-q-PCR dans des cellules 1.1B4 infectées de manière persistante par CVB4 à 180 jours post-infection	61
Figure 12 : Recherche d'ARN viral par RT-PCR sans extraction dans des cellules 1.1B4 infectées par CVB4 de manière persistante à 180 jours post-infection.....	62

Table des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques des virus de la famille des <i>Picornaviridae</i>	21
Tableau 2 : Classification du genre <i>Enterovirus</i>	24
Tableau 3 : Prélèvements recommandés pour le diagnostic d'infection entérovirale selon la manifestation clinique	32
Tableau 4 : Séquences des amorces et sondes utilisées pour la détection d'ARN entéroviral en RT-q-PCR et RT-PCR sans extraction	50
Tableau 5 : Cellules HEp-2 issues de culture infectée par CVB4 cocultivées avec des cellules HEp-2.....	58
Tableau 6 : Cellules Panc-1 issues de culture infectée par CVB4 de manière persistante cocultivées avec des cellules HEp-2.....	63

Lexique

AANE : Acides aminés non essentiel
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : ARN messenger
BSA : *Bovine serumalbumin*
CAR : *Coxsackievirus and Adenovirus Receptor*
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
Ct : *Cycle Treshold*
CVB (4) : Coxsackievirus de type B (4)
DAF : *Decay-Accelerating factor*
DMEM : *Dulbecco's modified Eagle's medium*
DT1 : Diabète de type 1
ECP : Effet cytopathique
ELISA : *Enzyme linked immunosorbent assay*
EV : Entérovirus
HEp-2 : *Human Epithelial cell line type 2*
HEV : *Human enterovirus*
ICTV : *International Committee on Taxonomy of Viruses*
IRES : *internal ribosome entry site*
IS-RT-PCR : *In situ polymerase chain reaction*
LCS : liquide cérebrospinal
MDA5 : *melanoma differentiation-associated protein 5*
MEM : *Minimum essential medium*
miARN : micro ARN
MOI : *Multiplicity of infection*
PBS : *Phosphate-buffered saline*
PCR : *Polymerase chain reaction*
PI4B : phosphatidylinositol 4-kinase β
PFA : Paraformaldéhyde
PVR : *Poliovirus Receptor*
Rpm : Rotations par minute
RPMI : *Roswell Park Memorial Institute medium*
RT-PCR : *Reverse transcription – Polymerase chain reaction*
SCARB2 : *Scavenger Receptor Class B, member2*
siRNA : *small interfering RNA*
SNC : Système nerveux central
SVF : sérum de veau foetal
TCID₅₀ : *50% Tissue culture infective dose*

Introduction

I) Enterovirus

1) Taxonomie et classification

Les entérovirus sont de petits virus à ARN appartenant à la famille des Picornaviridae. D'après l'*International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV), cette famille comprend plus de 30 genres et 75 espèces. Ces virus peuvent être responsables, chez l'Homme et l'animal, de manifestations cliniques variées allant d'une fièvre légère à des atteintes sévères cardiaques, hépatiques voire du système nerveux central (1). Les caractéristiques des *Picornaviridae* sont résumées dans le tableau 1.

Tableau 1 : Caractéristiques des virus de la famille des *Picornaviridae* (adapté de Zell *et al.*, 2017)

Caractéristique	Description
Membre caractéristique	Poliovirus 1 Mahoney (V01149), espèces Enterovirus C, genre Enterovirus
Morphologie du virion	Non-enveloppé, 30-32nm, formé de 60 protomères
Génome	6,7 – 10,1 kb, sens positif, ARN non-segmenté avec une queue poly(A)
Réplication	La synthèse d'ARN débute dans des organelles de réplication cytoplasmiques contenant des protéines non-structurales dérivant des régions 2BC-P3 de la polyprotéine codée par le génome viral. Les extrémités 5' et 3' du génome dirigent l'initiation de la synthèse d'ARN et la région 3B uridylée sert d'amorce pour la synthèse des deux brins d'ARN
Traduction	Directement à partir d'ARN génomique contenant un IRES (<i>internal ribosome entry site</i>)
Hôtes	Mammifères, oiseaux, reptiles, amphibiens et poissons osseux
Taxonomie	Membre de l'ordre <i>Picornavirales</i> ; > 30 genres contenant > 75 espèces

Historiquement, la classification des picornavirus s'effectuait sur une combinaison de propriétés physiques et sérologiques. De nos jours, celle-ci est basée sur des données phylogéniques permettant de classer avec précision ces virus en types, espèces, genre et

famille (2,3). Parmi ces virus, certains sont détectés uniquement chez l'Homme (ex : Cosavirus et Salivirus), l'animal (ex : Aphthovirus, Erbovirus, Teschovirus, etc.) ou détectés chez l'Homme et l'animal (Enterovirus, Parechovirus, Hepatovirus, etc.) (Figure 1). Le genre *Enterovirus* est le plus représenté avec plus de 300 virus regroupés en 15 espèces dont 7 pouvant causer des pathologies chez l'Homme (*Enterovirus A-D* et *Rhinovirus A-C*). À l'origine, ce genre était classé selon leur pathogénicité chez l'Homme et l'animal (4) mais suite à la découverte de nouveaux virus, il a été difficile de les classer selon les manifestations cliniques induites par ceux-ci car quelques différences moléculaires dans un sérotype peuvent modifier le phénotype viral et provoquer divers symptômes. Donc, depuis 1974, des entérovirus ont été classés selon leurs propriétés sérologiques et numérotés par ordre chronologique d'identification en commençant par l'EV-68 isolé et caractérisé en 1962 dans des prélèvements oropharyngés chez 4 enfants californiens atteints de pneumonie et bronchiolite (5,6). Aujourd'hui, la classification des entérovirus (EV) repose sur l'organisation du génome et sur les séquences en acides aminés de la polyprotéine, de la protéine P1 ainsi que des protéines non-structurales 2C + 3CD (7). Les premiers entérovirus découverts après les poliovirus sont les coxsackievirus nommés en raison du lieu du premier isolement de ces virus (Coxsackie, Etat de New-York, Etats-Unis) dans des selles d'enfants au cours d'une épidémie de poliomyélites (8). Une distinction a été faite selon les signes cliniques induits dans des modèles murins avec les coxsackievirus A (CVA) capables de provoquer des paralysies flasques ainsi que des atteintes des muscles squelettiques et cardiaques alors que les coxsackievirus B (CVB) peuvent causer des paralysies spastiques et toucher de nombreux tissus tels que le système nerveux central (SNC), le foie, le pancréas, le tissu adipeux brun ainsi que les muscles striés (9).

Les coxsackievirus A sont retrouvés dans les espèces *Enterovirus A*, B et C, alors que les coxsackievirus B sont retrouvés exclusivement dans les *Enterovirus B* (Tableau 2).

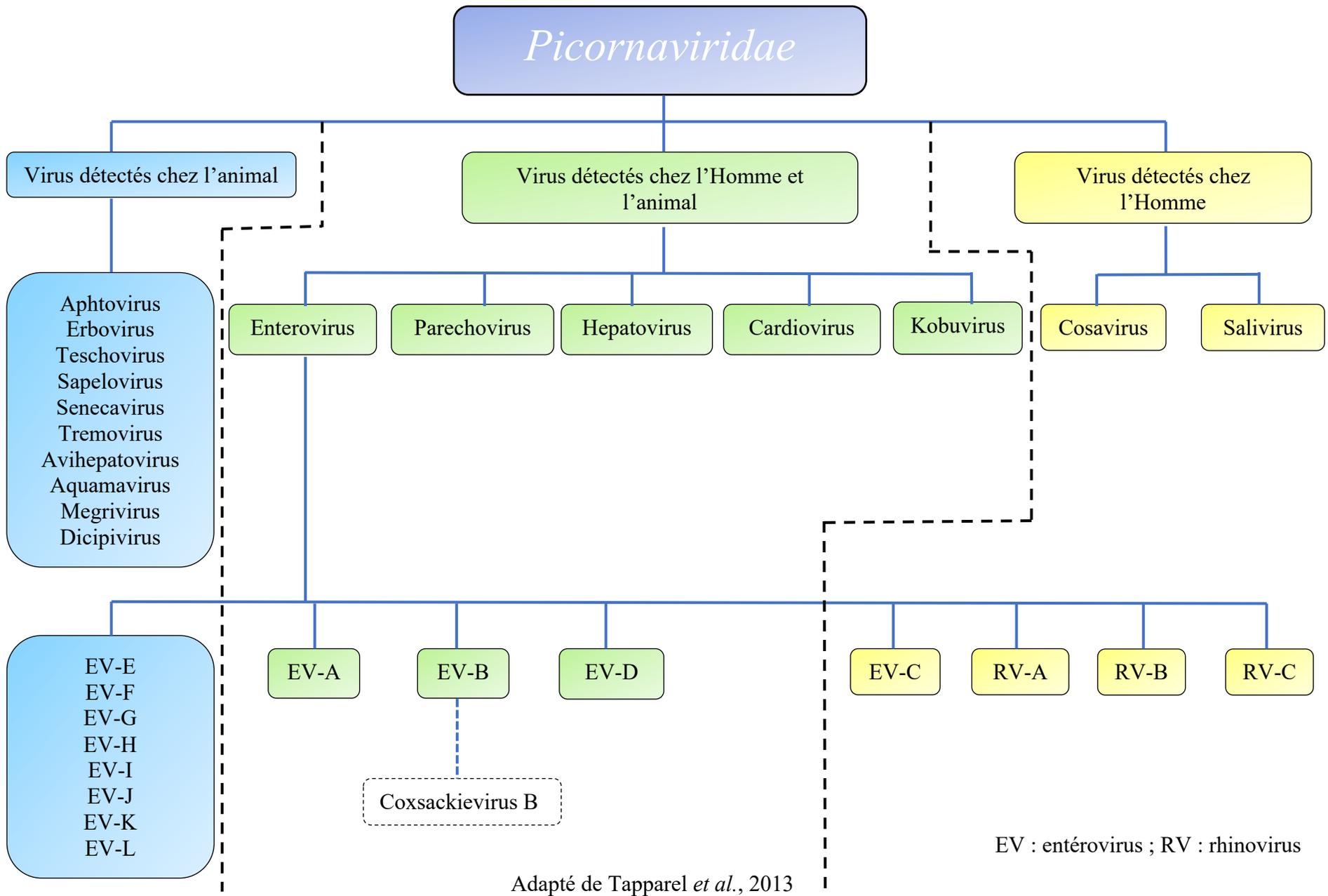


Figure 1 : Place des coxsackievirus B dans le genre *Picornaviridae*

Tableau 2 : Classification du genre *Enterovirus* (d'après picornaviridae.com)

Espèce (nombre de sérotypes)	Sérotypes
Enterovirus (25)	A CVA 2-8, 10, 12, 14, 16 EV-A 71, 76, 89, 90, 91, 92, 114, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125
Enterovirus (63)	B CVA 9 CVB 1-6 Echovirus 1-9, 11-21, 24-27, 29-33 EV-B 69, 73-75, 77- 88, 93, 97, 98, 100, 101, 106, 107, 110-114
Enterovirus (23)	C Poliovirus 1, 2, 3 CVA 1, 11, 13, 17, 19-22, 24 EV-C 95, 96, 99, 102, 104, 105, 109, 113, 116-118
Enterovirus D (5)	EV-D 68, 70, 94, 111, 120
Enterovirus E (4)	EV-E 1-4
Enterovirus F (6)	EV-F 1-6
Enterovirus (20)	G EV-G 1-20
Enterovirus H (1)	EV-H1
Enterovirus I (1)	Dromedary camel enterovirus (DcEV)
Enterovirus J (6)	EV-J 103, 108, 112, 115, 121, 122
Enterovirus K (2)	2 entérovirus trouvés chez des rongeurs en Chine
Enterovirus L (1)	1 entérovirus trouvé chez des singes en Chine
Rhinovirus A (80)	RV-A 1, 2, 7-13, 15, 16, 18-25, 28-34, 36, 38-41, 43, 45-47, 49-51, 53-68, 71, 73-78, 80-82, 85, 88-90, 94, 96, 100-109
Rhinovirus B (32)	RV-B 3-6, 14, 17, 26, 27, 35, 37, 42, 48, 52, 69, 70, 72, 79, 83, 84, 86, 91-93, 97, 99-106
Rhinovirus C (57)	RV-C 1-57

Abréviations : CV : Coxsackievirus / EV : Entérovirus / RV : Rhinovirus

2) Structure et cycle viral

Les entérovirus humains sont de petits virus nus (25 – 30 nm de diamètre), non-enveloppés, à ARN linéaire simple brin de polarité positive. Le génome d'environ 7400 bases a un seul cadre de lecture ouvert (*Open reading frame*) et est couplé de manière covalente à une protéine VPg code pour une unique polyprotéine qui aboutira à la formation de 4 protéines structurales (VP1, VP2, VP3, VP4) ainsi que 7

non-structurales (2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C, 3D). La capside icosaédrique des entérovirus est constituée de 60 capsomères contenant chacun les 4 protéines structurales (VP1, VP2, VP3, VP4). Des données de cristallographie nous indiquent que VP1, VP2 et VP3 sont localisées sur la surface externe de la capside, contrairement à VP4 qui est située sur la surface interne de celle-ci. Des dépressions, appelées « canyon », de 25 Å de profondeur et de 12-30 Å de largeur sont réparties sur la capside du virus. C'est dans ce canyon que se situe le site de liaison au récepteur des entérovirus (10,11) (Figure 2).

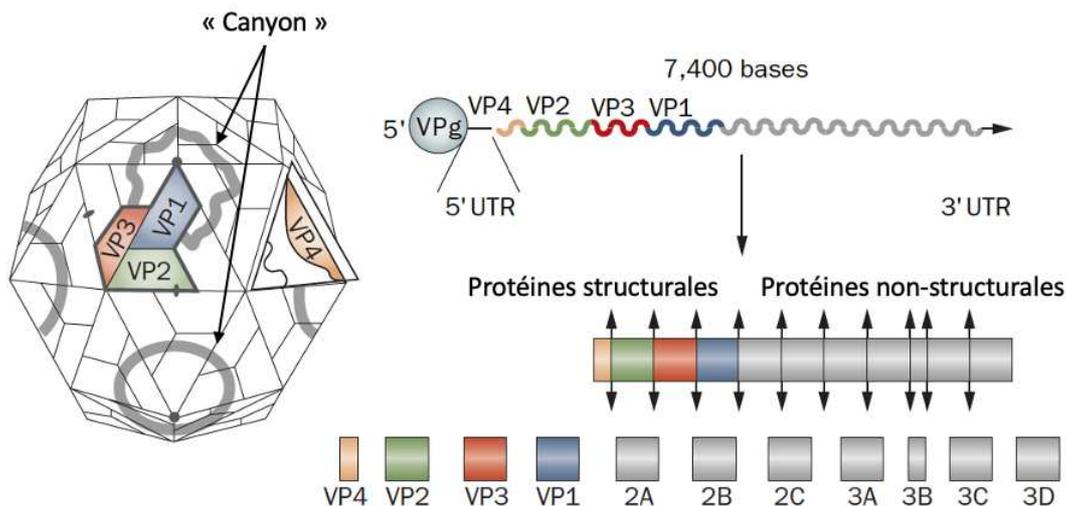


Figure 2 : Structure de la capside et du génome des entérovirus (adapté de Hober et Sauter, 2010)

Bien qu'il existe plus de 300 entérovirus ayant des récepteurs et des mécanismes d'entrée variés, qu'ils peuvent être responsables de diverses pathologies, le cycle viral demeure assez conservé (12). Après une étape d'attachement à son(ses) récepteur(s), récepteur CAR (*Coxsackievirus and Adenovirus Receptor*) pour les coxsackievirus, l'entérovirus est endocyté et libère son ARN linéaire simple brin de polarité positive dans le cytoplasme. Cet ARN viral sera traduit en une polyprotéine qui sera clivée par les protéinases 2A^{pro}, 3C^{pro} et 3CD^{pro} en 10 protéines : 3 structurales (VP0, VP1 et VP3) et 7 non-structurales (2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C, 3D) qui permettront la réplication du virus. Cette étape a lieu à la surface d'une vésicule de réplication qui est une membrane lipidique contenant des constituants viraux et cellulaires nécessaires à l'amplification du génome et protégerait l'ARN viral des RNases cellulaires et des réponses antivirales. Cette vésicule est créée par les protéines virales 2B, 2C et 3A ainsi que par des protéines de l'hôte dont la phosphatidylinositol 4-kinase β (PI4B) (13). Cette kinase permet la synthèse de phosphatidylinositol-4-phosphate présent dans la membrane de ces organelles de

réplication et est nécessaire pour la réplication du virus. La réplication du génome viral débute avec la synthèse d'un brin d'ARN négatif par l'ARN polymérase ARN-dépendante pour former un intermédiaire de réplication ARN double-brin. Le brin d'ARN négatif permet la synthèse de nouveaux brins positifs. Les ARN viraux ainsi synthétisés peuvent se comporter comme des ARNm pour la traduction d'une polyprotéine ou être répliqués et ils peuvent également être des ARN génomiques encapsidés pour former de nouveaux virions. La capsid est formée par l'association des protéines VP0, VP1 et VP3 sous forme de protomères puis de pentamères. L'association d'ARN néo-synthétisé et de pentamères forme le provirion. Une étape de maturation par autoclivage de la VP0 en VP2 et VP4 permet la finition de ces provirions en virus matures. Par ailleurs, les protéinases 2A^{pro} et 3C^{pro}, en plus de cliver la polyprotéine virale, clivent de nombreuses protéines de l'hôte afin d'optimiser le cycle viral et supprimer les réponses cellulaires antivirales. Toutes les étapes du cycle viral ont lieu dans le cytoplasme des cellules infectées.

3) Épidémiologie

a) Transmission

Les entérovirus humains (HEV) sont les agents infectieux les plus couramment retrouvés à travers le monde, notamment chez l'enfant (14,15). Ce sont des virus nus, ubiquitaires, résistants dans l'environnement, et leur transmission est surtout interhumaine. La principale source de contamination est liée au péril fécal notamment par l'ingestion d'aliments ou d'eau souillés par des fèces contaminés. Des transmissions d'entérovirus ont été notifiées par consommation de fruits de mer contaminés (16) voire même de baignades (17) .

Cependant d'autres voies de transmission directes existent comme la transmission par voie respiratoire (18), par une infection au niveau oculaire (19) mais également par voie materno-fœtale, notamment par voie transplacentaire ou périnatale suite au contact de l'enfant avec le sang et les sécrétions vaginales de la mère (20,21). La transmission *via* le lait maternel est suggérée (22).

Ce sont également des virus responsables d'infections nosocomiales, notamment chez les nouveau-nés dans les services de néonatalogie ainsi que dans les nurseries (23).

b) Distribution géographique et saisonnière

La distribution des entérovirus est mondiale, à l'exception du poliovirus sérotype 1 que l'on retrouve exclusivement au Pakistan et en Afghanistan (24). Un caractère saisonnier avec un pic de détection estival a été rapporté. En effet, la surveillance épidémiologique de ces virus a été entreprise aux États-Unis entre 1970 et 2005 et a montré un pic de détection en été/automne (de juin à octobre) représentant 77,9% des infections (15). Une étude rétrospective française a mis en avant une saisonnalité de ces virus avec 93,2% d'entérovirus détectés entre mai et août au cours de l'année 2000 (25).

c) Âge et sexe

L'âge est un facteur majeur de la susceptibilité à l'infection et de la gravité des infections à entérovirus. Les enfants sont le principal réservoir d'entérovirus. Lors d'épidémies de méningites entérovirales, les enfants de moins de 10 ans présentent plus de manifestations cliniques que les adultes (26). Cependant, les enfants plus âgés et les adultes peuvent développer des atteintes plus sévères (27). De plus, lors d'infections à CVB, la moyenne d'âge diffère selon les signes cliniques retrouvés avec des gastro-entérites chez les patients les plus jeunes (âge moyen : 1,3 ans), en comparaison avec les méningites (7,7 ans), infections respiratoires (9,3 ans) et péricardites (9,9 ans) (28).

Les infections et pathologies à entérovirus surviennent plus fréquemment chez les hommes que chez les femmes (29) avec un *sex ratio* variant de 1,5 à 2,5/1 selon les études, avec les hommes présentant des tableaux cliniques plus sévères.

d) Socioéconomique

Les infections à entérovirus sont plus fréquentes chez les personnes provenant de milieux socioéconomiques défavorisés et ceux vivant en zones urbaines (30–32). Cependant, le risque de paralysies associée à la poliomyélite est plus important chez les sujets de statut socioéconomique plus élevé (33).

Certaines études ne montrent pas de lien entre infections entérovirales et milieu socioéconomique (34).

e) Autres facteurs

D'autres paramètres tels que la grossesse ou l'effort physique peuvent accroître la sévérité de l'infection. En effet, l'étude de Rindge montre une augmentation de cas de poliomyélites chez les femmes enceintes, notamment lorsque l'infection a lieu lors du deuxième trimestre de grossesse. Le risque de mort fœtale est maximal lors du premier trimestre et le risque de mort maternelle lors du troisième trimestre de grossesse (35).

L'exercice physique semble jouer un rôle dans l'incidence et la sévérité des maladies à entérovirus. Lors d'une épidémie à entérovirus, Baron et collaborateurs ont montré une incidence de méningites aseptiques avec présence d'Echovirus 16 augmentée chez des joueurs d'une équipe de lycée de football américain par rapport aux étudiants n'appartenant pas à l'équipe. De plus, les symptômes chez ces lycéens pratiquant le football américain étaient plus sévères que ceux ne pratiquant pas (36).

Des facteurs de prédisposition génétiques existent également, avec des facteurs génétiques liés au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) retrouvés chez des patients ayant des formes paralytiques de poliomyélites (37) ou encore des mutations du gène OAS1 diminuant la réponse antivirale lors d'infections à entérovirus pouvant favoriser l'apparition d'un diabète de type 1 (DT1) ou le gène IFIH-1 dont le produit est MDA5 (*melanoma differentiation-associated protein 5*) détecte la présence d'ARN viral double-brin dans les cellules infectées et déclenche la production d'IFN- α , d'IFN- β et de cytokines pro-inflammatoires (CCL-2, CCL-5, CXCL-10 et l'IL-15) contribuant à un état inflammatoire qui pourrait être responsable DT1 (38).

4) Physiopathologie des infections à entérovirus

a) Entrée chez l'hôte

L'infection débute par l'attachement du virus à un récepteur cellulaire. Les entérovirus humains n'ont pas un récepteur commun, il en existe de nombreux. Pour les poliovirus, la fixation se fait sur le CD155 (anciennement PVR, *Poliovirus Receptor*) (39) qui est une glycoprotéine ancrée dans la membrane cellulaire alors que la protéine transmembranaire SCARB2 (*Scavenger Receptor Class B, member2*) permet la fixation de l'EV-71 et du CVA16 (40).

Les CVB, quant à eux, interagissent avec 2 récepteurs : la protéine CAR (*Coxsackievirus-Adenovirus Receptor*) et DAF (*Decay-Accelerating factor – CD55*) (41).

La présence de récepteurs cellulaires spécifiques est responsable du tropisme des différents virus pour les organes et des maladies causées par les entérovirus.

b) Réplication primaire, dissémination et tropisme tissulaire

Les entérovirus sont transmis par voie oro-fécale, ils entrent et se répliquent dans les cellules de l'oropharynx et de l'intestin (Figure 3). Certains entérovirus se transmettent *via* les aérosols pour infecter l'hôte par les voies respiratoires causant des infections respiratoires hautes mais également basses. L'EV-70, responsable de conjonctivites hémorragiques aiguës, se transmet par un contact main-œil avec des mains contaminées.

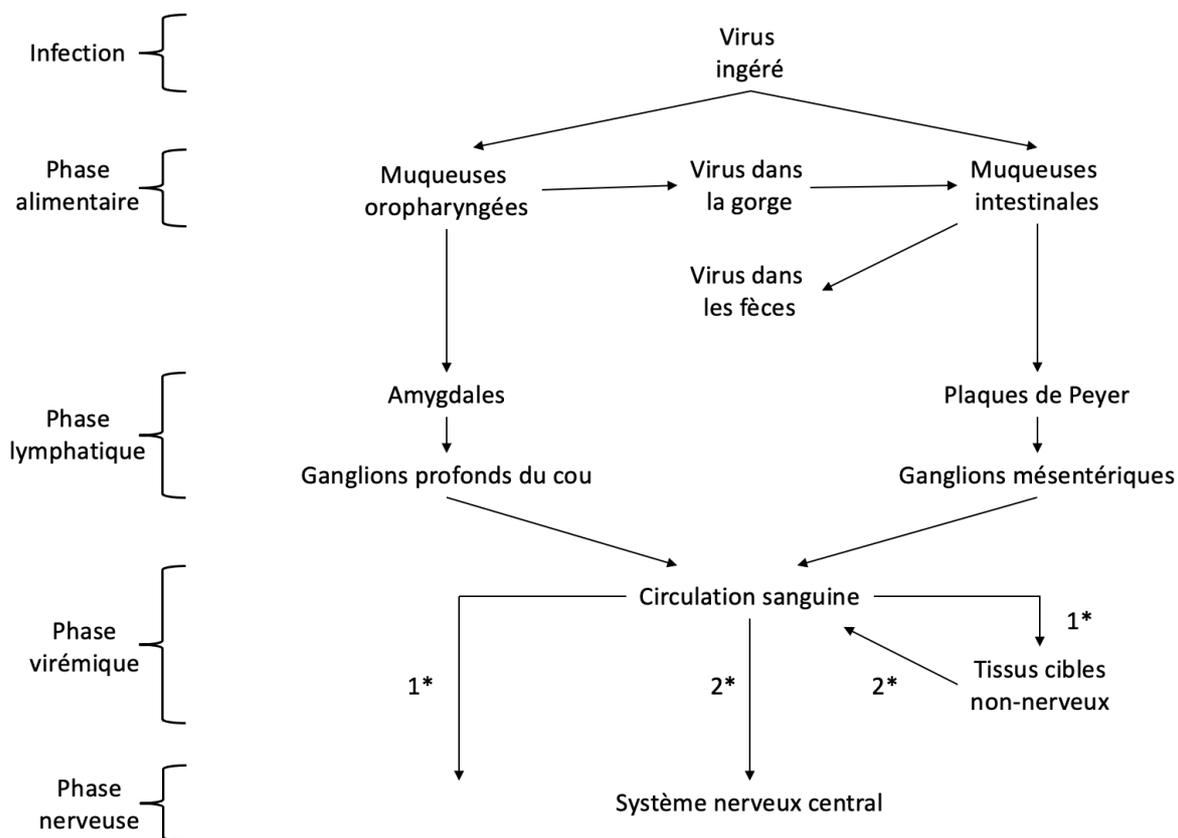


Figure 3 Schéma résumant la pathogenèse de la poliomyélite. 1* : virémie primaire – 2* virémie secondaire (adapté de Jubelt et Lipton, 2014)

Après réplication dans le tube digestif, les entérovirus passent par voie lymphatique jusqu'à la circulation sanguine pour atteindre ensuite leurs organes cibles. Les entérovirus peuvent infecter le système nerveux central de deux manières : par la

circulation sanguine, le virus pourrait traverser la barrière hémato-encéphalique d'une part (42,43) et par transport axonal rétrograde d'autre part (44,45).

Certains entérovirus ont un tropisme tissulaire particulier. C'est le cas des CVB qui sont considérés comme étant l'une des principales causes de myocardites virales (46). Les CVB sont également impliqués dans des pancréatites et méningoencéphalites alors que l'EV-70 (EV-D), responsable de conjonctivites hémorragiques aiguës, a un tropisme oculaire.

c) Persistance

Bien que les entérovirus soient cytolitiques dans de nombreux types cellulaires, ils peuvent infecter des cultures cellulaires de manière persistante.

Deux types majeurs de persistance virale ont été décrits *in vitro* : la persistance de type stable « *steadystate* » dans laquelle toutes les cellules sont infectées, sans réplication lytique, et la persistance de type porteur « *carrier-state* » caractérisée par l'infection d'une proportion limitée de cellules, avec une production importante de nouvelles particules virales. Des travaux suggèrent que les CVB sont capables d'établir une infection persistante selon le modèle « *carrier-state* » (47–49).

L'infection persistante à CVB4 a été étudiée, il a été démontré que des cellules β d'îlots pancréatiques humains infectés de manière persistante par CVB4 synthétisaient de l'IFN-alpha dont l'efficacité antivirale est connue (50,51). L'infection persistante à CVB4 des cellules 1.1B4 (fusion de cellules Panc-1 avec une cellule β humaine primaire) a été obtenue (52). D'autres travaux ont montré que la persistance observée dans des cellules β pancréatiques ainsi que dans des cellules canalaire pancréatiques s'accompagne de modifications cellulaires (diminution de l'expression membranaire du récepteur de ces virus, inhibition de l'expression du facteur de transcription Pdx1 qui est nécessaire à la formation de cellules pancréatiques endocrines ainsi qu'une modification de l'expression des miARN), mais également de modifications du génome viral (53–55) (Figure 4).

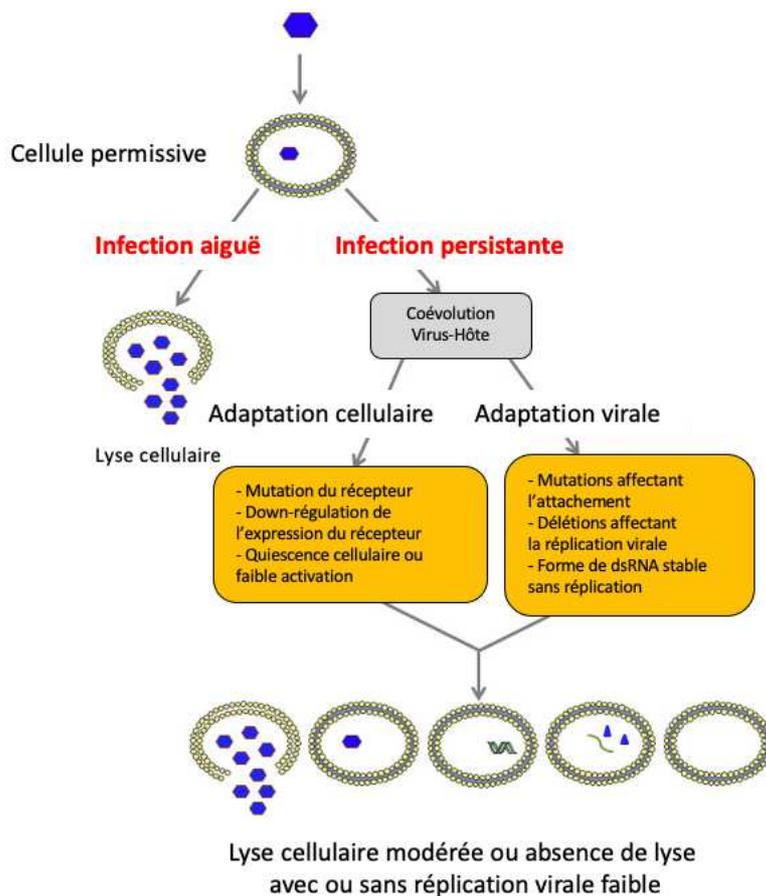


Figure 4 : Mécanismes présumés de la persistance de coxsackievirus B. L'infection de CVB pourtant lytique peut, sous certaines conditions, induire une infection persistante liée à des modifications cellulaires et virales aboutissant à une diminution ou suppression de la réplication virale (adapté d'Alidjinou *et al.*, 2014)

5) Diagnostic des infections entérovirales

La détection et le diagnostic précoce des infections entérovirales sont essentiels. En effet, le diagnostic d'infection à entérovirus permet de réduire la consommation d'antibiotiques, de limiter la réalisation d'examens coûteux, de diminuer les durées d'hospitalisation et ainsi de réduire le risque de complications (56,57).

Les prélèvements doivent être réalisés selon la manifestation clinique (Tableau 3) et aussi vite que possible dès l'apparition des symptômes. Les principales matrices prélevées sont les selles, le liquide cébrospinal (LCS), les aspirations et écouvillonnages nasopharyngés, lavages broncho-alvéolaires, écouvillonnages conjonctivaux, liquides vésiculaires, biopsies, ainsi que les urines et le sang (58).

Tableau 3 : Prélèvements recommandés pour le diagnostic d'infection entérovirale selon la manifestation clinique (d'après Harvala *et al.*, 2018)

Manifestation clinique	Prélèvements recommandés
Méningites/méningoencéphalites	LCS, selles et prélèvement respiratoire (sang possible)
Sepsis néonatal	LCS, selles, sang et prélèvement respiratoire
Paralyse/myélite flasque aiguë	Prélèvement respiratoire, selles, LCS et sang
Syndrome pieds-mains-bouche/ Autres rash	Liquide vésiculaire, prélèvement respiratoire et/ou selles
Infections respiratoires	Prélèvement respiratoire, selles possibles
Myocardites	Selles et prélèvement respiratoire, sang et/ou biopsie cardiaque
Conjonctivites	Écouvillonnage conjonctival

LCS : liquide cébrospinal

Les méthodes utilisées pour le diagnostic des infections entérovirales sont la biologie moléculaire, l'isolement viral ainsi que des tests sérologiques.

a) Diagnostic moléculaire

La RT-PCR est une technique plus sensible que la culture cellulaire pour la détection d'entérovirus dans les échantillons biologiques (59). Il existe de nombreux tests détectant le génome entéroviral mais un point commun est que les amorces ciblent et permettent l'amplification de régions conservées 5' UTR du génome. L'emploi d'amorces ciblant des régions conservées permet la détection de tous les entérovirus à l'aide d'une RT-PCR. En utilisant des amorces spécifiques de certains entérovirus, il est possible de les détecter spécifiquement. De plus, l'emploi d'amorces permet d'envisager des techniques d'hybridation *in situ* (60) voire de RT-PCR *in situ* (61) permettant d'étudier la localisation virale dans des cellules ou des tissus infectés.

L'identification des entérovirus peut se faire en séquençant le gène de la protéine de capsid virale VP1. Les entérovirus d'une même souche ont au moins 75% de similitudes dans leurs séquences nucléotidiques et au moins 88% d'acides aminés en commun (62).

b) Isolement viral

Bien que la culture cellulaire ne soit plus employée pour le diagnostic de routine, elle demeure utile. En effet, la culture cellulaire permet de confirmer des résultats de RT-PCR négatives (apparition de nouveaux variants non-détectés par la RT-PCR), pour typer les souches avec des techniques de neutralisation, mesurer la neutralisation par des anticorps sériques ou encore pour tester l'activité antivirale de certains composés (58).

L'isolement viral nécessite d'inoculer un prélèvement à des cellules permissives. Il n'existe pas de lignée cellulaire permettant la culture de tous les entérovirus. De nombreux entérovirus peuvent être isolés sur des lignées cellulaires de mammifères (63). En général, 3 lignées cellulaires sont utilisées incluant des cellules de reins de singe et de fibroblastes humains (64). Toutefois, malgré la variété de cellules disponibles, certains sérotypes ne se cultivent pas aisément. C'est le cas des Entérovirus A qui se développent peu en culture et l'EV-D68 qui nécessite des températures d'incubation plus basses que celles habituellement utilisées pour les autres entérovirus.

c) Diagnostic sérologique

Le diagnostic sérologique d'infections entérovirales est utilisé à des fins épidémiologiques plutôt que cliniques. En effet, bien que la production d'IgM et IgG soit décrite pour les infections entérovirales, leur utilité clinique est limitée du fait des réactions croisées entre les antigènes des différents sérotypes. De plus, la cinétique de la production des anticorps limite également l'utilité de la sérologie en pratique clinique. Cependant, lorsqu'un prélèvement est impossible pour des suspicions d'infections, la recherche d'anticorps présente un intérêt. C'est notamment le cas pour les infections cardiaques ainsi que pour les infections du SNC.

L'isolement du virus du patient permet le titrage des anticorps neutralisants (séroneutralisation) et les anticorps peuvent être recherchés par ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) (65,66). Les tests sérologiques s'effectuent en comparant les titres obtenus au cours de la phase aiguë et au moins 2 semaines après avec une confirmation diagnostique si le titre d'anticorps est multiplié par quatre ou plus.

6) Prévention et prise en charge

a) Traitement

Bien qu'il n'existe, actuellement, pas de traitements médicamenteux utilisés chez l'Homme dans les pays occidentaux. Certains composés montrent une activité *in vitro* ou dans des modèles animaux.

Parmi les molécules ayant des propriétés antivirales, les composés développés par Sterling-Winthrop (composés WIN) ont montré une efficacité initialement contre les Rhinovirus. Ces molécules se lient à un site hydrophobe à proximité de la surface du virion, ce qui interfère dans les étapes d'attachement et de décapsidation du virus. L'efficacité de ces molécules varie selon les différents picornavirus testés. Le WIN 54954 est capable de diminuer l'apoptose de cardiomyocytes, la nécrose et l'ARN viral chez des souris chez lesquelles une myocardite virale à CVB3 était induite (67). Hayden et collaborateurs (68) ont montré dans une étude clinique de phase III en double aveugle chez des patients infectés qu'un traitement précoce par le Pleconaril (WIN 63843) réduit la durée et la sévérité des infections aux rhinovirus et entérovirus chez l'adulte.

Une stratégie antivirale suggérée est l'utilisation de *small interfering RNA* (siRNA). Certaines études montrent une efficacité *in vitro* vis-à-vis de CVB3 (69), EV-71 (70) et poliovirus (71). De plus, l'utilisation de plusieurs siRNA ciblant de nombreuses régions du génome viral limite l'apparition de variants résistants (71). Un intérêt de cette stratégie est qu'il serait possible de concevoir des siRNA qui pourraient être efficaces contre plusieurs entérovirus différents.

b) Vaccins

La vaccination est une stratégie efficace dans la lutte contre les entérovirus. En effet, la vaccination a été développée contre les infections à poliovirus chez l'Homme. La transmission de poliovirus a diminué de plus de 99% dans le monde à l'aide des vaccins oraux vivants atténués et des vaccins inactivés. L'emploi de ces vaccins permet d'envisager l'éradication de la poliomyélite dans un futur proche (72).

Cependant, il n'existe pas d'autres vaccins contre des entérovirus commercialisés en occident chez l'Homme. Un vaccin a été développé en Chine pour lutter contre EV-71 (73,74) et des recherches sont en cours pour lutter contre les CVB (75,76).

II) Pathologies

La plupart des infections à entérovirus sont asymptomatiques. Néanmoins, la grande variété d'entérovirus peut être responsable de pathologies variées aiguës et chroniques. Un sérotype particulier peut induire différentes symptomatologies et chaque symptomatologie peut être induite par différents sérotypes. Cependant, des atteintes sont spécifiques de certains entérovirus comme pour les conjonctivites hémorragiques causées par l'EV-70 ou le CVA-24 variant et les paralysies flasques aiguës causées par les poliovirus ou l'EV-71. Les souches d'entérovirus retrouvées chez des patients diabétiques de type 1 sont généralement des CVB.

1) Poliomyélite

La poliomyélite est une infection aiguë causée par les poliovirus. Comme pour les entérovirus non-poliomyélitiques, toutes les infections à poliovirus n'induisent pas de maladie. La forme symptomatique principalement retrouvée est la poliomyélite abortive qui survient principalement chez le jeune enfant et qui se manifeste par une fièvre modérée avec ou sans signes digestifs. La période d'incubation est de 1 à 3 jours. Plus rarement, peuvent survenir des méningites aseptiques à poliovirus qui est non-paralytique et associe les signes cliniques de méningites virales avec fièvre, céphalées, signes méningés sans augmentation de leucocytes dans le LCS. Environ 1 infection sur 200 est capable d'induire une pathologie paralytique appelée poliomyélite. La période d'incubation est en général de 4 à 10 jours. La paralysie survient 2 à 5 jours après l'apparition de céphalées. Une phase prodromale survient avec des hyperesthésies, paresthésies et des douleurs musculaires.

La poliomyélite ou la paralysie flasque aiguë peut survenir avec d'autres virus que les PV tels que l'EV71, (77,78), ou l'EV70 responsable d'épidémies de conjonctivites hémorragiques (79). De plus, certains echovirus et coxsackievirus sont capables d'induire une paralysie flasque aiguë (80,81).

2) Syndrome post-poliomyélite et sclérose latérale amyotrophique

Les patients atteints de poliomyélite paralytique peuvent être atteints, des années après l'infection, de syndrome post-poliomyélite. Ce syndrome associe des symptômes systémiques, des douleurs musculaires et des atteintes neurologiques. La physiopathologie de ce syndrome n'est pas certaine mais il semblerait qu'elle soit liée à la diminution du nombre de motoneurons de la corne antérieure de la moelle ou du tronc cérébral lors de la phase aiguë de la poliomyélite. Après la phase aiguë, une phase de « récupération » s'installe avec un bourgeonnement des axones épargnés lors de la phase aiguë permettant l'innervation des muscles atteints (82,83) mais les unités motrices produites sont métaboliquement instables (84). Une autre hypothèse a été suggérée et repose sur des mécanismes inflammatoires ou auto-immuns. En effet, des observations *post-mortem* chez des patients ayant survécu à la poliomyélite ont mis en évidence des réactions inflammatoires sur des prélèvements de moelle (85) ainsi que par la réponse immune intrathécale contre les poliovirus chez des patients atteints de syndrome post-poliomyélite (86,87).

La sclérose latérale amyotrophique est une maladie neurodégénérative attaquant les motoneurons provoquant la paralysie des patients et *in fine* la mort. L'étiologie de cette maladie est inconnue. Cependant, certains entérovirus (poliovirus, coxsackievirus, EV-A71, EV-D68) sont suspectés de contribuer au développement de la pathologie. Des études ont montré la présence de génomes entéroviraux dans des tissus de malades. Cependant les données cliniques sont sujets à controverses et aucun lien de causalité n'a été établi (88).

3) Méningites et encéphalites

Les atteintes du système nerveux central sont les complications les plus fréquentes des infections à entérovirus (27).

Les méningites aseptiques sont les affections neurologiques les plus communes causées par les entérovirus (27). De plus, les entérovirus sont les virus les plus fréquemment retrouvés dans les méningites virales (89). Ces pathologies sont principalement causées par les coxsackievirus, les échovirus (90,91) et l'EV-71

(77,78,92). Les méningites aseptiques sont caractérisées par la survenue aiguë de fièvre, de signes méningés, d'une pléïocytose du LCS, de cultures bactériologiques stériles et d'un bon pronostic. Elles peuvent être précédées d'un syndrome pseudo-grippal pouvant survenir quelques jours avant l'apparition des symptômes neurologiques. Des signes non-neurologiques peuvent survenir tels que des éruptions cutanées, pleurodynies voire des péricardites. Ces méningites sont souvent résolutive en une semaine mais la sensation de malaise et la fatigue peuvent persister plusieurs semaines.

Les encéphalites sont les 2^e affections du SNC les plus courantes causées par les entérovirus (93) et ce sont les principaux virus, avec l'Herpes simplex virus-1, retrouvés lors d'encéphalites virales (94). Les entérovirus retrouvés sont les coxsackievirus, les échovirus et l'EV-71 (95,96). Les encéphalites entérovirales sont causées par des atteintes du parenchyme cérébral, dues à un envahissement viral, avec une infection cytolitique des neurones (encéphalites primaires) contrairement aux encéphalites post-infectieuses qui reposeraient plutôt sur des mécanismes immuns (encéphalites secondaires). Cliniquement, au cours des encéphalites, des signes méningés sont également observés, on parle donc de méningo-encéphalites. Les patients ont des symptômes de méningites aseptiques en plus d'une atteinte du parenchyme cérébral qui se caractérise par une confusion mentale, de convulsions et de signes neurologiques focaux. Habituellement, ce sont des encéphalites de bon pronostic, à l'exception des encéphalites fulminantes chez des nouveau-nés avec des coxsackievirus B et des encéphalites chroniques chez les patients agammaglobulinémiques. De plus, lorsque les encéphalites entérovirales surviennent chez des enfants, des déficits intellectuels peuvent subsister (97).

4) Cardiopathies

Les myocardites sont des inflammations du myocarde associées à de la nécrose sans ischémie (98). Les CVB sont la principale cause de myocardites virales (46). Les myocardites aiguës passent souvent inaperçues mais sont retrouvées dans environ 1% des autopsies (99). Les premiers symptômes retrouvés sont souvent un syndrome pseudo-grippal avant que les premiers symptômes cardiaques n'apparaissent. Ces symptômes peuvent survenir des jours à des semaines après et incluent fatigue, dyspnée, palpitations, malaise. D'autres signes peuvent être retrouvés tels qu'une tachycardie sinusale, une insuffisance mitrale ou tricuspide, ou

plus rarement un frottement péricardique. La physiopathologie peut être décomposée en 3 étapes. Premièrement, l'infection virale induit la lyse des cardiomyocytes. Deuxièmement, la libération d'antigènes causés par la lyse cellulaire est responsable d'une réponse auto-immune ciblant le cœur responsable de lésions. Troisièmement, le remodelage de ces lésions induit une cardiomyopathie dilatée (100). Les virus responsables de cardiopathies sont des pathogènes fréquents, 90% de la population a été infecté par un ou plusieurs de ces virus (46). Cependant, moins de 10% des sujets infectés développent une myocardite virale prouvée histologiquement. L'hypothèse de la susceptibilité génétique est évoquée et expliquerait que certains patients développent une myocardite virale ou chronique et/ou la progression en cardiomyopathie dilatée après une infection virale active (99,101,102).

5) Pathologies musculaires

Les myopathies aiguës et chroniques sont parfois associées aux infections à coxsackievirus et à échovirus (80). Les pathologies aiguës sont caractérisées par des myalgies, des enzymes musculaires élevées, et parfois des myoglobinuries. Les pathologies chroniques sont des polymyosites, des dermatomyosites ou des myosites à inclusions. Les dermatomyosites sont associées à des éruptions cutanées. Ces pathologies sont en général de bon pronostic. Le coxsackievirus A9 a été retrouvé chez un enfant présentant une myopathie chronique (103) et des sérologies positives à coxsackievirus B3 et B4 ont été retrouvés chez des patients atteints de polymyosites ou de dermatomyosites chez des immunocompétents (104). De plus, de l'ARN de CVB a été retrouvé dans des biopsies de muscles squelettiques de patients atteints de polymyosites et de dermatomyosites (105).

6) Atteintes oculaires

Les conjonctivites aiguës hémorragiques sont caractérisées par une période d'incubation courte (inférieure à 24 heures) précédant la conjonctivite d'apparition brutale avec un épanchement sanguin au niveau des conjonctives. Parfois, elles s'accompagnent d'une fébricule n'excédant pas 38°C. Ces conjonctivites sont d'évolution favorable et spontanément résolutives en 3 à 5 jours. Elles sont extrêmement contagieuses. La première épidémie fut décrite en 1969 au Ghana et fut surnommée *Maladie Apollo 11*, contemporaine de la mission spatiale du même nom. Les populations touchées pensaient que cette maladie était une malédiction

suite à la profanation de la Lune (106). Cette épidémie était causée par deux entérovirus : l'EV-70 et un variant du CVA-24 (CVA-24 v) (107). Les principaux entérovirus retrouvés dans ces conjonctivites sont l'EV-70 et le CVA-24 v mais d'autres coxsackievirus et echovirus ont été isolés chez des patients présentant des conjonctivites non-hémorragiques (80,108,109).

7) Infections respiratoires, Herpangines et syndrome Pied-Main-Bouche

Les entérovirus sont une cause fréquente d'infections respiratoires. Celles-ci touchent plutôt les voies aériennes supérieures causant des rhumes, croupes, épiglottites que les voies aériennes inférieures (pneumonies). Ces infections sont en général peu sévères avec une période d'incubation d'1 à 3 jours. Les principaux entérovirus retrouvés dans les infections respiratoires sont les CVA, les CVB et les échovirus (80,110).

L'herpangine est une affection fébrile de survenue brutale avec angine, céphalées, anorexie et douleurs du cou. Cette infection est responsable de lésions oropharyngées, touche préférentiellement les nourrissons et les enfants et les symptômes disparaissent en quelques jours. Les complications de l'herpangine sont rares mais des méningites peuvent survenir. Le syndrome Pied-Main-Bouche est une pathologie associant des lésions vésiculeuses des pieds, des mains, de la bouche et parfois des fesses. Ces syndromes sont causés par les CVA (80,110). Plus rarement, ces affections peuvent être causées par des CVB ainsi que des échovirus. De plus, l'EV-71 peut être responsable également de syndrome Pied-Main-Bouche (27,80,111). En Asie du Sud-Est, le syndrome Pied-Main-Bouche peut évoluer en forme sévère et même mortelle, provoqué par des virus de génogroupes d'EV-71 différents de ceux qui circulent dans les pays occidentaux (112,113).

8) Pathologies du nouveau-né et de l'enfant

Les nouveau-nés sont à risques de faire des infections entérovirales. Le plus souvent, elles sont asymptomatiques (32) mais une fièvre et des signes cliniques non spécifiques peuvent survenir avec des éruptions cutanées pouvant survenir dans 30% des cas (114). La susceptibilité des infections du SNC par les CVB pourrait

s'expliquer par le tropisme qu'ont ces virus pour les cellules souches des nouveau-nés (115).

Un syndrome semblable à un sepsis peut être causé par une infection à entérovirus chez les enfants (116). Les entérovirus sont retrouvés chez 65% des enfants de moins de 3 ans pour lesquels un diagnostic de sepsis est suspecté (117). Cette affection se caractérise par une atteinte multiviscérale (foie, poumons, cœur, pancréas, cerveau), des troubles de l'hémostase et pouvant provoquer le décès de l'enfant.

Les infections sévères à entérovirus chez le nouveau-né et l'enfant sont associées à un jeune âge, la prématurité, une infection sévère de la mère, une atteinte multiviscérale, un faible statut socio-économique, l'allaitement au biberon et l'absence d'anticorps neutralisants (114).

Les entérovirus peuvent causer des infections néonatales par différentes voies. Des études ont mis en évidence des placentites et l'infection de tissus fœtaux (114). Le virus peut infecter le placenta ou le fœtus à partir du sang de la mère, fèces, sécrétions vaginales au cours de la grossesse ou de la délivrance. Les infections néonatales peuvent également être nosocomiales : des épidémies surviennent dans des services de néonatalogie ou dans les nurseries (23).

9) CVB4 et DT1

Des études épidémiologiques montrent que les infections à entérovirus, notamment à CVB, peuvent contribuer à l'initiation et/ou à la progression de l'autoimmunité vers le diabète de type 1 (118). Le DT1 est une maladie auto-immune chronique caractérisée par l'altération de fonction des cellules β (bêta) des îlots pancréatiques aboutissant à une diminution de la production d'insuline par ces dernières (119). Des études expérimentales ont mis en évidence différents mécanismes qui peuvent être impliqués dans la pathogenèse entérovirale du DT1 : l'activation de lymphocytes T auto-réactifs (120), le mimétisme moléculaire (121), la facilitation de l'infection par des anticorps ou la persistance virale (38,122).

In vitro des entérovirus peuvent persister dans des lignées cellulaires et *in vivo*, chez des souris, l'ARN peut être retrouvé dans les organes par RT-PCR des semaines et

des mois après l'infection. De plus, la présence d'ARN entéroviral dans les cellules du sang périphérique et la muqueuse intestinale des patients qui a été détectée par RT-PCR est en faveur d'une infection persistante. La présence de protéines et d'ARN entéroviral et de particules entérovirales dans les cellules bêta de patients diabétiques a été détectée (123). Cependant la proportion de cellules dans lesquelles la protéine virale VP1 est mise en évidence par immunohistochimie est très faible dans de rares îlots de pancréas chez les patients (124).

Actuellement, la recherche de cellules infectées par des entérovirus chez des patients avec un diabète de type 1 repose sur la détection d'antigène de capsid VP1 par immunohistochimie (124) ou d'ARN entéroviral par RT-PCR (123) ou par hybridation *in situ* (125). La proportion de cellules infectées au cours d'infection aiguë et persistante reste mal connue.

Objectifs

L'objectif de nos travaux est d'étudier les marqueurs virologiques de l'infection à entérovirus. Les virus du genre *Entérovirus* sont très nombreux et répartis en plusieurs espèces dont l'espèce B qui comprend les CVB. Nous avons concentré notre attention sur CVB4. Nous avons ainsi recherché des marqueurs virologiques de l'infection à CVB4 *in vitro* dans des modèles d'infection aiguë et persistante. Dans ces modèles, il s'agit de déterminer la quantité de particules infectieuses dans les surnageants de culture, la présence d'ARN viral dans les cellules et d'évaluer la proportion de cellules infectées grâce à la détection de protéines de capsidie dans les cellules par immunofluorescence indirecte et d'ARN viral intracellulaire par RT-PCR sans extraction. De plus, dans les modèles d'infection aiguë et d'infection persistante la proportion de cellules capables de transmettre le virus à des cellules permissives a été évaluée.

Matériel et Méthodes

I) Matériel

1) Lignées cellulaires

Les cellules HEp-2 (Human Epithelial cell line type 2 – BioWhittaker), 1.1B4 (lignée de cellules pancréatiques bêta humaines – ECACC 10012801) et Panc-1 (lignée de cellules ductales humaines - ATCC® CRL-1469™) ont été cultivées dans une étuve à 37°C sous atmosphère humide à 5% de CO₂, respectivement dans du Eagle's minimum essential medium (MEM) (Gibco), du Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI)-1640 (Eurobio Scientific). Ces milieux ont été supplémentés avec 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (SVF HI, Sigma), 1% de L-glutamine (Gibco BRL), 1% d'antibiotiques (pénicilline 100 U/mL et streptomycine 100 µg/mL – Invitrogen). Le MEM a également été complémenté avec 1% d'acides aminés non essentiels (AANE) (Gibco BRL).

Les cellules Panc-1 ont été cultivées dans du Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 4.5 g/L glucose (Invitrogen, France) et supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal et 100U de pénicilline et 100 µg de streptomycine par mL (Invitrogen).

La viabilité des cellules a été évaluée au microscope grâce au test d'exclusion au bleu Trypan (Eurobio Scientific).

2) Virus

La souche diabétogène CVB4 E2 utilisée dans toutes nos expériences a été fournie par Ji-Won Yoon (126), du Centre de recherche sur le diabète Julia McFarlane, Calgary, Alberta, Canada. Le virus a été produit sur des cellules HEp-2 cultivées dans du MEM à 37°C dans une atmosphère humide à 5% de CO₂. Brièvement, 50µL de la suspension virale ont été inoculés aux cellules HEp-2 confluentes à 80% dans un flacon de culture de 25 cm² (ThermoFisher Scientific), puis les cellules ont été incubées 48 à 72 heures à 37°C et 5% de CO₂. Dès l'apparition de 100% d'effet cytopathique (ECP), les particules virales ont été libérées des cellules grâce à 3 cycles de congélation/décongélation (-80°C/+37°C), puis après une centrifugation à 3500 rpm à 4°C pendant 10 minutes, le surnageant de culture a été récupéré, aliquoté et stocké à -80°C jusqu'à la détermination du titre viral. Le surnageant de

culture des cellules HEp-2 non infectées soumis au même protocole a été aussi récupéré pour servir de contrôle négatif.

Détermination du titre :

Le titre viral a été déterminé selon la méthode de dilution en point final sur les cellules HEp-2. Des cellules HEp-2 ont été trypsinées (PAN-Biotech) et réparties dans des plaques de 96 puits à raison de 1.25×10^4 cellules par puits dans 50 μL de milieu MEM supplémenté, puis incubées pendant 18 heures à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO_2 . Cent microlitres (100 μL) des surnageants à titrer ont été ensuite dilués en cascade au 1/10^{ème} (dilutions de 10^{-1} à 10^{-8} dans du MEM complet), puis 100 μL de chaque dilution ont été déposés sur les cellules HEp-2 à raison de 6 puits par dilution. Les plaques ont été incubées 72 heures à 37°C et 5% de CO_2 . L'ECP à 100% a ensuite été observé à l'aide d'un microscope inversé Primovert (Zeiss). Le titre viral exprimé en TCID₅₀/mL (Tissue Culture 50% Infectious Dose) a été calculé selon la méthode de Spearman-Kärber grâce aux ECP observés sur les cellules HEp-2.

3) Infection chronique, production virale

Un modèle de cellules pancréatiques humaines 1.1B4 chroniquement infectées par CVB4 a été obtenu par notre équipe (52). Brièvement, les cellules 1.1B4 ont été mises en culture à $1,25 \times 10^5$ cellules par puits dans des plaques de 24 puits et infectées par CVB4 avec une MOI de 0,01. 24 heures après l'infection, les tapis de cellules ont été lavés chaque jour lors de la crise aiguë puis tous les 2 à 3 jours tout au long du suivi. Des cellules infectées et témoins ont été récupérées et mises en culture dans des flacons de culture ventilés (Becton-Dickinson). Les cellules ont été ensuite grattées et remises en culture une fois par semaine durant plus de 180 jours. Les surnageants de culture ont été récupérés tout au long du suivi et conservés dans un congélateur à -80°C.

Les cellules Panc-1 ont également été infectées de manière persistante par CVB4 par notre équipe comme décrit antérieurement (53). Brièvement, les cellules Panc-1 ont été mises en culture à $1,25 \times 10^5$ cellules par puits dans des plaques de 24 puits et infectées par CVB4 (MOI= 0,01). Au bout de 24h d'incubation, les cellules ont été lavées avec du PBS avant d'être remises en culture. Les cellules ont ensuite été

suivies 37 semaines avec un changement de milieu tous les 3 jours. Les surnageants de culture ont été récupérés tout au long du suivi et conservés à -80°C.

II) Méthodes

1) Détection de protéines virales par immunofluorescence indirecte

2.10⁴ cellules HEp-2 infectées par CVB4 en ajoutant ce virus à MOI = 1 puis en incubant ces cellules 18 heures à 37°C et 2. 10⁴ cellules 1.1B4 chroniquement infectées par le CVB4 à partir de 180 jours post-infection ont été déposées sur des lames d'immunofluorescence (ThermoScientific) ou des lames en verre stériles (ThermoScientific). Suite, à un séchage de 5 minutes à température ambiante, les cellules ont été fixées 30 minutes à température ambiante avec du paraformaldéhyde à 4% (PFA 4%) (Alfa Aesar).

Après deux lavages avec du PBS 1X, les cellules ont été perméabilisées avec un mélange méthanol/acétone (2V/1V) à -20°C pendant 10 minutes. Les sites aldéhydes libres ont été bloqués avec une solution de PBS 1X contenant 50 mM de NH₄Cl (Merck) et 10 mM de glycine (Sigma) pendant 30 minutes à 25°C. Le blocage des sites de fixation non spécifiques a été réalisé en incubant les lames pendant 30 minutes à 25°C avec une solution de PBS 1X contenant 5% de sérum de chèvre et 5% d'albumine de sérum bovin (Sigma). Les cellules ont été ensuite incubées 16 heures à 4°C avec un anticorps primaire murin anti-enterovirus VP1 clone VP1 5D8/1 (Dako) dilué au 1/20^e ou un anticorps primaire murin anti-enterovirus VP3 clone L66J (Invitrogen) dilué au 1/40^e ou une immunoglobuline IgG2a murine (Agilent) diluée au 1/20^e ou 1/40^e (contrôle négatif). Après deux lavages avec du PBS 1X, les cellules sont incubées 2 heures à 25°C avec un anticorps secondaire (immunoglobuline de chèvre anti-souris conjuguée à Alexa Fluor® 488 (Invitrogen, France) dilué au 1/400^e dans une solution de Bleu Evans (BioMérieux) selon les recommandations du fabricant. Du liquide de montage contenant du DAPI (Vector Laboratories) est déposé sur les lames ainsi qu'une lamelle.

La lecture des lames d'immunofluorescence s'effectue à l'aide d'un microscope à fluorescence Leica Wild MPS52 au grossissement X200, X400 et X1000 à immersion.

2) Extraction d'ARN

L'ARN total a été extrait des cellules infectées avec du TriReagent® (Sigma). 100 µL de cellules ont été lysés dans 900 µL de TriReagent pendant 5 minutes à température ambiante. 200 µL de chloroforme (Sigma) ont été ajoutés puis les tubes sont vortexés et laissés 15 minutes à température ambiante. Après une centrifugation de 15 minutes à 12000 g à 4°C, l'ARN présent dans la phase aqueuse est récupéré dans un nouveau tube et 500 µL d'isopropanol (Sigma) sont ajoutés. Après 10 minutes à température ambiante, l'ARN est précipité par centrifugation à 12000 g pendant 10 minutes à 4°C. Le culot est lavé 2 fois par centrifugation à 12000 g pendant 5 minutes à 4°C dans 1 mL d'éthanol à 75% (Sigma) puis séché 5 minutes sous la hotte. L'ARN extrait est dissout dans 50 µL d'eau Nuclease free et quantifié à 260 et 280 nm à l'aide d'un Nanodrop® et d'un spectrophotomètre (Thermofisher Scientific).

3) RT-q-PCR

La RT-q-PCR pour rechercher l'ARN entéroviral a été faite en une étape à l'aide du kit Taq Man Fast virus – 1 Step Master Mix (Applied Biosystems) dans un thermocycleur Mx3000p® (Stratagene).

La réaction a été réalisée avec 100 ng d'ARN total extrait dans un volume final de 25µL contenant 6,25 µL de Mix 4X, 10 µM d'amorce Ent-F (Eurofins Genomics) et EV2 (Eurofins Genomics) et 1 µM d'une sonde fluorescente FAM/TAMRA spécifique (Eurofins Genomics) (décrites dans le Tableau 4). Les étapes de reverse transcription et d'amplification se déroulent au cours de la même réaction. L'ARN cellulaire a été rétro-transcrit durant 5 minutes à 50°C. L'ADNc a été soumis à un cycle de dénaturation de 95°C pendant 20 secondes (permettant aussi l'inactivation de la reverse transcriptase) puis à 40 cycles de dénaturation à 95°C pendant 15 secondes et d'hybridation/élongation à 60°C durant 60 secondes. Une condition contrôle sans ARN a été incluse pour chaque réaction.

4) RT-PCR sans extraction appliquée à une ou quelques cellules

Des cellules HEP-2 contrôles et infectées par CVB4 de manière aiguë ou des cellules 1.1B4 infectées par ce même virus de manière persistante ont été mises en culture

dans des plaques 6-puits ou dans des flacons de 25 cm², respectivement (Thermofisher Scientific). Les tapis de cellules dans ces plaques et flacons ont été lavés 8 fois avec du PBS sur glace. Le PBS du dernier lavage a été récupéré afin d'être testé pour la détection d'ARN viral par RT-PCR suivie d'une PCR semi-nichée. Les cellules ont été détachées avec de la Versène trypsine (Pan-Biotech) 5 minutes à 37°C puis reprises dans du milieu de culture, MEM pour les cellules HEP-2, dans des tubes de centrifugation de 25 mL. Après centrifugation à 2500 rpm pendant 5 minutes à 4°C, le surnageant a été rejeté et les culots repris dans 1 mL de PBS sur glace. Cette opération est répétée 2 fois. Le comptage des cellules vivantes est effectué à l'aide du test d'exclusion du bleu trypan (Eurobio Scientific) ensuite la suspension cellulaire est diluée de manière à obtenir 10⁵ cellules/mL.

Une dilution au 1/50^e suivie d'une dilution au 1/10^e dans du PBS sur glace sont faites pour avoir une suspension cellulaire de 200 cellules/mL. 5 µL de cette suspension, contenant 1 cellule, sont distribués dans des puits de plaques 96-puits à fond rond. Les plaques sont centrifugées à 3500 rpm pendant 10 min à 4°C. Ces plaques sont observées au microscope inversé Primovert (Zeiss) et les puits contenant 1 cellule sont sélectionnés. L'ARN a été libéré en incubant les plaques à 65°C pendant 20 minutes, placées dans de la glace durant 5 minutes et congelées à -80°C.

Afin d'éviter la dégradation de l'ARN, un inhibiteur de RNase (Roche) a été ajouté avant l'étape de RT-PCR sans extraction d'ARN préalable. Elle est effectuée en tube avec le kit Superscript™ One-Step RT-PCR with Platinum® Taq (Invitrogen). Le mix réactionnel de 50 µL contient 25 µL de tampon 2X *Reaction Mix*, 1 µL de chaque amorce (EV1 et EV2), 2,5 U de mix enzyme RT/Platinum Taq. Des amorces β-actine sens et anti-sens (décrites dans le Tableau 4) ont également été utilisées pour s'assurer de la présence de cellule(s) dans chacun des échantillons.

L'étape de transcription inverse se fait à 50°C pendant 30 minutes, suivie par 2 minutes de dénaturation à 94°C et par 35 cycles de 30 secondes de dénaturation à 94°C, 45 secondes d'hybridation à 55°C et 45 secondes d'élongation à 72°C. La réaction se termine par une étape d'élongation finale à 72°C pendant 10 minutes.

Les ADNc obtenus ont été amplifiés à nouveau par une réaction de PCR semi-nichée avec le kit JumpStart AccuTaq LA DNA Polymerase Mix (Sigma). La réaction se fait avec 1 µL d'ADNC et 0,4 µM de chaque amorce (EV1 et EV3) (décrites dans le Tableau 4) dans un volume total de 50µL contenant 1 U d'Accu Taq LA DNA polymerase, 10 mM de dNTP et 5 µL de tampon Accu Taq 10X. Les mix ont subi une étape de dénaturation à 94°C suivie de 30 cycles de PCR constitués d'une étape de dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, d'une étape d'hybridation à 52°C pendant

30 secondes et d'une étape d'élongation à 72°C pendant 30 secondes, suivie d'une étape d'élongation finale à 72°C pendant 7 minutes. Toutes les réactions ont été réalisées dans un thermocycleur Mastercycler gradient (Eppendorf).

Tableau 4 : Séquences des amorces et sondes utilisées pour la détection d'ARN entéroviral en RT-q-PCR et RT-PCR sans extraction

Séquences	
Amorce sens EV1	5'-CAAGCACTTCTGTTTCCCCGG-3'
Amorce anti-sens EV2	5'-ATTGTCACCATAAGCAGCCA-3'
Amorce anti-sens EV3	5'-CTTGCGCGTTACGAC-3'
Amorce sens Ent-F	5'-CCCTGAATGCGGCTAATC-3'
Amorce β-actine sens	5'-TTGCCGACAGGATGCAGAA-3'
Amorce β-actine anti-sens	5'-GCCGATCCACACGGAGTACT-3'
Sonde	5'-AACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTT-3'

5) Analyses statistiques

Les analyses de données ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad QuickCalcs (GraphPad Software). Les valeurs présentées sont des moyennes \pm déviation standard (SD).

Lorsque des images sont présentées, le nombre de répétitions indépendantes des expériences est indiqué.

Résultats

I) Marqueurs de l'infection aiguë à CVB4 *in vitro*

1) Titre viral dans le surnageant de culture

Des cultures de cellules HEp-2 ont été inoculées avec CVB4 à différentes MOI. Les tapis de cellules ont été régulièrement observés afin de suivre l'apparition d'un ECP partiel ou total (Figure 5a). Aucune apparition d'ECP n'est survenue avant 12 heures post-infection. À 18 heures post-infection des ECP partiels (10 à 90% du tapis cellulaire est altéré) sont observés, d'autant plus étendu que la MOI est importante (figure 5b). De plus, le titre viral du surnageant de culture de ces cellules infectées à différentes MOI prélevé après 6, 12 et 18h d'incubation a été déterminé (Figure 5c). La différence de titre viral entre l'infection à MOI = 1 et à MOI = 50 est relativement faible (environ 1 log) alors que la différence de dégradation du tapis cellulaire est plus marquée (environ 10% d'ECP pour MOI = 1 et environ 90% pour MOI = 50). La suite de nos travaux a été réalisée avec des cellules infectées avec une MOI = 1. Dans ces conditions l'infection est efficace, comme l'indique le titre viral du surnageant avec une majorité de cellules non-altérées dans les puits.

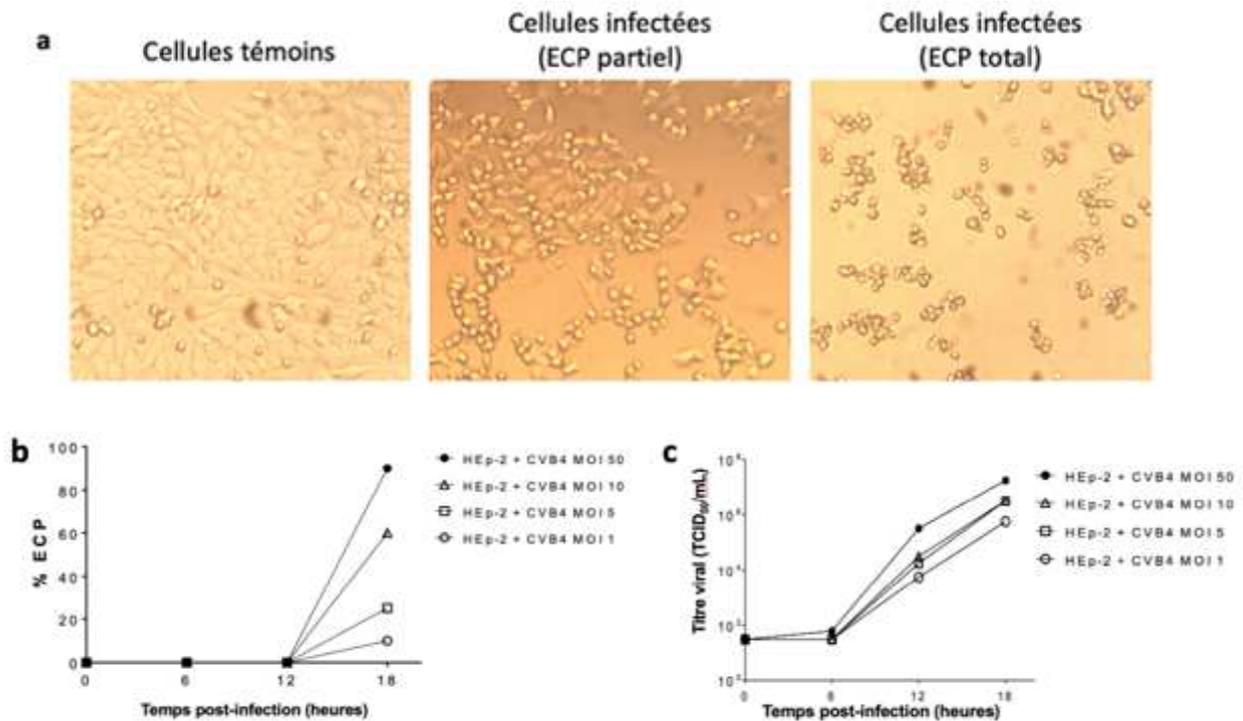


Figure 5 : Infection aiguë de cellules HEp-2 par CVB4. Des cellules HEp-2 ont été infectées par CVB4 à différentes MOI (MOI = 1 – 5 – 10 – 50), le surnageant de culture a été prélevé après 6h, 12h et 18h d'incubation. (a) Les tapis de cellules ont été observés à l'aide d'un microscope inversé Primovert (Zeiss). L'aspect de tapis de cellules non-infectés et de tapis de cellules infectées avec ECP partiel et ECP total (100%) est montré. (Grossissement X100). (b) ECP observé après 18h d'incubation. Le pourcentage d'ECP observé dans les cultures infectées à MOI 1 à 50 est représenté (c) Titres infectieux des surnageants. Résultats représentatifs de deux expériences indépendantes.

2) Détection de protéines virales intracellulaires

Pour documenter davantage l'infection de cellules HEp-2 par CVB4, la présence de protéines entérovirales VP1 et VP3 a été recherchée. Ces protéines ont été détectées par immunofluorescence indirecte dans des cellules infectées, récupérées à l'aide d'un grattoir et déposées sur des lames d'immunofluorescence (Figure 6). Les cellules obtenues par grattage présentent une proportion de cellules positives pour le marquage VP1 et VP3 d'environ 5% (Figure 6a).

La récupération des cellules par grattage pouvant altérer les cellules, nous avons décidé de cultiver des cellules HEp-2 sur lame. Ces cellules ont été infectées par CVB4 et au bout de 18 heures d'incubation, la recherche de la protéine VP1 par immunofluorescence indirecte a été effectuée (Figure 6b). La proportion de cellules positives était d'environ 15%.

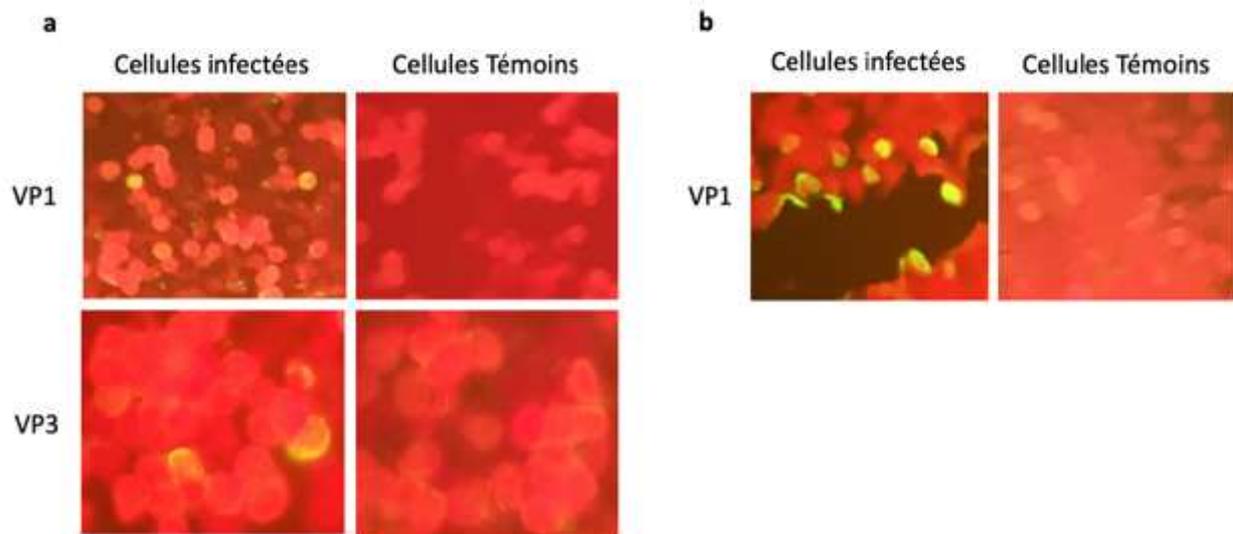


Figure 6 : Détection de protéines virales par immunofluorescence indirecte dans des cellules HEp-2 infectées par CVB4 de manière aiguë. Des cellules HEp-2 ont été infectées (MOI = 1). (a) Après 18h d'incubation les cellules ont été récupérées à l'aide d'un grattoir pour rechercher la protéine VP1 d'une part et la protéine VP3 d'autre part par immunofluorescence indirecte. Les cellules ont été observées à l'aide d'un microscope à fluorescence Leica Wild MPS52. Les images sont représentatives de 3 expériences indépendantes (Grossissement X200 pour la détection de VP1, Grossissement X 1000 à immersion pour la détection de VP3). (b) Les cellules ont été cultivées sur lame pendant 18h, ensuite la protéine VP1 a été recherchée par immunofluorescence indirecte. Les résultats sont représentatifs de 2 expériences indépendantes (Grossissement X200).

3) Détection d'ARN viral intracellulaire

L'ARN viral intracellulaire a été recherché par RT-q-PCR. L'ARN de cellules infectées (MOI = 1) et incubées pendant 18h heures a été extrait. La RT-q-PCR a été appliquée à l'ARN extrait de cellules infectées, et à l'ARN extrait de cellules témoins. (Figure 7). Le Ct (cycle seuil) obtenu dans nos cellules HEp-2 infectées est de 19,73 indiquant la présence d'ARN viral dans nos cellules alors qu'aucune amplification n'a été détectée à partir d'ARN extrait des cellules témoins.

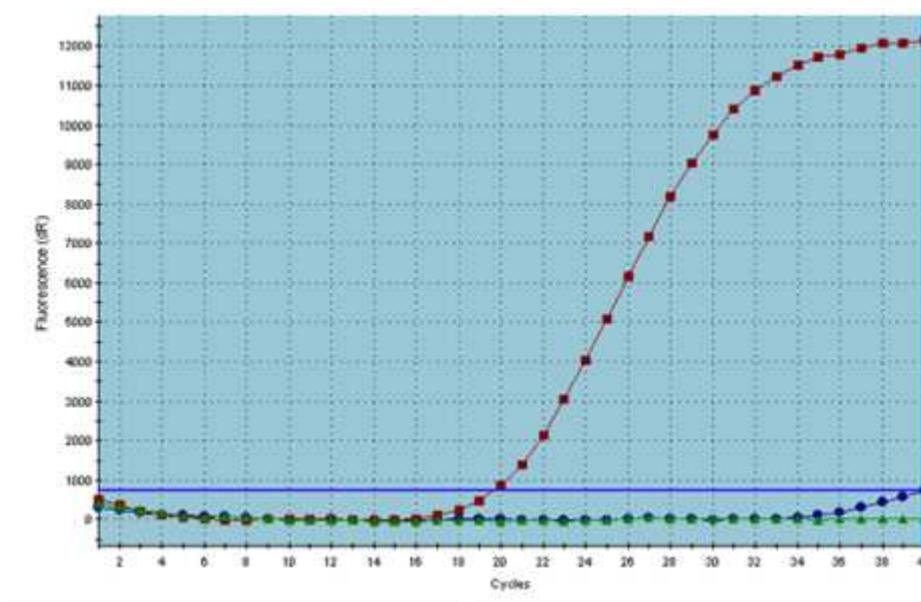


Figure 7 : Détection d'ARN viral par RT-q-PCR dans des cellules HEp-2 infectées par CVB4 de manière aiguë. Des cellules HEp-2 ont été infectées par CVB4 (MOI = 1) puis incubées pendant 18 heures à 37°C. Les conditions contrôles sont des cellules HEp-2 non-infectées (en bleu) et le mix sans ARN (en vert). La RT-q-PCR a été réalisée dans un thermocycleur Mx3000p® (Stratagene) avec des sondes TaqMan FAM/TAMRA.

4) Détermination de la proportion de cellules hébergeant l'ARN viral

Afin de documenter davantage l'infection des cellules HEp-2 par CVB4, l'ARN viral intracellulaire a été recherché par RT-PCR sans extraction telle que décrite dans la partie « Matériel et méthodes ». Cette méthode permet de déterminer la proportion de cellules hébergeant l'ARN viral. Pour ce faire, des cellules HEp-2 sont cultivées en plaques 6-puits et sont infectées ou non. Les tapis de cellules dans des puits ont été lavés avec du PBS froid et le surnageant du dernier lavage a été récupéré afin d'être testé pour la détection d'ARN viral. Ensuite, les cellules ont été détachées avec une solution de Versène trypsine et reprises dans du milieu. Les cellules sont comptées et diluées de manière à déposer 1 ou 10 cellule(s) par micropuits. Une RT-PCR sans extraction d'ARN est ensuite réalisée en tube pour détecter l'ARNm de la β -actine, permettant de vérifier la présence de cellule(s) dans le tube et une autre RT-PCR est effectuée pour rétro-transcrire et amplifier l'ARN entéroviral. Cette dernière RT-PCR sera suivie d'une réaction de PCR semi-nichée afin d'amplifier à nouveau le génome viral.

Nous avons travaillé avec 4 tubes contenant 1 cellule issue d'une culture de cellules infectées par CVB4, parmi ceux-ci, un tube n'était pas exploitable (absence d'ADNc

β -actine). Sur ces 3 puits, un seul contenait de l'ARN viral. De plus, la détection d'ARN viral dans le surnageant de la suspension cellulaire après lavages était négative (résultat non montré).

Pour la condition à 10 cellules/puits, nous avons 3 tubes dont un inexploitable (absence d'ADNc β -actine). L'ARN viral a été détecté dans ces 2 puits (Figure 8).

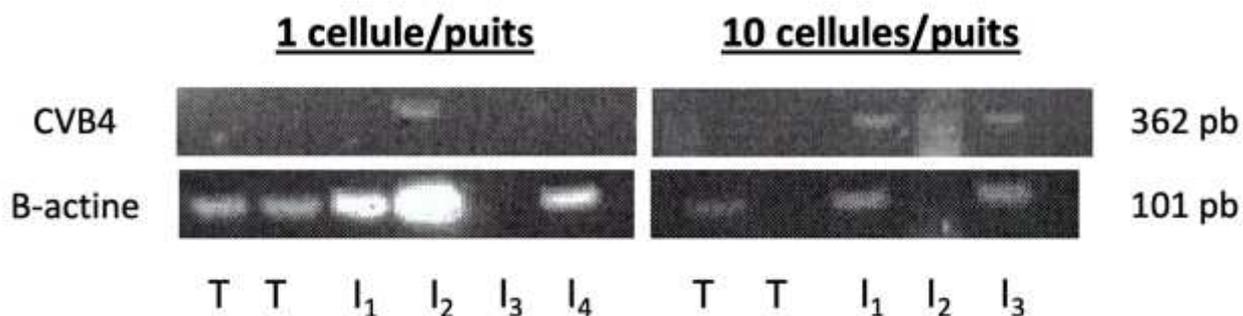


Figure 8 : Recherche d'ARN viral par RT-PCR sans extraction dans des cellules HEp-2 infectées de manière aiguë. Des cellules HEp-2 ont été infectées (I) ou non (T) par CVB4 (MOI = 1) puis incubées pendant 18 heures à 37°C, ensuite les cellules ont été lavées 8 fois et réparties dans des micropuits de manière à obtenir 1 ou 10 cellules par puits. L'ARN a été obtenu sans extraction. Les RT-PCR spécifiques de l'ARN entéroviral et de l'ARN de la β -actine (contrôle de la présence de cellules dans le tube) ont été réalisées. Une réaction de PCR semi-nichée suivie de migration en gel d'agarose a été nécessaire pour observer les bandes spécifiques de CVB4. Les gels d'agarose présentent les résultats obtenus à partir de 4 puits contenant chacun 1 cellule et les résultats obtenus à partir de 3 puits contenant 10 cellules par puits.

La recherche d'ARN viral par RT-PCR sans extraction nous a permis de constater que la proportion de cellules hébergeant cet ARN est plus élevée que la proportion de cellules positives pour la détection de protéines virales (VP1 et VP3).

La présence d'ARN viral a été mise en évidence dans environ 30 % des cellules HEp-2 infectées de manière aiguë grâce à la RT-PCR sans extraction.

5) Proportion de cellules capables de transmettre le virus

Nous avons décidé de déterminer quelle était la proportion de cellules avec infection productive dans les cultures de cellules HEp-2 infectées par CVB4. Dans ce but, nous avons mis au point la coculture de 1 cellule HEp-2 issue d'une culture infectée avec des cellules HEp-2. Des cellules HEp-2 ont été incubées avec une suspension de virus (MOI = 2) durant 1 heure, puis les tapis ont été lavés avec du milieu MEM sans SVF et incubées à nouveau pendant 3 heures. Les cellules ont été récupérées et distribuées à raison de 1 cellule par micropuits à fond rond. Les plaques ont été observées afin de repérer les puits contenant 1 cellule et ceux n'en contenant pas. Le contenu des puits ne contenant pas de cellule a été récupéré afin de n'avoir que du surnageant. Ce surnageant a été distribué en micropuits à fond plat. Ensuite, $1,25 \cdot 10^4$ cellules HEp-2 dans 50 μ L de milieu MEM supplémenté ont été ajoutés puis les microplaques ont été placées dans l'incubateur à CO₂. Régulièrement, les microplaques ont été observées à l'aide d'un microscope inversé pour suivre l'apparition d'un ECP. Les résultats obtenus après 8 jours de suivi régulier sont indiqués dans le tableau 5.

Un ECP à 100% est observé dans 1 puits sur 8 dans le cas des cocultures contenant 1 cellule issue d'une culture. Les cocultures ont été suivies pendant 8 jours mais les résultats étaient inchangés par rapport à ceux obtenus au 4^{ème} jour de suivi. Au bout de 8 jours de suivi, aucun ECP n'a été observé dans les cultures inoculées avec le surnageant obtenu de puits ne contenant pas de cellule.

Au total, grâce à la coculture d'1 cellule HEp-2 issue d'une culture infectée avec des cellules HEp-2 nous pouvons déduire que la proportion de cellules HEp-2 infectées capables de transmettre le virus est d'environ 12,5% (ECP induit dans 1 puits sur 8 contenant 1 cellule cocultivée).

Tableau 5 : Cellules HEp-2 issues de culture infectée par CVB4 cocultivées avec des cellules HEp-2.

Cellules HEp-2	Coculture avec des cellules HEp-2	ECP
Contrôle : 1 cellule (n= 8)	Surnageant	0/8
	Cellule	0/8
Infectée par CVB4 : 1 cellule (n=8)	Surnageant	0/8
	Cellule	1/8

Des cellules HEp-2 ont été infectées ou non (culture contrôle) par CVB4 (MOI = 2) puis incubées pendant 1 heure à 37°C, les tapis ont été lavés et les cellules incubées à nouveau pendant 3 heures. Les tapis ont été lavés, les cellules récupérées et distribuées à raison de 1 cellule par micropuits à fond rond. Les surnageants ont été obtenus des puits ne contenant pas de cellule. L'ECP est apparu le 4^{ème} jour mais l'ensemble des puits a été suivi 8 jours. Les résultats sont représentatifs de 2 expériences indépendantes.

II) Marqueurs de l'infection persistante à CVB4 *in vitro*

1) Titre viral dans le surnageant de culture

Des cellules 1.1B4 ont été infectées par CVB4 de manière à obtenir une persistance du virus au moins jusqu'à 210 jours post-infection (voir Matériel et Méthodes) (52). Le titre infectieux du surnageant de cultures a été déterminé au cours du suivi (Figure 9). À 180 jours, la valeur était $1,26 \cdot 10^6$ TCID₅₀/mL.

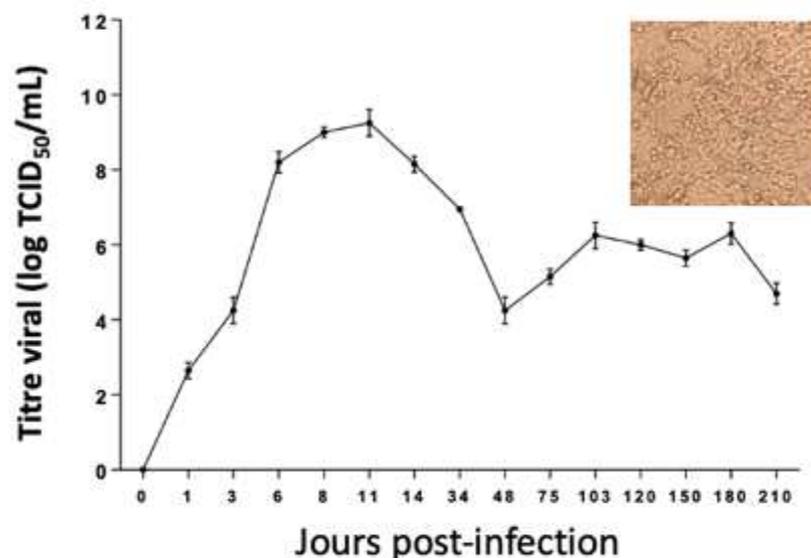


Figure 9 : Infection à CVB4 persistante de cellules pancréatiques 1.1B4. Le titre infectieux du surnageant est déterminé au cours du suivi de la culture. Les titres ont été déterminés au cours de 2 expériences indépendantes. L'aspect du tapis de cellules à 180 j post-infection est montré (Grossissement X100), il est similaire à celui des cultures de cellules contrôles.

2) Détection de protéines virales intracellulaires

Les protéines entérovirales de capsid VP1 et VP3 ont été recherchées dans les cellules 1.1B4 infectées de manière persistante. Les cellules infectées et témoins ont été récupérées par grattage et des lames d'immunofluorescence ont été préparées (Figure 10). La proportion de cellules positives pour les marquages VP1 et VP3 est d'environ 2,5%.

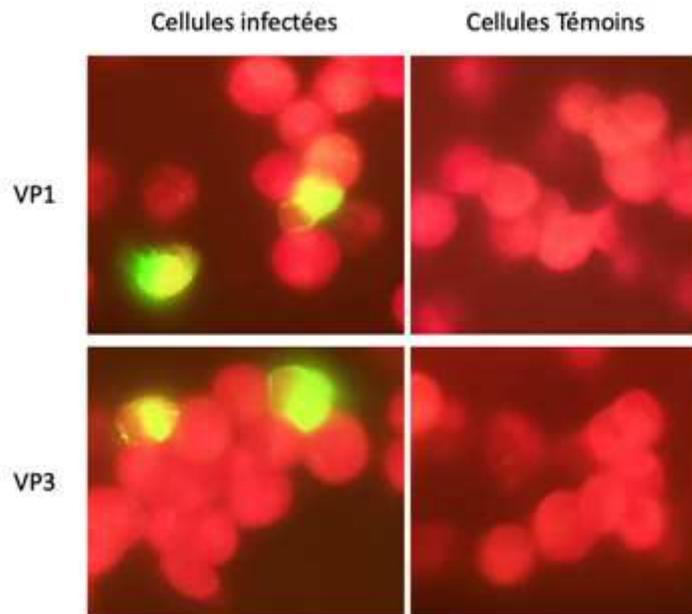


Figure 10 : Détection de protéines virales par immunofluorescence indirecte dans des cellules 1.1B4 infectées par CVB4 de manière persistante récupérées 180 jours post-infection. Des anticorps primaires murins anti-VP1 ou anti-VP3 avec un anticorps secondaire de chèvre anti-souris Alexa Fluor 488 ont été utilisés. Les cellules ont été visualisées à l'aide d'un microscope à fluorescence Leica Wild MPS52 (Grossissement X 1000 à immersion) Les images sont représentatives de 3 expériences indépendantes.

3) Détection d'ARN viral intracellulaire

La présence d'ARN viral dans les cellules infectées de manière persistante par CVB4 a été étudiée. Des cellules ont été récupérées à partir de 180 jours post-infection et l'ARN a été extrait. Après extraction et reprise du culot dans de l'eau Nuclease-Free, 100 ng d'ARN sont utilisés pour réaliser une RT-q-PCR.

La RT-q-PCR a été faite avec l'ARN de cellules infectées de manière persistante 180 jours post-infection et avec l'ARN de cellules témoins ayant subi le même nombre de repiquages que les cellules infectées (Figure 11). La valeur de Ct était 31,13 avec l'ARN de cellules infectées de manière persistante. Aucune amplification n'a été détectée à partir d'ARN extrait des cellules témoins.

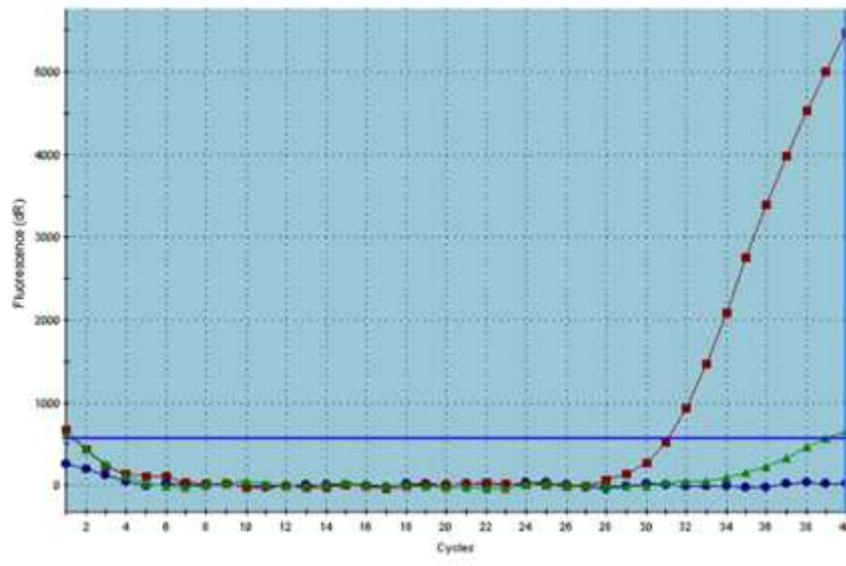


Figure 11 : Détection d'ARN viral par RT-q-PCR dans des cellules 1.1B4 infectées de manière persistante par CVB4 à 180 jours post-infection. Les conditions contrôles sont des cellules 1.1B4 non-infectées (en vert) ainsi que du mix sans ARN (en bleu). La RT-q-PCR a été réalisée sur à l'aide d'un thermocycleur Mx3000p® (Stratagene) avec des sondes TaqMan FAM/TAMRA.

4) Détermination de la proportion de cellules hébergeant l'ARN viral

Afin de de déterminer la proportion de cellules hébergeant l'ARN viral, nous avons réalisé une RT-PCR sans extraction telle que décrite dans la partie « Matériel et méthodes ». Des cellules 1.1B4 infectées de manière persistante par CVB4 ou non-infectées, traitées dans les mêmes conditions, sont cultivées dans des flacons de culture de 25cm². Les tapis de cellules dans ces flacons ont été lavés avec du PBS froid et le surnageant du dernier lavage a été récupéré afin de rechercher l'ARN entéroviral. Ensuite, les cellules ont été détachées avec une solution de Versène trypsine et reprises dans du milieu. Les cellules sont comptées et diluées de manière à en déposer 1 par micropuits. Une RT-PCR sans extraction d'ARN est ensuite réalisée en tube pour détecter l'ARNm de la β -actine, permettant de vérifier la présence de cellule(s) dans le tube et une autre RT-PCR est effectuée pour rétro-transcrire et amplifier l'ARN entéroviral. Cette dernière RT-PCR sera suivie d'une réaction de PCR semi-nichée afin d'amplifier à nouveau le génome viral.

Nous avons travaillé avec 13 tubes, parmi ceux-ci 5 (38,5%) hébergeaient l'ARN viral (Figure 12). La détection d'ARN viral dans le surnageant de la suspension cellulaire après lavages était négative (résultat non montré).

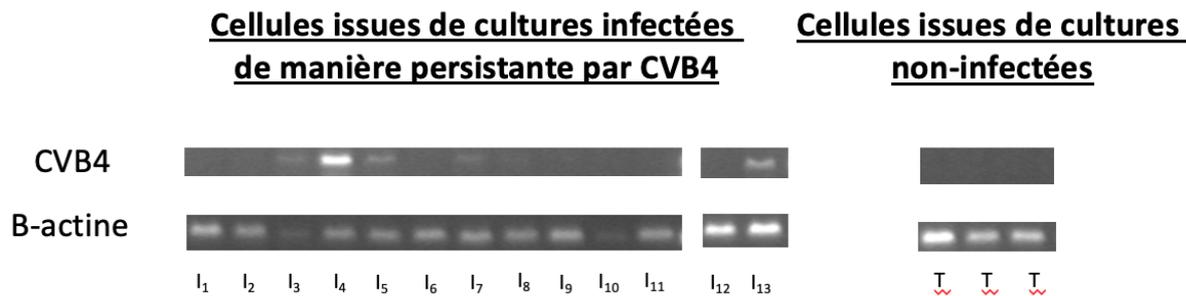


Figure 12 : Recherche d'ARN viral par RT-PCR sans extraction dans des cellules 1.1B4 infectées par CVB4 de manière persistante à 180 jours post-infection (I). Des cellules non infectées cultivées pendant 180j servent de témoin (T). Les cellules ont été lavées 8 fois et réparties dans des micropuits de manière à obtenir 1 cellule par puits. L'ARN a été obtenu sans extraction. Les RT-PCR spécifiques de l'ARN entéroviral et de l'ARN de la β -actine (contrôle de la présence de cellules dans le tube) ont été réalisées. Une réaction de PCR semi-nichée suivie de migration en gel d'agarose a été nécessaire pour observer les bandes spécifiques de CVB4. Les gels d'agarose présentent les résultats obtenus à partir de 13 puits contenant chacun 1 cellule infectée et les résultats obtenus à partir de 3 puits contenant 1 cellule témoin par puits. Les résultats sont représentatifs de 2 expériences indépendantes.

Une infection à CVB4 persistante des cellules Panc-1 a été obtenue tel que décrit antérieurement. (53) La proportion de cellules exprimant des constituants viraux a été étudiée dans ce modèle d'infection persistante. Les résultats sont similaires dans le modèle de cellules Panc-1 et le modèle de cellules 1.1B4 infectées de manière persistante par CVB4. En effet, la proportion de cellules Panc-1 hébergeant la protéine entérovirale VP1 est de 1 à 5% et elle est d'environ 2,5% dans des cultures de cellules 1.1B4. La proportion de cellules Panc-1 hébergeant l'ARN entéroviral est plus élevée que celle des cellules hébergeant la protéine VP1. La RT-PCR sans extraction a permis de mettre en évidence que 54 % des cellules Panc-1 hébergeaient l'ARN entéroviral.

5) Proportion de cellules capables de transmettre le virus

Nous avons décidé de déterminer la proportion de cellules Panc-1 issues de cultures infectées de manière persistante par CVB4, capables de transmettre le virus à des cellules permissives. Dans ce but nous avons appliqué la méthode reposant sur le principe de la coculture mise au point pour caractériser les cultures de cellules HEP-2 infectées par CVB4 (voir I5)).

Les cellules ont été distribuées à raison de 1 cellule dans 100 µL de milieu DMEM par micropuits à fond plat. Après avoir laissé sédimenter la suspension, 50 µL de surnageant ont été prélevés et déposés dans un micropuits d'une autre microplaque. Ensuite, 1,25 10⁴ cellules HEp-2 dans du milieu DMEM supplémenté ont été ajoutées puis les microplaques ont été placées dans l'incubateur à CO₂. Régulièrement les tapis de cellules ont été observés au microscope inversé pendant 7 jours pour rechercher un ECP. Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau 6.

Un ECP à 100% a été observé dès le troisième jour (J3) dans 5 puits sur 10 dans les puits contenant 1 cellule alors qu'aucun ECP n'a été observé dans les puits contenant le surnageant de ces cellules. Les cocultures ont été suivies pendant 7 jours mais les résultats demeuraient inchangés par rapport à ceux obtenus au 3^{ème} jour.

Au total, grâce à la coculture de cellules HEp-2 avec 1 cellule issue de culture de cellules Panc-1 infectées de manière persistante par CVB4, nous pouvons déduire que la proportion de cellules Panc-1 infectées capables de transmettre le virus est d'environ 50% (ECP induit dans 5 puits sur 10 contenant 1 cellule cocultivée).

Tableau 6 : Cellules Panc-1 issues de culture infectée par CVB4 de manière persistante cocultivées avec des cellules HEp-2.

Culture de cellules Panc-1 Infectées par CVB4	Coculture avec des cellules HEp-2	ECP
1 cellule (n=10)	Surnageant	0/10
	Cellule	5/10

Des cellules Panc-1 ont été infectées par CVB4 de manière persistante et récupérées 37 semaines post-infection. Les tapis ont été lavés, les cellules récupérées et distribuées à raison de 1 cellule par micropuits à fond rond. Après avoir laissé sédimenter, du surnageant a été prélevé en surface et déposé dans un micropuits. 1,25. 10⁴ cellules Hep-2 ont été ajoutées puis les microplaques ont été placées dans l'incubateur à CO₂ et observées quotidiennement au microscope inversé durant 7 jours pour rechercher l'apparition d'un ECP. Les résultats correspondent à la moyenne de 2 expériences indépendantes.

Discussion

Notre objectif était d'étudier l'infection aiguë et l'infection persistante par CVB4 dans des modèles de cultures de cellules et de déterminer à l'aide de méthodes sensibles reposant sur la détection d'ARN viral et de protéines virales la proportion de cellules infectées par ce virus et de déterminer la proportion de cellules capables de transmettre le virus à des cellules permissives.

La persistance de CVB dans les cellules pancréatiques de patients avec un DT1 est fortement suspectée. La présence de marqueurs d'infection à entérovirus dans des îlots de Langerhans de patients atteints de diabète de type 1 a été mise en évidence par différentes techniques telles que l'immunohistochimie par la recherche de la protéine de capsid (127), l'hybridation *in situ* (125), ou encore la RT-PCR (123). Il a été démontré que la proportion de cellules infectées, détectées par ces techniques pouvait être sous-estimée (52,53).

Nous avons étudié la proportion de cellules avec marqueurs d'infection dans des cultures de cellules HEp-2 et des cellules pancréatiques humaines (lignées 1.1B4 et Panc-1) infectées par CVB4 de manière aiguë ou persistante respectivement. Dans ces modèles la proportion de cellules capables de transmettre le virus à des cellules permissives a été déterminée.

Nous avons montré que les protéines entérovirales VP1 et VP3 pouvaient être détectées dans des modèles d'infection aiguë (cellules HEp-2) et chronique de cellules pancréatiques humaines (notamment lignée 1.1B4) infectées par CVB4. La proportion de cellules infectées de manière aiguë ou persistante qui hébergeaient des protéines entérovirales VP1 et VP3 était faible mais les cellules contenaient de l'ARN entéroviral détecté par RT-q-PCR. Cependant, cette technique nous renseigne sur la présence, ou non d'ARN viral intracellulaire, mais ne nous informe pas sur la proportion de cellules exprimant cet ARN. C'est la raison pour laquelle nous avons appliqué la RT-PCR sans extraction à peu (1 ou 10) de cellules HEp-2 infectées de manière aiguë ainsi qu'à des cellules 1.1B4 infectées de manière persistante, méthode que notre équipe avait mise au point et appliquée à l'étude de la persistance de l'ARN viral dans les cellules Panc-1 infectées par CVB4 de manière persistante (53).

La RT-PCR sans extraction est une technique de biologie moléculaire qui permet de détecter des ARNm ainsi que de l'ARN viral intracellulaires (128,129). Cette méthode

de RT-PCR sans extraction s'applique à des cellules uniques ou à un faible nombre de cellules mais ne s'applique pas aux tissus. Elle montre que la proportion de cellules HEp-2 infectées de manière aiguë et 1.1B4 infectées de manière persistante exprimant de l'ARN viral était supérieure à la proportion de cellules exprimant les protéines entérovirales VP1 et VP3. Le profil de résultats que nous avons obtenu est en accord avec les observations rapportées par notre équipe à la faveur de l'étude de l'infection persistante à CVB4 des cellules Panc-1 (lignée de cellules canalaire pancréatiques humaines). Dans ces études antérieures, la proportion de cellules hébergeant l'ARN viral était supérieure à la proportion de cellules exprimant la protéine virale VP1 détectée par immunofluorescence indirecte. Le fait que la proportion de cellules hébergeant l'ARN viral soit supérieure à la proportion de cellules exprimant les protéines entérovirales VP1 et VP3 est en faveur d'une infection persistante avec possiblement, dans certaines cellules, une réplication virale à bas-bruit sous la limite de détection des protéines virales par immunofluorescence indirecte (47–49) .

Au cours de notre travail, nous avons mis au point une technique de culture cellulaire sur lame à partir de cellules HEp-2. Cette technique présente l'avantage d'être moins délétère pour les cellules en les cultivant directement sur la lame de verre afin de s'affranchir de l'étape de grattage des cellules avant la préparation de nos lames d'immunofluorescence. La quantité de cellules positives, lorsque la culture est réalisée sur lame est plus élevée que lorsque les cellules sont obtenues par grattage (15% de cellules positives pour la détection de la protéine VP1 dans des cellules HEp-2 cultivées sur lame contre 5% quand les cellules obtenues par grattage), suggérant ainsi une perte de cellules infectées lors de la récupération par grattage. Cette technique sera mise à profit dans des travaux ultérieurs notamment pour étudier la présence d'ARN viral dans les cellules par RT-PCR *in situ*. Nous ne sommes pas parvenus à appliquer l'immunofluorescence indirecte pour détecter les protéines virales dans les cellules 1.1B4 cultivées sur lames, car ces cellules n'adhèrent pas suffisamment et se détachent dès le premier lavage. Des travaux seront réalisés au laboratoire pour surmonter ce problème en utilisant notamment des lames adhésives (silanes, polylysines) ou le traitement de lames de verre par la BSA afin de faciliter l'adhérence des cellules 1.1B4.

La RT-PCR *in situ* est une technique de biologie moléculaire alliant la sensibilité de la RT-PCR avec la possibilité d'étudier la distribution d'ARN dans des cellules ou des

tissus (130–133). C'est un outil qui a été utilisé pour démontrer la persistance entérovirale et la localisation cellulaire dans le foie dans des modèles murins (134), dans le pancréas de souris diabétiques (131) et dans le liquide cébrospinal de patients atteints de sclérose latérale amyotrophique (133). Cette technique s'applique également à d'autres virus tels que : le virus de la fièvre aphteuse dans des cellules de rein d'agneau (135), le virus de la rougeole dans des cellules de rein de singe (136), le virus de l'hépatite C dans le foie de patients séropositifs pour ce virus (137). La RT-PCR *in situ* appliquée dans notre laboratoire au modèle d'infection de cellules HEp-2 par CVB4 a permis d'obtenir des résultats encourageants ce qui nous incite à poursuivre dans cette voie pour disposer d'une méthode d'une grande sensibilité pour étudier la présence d'ARN viral dans nos modèles.

Des chercheurs utilisant la RT-PCR *in situ* révèlent le signal de manière colorimétrique par incorporation de d-UTPs couplés à la digoxigénine et utilisation d'anticorps anti-digoxigénine conjugués à la phosphatase alcaline (135) ou en révélant un signal fluorescent par l'utilisation d'amorces spécifiques marquées par un fluorophore. (138). Cependant, la lecture est difficile en raison de la révélation de signal non-spécifique. Preudhomme et collaborateurs (139) ont utilisé la RT-PCR *in situ* en intégrant des d-UTPs marqués à la digoxigénine avec une révélation par des anticorps anti-digoxigénine couplés à un marqueur fluorescent afin d'améliorer la sensibilité et la spécificité de la technique. L'approche reposant sur l'immunofluorescence indirecte afin de faciliter la lecture en intégrant des d-UTPs biotinylés lors des étapes de PCR et en utilisant un anticorps murin anti-biotine a été tentée dans nos travaux. Nous avons constaté que la RT-PCR *in situ* se heurte à des difficultés techniques. En effet, il faut s'assurer que les chambres d'incubation utilisées pour les étapes de PCR soient étanches au risque que les mix utilisés s'évaporent, empêchant ainsi l'amplification d'ADN et l'intégration des d-UTPs biotinylés. Des travaux sont en cours au laboratoire pour surmonter ces difficultés et poursuivre la mise au point d'une méthode de RT-PCR *in situ* applicable à nos modèles d'infection persistante à CVB4.

Les premiers résultats obtenus à l'aide de la RT-PCR *in situ* appliquée à un modèle d'infection aiguë à CVB4 confrontés aux résultats de détection d'ARN par RT-PCR sans extraction suggèrent que l'ARN entéroviral est davantage présent dans des cellules que ne le laisse supposer la détection de protéines VP1 et VP3 par immunofluorescence indirecte. Il reste à appliquer la méthode de RT-PCR *in situ* à

des cultures de cellules infectées de manière persistante par CVB4 pour mieux connaître le profil des marqueurs d'infection dans ce type d'infection.

Les retombées de la mise au point de la RT-PCR *in situ* sont multiples. En effet, c'est une méthode sensible de détection de l'ARN entéroviral pour étudier la persistance de CVB4 dans les cellules pancréatiques qui permettrait de savoir si l'ARN viral est présent dans un nombre limité de cellules ou au contraire dans de nombreuses cellules au cours de l'infection persistante de ces cellules. De plus, disposer de cette technique permettrait d'étudier la présence d'ARN viral dans les cellules pancréatiques et notamment dans les cellules β des îlots de Langerhans de patients avec un DT1. Dans la mesure où les amorces utilisées pour mettre au point cette technique ciblent des séquences nucléotidiques constantes dans la région 5' non-codante du génome entéroviral, elle peut être appliquée à la détection de tous les entérovirus pour étudier de nombreuses pathologies induites par ces virus (cardiomyopathies, conjonctivites hémorragiques, pancréatites, etc.) (95).

Pour la première fois à notre connaissance, nous rapportons des résultats concernant la proportion de cellules issues de cultures infectées par CVB4 capables de transmettre le virus à des cellules permissives. Nous avons obtenu ces résultats grâce à la coculture d'une cellule avec des cellules permissives HEp-2. Des suspensions de cellules HEp-2 infectées de manière aiguë et Panc-1 infectées de manière persistante sont diluées de manière à répartir un volume de milieu ne contenant qu'une cellule, de sorte que dans un micropuits l'observation au microscope inversé permette le repérage des puits avec une cellule ou aucune cellule. Les lavages ont pour but d'éliminer les particules virales extracellulaires de telle sorte qu'aucun ECP ne soit observé dans les cocultures des cellules permissives avec le surnageant de culture obtenu de puits ne contenant pas de cellules ou avec le surnageant de culture récupéré après décantation dans les puits contenant une cellule. Ainsi dans le cas des cellules HEp-2 infectées de manière aiguë, aucun ECP n'est visible avec les surnageants de culture dans les cocultures maintenues pendant 8 jours alors qu'un ECP est observé le 4^{ème} jour dans les cocultures réalisées avec 1 cellule. Concernant la coculture avec les cellules Panc-1 infectées de manière persistante, des ECP sont survenus le 3^{ème} jour dans les puits contenant 1 cellule mais pas dans les puits contenant du surnageant de culture dans les cocultures maintenues pendant 7 jours. Ces observations montrent que l'ECP obtenu dans les cocultures réalisées avec 1 cellule issue de culture infectée est

induit par le virus transmis par la cellule et qu'il ne s'agit pas de virus infectieux résiduel présent dans le surnageant de culture.

La proportion de cellules infectées capables de transmettre le virus est plus élevée que la proportion de cellules exprimant des protéines entérovirales détectées par immunofluorescence indirecte. Nos résultats suggèrent ainsi que la proportion de cellules infectées capables de transmettre le virus est sous-estimée par la détection de protéines virales par immunofluorescence indirecte. En effet, dans notre modèle d'infection aiguë d'une culture de cellules HEp-2, 5% des cellules sont positives pour la détection de la protéine VP1 par immunofluorescence indirecte, 12,5% sont capables de transmettre l'infection et 30% hébergent l'ARN viral. Dans le cas de cultures de cellules Panc-1 infectées de manière persistante, 5% des cellules sont positives pour la détection de la protéine VP1 par immunofluorescence indirecte, 50% sont capables de transmettre l'infection et 54% hébergent l'ARN viral. Nos résultats montrent que dans le modèle d'infection aiguë de cellules HEp-2, la proportion de cellules hébergeant l'ARN viral est supérieure à la proportion de cellules capables de transmettre le virus, alors que ces proportions sont du même ordre de grandeur dans le cas des cellules Panc-1 infectées de manière persistante.

Les données de la littérature suggèrent que les entérovirus persistent *in vitro* selon le mode « état porteur » (49). Les deux principaux types d'infections persistantes *in vitro* sont les infections selon un état d'équilibre (« *steady-state* ») ou un état porteur (« *carrier-state* »). Dans le cas des entérovirus, peu de cellules seraient infectées et seraient responsables de la persistance avec une réplication productive. Cependant, les données obtenues au cours de notre étude semblent remettre en cause cette persistance par état porteur. En effet, nos données obtenues par RT-PCR sans extraction suggèrent que davantage de cellules hébergent l'ARN viral et sont donc infectées par rapport aux évaluations antérieures reposant sur des données immunocytochimiques de détection de protéines virales. Néanmoins, la présence de constituants viraux intracellulaires ne renseigne pas sur la capacité qu'ont les cellules infectées à transmettre le virus. Les résultats obtenus par coculture de cellules issues de cultures infectées de manière aiguë et persistante nous renseignent sur cette capacité et suggèrent que la proportion de cellules capables de transmettre l'infection est plus élevée que la proportion de cellules positives pour la détection de la protéine de capsid VP1. Dans le modèle d'infection aiguë, la proportion de cellules hébergeant de l'ARN viral (30%) est plus élevée que celle de

cellules transmettant l'infection (12,5%) suggérant la présence d'ARN non-infectieux alors que dans le cas des cellules infectées de manière persistante, la proportion de cellules contenant de l'ARN viral et la proportion de cellules capables de transmettre l'infection est bien plus élevée que pour les cellules infectées de manière aiguë avec 54% de cellules contenant de l'ARN et 50% transmettant l'infection.

Chez l'Homme, les marqueurs d'infection entérovirale font l'objet de travaux dans le cadre des études relatives au rôle des virus dans le diabète de type 1. L'application de l'immunohistochimie à l'étude de biopsies de pancréas a montré que la proportion d'îlots pancréatiques hébergeant la protéine VP1 chez des patients diabétiques de type 1 était inférieure à 2% (123). Cependant, la proportion de cellules infectées est peut-être sous-estimée. Des travaux antérieurs de notre équipe avaient mis en évidence dans des îlots pancréatiques humains infectés *in vitro* par CVB4, maintenus en culture plusieurs mois, la présence d'ARN viral intracellulaire dans les cellules par hybridation *in situ*. Avec cette méthode il a été observé que l'ARN viral était présent dans 50 à 70% des cellules des îlots lors de la phase aiguë de l'infection (de J1 à J5) et dans 10 à 20% des cellules des îlots lors de la phase chronique de l'infection (après 20 jours post-infection) (51).

Une équipe a développé une méthode sensible de détection de constituants viraux. Cette équipe a rapporté la détection d'une seule molécule d'ARN *in situ* dans des coupes de pancréas et de rates de patients atteints de diabète de type 1, de patients non-diabétiques avec présence d'auto-anticorps et de patients non-diabétiques sans auto-anticorps à l'aide d'une technique de type FISH (*Fluorescence in situ hybridization*): *single-molecule-based* FISH (smFISH) (140). Cette méthode repose sur l'hybridation *in situ* en utilisant de courtes séquences de nucléotides (environ 20 nt) marqués avec une molécule fluorescente. La lecture au microscope à fluorescence permet de voir une molécule d'ARN objectivée par un point fluorescent. L'avantage de cette méthode est qu'elle permet la détection et la localisation de constituants viraux à des charges virales plus faibles qu'en immunohistochimie. La sensibilité de cette technique a été comparée à celle d'une RT-PCR et les 2 méthodes étaient capables de détecter la présence de génome viral aux plus hautes dilutions étudiées (141,142). L'objectif initial de ces travaux était double. Premièrement, identifier s'il existait une corrélation entre la présence d'ARN entéroviral pancréatique, la présence d'autoanticorps et le diabète de type 1 et, deuxièmement, localiser et caractériser l'infection à entérovirus dans le pancréas. Il a

ainsi été montré que les cellules infectées par entérovirus étaient plus nombreuses chez les patients diabétiques de type 1 ou chez des patients avec des auto-anticorps que chez les patients non-diabétiques sans auto-anticorps et que la plupart des cellules pancréatiques infectées se trouvaient dans le tissu exocrine. De plus, la proportion de cellules spléniques infectées était plus élevée chez les patients diabétiques de type 1. Cependant, le trop faible nombre de patients inclus (15 patients diabétiques de type 1, 10 patients non-diabétiques avec auto-anticorps et 14 patients sans diabète ni auto-anticorps) dans cette étude ne permet pas de conclure si une corrélation existe entre la présence d'ARN viral dans le pancréas ou la rate et les marqueurs d'auto-immunité ou le diabète de type 1.

Conclusion

En conclusion, nos résultats *in vitro* suggèrent que la détection de CVB4 dans des modèles de cultures cellulaires infectées de manière aiguë et persistante est sous-estimée avec les méthodes de détection actuelles couramment utilisées. De nombreuses études de l'infection par des entérovirus de cellules et de tissus reposent sur la recherche de protéine VP1. Nous avons montré que la RT-PCR sans extraction permettait de mettre en évidence la présence d'ARN entéroviral dans une plus grande proportion de cellules par rapport à la détection de protéines virales par immunofluorescence indirecte. Cette technique est beaucoup plus sensible que l'immunofluorescence mais présente l'inconvénient de ne pas s'appliquer à des tissus. La RT-PCR sans extraction et la coculture d'une cellule avec des cellules permissives a permis de mieux connaître le profil des marqueurs entéroviraux dans nos modèles d'infection aiguë et d'infection persistante *in vitro*. L'expression des différents marqueurs étudiés (VP1, ARN intracellulaires et capacité des cellules à transmettre le virus) varie selon le type d'infection. En effet, lorsque des cultures de cellules sont infectées de manière persistante, les proportions de cellules hébergeant de l'ARN viral et capables de transmettre l'infection sont plus élevées que dans des cultures de cellules infectées de manière aiguë. L'étude de la transmission du virus, à l'aide d'une méthode de coculture d'une cellule Panc-1 issue de culture infectée de manière persistante avec des cellules permissives remet en cause le concept de persistance par état porteur. Selon ce concept, la proportion de cellules infectées et productrices de particules infectieuses est faible. Cependant les données de ce travail indiquent que la proportion de cellules infectées est plus élevée qu'attendu au vu des résultats de la détection de la protéine VP1.

La persistance des entérovirus, peut expliquer la pathogenèse de maladies chroniques induite par ces virus. De plus des stratégies de lutte contre les infections entérovirales persistantes permettraient de limiter l'effet délétère de ces infections sur l'hôte et le développement des maladies qui leur sont associées (143). Il est donc important de poursuivre l'étude de la persistance des entérovirus et les mécanismes mis en jeu notamment dans les cellules pancréatiques. Les futurs travaux du laboratoire seront orientés dans cette direction.

Bibliographie

1. Zell R, Delwart E, Gorbalenya AE, Hovi T, King AMQ, Knowles NJ, et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Picornaviridae. *J Gen Virol*. 2017;98(10):2421–2.
2. Lauber C, Gorbalenya AE. Partitioning the Genetic Diversity of a Virus Family: Approach and Evaluation through a Case Study of Picornaviruses. *J Virol*. 2012;86(7):3890–904.
3. Lauber C, Gorbalenya AE. Toward Genetics-Based Virus Taxonomy: Comparative Analysis of a Genetics-Based Classification and the Taxonomy of Picornaviruses. *J Virol*. 2012;86(7):3905–15.
4. Hyypiä T, Hovi T, Knowles NJ, Stanway G. Classification of enteroviruses based on molecular and biological properties. *J Gen Virol*. 1997;78(1):1–11.
5. Schieble JH, Fox VL, Lennette EH. A probable new human picornavirus associated with respiratory diseases. *Am J Epidemiol*. 1967;85(2):297-310
6. Melnick JL, Tagaya I, Magnus H von. Enteroviruses 69, 70, and 71. *Intervirology*. 1974;4(6):369–70.
7. Genus: Enterovirus - Picornaviridae - Positive-sense RNA Viruses - ICTV [Internet]. [cited 2021 Jul 23]. Available from: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/picornaviridae/681/genus-enterovirus
8. Dalldorf G, Sickles GM. An Unidentified, Filtrable Agent Isolated From the Feces of Children With Paralysis. *Science*. 1948;108(2794):61–2.
9. Crowell RL, Landau BJ. A short history and introductory background on the coxsackieviruses of group B. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1997;223:1-11.
10. Hogle JM, Chow M, Filman DJ. Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution. *Science*. 1985;229(4720):1358–65.
11. Rossmann MG, Arnold E, Erickson JW, Frankenberger EA, Griffith JP, Hecht HJ, Johnson JE, Kamer G, Luo M, Mosser AG, et al. Structure of a human common cold virus and functional relationship to other picornaviruses. *Nature*. 1985;317(6033):145-53.
12. Baggen J, Thibaut HJ, Strating JRPM, van Kuppeveld FJM. The life cycle of non-polio enteroviruses and how to target it. *Nat Rev Microbiol*. 2018;16(6):368–81.
13. van der Schaar HM, Dorobantu CM, Albulescu L, Strating JRPM, van Kuppeveld FJM. Fat(al) attraction: Picornaviruses Usurp Lipid Transfer at Membrane Contact Sites to Create Replication Organelles. *Trends Microbiol*. 2016;24(7):535–46.
14. Mackie PL. The classification of viruses infecting the respiratory tract. *Paediatr Respir Rev*. 2003;4(2):84–90.

15. Khetsuriani N. Enterovirus Surveillance --- United States, 1970--2005 [Internet]. [cited 2021 Sep 21]. Available from: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/ss5508a1.htm>
16. Iritani N, Kaida A, Abe N, Kubo H, Sekiguchi J-I, Yamamoto SP, et al. Detection and genetic characterization of human enteric viruses in oyster-associated gastroenteritis outbreaks between 2001 and 2012 in Osaka City, Japan. *J Med Virol*. 2014;86(12):2019–25.
17. Begier EM, Oberste MS, Landry ML, Brennan T, Mlynarski D, Mshar PA, et al. An Outbreak of Concurrent Echovirus 30 and Coxsackievirus A1 Infections Associated with Sea Swimming among a Group of Travelers to Mexico. *Clin Infect Dis*. 2008;47(5):616–23.
18. Jacques J, Moret H, Minette D, Lévêque N, Jovenin N, Deslée G, et al. Epidemiological, Molecular, and Clinical Features of Enterovirus Respiratory Infections in French Children between 1999 and 2005. *J Clin Microbiol*. 2008;46(1):206–13.
19. Nilsson EC, Jamshidi F, Johansson SMC, Oberste MS, Arnberg N. Sialic Acid Is a Cellular Receptor for Coxsackievirus A24 Variant, an Emerging Virus with Pandemic Potential. *J Virol*. 2008;82(6):3061–8.
20. Kaplan MH, Klein SW, McPhee J, Harper RG. Group B Coxsackievirus Infections in Infants Younger than Three Months of Age: A Serious Childhood Illness. *Clin Infect Dis*. 1983;5(6):1019–32.
21. Modlin JF. Perinatal echovirus infection: insights from a literature review of 61 cases of serious infection and 16 outbreaks in nurseries. *Rev Infect Dis*. 1986;8(6):918-26.
22. Chuang Y-Y, Huang Y-C. Enteroviral infection in neonates. *J Microbiol Immunol Infect*. 2019;52(6):851–7.
23. Peigue-Lafeuille H, Chambon M, Bailly JL, Henquell C, Alcaraz S, Gaulme J. Infections nosocomiales à entérovirus en néonatalogie et dans les nurseries: un risque à ne pas négliger. *Médecine Mal Infect*. 2000;30(11):683–90.
24. Shaikh N, Fatima N, Muhammad SZ. Poliovirus eradication initiatives in dire straits: Updates from Pakistan. *J Glob Health*. 2021;11:03036.
25. Tan CYQ, Ninove L, Gaudart J, Nougairède A, Zandotti C, Thirion-Perrier L, et al. A Retrospective Overview of Enterovirus Infection Diagnosis and Molecular Epidemiology in the Public Hospitals of Marseille, France (1985–2005). *PLoS ONE*. 2011;6(3):e18022.
26. Irvine DH, Irvine AB, Gardner PS. Outbreak of E.C.H.O. virus type 30 in a general practice. *Br Med J*. 1967;4(5582):774–6.
27. Moore M. Enteroviral Disease in the United States, 1970-1979. *J Infect Dis*. 1982;146(1):103–8.
28. Dery P, Marks MI, Shapera R. Clinical manifestations of coxsackievirus infections in children. *Am J Dis Child* 1960. 1974;128(4):464–8.

29. Gondo K, Kusuhara K, Take H, Ueda K. Echovirus type 9 epidemic in Kagoshima, southern Japan: seroepidemiology and clinical observation of aseptic meningitis. *Pediatr Infect Dis J*. 1995;14(9):787–91.
30. HONIG EI, MELNICK JL, ISACSON P, PARR R, MYERS IL, WALTON M. An epidemiological study of enteric virus infections: poliomyelitis, coxsackie, and orphan (ECHO) viruses isolated from normal children in two socioeconomic groups. *J Exp Med*. 1956;103(2):247-62.
31. Hall CE, Cooney MK, Fox JP. The Seattle virus watch program. I. Infection and illness experience of virus watch families during a communitywide epidemic of echovirus type 30 aseptic meningitis. *Am J Public Health Nations Health*. 1970;60(8):1456–65.
32. Jenista JA, Powell KR, Menegus MA. Epidemiology of neonatal enterovirus infection. *J Pediatr*. 1984;104(5):685–90.
33. Nolan JP, Wilmer BH, Melnick JL. Poliomyelitis: its highly invasive nature and narrow stream of infection in a community of high socioeconomic level. *N Engl J Med*. 1955;253(22):945–54.
34. Kua JA, Pang J. The epidemiological risk factors of hand, foot, mouth disease among children in Singapore: A retrospective case-control study. *PloS One*. 2020;15(8):e0236711.
35. Rindge ME. Poliomyelitis in pregnancy; a report of 79 cases in Connecticut. *N Engl J Med*. 1957;256(7):281–5.
36. Baron RC, Hatch MH, Kleeman K, MacCormack JN. Aseptic meningitis among members of a high school football team. An outbreak associated with echovirus 16 infection. *JAMA*. 1982;248(14):1724–7.
37. van Eden W, Persijn GG, Bijkerk H, de Vries RRP, Schuurman RKB, van Rood JJ. Differential Resistance to Paralytic Poliomyelitis Controlled by Histocompatibility Leukocyte Antigens. *J Infect Dis*. 1983;147(3):422–6.
38. Hober D, Sauter P. Pathogenesis of type 1 diabetes mellitus: interplay between enterovirus and host. *Nat Rev Endocrinol*. 2010;6(5):279–89.
39. He Y, Mueller S, Chipman PR, Bator CM, Peng X, Bowman VD, et al. Complexes of Poliovirus Serotypes with Their Common Cellular Receptor, CD155. *J Virol*. 2003;77(8):4827–35.
40. Yamayoshi S, Iizuka S, Yamashita T, Minagawa H, Mizuta K, Okamoto M, et al. Human SCARB2-Dependent Infection by Coxsackievirus A7, A14, and A16 and Enterovirus 71. *J Virol*. 2012;86(10):5686–96.
41. Selinka H-C, Wolde A, Sauter M, Kandolf R, Klingel K. Virus-receptor interactions of coxsackie B viruses and their putative influence on cardiotropism. *Med Microbiol Immunol (Berl)*. 2004;193(2–3):127–31.
42. Coyne CB, Kim KS, Bergelson JM. Poliovirus entry into human brain microvascular cells requires receptor-induced activation of SHP-2. *EMBO J*. 2007;26(17):4016–28.

43. Ohka S, Nihei C-I, Yamazaki M, Nomoto A. Poliovirus trafficking toward central nervous system via human poliovirus receptor-dependent and -independent pathway. *Front Microbiol.* 2012;3:147.
44. Ren R, Racaniello VR. Poliovirus spreads from muscle to the central nervous system by neural pathways. *J Infect Dis.* 1992;166(4):747–52.
45. Hixon AM, Clarke P, Tyler KL. Contemporary Circulating Enterovirus D68 Strains Infect and Undergo Retrograde Axonal Transport in Spinal Motor Neurons Independent of Sialic Acid. *J Virol.* 2019;93(16):e00578-19.
46. Andréoletti L, Lévêque N, Boulagnon C, Brasselet C, Fornes P. Viral causes of human myocarditis. *Arch Cardiovasc Dis.* 2009;102(6–7):559–68.
47. Heim A, Canu A, Kirschner P, Simon T, Mall G, Hofschneider PH, Kandolf R. Synergistic interaction of interferon-beta and interferon-gamma in coxsackievirus B3-infected carrier cultures of human myocardial fibroblasts. *J Infect Dis.* 1992;166(5):958-65.
48. Heim A, Brehm C, Stille-Siegener M, Müller G, Hake S, Kandolf R, et al. Cultured human myocardial fibroblasts of pediatric origin: natural human interferon-alpha is more effective than recombinant interferon-alpha 2a in carrier-state coxsackievirus B3 replication. *J Mol Cell Cardiol.* 1995;27(10):2199–208.
49. Pinkert S, Klingel K, Lindig V, Dörner A, Zeichhardt H, Spiller OB, Fechner H. Virus-host coevolution in a persistently coxsackievirus B3-infected cardiomyocyte cell line. *J Virol.* 2011;85(24):13409-19.
50. Biron CA. Initial and innate responses to viral infections--pattern setting in immunity or disease. *Curr Opin Microbiol.* 1999;2(4):374–81.
51. Chehadeh W, Kerr-Conte J, Pattou F, Alm G, Lefebvre J, Wattré P, et al. Persistent infection of human pancreatic islets by coxsackievirus B is associated with alpha interferon synthesis in beta cells. *J Virol.* 2000;74(21):10153–64.
52. Nekoua MP, Bertin A, Sane F, Alidjinou EK, Lobert D, Trauet J, et al. Pancreatic beta cells persistently infected with coxsackievirus B4 are targets of NK cell-mediated cytolytic activity. *Cell Mol Life Sci CMLS.* 2020;77(1):179–94.
53. Sane F, Caloone D, Gmyr V, Engelmann I, Belaich S, Kerr-Conte J, et al. Coxsackievirus B4 can infect human pancreas ductal cells and persist in ductal-like cell cultures which results in inhibition of Pdx1 expression and disturbed formation of islet-like cell aggregates. *Cell Mol Life Sci CMLS.* 2013;70(21):4169–80.
54. Alidjinou EK, Sane F, Engelmann I, Geenen V, Hober D. Enterovirus Persistence as a Mechanism in the Pathogenesis of Type 1 Diabetes. *Discov Med.* 2014;18(100):273–82.
55. Alidjinou EK, Engelmann I, Bossu J, Villenet C, Figeac M, Romond M-B, et al. Persistence of Coxsackievirus B4 in pancreatic ductal-like cells results in cellular and viral changes. *Virulence.* 2017;8(7):1229–44.

56. Ramers C, Billman G, Hartin M, Ho S, Sawyer MH. Impact of a Diagnostic Cerebrospinal Fluid Enterovirus Polymerase Chain Reaction Test on Patient Management. *JAMA*. 2000;283(20):2680–5.
57. Robinson CC, Willis M, Meagher A, Giesecker KE, Rotbart H, Glodé MP. Impact of rapid polymerase chain reaction results on management of pediatric patients with enteroviral meningitis. *Pediatr Infect Dis J*. 2002;21(4):283–6.
58. Harvala H, Broberg E, Benschop K, Berginc N, Ladhani S, Susi P, et al. Recommendations for enterovirus diagnostics and characterisation within and beyond Europe. *J Clin Virol*. 2018;101:11–7.
59. Beld M, Minnaar R, Weel J, Sol C, Damen M, van der Avoort H, et al. Highly Sensitive Assay for Detection of Enterovirus in Clinical Specimens by Reverse Transcription-PCR with an Armored RNA Internal Control. *J Clin Microbiol*. 2004;42(7):3059–64.
60. Bouin A, Gretteau P-A, Wehbe M, Renois F, N’Guyen Y, Leveque N, et al. Enterovirus persistence in cardiac cells of patients suffering from idiopathic dilated cardiomyopathy is linked to 5’ terminal genomic RNA-deleted viral populations with viral-encoded proteinase activities. *Circulation*. 2019;139(20):2326–38.
61. Berger MM, See DM, Redl B, Aymard M, Lina B. Comparison of procedures for the detection of enteroviruses in murine heart samples by in situ polymerase chain reaction. *Res Virol*. 1997;148(6):409–16.
62. Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Flemister MR, Brown BA, Pallansch MA. Typing of Human Enteroviruses by Partial Sequencing of VP1. *J Clin Microbiol*. 1999;37(5):1288–93.
63. Schmidt NJ, Ho HH, Lennette EH. Propagation and isolation of group A coxsackieviruses in RD cells. *J Clin Microbiol*. 1975;2(3):183–5.
64. WHO, Polio Laboratory Manual, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2004.
65. Bell EJ, McCartney R a., Basquill D, Chaudhuri A k. r. μ -Antibody capture elisa for the rapid diagnosis of enterovirus infections in patients with aseptic meningitis. *J Med Virol*. 1986;19(3):213–7.
66. Lim B-K, Ju E-S, Lao DH, Yun S-H, Lee Y-J, Kim D-K, et al. Development of a enterovirus diagnostic assay system for diagnosis of viral myocarditis in humans. *Microbiol Immunol*. 2013;57(4):281–7.
67. Kytö V, Saraste A, Fohlman J, Ilbäck N-G, Harvala H, Vuorinen T, et al. Cardiomyocyte Apoptosis after Antiviral WIN 54954 Treatment in Murine Coxsackievirus B3 Myocarditis. *Scand Cardiovasc J*. 2002;36(3):187–92.
68. Hayden FG, Herrington DT, Coats TL, Kim K, Cooper EC, Villano SA, et al. Efficacy and safety of oral pleconaril for treatment of colds due to picornaviruses in adults: results of 2 double-blind, randomized, placebo-controlled trials. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2003;36(12):1523–32.

69. Ahn J, Jun ES, Lee HS, Yoon SY, Kim D, Joo C-H, et al. A Small Interfering RNA Targeting Coxsackievirus B3 Protects Permissive HeLa Cells from Viral Challenge. *J Virol.* 2005;79(13):8620–4.
70. Lin Z, Li Y, Xu T, Guo M, Wang C, Zhao M, et al. Inhibition of Enterovirus 71 by Selenium Nanoparticles Loaded with siRNA through Bax Signaling Pathways. *ACS Omega.* 2020;5(21):12495–500.
71. Gitlin L, Stone JK, Andino R. Poliovirus Escape from RNA Interference: Short Interfering RNA-Target Recognition and Implications for Therapeutic Approaches. *J Virol.* 2005;79(2):1027–35.
72. Bandyopadhyay AS, Garon J, Seib K, Orenstein WA. Polio vaccination: past, present and future. *Future Microbiol.* 2015;10(5):791–808.
73. Zeng J, Tang T, Wang YJ, Lyu HK, Huang JH, Li XQ, et al. [Post-marketing multi-center safety surveillance of inactivated enterovirus A71 vaccine (Vero cell)]. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi.* 2019;53(3):252–7.
74. Swain SK, Gadnayak A, Mohanty JN, Sarangi R, Das J. Does enterovirus 71 urge for effective vaccine control strategies? Challenges and current opinion. *Rev Med Virol.* 2022:e2322.
75. Henke A, Jarasch N, Wutzler P. Coxsackievirus B3 vaccines: use as an expression vector for prevention of myocarditis. *Expert Rev Vaccines.* 2008;7(10):1557–67.
76. Hyöty H, Leon F, Knip M. Developing a vaccine for type 1 diabetes by targeting coxsackievirus B. *Expert Rev Vaccines.* 2018;17(12):1071–83.
77. Chumakov M, Voroshilova M, Shindarov L, Lavrova I, Gracheva L, Koroleva G, et al. Enterovirus 71 isolated from cases of epidemic poliomyelitis-like disease in Bulgaria. *Arch Virol.* 1979;60(3–4):329–40.
78. Kim KH. Enterovirus 71 infection: An experience in Korea, 2009. *Korean J Pediatr.* 2010;53(5):616–22.
79. Katiyar BC, Misra S, Singh RB, Singh AK, Gupta S, Gulati AK, et al. Adult polio-like syndrome following Enterovirus 70 conjunctivitis (natural history of the disease). *Acta Neurol Scand.* 1983;67(5):263–74.
80. Grist NR, Bell EJ, Assaad F. Enteroviruses in human disease. *Prog Med Virol.* 1978;24:114–57.
81. Oyero OG, Adu FD, Ayukekbong JA. Molecular characterization of diverse species enterovirus-B types from children with acute flaccid paralysis and asymptomatic children in Nigeria. *Virus Res.* 2014;189:189–93.
82. Luciano CA, Sivakumar K, Spector SA, Dalakas MC. Reinnervation in Clinically Unaffected Muscles of Patients with Prior Paralytic Poliomyelitis. *Ann N Y Acad Sci.* 1995;753(1):394–401.
83. Luciano CA, Sivakumar K, Spector SA, Dalakas MC. Electrophysiologic and histologic studies in clinically unaffected muscles of patients with prior paralytic poliomyelitis. *Muscle Nerve.* 1996;19(11):1413–20.

84. Wiechers DO, Hubbell SL. Late changes in the motor unit after acute poliomyelitis. *Muscle Nerve*. 1981;4(6):524–8.
85. Kaminski HJ, Tresser N, Hogan RE, Martin E. Pathological analysis of spinal cords from survivors of poliomyelitis. *Ann N Y Acad Sci*. 1995;753:390–3.
86. Sharief MK, Hentges R, Ciardi M. Intrathecal immune response in patients with the post-polio syndrome. *N Engl J Med*. 1991;325(11):749–55.
87. Baj A, Colombo M, Headley JL, McFarlane JR, Liethof MA, Toniolo A. Post-poliomyelitis syndrome as a possible viral disease. *Int J Infect Dis*. 2015;35:107-16.
88. Xue YC, Feuer R, Cashman N, Luo H. Enteroviral Infection: The Forgotten Link to Amyotrophic Lateral Sclerosis? *Front Mol Neurosci*. 2018;11:63.
89. Kupila L, Vuorinen T, Vainionpää R, Hukkanen V, Marttila RJ, Kotilainen P. Etiology of aseptic meningitis and encephalitis in an adult population. *Neurology*. 2006;66(1):75–80.
90. Thivierge B, Delage G. Infections du système nerveux central à entérovirus: 223 cas vus à un hôpital pédiatrique entre 1973 et 1981 [Infections of the central nervous system caused by enterovirus: 223 cases seen at a pediatric hospital between 1973 and 1981]. *Can Med Assoc J*. 1982;127(11):1097-102.
91. Wang J, Meng M, Xu H, Wang T, Liu Y, Yan H, et al. Analysis of enterovirus genotypes in the cerebrospinal fluid of children associated with aseptic meningitis in Liaocheng, China, from 2018 to 2019. *BMC Infect Dis*. 2021;21:405.
92. Nagy G, Takátsy S, Kukán E, Mihály I, Dömök I. Virological diagnosis of enterovirus type 71 infections: experiences gained during an epidemic of acute CNS diseases in Hungary in 1978. *Arch Virol*. 1982;71(3):217–27.
93. Yang T-T, Huang L-M, Lu C-Y, Kao C-L, Lee W-T, Lee P-I, et al. Clinical features and factors of unfavorable outcomes for non-polio enterovirus infection of the central nervous system in northern Taiwan, 1994-2003. *J Microbiol Immunol Infect Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi*. 2005;38(6):417–24.
94. Frantidou F, Kamaria F, Dumaidi K, Skoura L, Antoniadis A, Papa A. Aseptic meningitis and encephalitis because of herpesviruses and enteroviruses in an immunocompetent adult population. *Eur J Neurol*. 2008;15(9):995–7.
95. Jubelt B, Lipton HL. Enterovirus/picornavirus infections. *Handb Clin Neurol*. 2014;123:379-416.
96. Chen B-S, Lee H-C, Lee K-M, Gong Y-N, Shih S-R. Enterovirus and Encephalitis. *Front Microbiol*. 2020;11:261.
97. Sells CJ, Carpenter RL, Ray CG. Sequelae of central-nervous-system enterovirus infections. *N Engl J Med*. 1975;293(1):1–4.
98. Aretz HT, Billingham ME, Edwards WD, Factor SM, Fallon JT, Fenoglio JJ, et al. Myocarditis. A histopathologic definition and classification. *Am J Cardiovasc Pathol*. 1987;1(1):3–14.

99. Gravanis MB, Sternby NH. Incidence of myocarditis. A 10-year autopsy study from Malmö, Sweden. *Arch Pathol Lab Med*. 1991;115(4):390–2.
100. Dennert R, Crijns HJ, Heymans S. Acute viral myocarditis. *Eur Heart J*. 2008;29(17):2073–82.
101. Xiong D, Lee G-H, Badorff C, Dorner A, Lee S, Wolf P, et al. Dystrophin deficiency markedly increases enterovirus-induced cardiomyopathy: a genetic predisposition to viral heart disease. *Nat Med*. 2002;8(8):872–7.
102. Gorbea C, Makar KA, Pauschinger M, Pratt G, Bersola JLF, Varela J, et al. A role for Toll-like receptor 3 variants in host susceptibility to enteroviral myocarditis and dilated cardiomyopathy. *J Biol Chem*. 2010;285(30):23208–23.
103. Tang TT, Sedmak GV, Siegesmund KA, McCreadie SR. Chronic myopathy associated with coxsackievirus type A9. A combined electron microscopical and viral isolation study. *N Engl J Med*. 1975;292(12):608–11.
104. Travers RL, Hughes GR, Cambridge G, Sewell JR. Coxsackie B neutralisation titres in polymyositis/dermatomyositis. *Lancet Lond Engl*. 1977;1(8024):1268.
105. Bowles NE, Dubowitz V, Sewry CA, Archard LC. Dermatomyositis, polymyositis, and Coxsackie-B-virus infection. *Lancet Lond Engl*. 1987;1(8540):1004–7.
106. Chatterjee S, Quarcoopome CO, Apenteg A. An epidemic of acute conjunctivitis. *Ghana Med J* 1970;9:11–3.
107. Lévêque N, Huguet P, Norder H, Chomel J-J. Les Enterovirus responsables de conjonctivite aiguë hémorragique. *Médecine Mal Infect*. 2010;40(4):212–8.
108. Kimura H, Saitoh M, Miyakubo H, Yoshida H, Kato M, Nagai A, et al. Keratoconjunctivitis caused by echovirus type 13 in Japanese children. *Pediatr Infect Dis J*. 2003;22(8):758–9.
109. Akçay E, Çarhan A, Hondur G, Tufan ZK, Duru N, Kılıç S, et al. Molecular identification of viral agents associated with acute conjunctivitis: a prospective controlled study. *Braz J Infect Dis Off Publ Braz Soc Infect Dis*. 2017;21(4):391–5.
110. Tapparel C, Siegrist F, Petty TJ, Kaiser L. Picornavirus and enterovirus diversity with associated human diseases. *Infect Genet Evol*. 2013;14:282–93.
111. Yang F, Zhang T, Hu Y, Wang X, Du J, Li Y, et al. Survey of enterovirus infections from hand, foot and mouth disease outbreak in china, 2009. *Viol J*. 2011;8:508.
112. Kairis B, Sauter P, Goffard A, Fronval S, Sane F, Hober D. Quand un entérovirus émerge [When an enterovirus emerges]. *Pathol Biol (Paris)*. 2009;57(3):258-67.
113. Aswathyraj S, Arunkumar G, Alidjinou EK, Hober D. Hand, foot and mouth disease (HFMD): emerging epidemiology and the need for a vaccine strategy. *Med Microbiol Immunol (Berl)*. 2016;205(5):397–407.

114. Abzug M. Perinatal enterovirus infections. In: Rotbart HA, ed. Human enterovirus infections. Washington, DC: ASM Press, 1995:221–238.
115. Feuer R, Mena I, Pagarigan RR, Harkins S, Hassett DE, Whitton JL. Coxsackievirus B3 and the neonatal CNS: the roles of stem cells, developing neurons, and apoptosis in infection, viral dissemination, and disease. *Am J Pathol.* 2003;163(4):1379–93.
116. de Jong EP, van den Beuken MGA, van Elzakker EPM, Wolthers KC, Sprij AJ, Lopriore E, et al. Epidemiology of Sepsis-like Illness in Young Infants: Major Role of Enterovirus and Human Parechovirus. *Pediatr Infect Dis J.* 2018;37(2):113–8.
117. Dagan R, Hall CB, Powell KR, Menegus MA. Epidemiology and laboratory diagnosis of infection with viral and bacterial pathogens in infants hospitalized for suspected sepsis. *J Pediatr.* 1989;115(3):351–6.
118. Yeung W-CG, Rawlinson WD, Craig ME. Enterovirus infection and type 1 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis of observational molecular studies. *BMJ.* 2011;342:d35.
119. DiMeglio LA, Evans-Molina C, Oram RA. Type 1 diabetes. *Lancet Lond Engl.* 2018;391(10138):2449–62.
120. Paronen J, Klemetti P, Kantele JM, Savilahti E, Perheentupa J, Akerblom HK, et al. Glutamate Decarboxylase-Reactive Peripheral Blood Lymphocytes From Patients With IDDM Express Gut-Specific Homing Receptor 4 7-Integrin. *Diabetes.* 1997;46(4):583–8.
121. Vreugdenhil GR, Geluk A, Ottenhoff THM, Melchers WJG, Roep BO, Galama JMD. Molecular mimicry in diabetes mellitus: the homologous domain in coxsackie B virus protein 2C and islet autoantigen GAD 65 is highly conserved in the coxsackie B-like enteroviruses and binds to the diabetes associated HLA-DR3 molecule. *Diabetologia.* 1998;41(1):40–6.
122. Jaïdane H, Hober D. Role of coxsackievirus B4 in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Diabetes Metab.* 2008;34(6):537–48.
123. Krogvold L, Edwin B, Buanes T, Frisk G, Skog O, Anagandula M, et al. Detection of a Low-Grade Enteroviral Infection in the Islets of Langerhans of Living Patients Newly Diagnosed With Type 1 Diabetes. *Diabetes.* 2015;64(5):1682–7.
124. Richardson SJ, Willcox A, Bone AJ, Foulis AK, Morgan NG. The prevalence of enteroviral capsid protein vp1 immunostaining in pancreatic islets in human type 1 diabetes. *Diabetologia.* 2009;52(6):1143–51.
125. Ylipaasto P, Klingel K, Lindberg AM, Otonkoski T, Kandolf R, Hovi T, Roivainen M. Enterovirus infection in human pancreatic islet cells, islet tropism in vivo and receptor involvement in cultured islet beta cells. *Diabetologia.* 2004;47(2):225–39.
126. Yoon JW, Austin M, Onodera T, Notkins AL. Isolation of a virus from the pancreas of a child with diabetic ketoacidosis. *N Engl J Med.* 1979;300(21):1173–9.

127. Dotta F, Censini S, van Halteren AGS, Marselli L, Masini M, Dionisi S, et al. Cocksackie B4 virus infection of β cells and natural killer cell insulinitis in recent-onset type 1 diabetic patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(12):5115–20.
128. Surmeier DJ, Song W-J, Yan Z. Coordinated Expression of Dopamine Receptors in Neostriatal Medium Spiny Neurons. *J Neurosci*. 1996;16(20):6579–91.
129. Wang HB, Laverghetta AV, Foehring R, Deng YP, Sun Z, Yamamoto K, et al. Single-cell RT-PCR, in situ hybridization histochemical, and immunohistochemical studies of substance P and enkephalin co-occurrence in striatal projection neurons in rats. *J Chem Neuroanat*. 2006;31(3):178–99.
130. Nuovo GJ. Detection of viral infections by in situ PCR: theoretical considerations and possible value in diagnostic pathology. *J Clin Lab Anal*. 1996;10(6):335–49.
131. Berger MM, See DM, Aymard M, Lina B. Demonstration of persistent enterovirus in the pancreas of diabetic mice by in situ polymerase chain reaction. *Clin Diagn Virol*. 1998;9(2):141–3.
132. Mee A, Dixon J, Hoyland J, Davies M, Selby P, Mawer E. Detection of canine distemper virus in 100% of Paget's disease samples by in situ-reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Bone*. 1998;23(2):171–5.
133. Berger MM, Kopp N, Vital C, Redl B, Aymard M, Lina B. Detection and cellular localization of enterovirus RNA sequences in spinal cord of patients with ALS. *Neurology*. 2000;54(1):20–5.
134. Berger MM, See DM, Redl B, Aymard M, Bruno L. Direct in situ reverse transcriptase polymerase chain reaction for the detection of Enterovirus genome in liver tissues. *J Virol Methods*. 1997;65(1):55–66.
135. Prato Murphy ML, Rodriguez M, Schudel AA, Meyer RF. Localization of foot and mouth disease virus RNA in tissue culture infected cells via in situ polymerase chain reaction. *J Virol Methods*. 1995;54(2):173–8.
136. Ray R, Cooper PJ, Sim R, Chadwick N, Earle P, Dhillon AP, et al. Direct in situ reverse transcriptase polymerase chain reaction for detection of measles virus. *J Virol Methods*. 1996;60(1):1–17.
137. Alzahrani AJ, Vallely PJ, McMahon RFT. Development of a novel nested in situ PCR–ISH method for detection of hepatitis C virus RNA in liver tissue. *J Virol Methods*. 2002;99(1):53–61.
138. Testoni N, Martinelli G, Farabegoli P, Zaccaria A, Amabile M, Raspadori D, et al. A new method of “in-cell reverse transcriptase-polymerase chain reaction” for the detection of BCR/ABL transcript in chronic myeloid leukemia patients. *Blood*. 1996;87(9):3822–7.
139. Preudhomme C, Chams-Eddine L, Roumier C, Duflos-Grardel N, Denis C, Cosson A, et al. Detection of BCR-ABL transcripts in chronic myeloid leukemia (CML) using an in situ RT-PCR assay. *Leukemia*. 1999;13(5):818–23.

140. Geravandi S, Richardson S, Pugliese A, Maedler K. Localization of enteroviral RNA within the pancreas in donors with T1D and T1D-associated autoantibodies. *Cell Rep Med.* 2021;2(8):100371.
141. Laiho JE, Oikarinen S, Oikarinen M, Larsson PG, Stone VM, Hober D, et al. Application of bioinformatics in probe design enables detection of enteroviruses on different taxonomic levels by advanced in situ hybridization technology. *J Clin Virol.* 2015;69:165–71.
142. Busse N, Paroni F, Richardson SJ, Laiho JE, Oikarinen M, Frisk G, et al. Detection and localization of viral infection in the pancreas of patients with type 1 diabetes using short fluorescently-labelled oligonucleotide probes. *Oncotarget.* 2017;8(8):12620–36.
143. Nekoua MP, Alidjinou EK, Hober D. Coxsackievirus persistence and pathogenesis of type 1 diabetes. *Nat Rev Endocrinol.* 2022 in press

Université de Lille
FACULTE DE PHARMACIE DE LILLE
DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
Année Universitaire 2021/2022

Nom : MERCIER
Prénom : Ambroise

Titre de la thèse : Marqueurs virologiques d'infection par les entérovirus

Mots-clés : marqueur, infection, entérovirus, persistance, coxsackievirus B4

Résumé :

Les virus du genre *Enterovirus* de la famille des *Picornaviridae* sont non enveloppés, à capsid icosaédrique, leur génome est constitué d'un brin d'ARN positif. Ce genre comprend plusieurs espèces et regroupe de nombreux virus, notamment les coxsackievirus B (CVB) 1 à 6 responsables, chez l'Homme, de nombreux tableaux cliniques aigus et leur rôle dans des pathologies chroniques et notamment le diabète de type 1 est fortement suspecté.

Nous avons étudié des marqueurs d'infection à CVB4 dans des modèles *in vitro*. Dans ces modèles, la quantité de particules infectieuses dans les surnageants de culture et la présence d'ARN viral dans les cellules ont été déterminées et nous avons évalué la proportion de cellules infectées grâce à la détection de protéines de capsid dans les cellules par immunofluorescence indirecte et d'ARN viral intracellulaire par RT-PCR sans extraction. Dans les modèles d'infection aiguë et d'infection persistante la proportion de cellules capables de transmettre le virus à des cellules permissives a été évaluée.

Les résultats de nos travaux indiquent que l'expression des marqueurs virologiques varie selon qu'il s'agit d'infection aiguë ou d'infection persistante et que la proportion de cellules infectées est sous-estimée avec les méthodes de détection couramment utilisées, notamment dans les modèles d'infection persistante.

Membres du jury :

Président :

Madame le Professeur M.-B. ROMOND
Professeur des Universités, Université de Lille

Directeur, conseiller de thèse :

Monsieur le Professeur D. HOBBER
Professeur des Universités – Praticien Hospitalier
Université de Lille et Centre Hospitalier Universitaire de Lille

Assesseurs :

Monsieur le Docteur E.K. ALIDJINOU
Maitre de conférences des Universités – Praticien Hospitalier
Université de Lille et Centre Hospitalier Universitaire de Lille

Madame le Docteur M.-N. NOULARD
Praticien Hospitalier, Centre Hospitalier d'Arras