

UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

THESE DE DOCTORAT EN SCIENCES

présentée et soutenue par

Mr Jérôme JACQUES

Sous la direction scientifique

Monsieur le Professeur Laurent ANDREOLETTI

TITRE :

**Étude Épidémiologique, Virologique et Physiopathologique  
des Infections Respiratoires Basses par les Entérovirus en  
Pédiatrie**

soutenue publiquement le

4 avril 2008

JURY :

Monsieur le Professeur Laurent ANDREOLETTI

Monsieur le Professeur Michel ABELY

Monsieur le Professeur François FREYMUTH (rapporteur)

Monsieur le Professeur Bruno LINA

Monsieur le Professeur Bruno POZZETTO (rapporteur)

Année universitaire 2007-2008

Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur le Professeur Laurent ANDREOLETTI de m'avoir accueilli en 2003 au sein de son laboratoire de l'UFR de médecine et du service de virologie du CHU de REIMS. Je voudrais lui signifier ma reconnaissance pour le temps, la patience et les conseils scientifiques qu'il m'a accordés tout au long de ces années, notamment lors de ces derniers mois au cours de la rédaction de cette thèse.

Je remercie chaleureusement les deux rapporteurs de ce mémoire :

Monsieur le Professeur Bruno POZZETTO, Professeur à la Faculté de Médecine de Saint-Etienne et chef du service du laboratoire de Bactériologie-Virologie du CHU Saint-Etienne qui m'a permis par ces conseils et ces remarques d'améliorer très nettement ce manuscrit.

Monsieur le Professeur François FREYMUTH, chef du service du laboratoire de Virologie du CHU de Caen pour le temps qu'il a consacré à la lecture et à la critique de ce travail.

J'espère que cette version aura davantage répondu à leurs attentes légitimes.

Je souhaite également remercier, Monsieur le Professeur Michel ABELY d'avoir collaboré et suivi ces travaux et d'avoir accepté de faire partie du jury de cette thèse.

Je remercie Monsieur le Professeur Bruno LINA, directeur du Centre National de Référence des entérovirus qui me fait l'honneur d'être présent aujourd'hui malgré la distance.

Mes remerciements les plus sincères s'adressent à Monsieur le docteur Nicolas Lévêque pour les discussions que nous avons eu et son aide. Je lui adresse tous mes encouragements pour la suite de sa carrière professionnelle au sein de son nouveau laboratoire.

Je souhaite remercier Madame le docteur Hélène MORET pour la patience dont elle a fait preuve durant toutes ces années. Je lui témoigne ici ma reconnaissance et mon amitié.

Je souhaite remercier Madame le docteur Véronique BRODARD, à qui je témoigne ici ma reconnaissance pour son aide, sa disponibilité ainsi que son amitié.

A toute l'équipe du laboratoire de virologie du CHU Robert Debré de Reims. Merci pour votre accueil, votre aide et votre soutien toujours dans la bonne humeur et ceci depuis des années maintenant.

Un grand merci à tous mes amis et collègues, en particuliers Fanny et Amira. Merci Damien pour ton aide et ton soutien toutes ces années durant et bon courage pour la suite. A Pierre et Manu pour toutes ces années.

A mes parents et ma sœur qui m'ont toujours poussé et motivé dans mes études. Sans eux, je n'aurais certainement pas fait tout cela. Cette thèse représente donc l'aboutissement du soutien et des encouragements qu'ils m'ont prodigués tout au long de mes études. Qu'ils soient remerciés ici.

## Table des matières

INTRODUCTION GENERALE .....	1
DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES .....	4
1. LES ENTÉROVIRUS .....	5
1.1. DÉFINITION .....	5
1.2. UNE CLASSIFICATION EN CONSTANTE ÉVOLUTION .....	8
1.3. MORPHOLOGIE.....	10
1.3.1. STRUCTURE DE LA CAPSIDE .....	10
1.3.2. STRUCTURE DU GÉNOME.....	12
2. CYCLE DE MULTIPLICATION DES <i>ENTEROVIRUS</i> DANS LA CELLULE CIBLE .....	18
2.1. MÉCANISMES D'ATTACHEMENT DES <i>ENTEROVIRUS</i> À LEURS RÉCEPTEURS CELLULAIRES .....	18
2.2. L'ENTRÉE DANS LA CELLULE .....	23
2.3. TRADUCTION DU GÉNOME VIRAL .....	23
2.4. RÉPLICATION DU GÉNOME VIRAL .....	27
2.5. MODIFICATIONS DE LA FONCTIONNALITÉ CELLULAIRE .....	28
2.5.1. INHIBITION DE LA SYNTHÈSE PROTÉIQUE .....	28
2.5.2. INHIBITION DE LA SYNTHÈSE DES ARN.....	28
2.5.3. INHIBITION DE LA SÉCRÉTION DES PROTÉINES .....	28
2.5.4. EFFET CYTOPATHIQUE ET L'APOPTOSE.....	29
2.6. ÉVOLUTION GÉNÉTIQUE DES ENTÉROVIRUS : MUTATIONS ET RECOMBINAISONS.....	29
2.6.1. MUTATIONS GÉNÉTIQUES.....	30
2.6.2. RECOMBINAISON GÉNÉTIQUE.....	31
2.6.2.1. RECOMBINAISON CHEZ LES POLIOVIRUS.....	31
2.6.2.2. RECOMBINAISON CHEZ LES ENTÉROVIRUS NON POLIO.....	32
2.7. DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE ET QUASI-ESPÈCES.....	34

## Table des matières

2.8. MORPHOGÉNÈSE ET LIÉRATION DES VIRIONS .....	35
3. LES INFECTIONS HUMAINES À ENTÉROVIRUS .....	36
3.1. EPIDÉMIOLOGIE GÉNÉRALE .....	36
3.1.1. MODE DE TRANSMISSION .....	36
3.1.2. CIRCULATION DES ENTÉROVIRUS .....	38
3.1.3. FACTEURS INFLUENÇANT LA CIRCULATION.....	38
3.1.4. ÉPIDÉMIOLOGIE MOLÉCULAIRE .....	40
3.2. PHYSIOPATHOLOGIE DE L'INFECTION.....	41
3.2.1. PHYSIOPATHOLOGIE GÉNÉRALE .....	41
3.2.2. HÔTES ET TROPISME TISSULAIRE.....	41
3.2.3. RÉPONSE IMMUNE ANTIVIRALE.....	45
3.3. PATHOLOGIES HUMAINES À ENTÉROVIRUS.....	46
3.3.1. INFECTIONS AIGUËS .....	46
3.3.2. INFECTIONS PERSISTANTES OU CHRONIQUES EN PATHOLOGIE HUMAINE .....	52
4. LES <i>ENTEROVIRUS</i> : DES PATHOGÈNES À TROPISME RESPIRATOIRE .....	54
4.1. DONNÉES CLINIQUES .....	54
4.1.1. INFECTIONS RESPIRATOIRES HAUTES À ENTÉROVIRUS.....	54
4.1.2. INFECTIONS RESPIRATOIRES BASSES À ENTÉROVIRUS .....	54
4.2. DONNÉES EPIDÉMIOLOGIQUES .....	57
4.2.1. POPULATION .....	57
4.2.2. SAISONNALITÉ .....	58
4.2.3. MODE DE CIRCULATION .....	58
4.2.4. SÉROTYPES IDENTIFIÉS .....	60
4.3. DONNÉES VIROLOGIQUES.....	60
4.3.1. DÉTECTION DES ENTÉROVIRUS.....	63
4.3.1.1. PRÉLÈVEMENT .....	63

## Table des matières

4.3.1.2. OUTILS DE DIAGNOSTIC .....	65
4.3.1.2.1. ISOLEMENT DES ENTÉROVIRUS .....	65
4.3.1.2.2. OUTILS DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE .....	67
4.3.2. IDENTIFICATION DES ENTÉROVIRUS .....	68
4.3.2.1. NEUTRALISATION.....	68
4.3.2.2. GÉNOTYPAGE .....	68
4.4. DONNÉES EXPÉRIMENTALES.....	72
4.4.1. ETUDES <i>IN VITRO</i> .....	72
4.4.2. ETUDES <i>IN VIVO</i> .....	73
5. CONCLUSION DES DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES.....	74

## Table des matières

TRAVAUX ORIGINAUX.....	75
OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THÈSE.....	76
ETUDE CLINIQUE : LE RÔLE DES <i>ENTÉROVIRUS</i> DANS LA BRONCHOLITE DU NOURRISSON .....	77
ARTICLE N°1 : .....	79
“ASSOCIATION OF RESPIRATORY PICORNAVIRUSES WITH ACUTE BRONCHIOLITIS IN FRENCH INFANTS” .....	80
ETUDE EPIDÉMIOLOGIQUE, MOLÉCULAIRE ET CLINIQUE DES INFECTIONS RESPIRATOIRES À <i>ENTÉROVIRUS</i> .....	84
ARTICLE N°2 : .....	86
“EPIDEMIOLOGICAL, MOLECULAR AND CLINICAL FEATURES OF ENTEROVIRUS RESPIRATORY INFECTIONS IN FRENCH CHILDREN BETWEEN 1999 AND 2005” .....	87
INFECTION EXPÉRIMENTALE DES CELLULES BRONCHIQUES HUMAINES PAR LES <i>ENTÉROVIRUS</i> .....	95
ARTICLE N°3: .....	97
“SPECIFIC PRODUCTION OF CC OR CXC CHEMOKINES BY HUMAN BRONCHIAL EPITHELIAL CELLS AND EOSINOPHILS INFECTED BY RESPIRATORY ENTEROVIRUSES” .....	98
DISCUSSION GENERALE .....	129
CONCLUSION GENERALE .....	144
PERSPECTIVES .....	146
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	148
ANNEXES.....	204
ANNEXE 1 : .....	205
“ AUTRES TRAVAUX CONCERNANT LES INFECTIONS À ENTÉROVIRUS PUBLIÉS PAR LE CANDIDAT” .....	205
ANNEXE 2 : .....	206
“ PROJET DE RECHERCHE POST DOCTORAL SUR LES INFECTIONS RESPIRATOIRES PAR LES ENTÉROVIRUS HUMAINS ” .....	206

## **Tableaux**

---

### Tableau 1

Classification actuelle des Picornaviridae.....page 6

### Tableau 2

Localisation des sites antigéniques de neutralisation des poliovirus .....page 9

### Tableau 3

Récepteurs cellulaires des picornavirus.....page 22

### Tableau 4

Spectre d'hôte et tropisme cellulaire des entérovirus humains .....page 44

### Tableau 5

Principaux syndromes cliniques associés aux entérovirus humains .....page 49

### Tableau 6

Etiologies virales lors des infections respiratoires basses.....page 56

### Tableau 7

Données épidémiologiques et cliniques des infections à entérovirus.....page 64

## **Figures**

---

### Figure 1

Classification des entérovirus humains en 5 espèces ou génogroupes.....page 7

### Figure 2

Structure de la capsid des entérovirus .....page 11

### Figure 3

Modélisation en 3 dimension de la capsid des entérovirus ..... page 13

### Figure 4

Organisation génomique des entérovirus..... page 15

### Figure 5

Représentation schématique de la structure secondaire de la région 5'NC..... page 15

### Figure 6

Cycle de répliation du poliovirus dans la cellule humaine.....page 19



Figure 7	
Représentation des différents récepteurs des picornavirus.....	page 21
Figure 8	
Mécanismes théoriques de libération du génome des poliovirus dans le cytoplasme .....	page 24
Figure 9	
Mécanismes théoriques de décapsidation lors d'endocytose.....	page 25
Figure 10	
Représentation schématique du cycle de réplication intracellulaire ....	page 26
Figure 11	
Représentation schématique du mécanisme le plus probable de recombinaison génétique .....	page 33
Figure 12	
Schéma représentatif de la synthèse et de l'assemblage des protéines de la capsidie des entérovirus .....	page 37
Figure 13	
Modes de transmission des entérovirus humains .....	page 39
Figure 14	
Répartition par tranche d'âge de la mortalité associée aux infections par les entérovirus.....	page 42
Figure 15	
Physiopathologie de l'infection par les entérovirus humains.....	page 43
Figure 16	
Distribution annuelle de la circulation de deux sérotypes épidémiques.....	page 59
Figure 17	
Répartition annuelle de la circulation de deux sérotypes endémiques .....	page 61
Figure 18	
Photographies d'effet cytopathique induit par les entérovirus sur des cultures cellulaires.....	page 66
Figure 19	
Arbre phylogénique de différentes régions du génome des entérovirus .....	page 71

## Abréviations

**S** : Coefficient de sédimentation

**3Dpol** : *Picornaviridae RNA-dependent RNA polymerase*

**A°** : Angström

**Aa** : Acides aminé

**Ac** : Anticorps

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**ADNc** : Acide désoxyribonucléique complémentaire

**Ag** : Antigène

**ARN** : Acide ribonucléique

**Ca<sup>2+</sup>** : Ion bivalent calcique

**CAR** : *Coxsackievirus-adenovirus receptor*

**CDC** : *Centers for disease control and prevention*

**CMH** : Complexe majeur d'histocompatibilité

**CNR** : Centre nationale de référence

**CV-A** : Coxsackievirus A

**CV-B** : Coxsackievirus B

**DAF** : *Decay accelerating factor*

**E** : Echovirus

**EAAT<sub>2</sub>** : *excitatory amino acid transporter2*

**ECP** : Effet cytopathogène

**eIF** : Facteur d'initiation de la transcription

**ENA-78** : *Epithelial neutrophil activating peptide-78*

**EV** : Entérovirus

**Fc** : Fragment peptidique d'une immunoglobuline

**ICAM-1** : *Intracellular adhesion molecule*

**ICTV** : *International committee on taxonomy of Viruses*

**IFN** : Interféron

**Ig** : Immunoglobuline

**IL-17** : Interleukine 17

**IL-8** : Interleukine 8

**InVS** : Institut de veille sanitaire

**IP-10** : *IFN-gamma-inducible protein 10*

**IRES** : *Internal ribosomal entry site*

**kDa** : Kilodalton

**LBM** : Lin et Benyesh-Melnick

**LCMV** : Virus de la chorioméningite lymphocytaire

**LDLR** : *Low density lipoprotein receptor*

**MCP-1** : *Monocyte chemotactic protein-1*

**NC** : Non codante

**NSP** : *Non structurale protein*

**Nt** : Nucléotides

**OMS** : Organisation mondiale de la santé

**ORF** : *Open reading Frame*

**ORL** : Oto-rhino-laryngologie

**PCBP** : *Poly r<sup>©</sup>-binding protein*

**PCR** : *Polymerase chain reaction*

**pro** : Protéase

**PV** : Poliovirus

**PVR** : *Poliovirus receptor*

**RSE** : Réseau de surveillance des entérovirus

**RT** : *Reverse transcription*

**SLA** : Sclérose latérale amyotrophique

**SVDV** : *Swine vesicular disease virus*

**TCD4** : Lymphocytes T CD4

**TCD8** : Lymphocytes T CD8

**TLR** : *Toll-like receptor*

**UNICEF** : United nations children's fund

**VP 1-2-3-4** : Protéine virale 1-2-3-4

**VPg** : Protéine virale génomique

***INTRODUCTION GENERALE***

Les entérovirus sont des agents pathogènes très communs en médecine humaine et responsables d'environ 1 milliard d'infections asymptomatiques chaque année dans le monde (Palacios & Oberste, 2005 ; Racaniello, 2007). Le genre *Enterovirus* de la famille des *Picornaviridae*, est constitué de petits virus non enveloppés à ARN simple brin de polarité positive (Racaniello, 2007). Il comprend actuellement 89 sérotypes pathogènes pour l'Homme, répartis en 5 espèces d'une classification en permanente évolution grâce à l'apport des outils moléculaires (Junttila *et al.*, 2007 ; Oberste *et al.*, 2007). Même si la majorité des infections à entérovirus est asymptomatique, ces pathogènes ubiquitaires sont responsables de syndromes infectieux variés, dont le pronostic dépend de la dose infectieuse, de l'organe cible, de l'âge, du sexe et du statut immunitaire de l'individu (Andréoletti, 2003 ; Hot *et al.*, 2003). Le virus pénètre dans l'organisme par voie oropharyngée ou par voie digestive après ingestion d'aliments ou d'eau souillés (contamination de type fécale-orale), mais également par voie aérienne à partir d'aérosols (Andréoletti, 2003 ; Hot *et al.*, 2003). Les infections à entérovirus sont responsables de pathologies neurologiques, cardiaques, musculaires, cutanées et muqueuses mais également d'infections néonatales ainsi que d'infections respiratoires hautes (rhinites, laryngites, pharyngites) et basses (bronchites, pneumonies, bronchiolites) (Chonmaitree *et al.*, 1995 ; Mc Carthy *et al.*, 2000).

Deux études de cohorte de nourrissons ou de jeunes enfants hospitalisés pour bronchiolite, ont détecté et identifié par RT-PCR (transcription inverse et réaction de polymérisation en chaîne), la présence du génome des entérovirus dans 8 et 25 % des échantillons de sécrétions respiratoires (Andréoletti *et al.*, 2000; Jartti T *et al.*, 2004). Les résultats de ces précédentes études cliniques indiquaient, que les entérovirus seraient l'une des trois premières causes virales de la bronchiolite infantile avec le Virus Respiratoire Syncytial (VRS) et les rhinovirus. Cependant, l'importance épidémiologique ainsi que les caractères cliniques et les mécanismes physiopathologiques des infections respiratoires basses à entérovirus restaient peu étudiés, voire totalement inconnus.

Récemment, l'identification de nouveaux sérotypes d'entérovirus ainsi que d'entérovirus non polio recombinants (virus mosaïques), suggère que de nouveaux entérovirus pourraient émerger et être responsables d'épidémies caractérisées par de nouvelles manifestations cliniques dont des syndromes respiratoires. Il devient donc important de préciser l'importance épidémiologique

ainsi que l'impact clinique de ces virus à tropisme en pathologie humaine, mais aussi de mieux connaître leur caractéristiques physiopathologique ainsi que leurs caractères génétiques et phénotypiques.

Ce travail de thèse s'est attaché à préciser dans un premier temps, les données épidémiologiques, virologiques et cliniques des infections humaines à entérovirus en pédiatrie. Dans une deuxième phase de notre travail, nous avons étudié en utilisant des modèles *in vitro*, les mécanismes virologiques ainsi que les processus inflammatoires liés à l'infection des cellules épithéliales pulmonaires humaines par des entérovirus à tropisme respiratoire.

Les retombées de ce travail de thèse concernent la prévention et le traitement des infections respiratoires basses à entérovirus en pédiatrie, par l'utilisation de molécules ou de stratégies antivirales bloquant une des phases spécifiques de la réplication intracellulaire des entérovirus à tropisme respiratoire. Par ailleurs, ces entérovirus à tropisme respiratoire pourraient également être impliqués dans les mécanismes «d'hyper-réactivité bronchique» impliqués dans la survenue de la bronchiolite et dans le développement de l'asthme infantile.

***DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES***

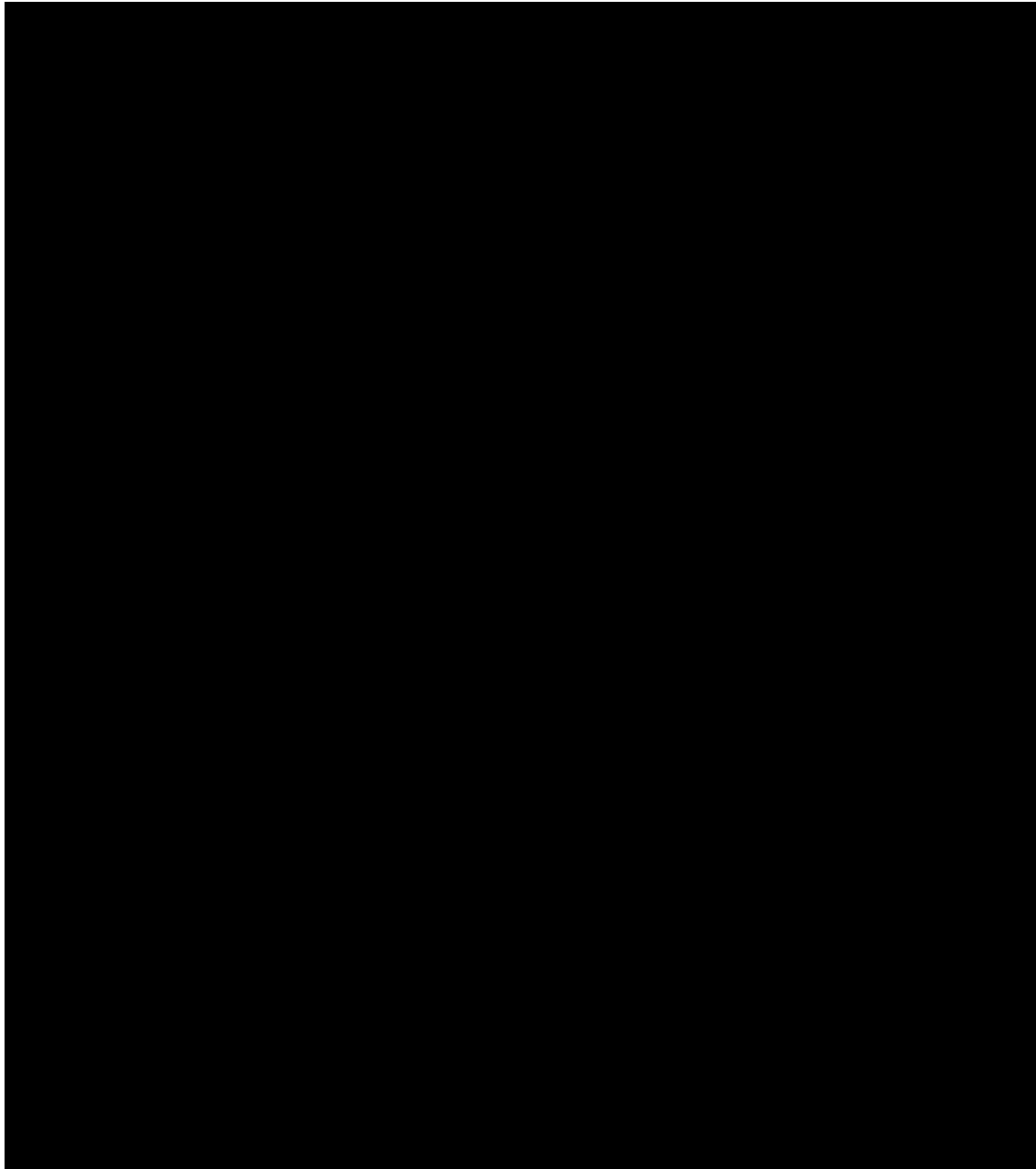
## 1. LES ENTÉROVIRUS

### 1.1. DÉFINITION

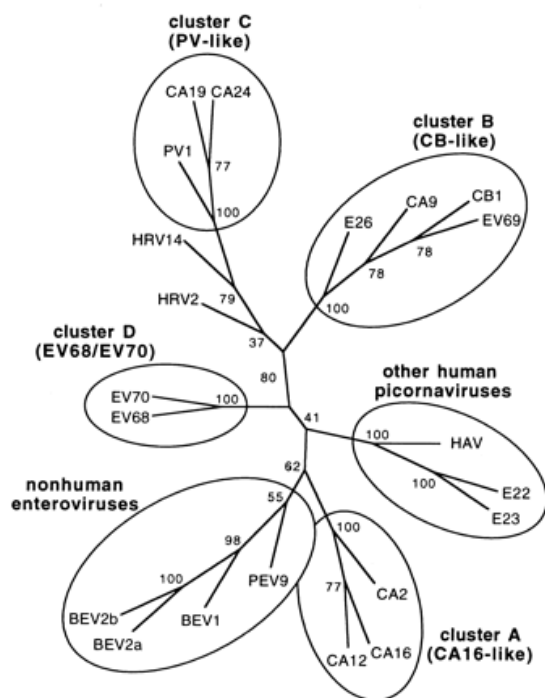
La famille des *Picornaviridae* regroupe des virus relativement proches, constitués de 9 genres (*entero-*, *rhino-*, *cardio-*, *aphto-*, *hepato-*, *parecho-*, *erbo-*, *kobu-* et *teschovirus*) (**Tableau 1**). En 1963, le genre *Enterovirus* a été créé afin de regrouper les trois sérotypes de poliovirus (PV1-3), les coxsackievirus A (21 sérotypes actuellement) et B (6 sérotypes actuellement) (CV-A et CV-B), les entérovirus (EV) (34 sérotypes actuellement) et les echovirus (E) (28 sérotypes actuellement) (Melnick *et al.*, 1963). Les entérovirus dits « humains » (c'est-à-dire pouvant infecter l'Homme) sont répartis en 5 espèces: les poliovirus et les entérovirus des espèces A, B, C et D (Oberste *et al.*, 2001 ; Stanway *et al.*, 2005, Racaniello, 2007) (**Figure 1**).

La terminologie de *Picorn* est un acronyme synthétique employé pour « poliovirus, insensitivity to ether, coxsackievirus, orphan virus, rhinovirus, ribo nucleic acid », mais également pour regrouper sous un même terme de petits (du grec, *pico*,  $10^{-12}$ ) virus à ARN (*RNA-virus*). La famille des *Picornaviridae* a été officialisée en 1974 par le Comité de Nomenclature des Virus (actuellement Comité International de Taxonomie des Virus -ICTV-), qui désigne des virus humains et animaux, non enveloppés dont le génome est un ARN simple brin de polarité positive. La famille des *Picornaviridae* regroupait alors 5 genres : les *Enterovirus*, *Rhinovirus*, *Cardiovirus*, *Hépatovirus* et *Aphtovirus* (Minor *et al.*, 1995). Cette classification établie initialement sur la base de données issue de la culture cellulaire est, depuis quelques années, en constante évolution consécutivement à l'acquisition des données issues de la biologie moléculaire. Le genre *Enterovirus* réunit à l'heure actuelle 116 sérotypes, dont 89 sont strictement humains. Les entérovirus humains provoquent une grande diversité de pathologies chez l'Homme.

**Tableau 1** : Classification actuelle des *Picornaviridae*. D'après Stanway, 2005 (Eigth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses) et le Groupe de travail des *Picornaviridae* (<http://www.picornastudygroup.com>).







**Figure 1.** Répartition des entérovirus humains en 5 espèces ou génogroupes obtenue par l'analyse phylogénique d'une partie de la boucle BC du gène codant la protéine de capsid VP1. La proximité génétique évidente entre les poliovirus et les entérovirus de l'espèce C a abouti à leur rapprochement au sein d'une même espèce (Brown *et al.*, 2003). D'après Oberste *et al.*, 2001.

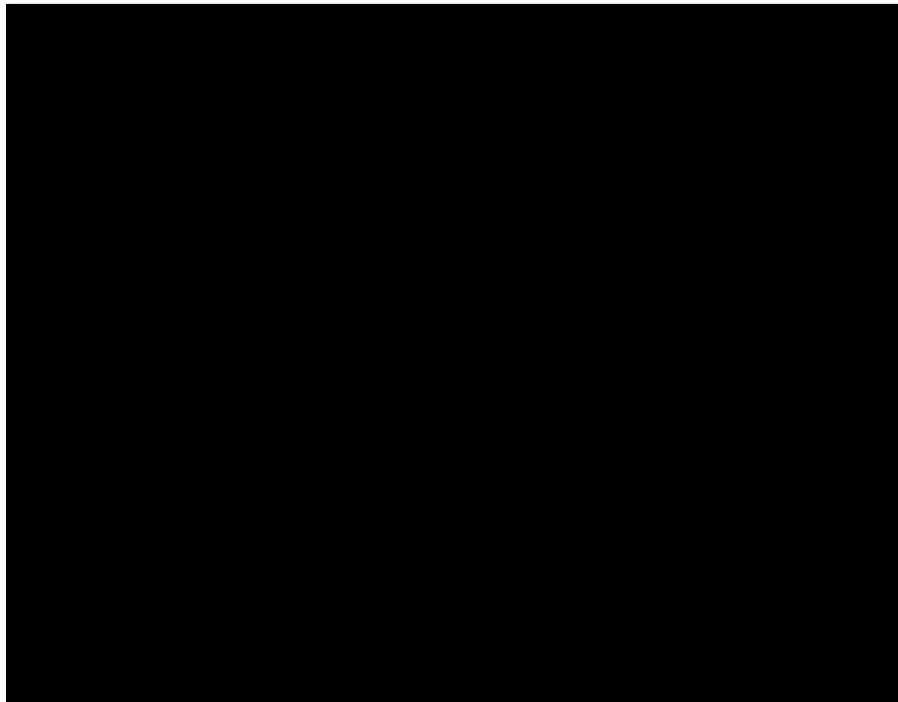
### 1.2. Une classification en constante évolution

La classification des *Enterovirus* a été initialement mise en place sur les propriétés antigéniques et pathogéniques, sur leur localisation géographique ainsi que sur leur capacité à infecter certaines lignées cellulaires. L'identification des souches d'entérovirus isolées chez l'Homme a été effectuée par des tests de séroneutralisation, utilisant des antigènes neutralisants spécifiques d'espèces (Hambling *et al.*, 1963 ; Melnick *et al.*, 1977). Cette classification a été rendue possible grâce à la reconnaissance des sites antigéniques présents sur les protéines de la capsid virale reconnus par les antigènes neutralisants (**Tableau 2**).

L'équipe de Marck Pallansch au CDC d'Atlanta (Center for Disease Control and prevention) a mis au point en 1999, une méthode d'identification des entérovirus par typage moléculaire basée sur l'amplification par RT-PCR (transcription inverse et réaction de polymérisation en chaîne) et le séquençage d'une portion du gène codant la protéine de capsid VP1 englobant la boucle BC (Oberste *et al.*, 1999b). Des méthodes semblables ont été développées par différentes équipes toujours sur la région VP1 (Caro *et al.*, 2001, Casas *et al.*, 2001, Norder *et al.*, 2001) et pour d'autres sur la région codant la protéine de capsid VP2 des entérovirus (Bousslama *et al.*, 2007 ; Nasri *et al.*, 2007). Certaines équipes, en plus de l'identification à partir de la séquence de la région VP1 ou VP2, réalisent un séquençage de la région 3Dpol pour étudier le phénomène de recombinaison génétique qui a été récemment identifié entre certains entérovirus non polio (Lukashev *et al.*, 2005, Lukashev *et al.*, 2008). L'identification d'une souche est rendue possible après comparaison de sa séquence avec celles des sérotypes d'entérovirus déjà répertoriés. L'approche moléculaire d'identification des entérovirus par séquençage d'une partie de la protéine VP1, permet de retrouver la classification en espèces et sérotypes qui avait été préalablement définie et mise en place par les tests sérologiques.

Tous les sérotypes connus du genre *Enterovirus* pouvant être amplifiés au niveau du gène codant la protéine de capsid VP1 et ensuite séquencés (Oberste *et al.*, 2000 ; Oberste *et al.*, 2003 ; Nix *et al.*, 2006), cette technique de typage moléculaire des souches d'entérovirus tend progressivement à remplacer la technique conventionnelle de séroneutralisation par les pools croisés de Melnick, permettant ainsi l'identification de souches non cultivables mais aussi de variants et de nouveaux sérotypes (Melnick *et al.*, 1977 ; Bailly *et al.*, 1996 ; Norder *et al.*, 2003).

**Tableau 2 :** Localisation des sites antigéniques de neutralisation du poliovirus (Minor *et al.*, 1986 ; Mateu, 1995)



Depuis 2001, 11 nouveaux sérotypes d'entérovirus ont ainsi été découverts : les entérovirus 73 à 78, 89 à 91, 93 et 94 (Oberste *et al.*, 2001 ; Norder *et al.*, 2003 ; Oberste *et al.*, 2004a ; Oberste *et al.*, 2005 ; Junttila *et al.*, 2007 ). Les entérovirus 76, 89, 90 et 91 ont été rattachés à l'espèce A, tandis que les entérovirus 77, 78 et 94 ont été classés dans l'espèce B. L'entérovirus 93 constitue le troisième membre de l'espèce D avec les entérovirus 68 et 70.

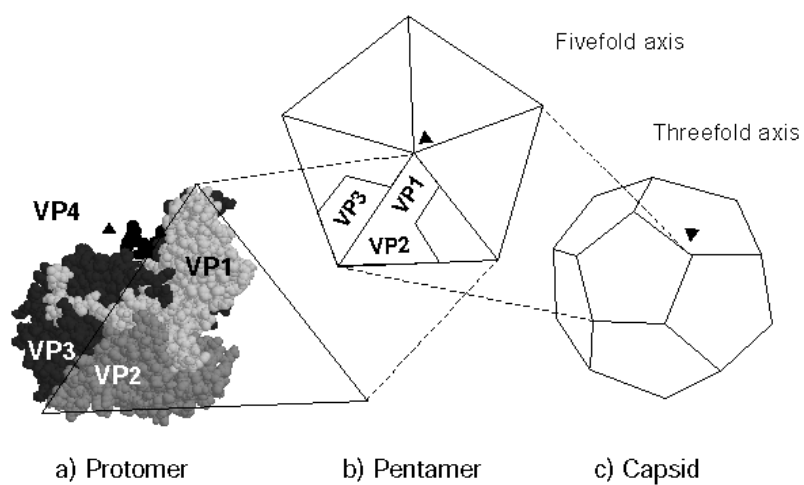
### 1.3. MORPHOLOGIE

Les entérovirus sont de petits virus ayant pour génome un ARN monocaténaire de polarité positive, c'est à dire un génome viral pouvant être directement traduit en protéines virales. Les entérovirus ont une capsidie icosaédrique (polyèdre régulier à 12 sommets et 20 faces qui sont des triangles équilatéraux) à symétrie cubique, de 24 à 30 nm de diamètre, d'un poids de  $8 \times 10^6$  à  $9 \times 10^6$  daltons, et sans enveloppe lipido-protéique (**Figure 2**). Leur densité est d'environ 1.32 à 1.35 g/cm<sup>3</sup>, et leur coefficient de sédimentation varie de 150 à 160 Svedberg. De nombreux aspects de la pathologie, de la transmission et de l'épidémiologie des entérovirus sont liés à leur grande résistance.

Ils sont en effet résistants aux désinfectants classiques tels que l'éthanol à 70°, l'isopropanol et les ammoniums quaternaires. Ces virus nus sont également insensibles aux solvants des lipides (éther et chloroforme), et aux acides faibles d'où leur adaptation au système digestif. Le formol, le glutaraldéhyde, les acides forts et l'hypochlorite de sodium permettent d'inactiver les entérovirus (Melnick, 1996).

#### 1.3.1. STRUCTURE DE LA CAPSIDIE

Le génome des entérovirus est emballé dans une structure protéique appelée capsidie (du mot grec *capsa* qui signifie boîte). On appelle nucléocapsidie la structure compacte formée par l'assemblage de la capsidie autour du génome.



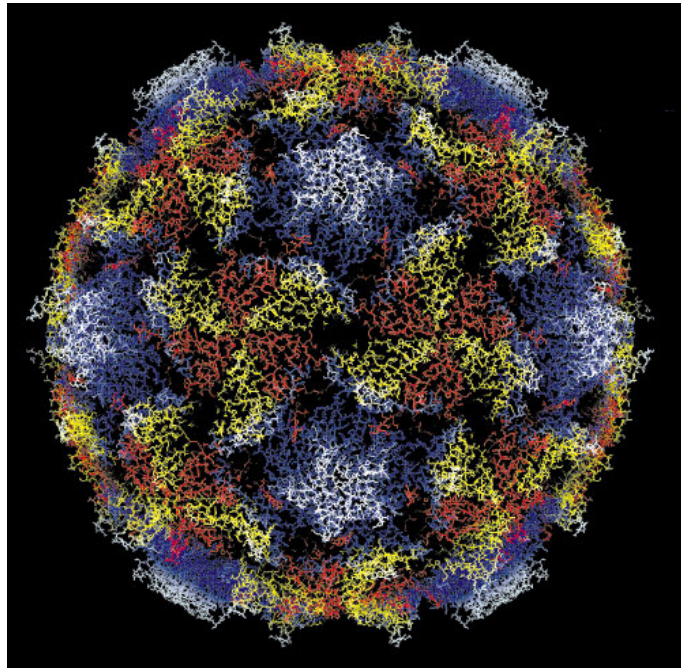
**Figure 2.** Structure de la capsid des entérovirus. Les protéines VP1, 2 et 3 constituent la surface du virus tandis que VP4 est interne. Le *canyon* entourant l'axe de symétrie 5 est bordé au nord par VP1 et au sud par VP3 et VP2. D'après Rueckert, 1996.

La capsid des entérovirus est composée de 60 protomères identiques, ou capsomères, chacun formé de 4 protéines structurales : VP1 (34 kDa), VP2 (30 kDa), VP3 (26 kDa) et VP4 (7 kDa) (Rueckert, 1996). VP1, VP2 et VP3 présentent des structures tridimensionnelles relativement homologues (Hogle *et al.*, 1985 ; Filman *et al.*, 1989 ; Belnap *et al.*, 2000a), caractérisées par 2 hélices  $\alpha$  et 8 feuillets  $\beta$  plissés, antiparallèles et reliés entre eux par des boucles de connexion, formant ainsi la surface de la capsid alors que VP4 tapisse la face interne. La surface de la capsid virale est caractérisée par la présence de dépressions dont une, d'une profondeur de 25 Å et entourant les axes de symétrie d'ordre 5, est appelée « canyon » et correspond au site d'attachement des entérovirus à leurs récepteurs cellulaires (**Figure 2**) (Colston & Racaniello, 1995 ; He *et al.*, 2000). L'étude par microscopie électronique et par cristallographie des protéines de la capsid des entérovirus a permis d'obtenir la structure tridimensionnelle (**Figure 3**). Cette structure a permis de comprendre les différents rôles de la capsid :

- Protéger le génome viral des nucléases de l'environnement,
- Reconnaître un récepteur cellulaire spécifique,
- Porter à sa surface les déterminants antigéniques,
- Contenir les informations pour l'encapsidation du génome viral et la maturation des virions,
- Libérer le génome viral dans les cellules hôtes infectées (Rueckert, 1996).

### 1.3.2. STRUCTURE DU GÉNOME

Le premier génome de Picornavirus cloné et séquencé fut celui du poliovirus de type 1 (Kitamura *et al.*, 1981). L'organisation génomique alors décrite s'avéra par la suite extrêmement conservée au sein de cette famille virale, avec cependant une grande variabilité dans la taille du génome et la séquence nucléotidique (Rueckert, 1996).



---

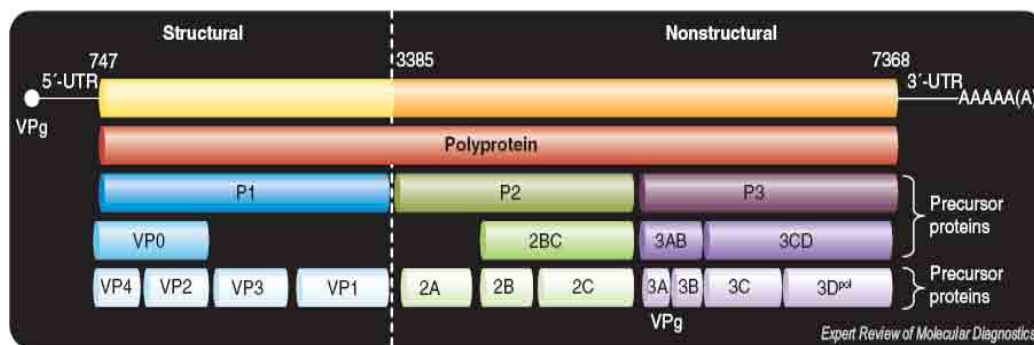
**Figure 3.** Modélisation en 3 dimensions par microscopie électronique et par cristallographie de la structure de la capsid des entérovirus : vue extérieure de la capsid virale. Les protéines de capsid VP1, VP2 et VP3 sont représenté respectivement en bleu, jaune et rouge. Les boucles de la protéine VP1 exposées à la surface forment des plateaux en forme d'étoile autour des axes de symétrie 5. Le *canyon* apparaît comme une dépression autour de ces plateaux (D'après Wien *et al.*, 1996).

Le génome des entérovirus est un ARN monocaténaire, non coiffé, de polarité positive d'environ 7500 nucléotides qui porte à son extrémité 3' une chaîne polyadénylée et à son extrémité 5' une protéine appelée VPg (Virion Protein Genome linked). L'ARN est dit « infectieux » parce qu'il peut être directement traduit en protéines virales nécessaires à la réplication dès sa libération dans la cellule. La région 5' non codante (5'NC) de taille variable (environ 740 nucléotides) comporte différentes séquences « hyper conservées » intervenant dans le contrôle de la traduction et de la réplication du génome viral. Cette région est caractérisée par une structure secondaire extrêmement complexe. A l'extrémité 3' se trouve une autre région non codante (3'NC), d'environ 90 nucléotides, impliquée dans les mécanismes de réplication du brin de polarité négative. Entre les deux régions non codantes terminales, se trouve une phase unique de lecture ouverte (ORF = Open Reading Frame), qui est traduite en une polyprotéine unique et qui après clivages enzymatiques successifs, donnera l'ensemble des protéines structurales et non structurales nécessaires à la réplication et la constitution du virus (**Figure 4**) (Rueckert, 1996 ; Andréoletti *et al.*, 1999).

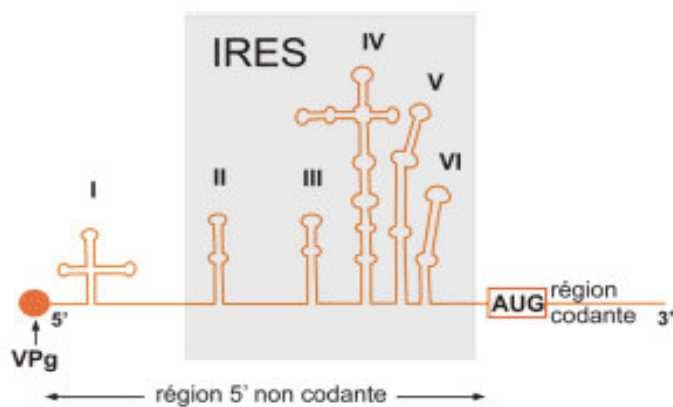
- La région 5' non codante (5'NC) :

Cette région est constituée d'environ 750 nucléotides, qui représentent 10% du génome des entérovirus. La séquence des 650 premiers nucléotides de la région 5'NC est très conservée dans le genre *Enterovirus* ; cette zone conservée présente un intérêt pour la détection moléculaire du genre entérovirus (Kitamura *et al.*, 1981 ; Toyoda *et al.*, 1984). Grâce à différentes études et modélisation, on sait que la région 5'NC a une structure secondaire complexe divisée en 6 domaines (I-VI) et qu'elle est impliquée dans les processus de régulation de mécanismes de réplication et de traduction de l'ARN viral (Skinner *et al.*, 1989 ; Agol, 1991 ; Rohll *et al.*, 1994). Le défaut de coiffe en 5' de l'ARN viral fait que la traduction du génome en polyprotéine est sous le contrôle d'une structure appelée RLP (« Ribosome Landing Pad ») ou IRES (« Internal Ribosome Entry Site »), constituée par les 450 nucléotides terminaux de la région 5'NC (Pelletier & Sonenberg, 1988 ; Rohll *et al.*, 1994). Les 100 premiers nucléotides vont fixer la protéine VPg et donnent aussi la structure secondaire en forme de trèfle du domaine I qui a un rôle dans la réplication du brin d'ARN de polarité positive, car il est reconnu par le complexe RNP (ribonucléoprotéique).





**Figure 4.** Organisation génomique des entérovirus. La région codante est entourée de 2 régions non codantes en 5' et 3' impliquées dans la régulation de la répllication et de la traduction. Elle code, elle-même, des protéines structurales (les 4 protéines de capsidite) et des protéines non structurales (protéases et polymérase) (D'après Nasri *et al.*, 2007).



**Figure 5.** Représentation schématique de la structure secondaire de la région 5'NC du génome des entérovirus (modèle du poliovirus). Les six structures secondaires de la région 5'NC sont notées de I à VI. Le domaine I représente la structure « feuille de trèfle ». Le site d'initiation interne de la traduction (IRES de type I) est délimité en gris (D'après Mammette, 2002).

L'IRES serait également impliquée dans la réplication du génome viral, via des signaux agissant en cis (Borman *et al.*, 1994) (**Figure 5**). Svitkin, en 1985, a montré que le domaine V de l'IRES porte les 3 mutations impliquées dans l'atténuation des souches vaccinales du poliovirus *Sabin*.

- La région 3' non codante (3' NC) :

Cette région non codante du côté 3' a une taille variable en fonction des différents sérotypes ; de 60 nts pour le poliovirus à 100 nts pour les coxsackievirus B. Plusieurs études semblent montrer que cette région serait impliquée dans l'initiation de la réplication de l'ARN viral (Jacobson *et al.*, 1993 ; Pierangeli *et al.*, 1995 ; Pilipenko *et al.*, 1996). Cette initialisation pourrait être contrôlée par la structure secondaire complexe (3 domaines en « épingle à cheveux ») via l'interaction de 2 boucles en épingles (Melchers *et al.*, 1997) ou par l'intermédiaire de la structure tertiaire en « pseudo-nœud » (Jacobson *et al.*, 1993 ; Mirmomeni *et al.*, 1997). Cette région 3'NC se termine par une séquence polyadénylée d'environ 75 nts. La fonction exacte de cette séquence polyadénylée est pour le moment encore mal connue, mais elle semble néanmoins impliquée dans le processus de réplication du génome et joue un rôle dans l'infectivité de l'ARN génomique (Sarnow, 1989).

- La phase ouverte de lecture :

Cette région du génome qui correspond à la phase de lecture est de taille relativement conservée et code la polyprotéine virale d'environ 250 kDa. Cette polyprotéine va être clivée par différentes protéases, générant alors 11 protéines virales. Elle est divisée en trois régions, P1, P2 et P3, correspondant aux trois précurseurs des protéines virales (**Figure 4**).

**La région P1** va donner naissance aux protéines structurales qui vont former la capsid du nouveau virus, VP4, VP2, VP3, et VP1 dans cet ordre sur le précurseur. La région P1 est libérée du reste de la polyprotéine par la protéase 2A. Ce précurseur est à son tour clivé en VP0, VP3 et VP1 par la protéase 3D, VP0 donnant ultérieurement VP4 et VP2 lors de l'assemblage du virion (Arnold *et al.*, 1987).

**Les régions P2 et P3** vont donner les protéines dites non structurales qui sont les enzymes nécessaires aux virus (clivage de la polyprotéine, réplication du génome et inhibition des fonctions cellulaires) (Porter, 1993 ; Pallansch & Roos, 2007). P2 est le précurseur des protéines 2A, 2B et 2C, et P3 le précurseur des protéines 3A, 3B, 3C et 3D.

- *La protéine 2A* est une protéase, libérée de manière autocatalytique de la polyprotéine virale (Hellen, *et al.*, 1992). Elle est ensuite impliquée dans le clivage protéolytique du précurseur 3CD, et participe également à la réplication de l'ARN viral (Lee & Wimmer, 1988 ; Molla *et al.*, 1993). Au niveau cellulaire, 2A est responsable du « shut-off » de la synthèse des protéines cellulaires par clivage protéolytique de la protéine p220 constituant le facteur d'initiation de traduction eucaryotique 4G, (eIF4-G, pour eucaryotique *Initiation Factor* 4G) (Hellen, *et al.*, 1992).
- *La protéine 2B* semble jouer un rôle structural dans les complexes de réplication virale (Johnson & Sarnow, 1991), dans le blocage des processus de sécrétion des protéines cellulaires au niveau du réticulum endoplasmique (Doedens & Kirkegaard, 1995), et dans la perturbation de l'intégrité membranaire de l'appareil de Golgi (Sandoval & Carosco, 1997).
- *La protéine 2C* interviendrait surtout au cours de l'initiation de la synthèse de l'ARN de polarité négative (Barton & Flanagan, 1997). Elle contient le site de résistance à la guanidine, une drogue inhibant la réplication entérovirale (Baltera & Tershak, 1992).
- *La protéine 3AB* participe à la réplication du génome viral (Xiang *et al.*, 1995). La protéine 3A pourrait intervenir dans l'inhibition de la communication réticulo-golgi (Doedens *et al.*, 1997), ainsi que dans l'effet cytopathique viro-induit (Lama *et al.*, 1998). La protéine 3B (VPg) est uridylée en VPg-pU(pU) et participe directement sous cette forme à la réplication du génome viral en servant d'amorce à l'ARN polymérase-ARN dépendante (Paul *et al.*, 1998).
- *La protéine 3CD* est impliquée dans les processus protéolytiques permettant la maturation des protéines structurales (Ypma-Wong *et al.*, 1998), ainsi que dans la réplication virale (Andino *et al.*, 1993). La protéine 3C est la protéase majeure responsable des clivages protéolytiques au sein des précurseurs P2 et P3 (Hanecak *et al.*, 1982). Elle serait également responsable du clivage d'un certain nombre de protéines cellulaires tels que le facteur de transcription TFIIC, la TATA-binding protein TBP, le facteur de transcription CREB et le facteur oct-1, cela ayant pour conséquence directe l'inhibition de la transcription cellulaire assurée par les ARN polymérases I, II, et III (Rubinstein *et al.*, 1992). La protéine 3D est l'ARN

polymérase-ARN dépendante, responsable de la synthèse des ARN positifs et négatifs (Neufeld *et al.*, 1991).

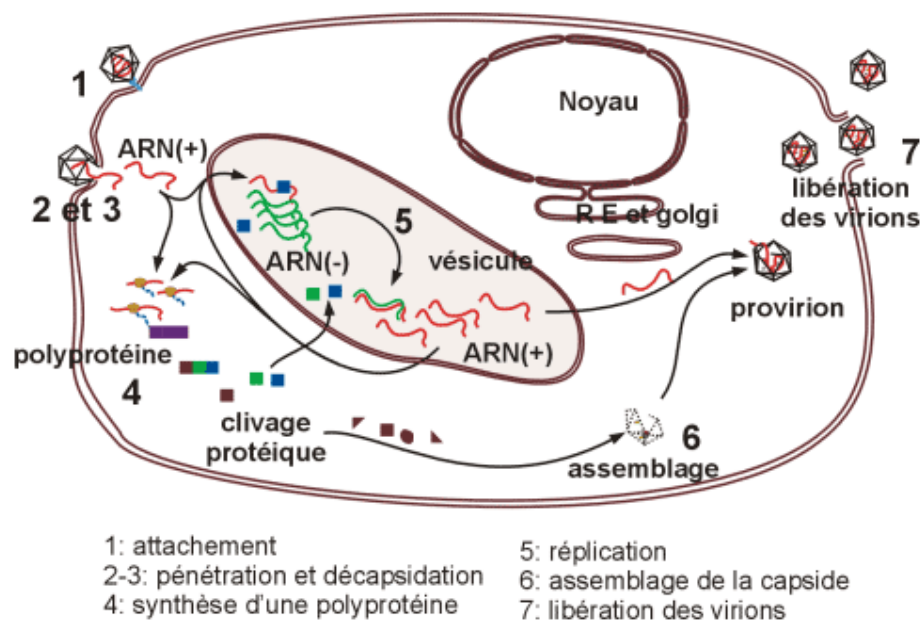
## **2. CYCLE DE MULTIPLICATION DES *ENTEROVIRUS* DANS LA CELLULE CIBLE**

Les entérovirus ne contiennent pas d'enzymes biosynthétiques ou métaboliques : ce sont donc des parasites intracellulaires stricts dont les composants sont multipliés séparément, puis assemblés. (**Figure 6**).

Le cycle de réplication virale débute par l'attachement du virus à la cellule cible sur les récepteurs transmembranaires présentant une structure de type « immunoglobulin like » (Rotbart, 1992). Après pénétration du virus, le génome viral est libéré (décapsidation) pour être directement traduit par les polyribosomes cellulaires et former les protéines virales nécessaires à la réplication et à la formation de nouvelles particules virales. Le cycle complet de réplication virale se déroule en 5 à 10 heures en moyenne dans le cytoplasme de la cellule infectée. Le cycle de multiplication des entérovirus s'achève par la lyse de la cellule et la libération des nouveaux virions (Racaniello, 2007).

### **2.1. MÉCANISMES D'ATTACHEMENT DES *PICORNAVIRUS* À LEURS RÉCEPTEURS CELLULAIRES**

L'attachement du virus à la cellule cible dépend d'un récepteur transmembranaire présentant dans un grand nombre de cas une structure de type « immunoglobulin-like ». Les virus ne sont capables d'infecter que les cellules à la surface desquelles ils peuvent se fixer. Les structures interagissant avec le récepteur sont des projections ou des dépressions de la capsid. L'attachement entre le virus et la cellule cible se produit entre les protéines de la capsid virale et celles du récepteur de la cellule et ceci par un phénomène électrostatique (Minor, 2004). Le site de liaison des entérovirus est localisé dans le *canyon*. Une liaison non spécifique du virus au co-récepteur cellulaire va permettre le contact entre l'entérovirus et son récepteur via le *canyon* et l'entrée du virus dans la cellule (Minor,2004).



**Figure 6.** Cycle de réplication du poliovirus dans la cellule humaine. L'infection débute par l'attachement du virus à son récepteur responsable de changements de conformation de la capsid permettant la libération de l'ARN viral dans le cytoplasme où il est aussitôt répliqué et traduit. La traduction du génome aboutit à la formation d'une longue polyprotéine secondairement clivée par des protéases virales. L'assemblage du virus se produit à mesure de la maturation de la polyprotéine à travers une série d'étapes successives : le protomère, le pentamère, la capsid vide, le provirion et enfin, le virus. (D'après Mammette, 2002).

La spécificité entre la capsid virale et le récepteur ainsi que son expression tissulaire déterminent le tropisme d'un virus caractérisant en partie son pouvoir pathogène et la maladie dont il est la cause. Pour la pénétration intracellulaire certains entérovirus ont besoin d'un co-récepteur fixant la particule à la surface cellulaire et facilitant l'interaction avec le récepteur principal indispensable à l'internalisation (Minor, 2004). La nature exacte des récepteurs des entérovirus est restée méconnue jusqu'en 1989, date de la découverte du récepteur des poliovirus (Greve *et al.*, 1989 ; Mendelsohn *et al.*, 1989 ; Staunton *et al.*, 1989) (**Figure 7**). Il existe actuellement plusieurs récepteurs qui permettent l'entrée des entérovirus dans les cellules hôtes (**Tableau 3**):

**CAR** (*Coxsackievirus and Adenovirus Receptor*) est un récepteur qui permet l'entrée dans la cellule des coxsackievirus mais aussi des adénovirus. Ce récepteur est constitué de deux domaines extracellulaires de type immunoglobuline et d'un domaine transmembranaire.

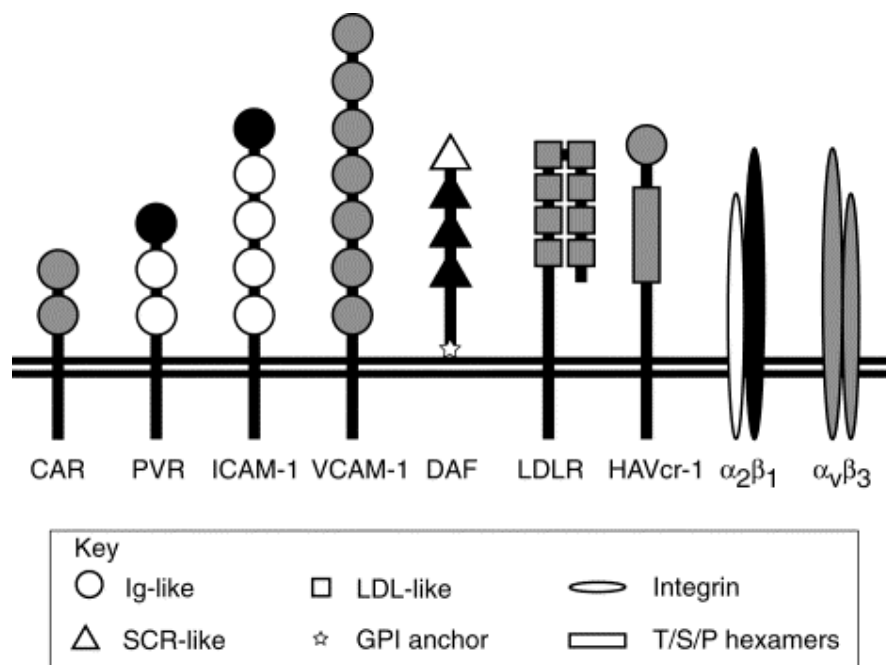
**PVR** (*Polio Virus Receptor*) ou CD155 est le récepteur commun à tous les poliovirus. Récepteur de la famille des immunoglobulines, c'est une glycoprotéine transmembranaire permettant la fixation du poliovirus aux cellules cibles. Une étude en 2000 a montré que *PVR* est impliqué dans la polarisation de la moelle épinière et dans la différenciation des motoneurones, ce qui pourrait expliquer le tropisme du poliovirus.

**ICAM-1** (*IntraCellular Adhesion Molecular 1*): ce récepteur de la famille des immunoglobulines est celui des coxsackievirus A21 et A13, mais surtout de la majorité des rhinovirus. C'est une protéine transmembranaire avec 5 domaines extracellulaires. L'interaction virus/ICAM-1 est localisée la plupart du temps sur le premier domaine de type immunoglobuline (McClelland *et al.*, 1991)

**DAF** (*Decay Accelerating Factor*): cette protéine joue plutôt un rôle de co-récepteur car DAF ne suffit pas à l'infection des cellules. La présence d'un autre récepteur comme CAR ou ICAM-1 est nécessaire pour permettre au virus d'infecter les cellules cibles.

**L'intégrine  $\alpha_2\beta_1$**  (*VLA-2 Very Late Antigen 2*): cette intégrine ayant pour ligand naturel le collagène, peut servir de récepteur à l'échovirus 1 car celui-ci a une structure capsidale reconnaissant la sous-unité  $\alpha_2$  (Ohman *et al.*, 2001)

**L'intégrine  $\alpha_v\beta_3$** . C'est le récepteur cellulaire du coxsackievirus A9 ; celui-ci se fixe après reconnaissance du tri peptide RGD (arginine-glycérine-aspartate).



**Figure 7.** Représentation des différents récepteurs des picornavirus. VCAM : Vascular Cell Adhesion Molecule ; DAF : Decay Accelerating Factor ; LDL-R : Low Density Lipoprotein Receptor ; HAVcr-1 : Hepatitis A Virus receptor ;  $\alpha_2\beta_1$  : Very Late antigen (super famille des intégrines) ;  $\alpha_V\beta_3$  : Vitronectin receptor (super famille des intégrines) ; Ig-like : Immunoglobuline-like ; SCR-like : Short Consensus Repeat-like ; LDL-like : Low Density Lipoprotein-like ; GPI: Glycosylphosphatidylinositol ; T/S/P : Thréonine/Sérine/Proline. (D'après Evans & Almond, 1998).

## Données bibliographiques

**Tableau 3** : Récepteurs cellulaires des picornavirus (D'après Racaniello, 2007).

Virus	Récepteur	Nature	Co-récepteur	Références
<i>Genre Aphthovirus</i>				
Virus de la fièvre aphteuse (adapté sur cellules en culture)	Sulfates d'héparane	Glycosaminoglycanes		(Jackson <i>et al.</i> , 1996)
Virus de la fièvre aphteuse Encéphalomyocardite	$\alpha_v\beta_3, \alpha_v\beta_8$ Vcam-1 Glycophorine A sialylée (pour l' hémagglutination)	Intégrine Famille des immunoglobulines Glucide		(Neff <i>et al.</i> , 1998) (Huber, 1994)
<i>Genre Enterovirus</i>				
Poliovirus 1-3	Pvr	Famille des immunoglobulines		(Mendelsohn <i>et al.</i> , 1989)
Coxsackievirus A13, A18, A21	Icam-1	Famille des immunoglobulines		(Colonno <i>et al.</i> , 1986)
Coxsackievirus A21	Decay-accelerating factor (CD55)	Domaines SCR (système du complément)	Icam-1	(Shafren <i>et al.</i> , 1997a)
Coxsackievirus A9	$\alpha_v\beta_3, \alpha_v\beta_6$	Intégrine		(Roivainen <i>et al.</i> , 1994; Williams <i>et al.</i> , 2004)
Coxsackievirus B1-B6	CAR (coxsackievirus-adenovirus receptor)	Famille des immunoglobulines		(Bergelson <i>et al.</i> , 1997)
Coxsackievirus B1, B3, B5	CD55	Domaines SCR	$\alpha_v\beta_6$ -Intégrine	(Agrez <i>et al.</i> , 1997; Shafren <i>et al.</i> , 1995)
Echovirus 1, 8	$\alpha_2\beta_1$ -Intégrine (Vla-2)	Intégrine	$\beta_2$ -Microglobulin	(Bergelson <i>et al.</i> , 1992; Ward <i>et al.</i> , 1998)
Echovirus 3, 6, 7, 11-13, 20, 21, 24, 29, 33	CD55	Domaines SCR	$\beta_2$ -Microglobulin	(Bergelson <i>et al.</i> , 1994; Powell <i>et al.</i> , 1997 ; Ward <i>et al.</i> , 1998)
Enterovirus 70	CD55/acide sialique	Domaines SCR /Glucide		(Alexander et Dimock, 2002)
Enterovirus Bovins	Acide sialique	Glucide		(Zajac et Crowell, 1965)
<i>Genre Parechovirus</i>				
Parechovirus 1	$\alpha_v\beta_1, \alpha_v\beta_3$ (Récepteur de la vitronectine)	Intégrine		(Triantafilou <i>et al.</i> , 2000)
<i>Genre Hepatovirus</i>				
Hépatite A	HAVcr-1	Famille des Ig, mucine		(Kaplan <i>et al.</i> , 1996)
<i>Genre Rhinovirus</i>				
Rhinovirus groupe majoritaire (91 sérotypes)	Icam-1	Famille des immunoglobulines		(Greve <i>et al.</i> , 1989 ; Staunton <i>et al.</i> , 1989)
Rhinovirus groupe minoritaire (10 sérotypes)	Récepteur des Low-density lipoprotéines	Molécule de signalisation		(Hofer <i>et al.</i> , 1994)
Rhinovirus 87	Acide sialique	Glucide		(Uncapher <i>et al.</i> , 1991)



**LDLR** (*Low Density Lipoprotein Receptor*): c'est le récepteur d'environ 10 sérotypes de rhinovirus (le groupe mineur). Ces virus se fixent au récepteur via l'excroissance qui entoure le *canyon*.

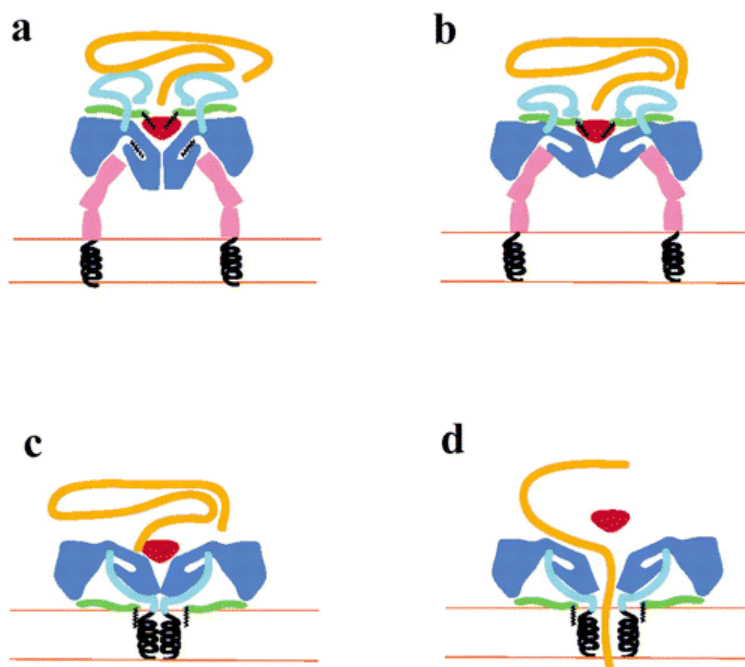
**HAVcr-1** (*Hepatitis A Virus cellular receptor 1*): ce récepteur permet au virus de l'hépatite A d'infecter les cellules cibles. Il présente à son extrémité N-terminale une région riche en cystéine ayant une forte homologie avec celle des immunoglobulines présentes dans certains des récepteurs des autres picornavirus.

## 2.2. L'ENTRÉE DANS LA CELLULE

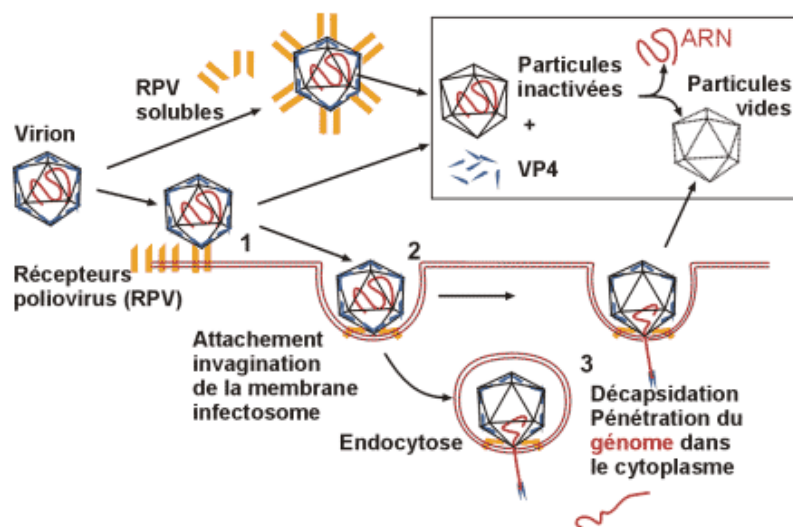
L'entrée du virus dans la cellule se fait par un mécanisme actif dépendant de la température, en transmettant un signal à travers la membrane cytoplasmique et en induisant des modifications de la structure protéique du virus pour permettre une libération plus facile du génome viral. Les entérovirus utilisent la stratégie de la ponction de la membrane, c'est-à-dire la formation d'un pore permettant au virus d'injecter son matériel génétique dans la cellule cible sans faire entrer la capsid (Figure 8) (Seth *et al.*, 1984 ; Belnap *et al.*, 2000b). L'extrémité N-terminale de la protéine VP1 hydrophobe, normalement interne à la capsid, se retrouve exposée à la surface et vient s'insérer dans la membrane cellulaire (Fricks et Hogle, 1990). Cette modification entraîne la formation d'un pore à travers lequel l'ARN sera injecté dans la cellule cible. Un autre modèle existe : une fois absorbé, le virus pénètre par endocytose dans la cellule. Dans ce cas, il y a formation d'un canal membranaire plasmique ou endosomal grâce à l'extrémité N-terminale des protéines VP1 et VP4. L'ARN viral est ensuite libéré dans le cytoplasme de la cellule (Racaniello, 2007) (Figure 9).

## 2.3. TRADUCTION DU GÉNOME VIRAL

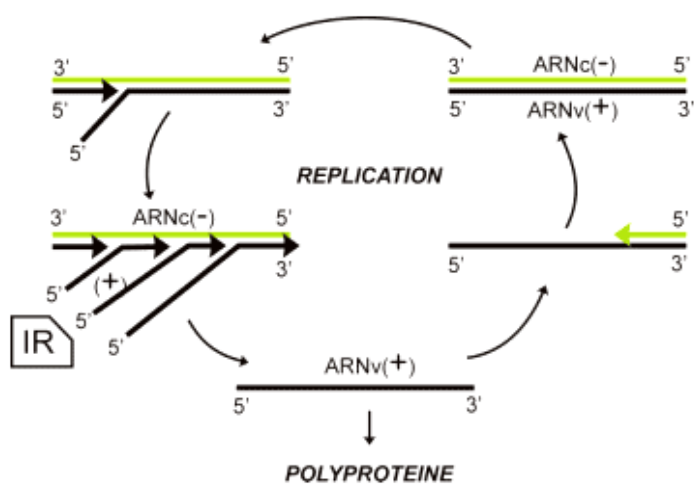
Après formation du pore membranaire, l'ARN viral est injecté dans le cytoplasme de la cellule. Cet ARN étant de polarité positive, il peut être traduit directement, après clivage de la protéine VPg (Figure 10).



**Figure 8.** Mécanisme théorique de libération dans le cytoplasme du génome des poliovirus par formation de pores dans la membrane cellulaire. (a) Le virus s'attache à son récepteur. Les trois domaines exposés de Pvr sont indiqués en rose tandis que les hélices transmembranaires d'ancrage à la membrane cytoplasmique apparaissent en noir. La capside du virus est bleue avec la poche hydrophobe en noir, l'extrémité N-terminale de la protéine VP1 en bleu clair, la valve formée par la protéine VP3 en rouge, la protéine VP4 en vert et l'ARN viral en orange. (b) A 37°C, l'interaction virus/récepteur induit une modification de la structure de la capside virale déplaçant le composé lipidique de la poche hydrophobe. (c) Les changements de conformation de la particule virale se traduisent par l'insertion de l'extrémité N-terminale de la protéine VP1 et de l'acide myristique de la protéine VP4 dans la membrane cellulaire entraînant la formation d'un tunnel. (d) Un afflux brutal d'ions calcium aboutit à une dilatation de la capside déplaçant provisoirement le cylindre formé par la protéine VP3 et libérant l'ARN viral dans la cellule. (D'après Hogle, 2002).



**Figure 9:** Les travaux récents suggèrent que les entérovirus ont recours à une ou plusieurs voies d'endocytose lors de l'infection. Le mécanisme de décapsidation et de libération du génome viral dans la cellule (Figure 8) se produirait alors à l'intérieur d'une vésicule d'endocytose, et non au niveau de la membrane cytoplasmique comme initialement décrit dans le cycle du poliovirus (D'après Mammette, 2002).



**Figure 10.** Représentation schématique de la traduction et de la réplication du génome des entérovirus. Le génome des entérovirus est constitué d'un ARN simple brin de polarité positive directement traduit en protéines à la suite de l'entrée dans la cellule. La réplication du génome ARNv(+) par une ARN polymérase nouvellement synthétisée par une matrice ARNc(-) et des intermédiaires de réplication. (D'après Mammette, 2002).

La traduction de l'ARN viral qui n'est pas coiffé (absence de la structure m<sup>7</sup>GpppN à l'extrémité 5') commence par un mécanisme appelé « initiation interne », médié par la fixation de la sous unité 40S du ribosome à la structure IRES du virus (Pelletier & Sonenberg, 1988). Cet ensemble va migrer vers le codon AUG initiateur de la traduction. Afin de stabiliser l'interaction entre l'IRES et la machinerie traductionnelle (en particulier le facteur d'initiation eucaryotique eIF4-G), certaines molécules cellulaires telles que l'auto-antigène La (p52), la polypyrimidine-tract-binding protein (PTB), ou encore eIF-2 $\alpha$  et la poly(rC)-binding protein 2 (PCBP2) agissent comme protéines chaperonnes (Rueckert, 1996 ; Belsham & Sonenberg, 2000, Racaniello, 2007). La protéine virale 2A inhibe la traduction de la plupart des ARNm cellulaires et stimule la traduction de l'ARN viral.

#### **2.4. RÉPLICATION DU GÉNOME VIRAL**

La réplication du génome viral débute après la traduction. Il semble que cette étape du cycle de réplication des entérovirus débute lorsqu'une certaine quantité de protéines virales a été synthétisée, ces deux étapes ne pouvant avoir lieu en même temps. La réplication du génome se déroule dans le cytoplasme des cellules infectées. Il existe plusieurs modèles expliquant la réplication mais le mécanisme exact est encore très mal connu dans son ensemble. La région IRES de la région 5'NC contrôle la réplication via la boucle IV de la feuille de trèfle qui interagit spécifiquement avec la PCBP cellulaire, sous régulation de la protéine virale 3CD (Gamarnik & Andino, 1998 ; Gamarnik & Andino, 2000).

De nombreux travaux ont permis le développement d'un modèle représentatif des mécanismes de réplication des entérovirus (Xiang *et al.*, 1997). La réplication de l'ARN viral (le brin négatif) se réalise en collaboration avec les protéines virales 3Dpol et 3AB. La synthèse de l'ARN commence par l'uridylation de la protéine 3AB (VPg) qui se fait par la protéine 3Dpol. Cette uridylation va servir d'amorce à la polymérase virale 3Dpol pour synthétiser le brin négatif (Paul *et al.*, 1998).

Plusieurs études ont montré que la synthèse du brin positif suit un mécanisme de trans-initiation (Agol *et al.*, 1999). La forme répllicative, dont la structure en hétéro duplex, serait reconnue par les protéines du complexe de réplication et stabilisée au niveau de la structure

en feuille de trèfle de l'ARN positif par des protéines virales et cellulaires non identifiées, et servirait d'origine de réplication. La forme répliquative débute dans la région 5' du brin de polarité positive via un complexe ribonucléoprotéique (Andino *et al.*, 1993). La libération de l'extrémité 3' du brin négatif surviendrait ensuite, suivie de l'uridylation de VPg par 3Dpol. Enfin, VPg nouvellement uridylée (VPg pU(pU)) et 3Dpol seraient transférées vers l'extrémité 3' du brin négatif pour initier la synthèse du brin positif (Andino *et al.*, 1993).

## **2.5. MODIFICATIONS DE LA FONCTIONNALITÉ CELLULAIRE**

### **2.5.1. Inhibition de la synthèse protéique**

Ce mécanisme dénommé « shut-off », survient 2 heures après l'infection des cellules par les entérovirus (Racaniello, 2007). Les polyribosomes sont désorganisés, ce qui a pour effet d'inhiber la traduction des ARN cellulaires. L'inhibition résulte de l'inactivation du facteur eIF4F par clivage des composants eIF4GI et eIF4GII par la protéase 2A. Il semblerait qu'il existe un mécanisme supplémentaire qui serait la déphosphorylation de la protéine 4E-BP1 (Racaniello, 2007).

### **2.5.2. Inhibition de la synthèse des ARN**

Des études ont montré que lors de l'infection virale, toutes les classes d'ARN polymérasés sont actives, suggérant ainsi que les protéines accessoires seraient des molécules clés dans ce mécanisme d'inhibition de synthèse des ARN. Les études *in vitro* ont montré que l'inhibition de la synthèse de l'ARN cellulaire était le résultat du clivage de facteurs de transcription « TFIID et TFIIC » par la protéase virale 3C (Kliwer & Dasgupta, 1988 ; Racaniello, 2007).

### **2.5.3. Inhibition de la sécrétion des protéines**

L'infection à entérovirus va bloquer la sécrétion des protéines nouvellement synthétisées et ceci *via* l'inhibition de leur transport. Ce blocage est rendu possible grâce à l'action de la protéine virale 2B et de son précurseur 2BC sur l'appareil de Golgi. Un second

mécanisme, dépendant de la protéine 3A, inhibe le transport vésiculaire à partir du réticulum endoplasmique (Barco & Carrasco, 1995 ; Sandoval & Carrasco, 1997).

#### **2.5.4. Effet cytopathique et l'apoptose**

L'effet cytopathique, qui correspond à un changement morphologique des cellules infectées par les entérovirus, est utilisé pour le diagnostic virologique (Dagan & Menegus, 1986 ; Kok *et al.*, 1998). Les changements dans la cellule commencent dès les premières heures de l'infection. Les modifications sont multiples au niveau du noyau ; on peut observer une déformation et une condensation de la chromatine. Dans le cytoplasme, il y a une accumulation de vésicules membranaires où des lipides sont stockés (Dagan & Menegus, 1986). Au niveau membranaire, on note un changement de la perméabilité dû à une augmentation de  $Ca^{2+}$  dans la cellule conduisant à la fuite de liquides et donc à une déshydratation intracellulaire (Racaniello, 2007). L'effet cytopathique favorise la lyse de la cellule et donc la propagation des virus natifs. La modification ultime des cellules lors de l'infection par les entérovirus correspond à l'apoptose. Il existe des facteurs viraux activateurs tels que les protéines 2Apro et 3Cpro (Barco *et al.*, 2000). Et récemment, certaines protéines entérovirales inhibent le déclenchement de ce phénomène telles que 2B, 3A et 2BC (Campanella *et al.*, 2004 ; Salako *et al.*, 2006).

Toutes ces modifications, qui perturbent la fonctionnalité de la cellule, vont aboutir à l'activation des mécanismes immunitaires et inflammatoires. Ces phénomènes donneront naissance à la pathologie qui sera liée à l'infection initiale par les entérovirus.

#### **2.6. EVOLUTION GÉNÉTIQUE DES ENTÉROVIRUS : MUTATIONS ET RECOMBINAISONS**

Comme tous les virus à ARN, les entérovirus évoluent au niveau génétique au cours de leur circulation et au cours du temps. Il existe deux phénomènes distincts quand on parle d'évolution génétique chez les entérovirus : les mutations et les recombinaisons. Ces mécanismes d'évolution permettent au virus de s'adapter aux modifications de l'environnement et aux diverses pressions de sélection. Cette évolution génétique est en relation directe avec leur virulence, mais aussi avec leur tropisme tissulaire et donc leur pouvoir pathogène (Pfeiffer & Kirkegaard, 2003, 2005).

### 2.6.1. Mutations génétiques

Les mutations génétiques sont liées au taux élevé d'erreurs induites par l'ARN polymérase ARN dépendante lors de l'élongation et à l'absence de correction exonucléasique 3'-5' fiable (proofreading) de ces erreurs (Wimmer *et al.*, 1993). Les erreurs, ou mutations ponctuelles, engendrées sont de l'ordre de  $10^{-3}$  à  $10^{-4}$  par site et par cycle (Ward & Flanagan, 1992). C'est par ce mécanisme que les entérovirus évoluent et augmentent leur diversité génétique, pouvant ainsi permettre l'apparition de sous-populations de variants génétiques : constituant les « quasi-espèces ». Les agents mutagènes n'ont que peu d'effets sur les taux de mutation car ceux-ci sont déjà très élevés. Les taux de mutations ponctuelles varient en fonction de la pression de sélection, et donc selon le principe de l'évolution darwinienne sur la sélection naturelle (Ward & Flanagan, 1992). Donc les mutations observées seraient la conséquence de l'adaptation du virus aux conditions environnementales, car si une mutation apporte un changement qui confère un avantage au virus (multiplication ou « fitness » plus rapide,...), ce nouveau variant aura tendance à devenir la population dominante. Plus la pression de sélection est importante, plus l'évolution des entérovirus est rapide et donc plus le taux de mutation élevé (Ward & Flanagan, 1992). Ce modèle d'évolution génétique basé sur la pression de sélection pourrait expliquer le grand nombre de variations observées sur les protéines de surface de la capsid VP1-2-3, exposées à l'environnement, et possédant jusqu'à 25% de variations nucléotidiques sur les gènes correspondants (Oberste *et al.*, 1999a). En revanche, la protéine VP4 présente un taux de variation assez faible que l'on peut expliquer par le fait de son internalisation dans la capsid. Toutes ces observations ont été confirmées par l'analyse de séquences nucléotidiques (Oberste *et al.*, 1999) ainsi que par la neutralisation des isolats par les anticorps monoclonaux (Prabhakar *et al.*, 1982 ; Crainic *et al.*, 1983). Sur ce même principe de mutations par pression de sélection, il a été démontré que les protéines non structurales ont un taux de mutation relativement faible et ceci pour deux raisons : premièrement, les protéines non structurales sont très peu soumises à l'influence du milieu extérieur, et deuxièmement ces protéines sont la plupart du temps des enzymes nécessaires au virus pour se répliquer. Donc une mutation sur ces protéines pourrait être délétère, ou capable de diminuer la capacité de répllication virale. Grâce à la dégénérescence du code génétique, la majorité des mutations sont silencieuses,



ce qui explique la stabilité du virus en termes d'acides aminés. Dans de rares cas, les mutations peuvent permettre l'émergence de phénotypes particuliers induisant une virulence plus élevée et provoquant par exemple, le retour à la virulence responsable de poliomyélites paralytiques (Holland & Domingo, 1998).

## 2.6.2. Recombinaison génétique

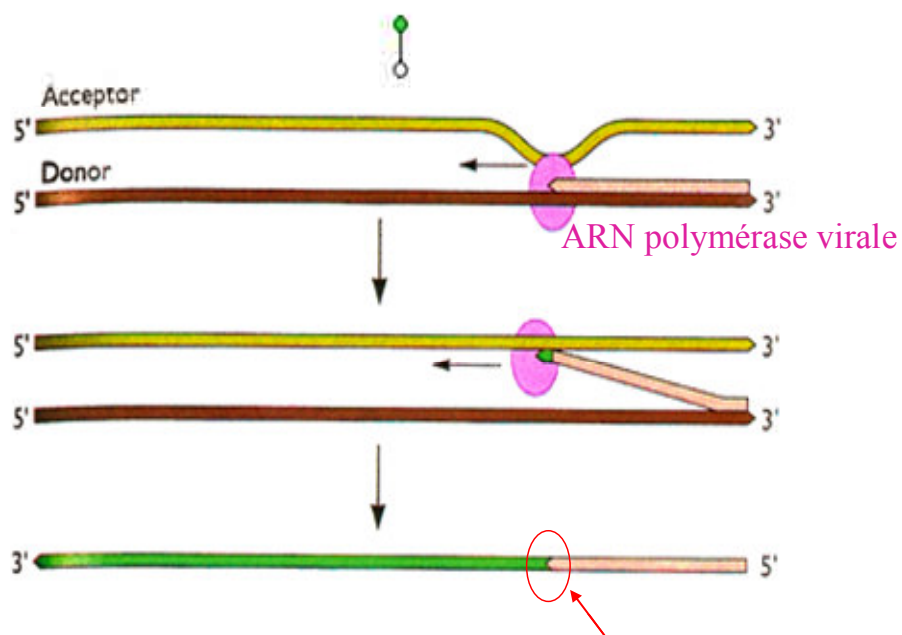
### 2.6.2.1. Recombinaison chez les poliovirus

Ce phénomène d'évolution consiste en un échange de matériel génétique entre deux souches distinctes infectant une même cellule cible et pouvant aboutir à l'apparition de virus « mosaïques » (**Figure 11**). Ce mécanisme a été identifié dans les années 60 par l'étude de souches de poliovirus (Hirst, 1962). Cet échange se fait au moment de la synthèse du brin négatif de l'ARN grâce à la polymérase virale (Kirkegaard & Baltimore, 1986). Plusieurs études ont montré une grande prévalence dans la détection de génomes recombinants ; plus de 50% présentaient une recombinaison inter-type (entre les poliovirus de type 1, 2 ou 3) chez des patients atteints de poliomyélite paralytique aiguë (Furione *et al.*, 1993 ; Ion-Nedelcu *et al.*, 1997). D'autres études ont montré que cette recombinaison se faisait entre les souches sauvages de poliovirus et les souches vaccinales (Lipskaya *et al.*, 1991 ; Georgescu *et al.*, 1995 ; Dahourou *et al.*, 2002), ce qui, dans certains cas, pouvait entraîner un phénomène de réversion des souches vaccinales vers un phénotype virulent responsable d'une poliomyélite paralytique aiguë. Ce phénomène de réversion phénotypique suite à une recombinaison génétique a également été observé entre les souches vaccinales de poliovirus et des souches d'entérovirus non-polio (l'espèce C des entérovirus) (Rousset *et al.*, 2003 ; Arita *et al.*, 2005 ; Rakoto-Andrianarivelo *et al.*, 2005). Les zones génomiques pour lesquelles ce type de recombinaison a été identifié se situent très préférentiellement dans la partie codant pour les protéines non structurales (Cuervo *et al.*, 2001 ; Lukashev *et al.*, 2003).

### 2.6.2.2. Recombinaison chez les entérovirus non polio

Bien que le phénomène de recombinaison génétique soit connu depuis longtemps comme étant un mécanisme fréquent chez les poliovirus (PV), plusieurs études ont démontré qu'il était aussi très fréquent chez les entérovirus non polio (Santi *et al.*, 1999 ; Andersson *et al.*, 2002 ; Oprisan *et al.*, 2002 ; Lindberg *et al.*, 2003 ; Norder *et al.*, 2003 ; Chevaliez *et al.*, 2004 ; Oberste *et al.*, 2004c ; Lukashev *et al.*, 2003, 2004, 2005 ; Bolanaki *et al.*, 2006 ; Chan *et al.*, 2006 ; Mirand *et al.*, 2007). La première recombinaison chez un entérovirus non polio a été observée entre une souche vaccinale de poliovirus et un coxsackievirus A-21 sur la région 3'NC (Hughes *et al.*, 1989). En 2003, Brown et coll, étant donné le caractère monospécifique de la recombinaison, ont proposé le reclassement des poliovirus dans l'espèce C des entérovirus. Ce mécanisme de recombinaison génétique a servi à expliquer la similitude de séquence existant entre le coxsackievirus B5 et le SVDV (Zhang *et al.*, 1993). De même, la souche Echovirus 9 Hill serait issue de la recombinaison interspécifique entre la souche Echovirus 9 Barty et la souche Echovirus 18 Metcalf (Anderson *et al.*, 2002). Plusieurs études émettent l'hypothèse que les recombinaisons génétiques seraient à l'origine de l'apparition des 4 espèces d'entérovirus via des recombinaisons « inter espèces », et expliqueraient aussi pourquoi l'analyse phylogénétique de la région 5'NC ne permet de distinguer que deux groupes (Santi *et al.*, 1999).

Dans la plupart des cas, la recombinaison inter sérotypique a été observée dans la région codant pour les protéines non structurales (NSP) du génome, alors que ce phénomène de recombinaison inter sérotypiques est un événement rare dans la région codant pour les protéines structurales de la région P1 surtout au niveau du bloc VP2-VP3-VP1 (Lukashev *et al.*, 2005). Ceci est probablement due à la nécessité de conserver les sites de reconnaissance des récepteurs cellulaires (Blomqvist *et al.*, 2003). La survenue d'événements intra et inter sérotypiques de recombinaison dans la région codant pour les protéines VP1, VP2, VP3 a été décrit entre les membres du groupe des poliovirus (Martin *et al.*, 2002 ; Blomqvist *et al.*, 2003 ; Oberste *et al.*, 2004c ; Yang *et al.*, 2005 ; Kyriakopoulou *et al.*, 2006). Très récemment il a été décrit pour la première fois un cas de recombinaison inter sérotypique au sein des entérovirus du groupe B au niveau du bloc VP2-VP3-VP1 (Bousslama *et al.*, 2007). La fréquence dans la circulation de ces souches recombinantes ainsi que leurs caractères phénotypiques, devront être déterminés dans de futures études épidémiologiques et expérimentales.



**Figure 11 :** Représentation schématique du mécanisme le plus probable de recombinaison génétique pour les entérovirus intervenant au cours de la réplication. L'ARN polymérase (ovale rose) commence à copier l'extrémité 3' du génome donneur, puis saute sur le génome accepteur, synthétisant ainsi un génome recombinant (D'après Kirkegaard & Baltimore, 1986)

## 2.7. DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE ET QUASI-ESPÈCES

L'hétérogénéité génétique des entérovirus a été largement documentée (Domingo *et al.*, 1990 ; Sobrino *et al.*, 2001). Contrairement aux concepts d'évolution génétique classique qui se produisent par le biais de la sélection des différents virus, la théorie de quasi-espèces propose que cette évolution se ferait par la sélection de sous-populations virales interdépendantes (Eigen, 1993). Plusieurs travaux rapportent des différences de séquences entre clones individuels isolés de plusieurs tissus infectés chez un même animal (Domingo *et al.*, 1980 ; King *et al.*, 1981, Rowlands *et al.*, 1983 ; Taboga *et al.*, 1997). Cette hétérogénéité trouve son origine dans l'absence d'activités correctrices associées à la réplication des ARN viraux. Le taux de mutations durant la réplication des génomes à ARN est en moyenne de  $10^{-4}$  substitutions par nucléotide copié, soit un taux d'erreur supérieur de plusieurs milliers de fois à celui rencontré au cours de la réplication de l'ADN cellulaire. En d'autres termes, lors de la réplication du génome, chaque molécule copiée sera en moyenne affectée par l'introduction d'une mutation. Chaque cycle de multiplication contribue donc au maintien d'une distribution complexe de génomes viraux étroitement liés mais non identiques, appelés quasi-espèces virales (Domingo *et al.*, 1994,1997). Bien que cette collection de génomes mutants soit souvent représentée par une séquence consensus ou génome moyen, les propriétés biologiques des entérovirus sont définies par l'ensemble des différents virus mutants qui peuplent la quasi-espèce. L'interaction entre les différents variants dans les quasi-espèces pourrait faciliter l'entrée et la réplication du virus. Donc cette diversité de mutants représente une réserve importante de variants phénotypiques qui peuvent être mobilisés suite à l'apparition de facteurs de sélection, comme par exemple la présence d'anticorps neutralisants ou d'antiviraux qui sélectionnent rapidement des variants antigéniques ou des mutants de résistance (Domingo, 1999 ; Baranowski *et al.*, 1999 ; Domingo *et al.*, 2000a). Cette hétérogénéité des populations est responsable de leur extraordinaire capacité d'adaptation. Le modèle de quasi-espèces est une caractéristique commune à tous les virus à ARN étudiés à ce jour (Domingo *et al.*, 2000b). Bien que les taux d'erreurs de l'ARN-polymérase soient peu influencés par la région génétique copiée, l'apparition de mutations au niveau du génome n'est pas homogène. Cette différence est déterminée par les conditions du milieu de multiplication du virus. Ces mutations répondent à la fois à des événements aléatoires et des mécanismes de sélection. L'événement aléatoire peut être l'infection d'un animal par un ou quelques virus, et donc la reconstitution d'une quasi-espèce chez cet animal. Chez le

poliovirus, il a été montré que l'augmentation de la fidélité de la réplication a un effet néfaste sur l'adaptation et la virulence, suggérant ainsi que les taux de mutation ont probablement été optimisés au cours de l'évolution virale (Pariente *et al.*, 2001, 2003 ; Anderson *et al.*, 2004). La sélection positive sera particulièrement évidente dans une population immunisée où des modifications antigéniques donnent un avantage sélectif à un variant. Certains variants au sein de la population peuvent donc faciliter la colonisation des cellules, d'autres pouvant servir d'appâts immunologiques pour le système immunitaire. Enfin, la sélection négative éliminera les génomes mutants porteurs de mutations délétères.

En résumé, la théorie de « quasi-espèces », qui est directement relié au succès de la colonisation de l'écosystème par la souche virale, dépend de la coopération des différents variants de virus qui représentent une distribution de séquences distinctes dans la population (Vignuzzi *et al.*, 2006).

## **2.8. MORPHOGENÈSE ET LIBÉRATION DES VIRIONS**

Le phénomène de morphogénèse chez les Entérovirus fut décrit suite aux études réalisées sur la capsidie des poliovirus (Basavappa *et al.*, 1994, Hellen & Wimmer, 1995). Le mécanisme commence après coupure par la protéase 2A de la polyprotéine qui libère le précurseur P1, puis la protéase 3CD libère les protéines VP0, VP1 et VP3 qui vont s'associer pour former le premier protomère (« 5S » du fait de son coefficient de sédimentation). Par la suite 5 protomères 5S vont s'assembler pour former un autre complexe pentamérique appelé 14S (Boege *et al.*, 1986 ; Rombaut *et al.*, 1990). Puis 12 complexes pentamériques vont donner la procapsidie de 75S. Le provirion peut alors être formé par l'assemblage de l'ARN viral néosynthétisé avec la procapsidie ; cette association donne une structure possédant un coefficient de sédimentation de 150S. La dernière étape de la morphogénèse des virus consiste en le clivage de la protéine VP0 pour donner les protéines de capsidie VP2 et VP4. Cette dernière étape permet de stabiliser la capsidie et d'obtenir le virion mature « 160S » (Basavappa *et al.*, 1994). L'encapsidation de l'ARN génomique est un processus exclusif, de telle sorte que ni l'ARN négatif, ni les ARNs cellulaires ne peuvent être encapsidés (Nomoto *et al.*, 1977 ; Novak *et Kirkegaard*, 1991 ; Barclay *et al.*, 1998) (**Figure 12**).

L'assemblage effectué, les particules virales s'accumulent dans le cytoplasme, sous forme de vésicules cristallines, puis sont ensuite libérées par éclatement des vacuoles à la surface des cellules. La libération des nouveaux virions est concomitante de la lyse cellulaire, induite par la protéine virale 2B serait impliquée (Van Kuppeveld *et al.*, 1997).

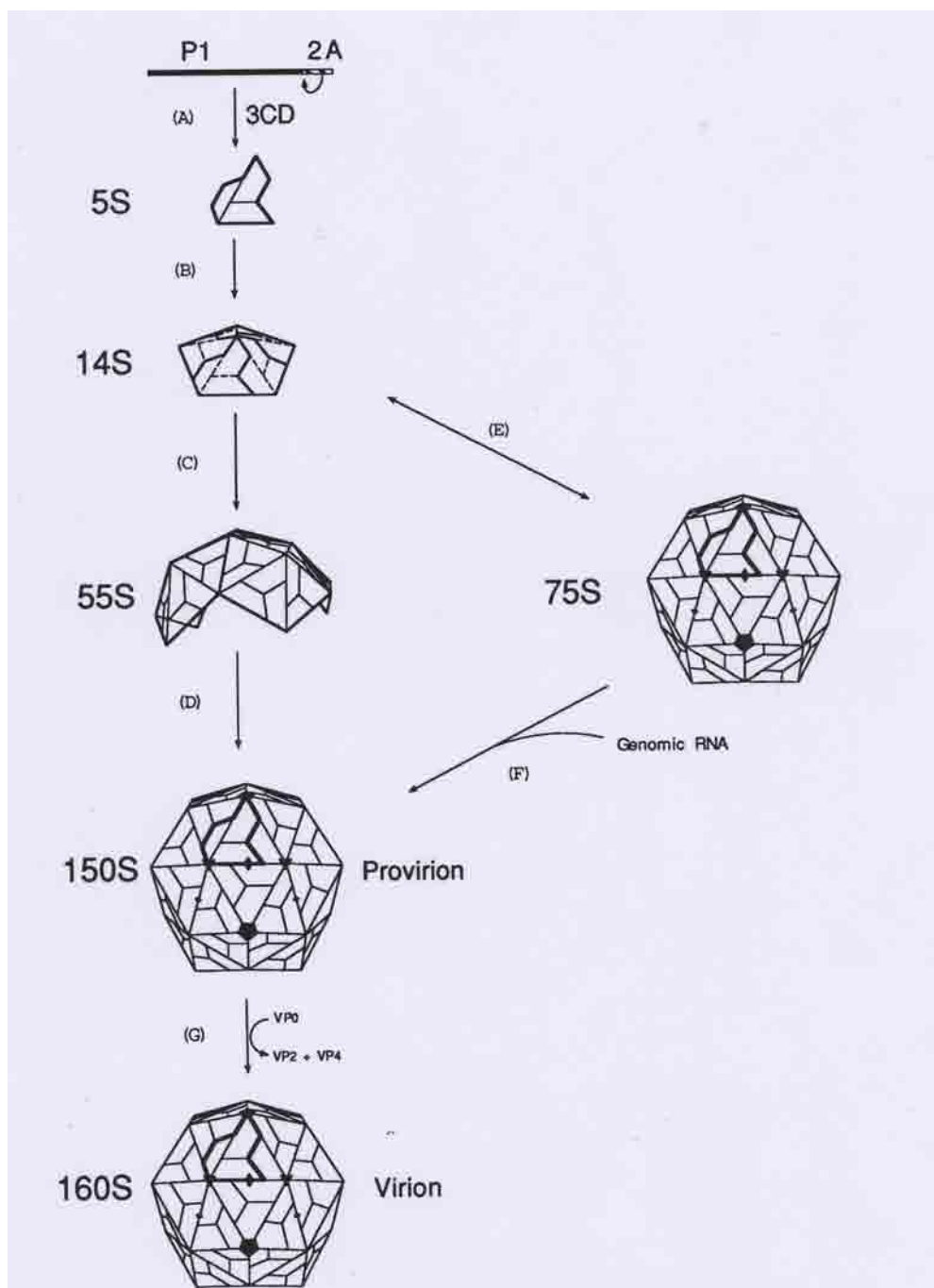
### **3. LES INFECTIONS HUMAINES À ENTÉROVIRUS**

Les entérovirus non poliomyéliques sont des pathogènes humains fréquemment rencontrés et se retrouvent dans le monde entier. Si, l'infection est souvent asymptomatique et inapparente, ces virus peuvent aussi être associés à des « bouffées épidémiques » au cours desquelles un nombre inhabituel de sujets sont atteints de troubles cliniquement identifiables et avec parfois des conséquences fatales (Pores, 1985 ; Legay *et al.*, 2007).

#### **3.1. EPIDÉMIOLOGIE GÉNÉRALE**

##### **3.1.1. Modes de transmission**

L'Homme est le seul hôte et réservoir naturel des entérovirus impliqués en pathologie humaine et les enfants en sont les principaux vecteurs de diffusion (Racaniello, 2007). Les entérovirus sont responsables d'un grand nombre de pathologies humaines spécifiques d'organe dont le pronostic dépend de la dose infectieuse, de l'organe cible, de l'âge, du sexe et du statut immunitaire de l'individu (Andréoletti, 2003). La contamination par les virus se fait d'autant plus précocement que le niveau socioéconomique est précaire. La vie en collectivité permet une bonne diffusion des virus. Le virus pénètre dans l'organisme par voie oropharyngée ou par voie digestive après ingestion d'aliments ou d'eau souillés (contamination de type fécale-orale) mais également par voie aérienne à partir d'aérosols (**Figure 13**) (Andréoletti, 2003). Il existe d'autres modes de transmission tels que les contaminations par aérosols qui pourraient contaminer l'épithélium respiratoire et conjonctival (Legay *et al.*, 2007). Les entérovirus sont très résistants ; il a été montré que l'on pouvait les retrouver dans les eaux de surface, les eaux usées, les boues et les coquillages (Melnick *et al.*, 1985 ; Gantzer *et al.*, 1998). La consommation d'eau ou de coquillages non cuits peut donc être un mode de contamination et de transmission des virus.



**Figure 12.** Schéma représentatif de la synthèse et l'assemblage des protéines de la capsid des entérovirus. Le précurseur P1 est libéré de la polyprotéine néo-synthétisée suite au clivage par la protéase virale 2A. La libération des trois protéines VP0, VP1, et VP3 est assurée par la protéase 3CD. VP0 est finalement clivée en VP2 et VP4 (d'après Hellen & Wimmer, 1995).

Malgré leur grande résistance dans le milieu extérieur, il n'existe pas à l'heure actuelle de preuve d'une transmission par des piqûres d'insectes hématophages. La transmission par les gouttelettes rhinopharyngées fut soupçonnée d'être à l'origine de la dernière épidémie de poliomyélite due au sérotype 3 en Finlande en 1984 (Hovi *et al.*, 1986).

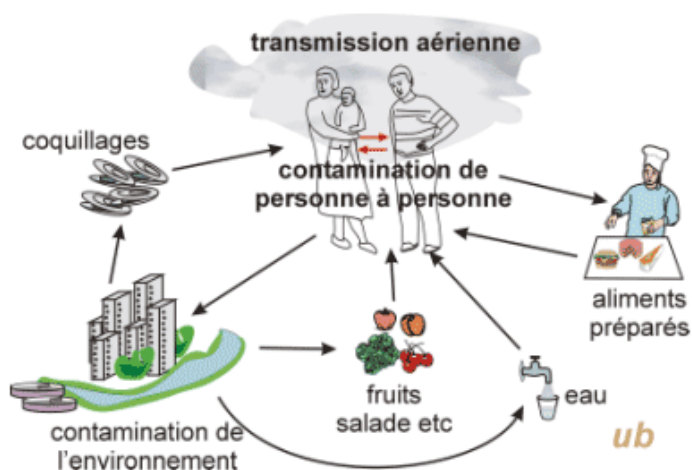
### **3.1.2. Circulation des entérovirus**

Dans les pays tempérés à haut niveau sanitaire, les infections évoluent volontiers sur un mode épidémique d'ampleur très variable entre juin et septembre (Morens & Pallansch, 1995). Durant ces phases épidémiques, on peut voir une co-circulation de plusieurs sérotypes d'entérovirus. Dans les pays en voie de développement, on observe une circulation endémique des entérovirus, l'infection se produisant très tôt au cours de la vie. Les infections à entérovirus sont facilitées par le fait que ces virus sont extrêmement résistants aux pH acides, à l'humidité et aux températures élevées, leur permettant une bonne dissémination par les sols et eaux de surface ou usées (Andréoletti, 2003). L'excrétion des entérovirus dans les matières fécales peut contaminer les eaux de surface, les eaux souterraines et les coquillages, ce qui constitue un risque pour la santé publique et peut donc servir d'indicateur de la pollution hydrique (Gerba *et al.*, 1979 ; Le Guyader *et al.*, 2000).

### **3.1.3. Facteurs influençant la circulation**

Plusieurs facteurs influencent la circulation des entérovirus, tant au niveau de la sévérité que de la transmission de ces virus. Concernant la sévérité et les manifestations cliniques, l'un des principaux facteurs est l'absence ou le faible niveau d'anticorps protecteurs chez des sujets infectés. Les jeunes enfants sont les premiers à être concernés par ce facteur car ils possèdent peu d'anticorps au début de leur vie, et une infection à coxsackievirus B peut être fatale pour les nouveau-nés. Les poliovirus et les infections à coxsackievirus A et echovirus voient leur pouvoir pathogène augmenter avec l'âge des patients, ce qui est lié à une diminution des capacités de « clairance virale ». La transmission des entérovirus peut être influencée par les conditions climatiques. Ainsi, dans les pays tropicaux et sub-tropicaux, les entérovirus circulent tout au long de l'année à cause de l'humidité et de la température et leur transmission est influencée par les orages et les tempêtes tropicales qui lessivent les sols (Andréoletti, 2003).





**Figure 13:** Modes de transmission des entérovirus humains. Les entérovirus sont des virus nus et donc très résistants par voie fécale-orale grâce à l'eau, les aliments souillés ou les mains sales. La transmission des entérovirus par voie aérienne à partir d'un aérosol de gouttelettes rhinopharyngées semblent désormais un fait établi. (D'après Mammette, 2002)

Le niveau socio-économique va jouer un rôle primordial pouvant modifier significativement l'incidence et la gravité des infections. Dans les populations des pays industrialisés, la moindre circulation des virus réduit la probabilité de contacts immunisants et maintient donc un état de réceptivité élevée aux infections par les entérovirus (Pallansch & Roos, 2007).

#### 3.1.4. Épidémiologie moléculaire

Il existe, dans le monde, plusieurs organismes ou réseaux chargés de surveiller la circulation des entérovirus. En France, jusqu'en 1998, les données épidémiologiques sur la circulation des entérovirus étaient disponibles à travers le réseau EPIVIR, coordonné par l'Institut de Veille Sanitaire (InVS). Depuis janvier 2000 a été mis en place un réseau élargi de surveillance par les laboratoires de Virologie effectuant la recherche d'entérovirus : le réseau de surveillance des entérovirus (RSE). Ce réseau est coordonné par le Centre National de Référence (CNR) des entérovirus et l'InVS afin de surveiller et de documenter la circulation des entérovirus chez l'Homme et dans l'environnement. Au cours des années 2000 à 2004, le Réseau de Surveillance des Entérovirus (RSE) a attentivement étudié l'épidémiologie des infections à entérovirus en France (Antona *et al.*, 2007). Cette surveillance a montré la circulation de 10 sérotypes majoritaires (echovirus 30, echovirus 13, echovirus 6, coxsackievirus B5, echovirus 11, coxsackievirus B4, echovirus 9, echovirus 7, coxsackievirus B1 et coxsackievirus B2 par ordre décroissant de fréquence) après l'analyse de 192 598 prélèvements incluant 39 276 liquides céphalorachidiens (14,7% positifs pour la présence d'un entérovirus), 45 889 selles (4,3% positifs), 70 330 prélèvements respiratoires (2,2% positifs) et 14 243 sérums (1,4% positifs) (Antona *et al.*, 2007). De plus, un réseau de surveillance similaire aux Etats-Unis a permis de connaître l'incidence des cas mortels qui présentent une distribution bimodale avec un premier pic pour les enfants de moins de 1 an qui représentent 60% des cas rapportés quelle que soit la complication, et un second pic pour les personnes de plus de 45 ans (Khetsuriani *et al.*, 2006) (**Figure 14**).

Les données concernant les connaissances épidémiologiques générales et moléculaires sur les infections par les entérovirus à tropisme respiratoires sont détaillées au chapitre 4.2 voir page 58.

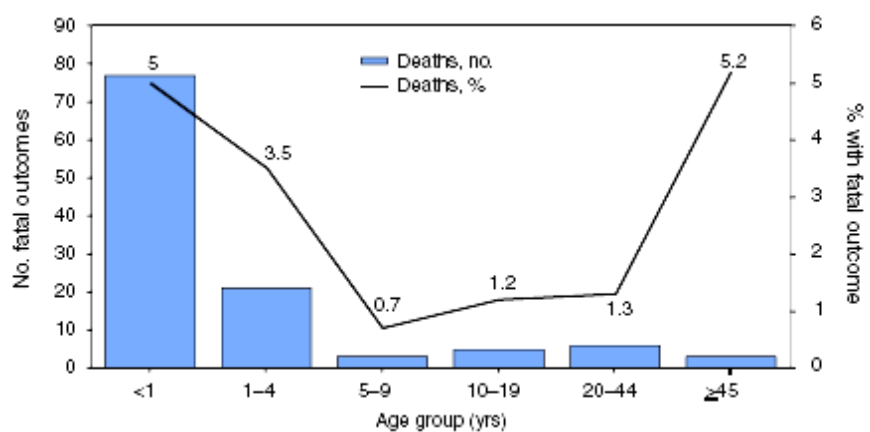
### **3.2. PHYSIOPATHOLOGIE DE L'INFECTION**

#### **3.2.1. Physiopathologie générale**

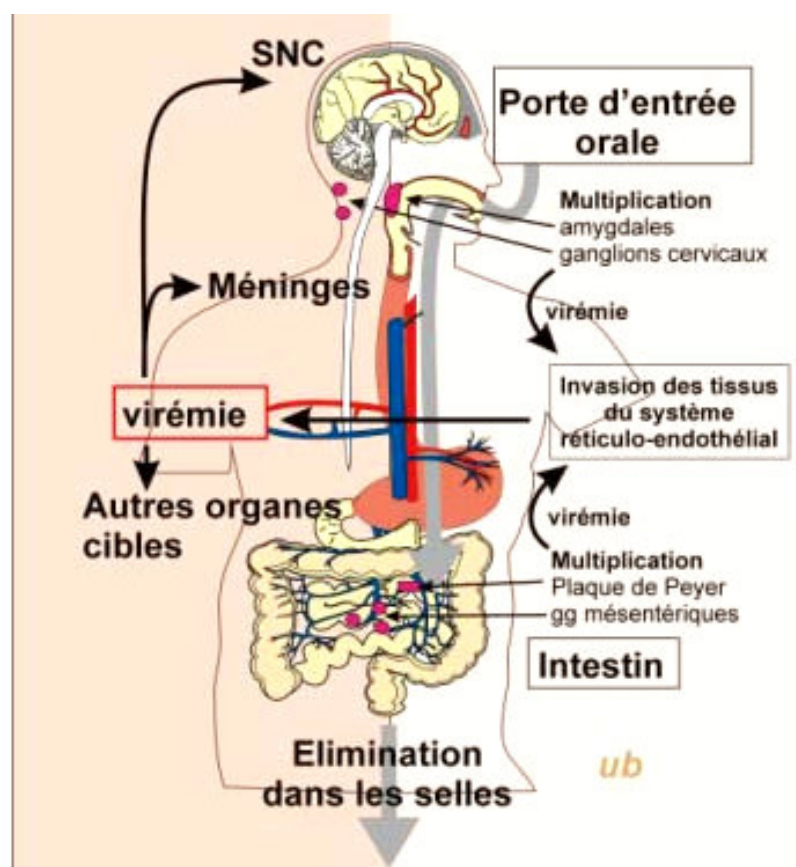
Elle est commune à tous les entérovirus. Après leur entrée, la réplication des entérovirus commence au niveau de l'épithélium des voies digestives (dans l'intestin d'où le terme *entéro-*) ou respiratoires (exception faite des conjonctivites à entérovirus) (**Figure 15**). Après cette phase initiale, les entérovirus se propagent vers les amygdales ou les ganglions cervicaux, les plaques de Peyer ou les ganglions mésentériques, en fonction du site initial de réplication (c'est la phase lymphatique). Il va s'ensuivre une atteinte réticulo-endothéliale (sites secondaires de réplication) et une virémie. L'infection peut alors atteindre les différents tissus et organes et provoquer diverses pathologies (**Figure 15**) (Crainic *et al.*, 1995 ; Melnick, 1996). Dans la majorité des cas, les infections sont asymptomatiques ou légères, prenant alors le plus souvent la forme d'affections fébriles non spécifiques. Parmi les autres manifestations, on peut mentionner les exanthèmes (rashes), l'herpangine ou pharyngite vésiculeuse (éruption vésiculaire et inflammation de la gorge), les infections respiratoires aiguës, la conjonctivite, la méningite à liquide clair, l'encéphalite (inflammation cérébrale), la péricardite et la myocardite (inflammation des tissus cardiaques) et, occasionnellement, des troubles paralytiques. La période d'incubation varie de 2 à 35 jours, avec une médiane se situant entre 7 et 14 jours (Andréoletti, 2003).

#### **3.2.2. Hôtes et tropisme tissulaire**

Les entérovirus sont capables d'infecter plusieurs lignées cellulaires dont des cellules humaines, des cellules de primates, mais aussi des cellules de souris qui expriment le CD155 pour l'infection par les poliovirus. Il faut cependant noter que tous les entérovirus ne sont pas capables de se répliquer dans tous les types de cellules (Dagan *et al.*, 1986 ; Kok *et al.*, 1998). Cela dépend de la présence ou non de récepteurs et corécepteurs spécifiques et de leur distribution à la surface des cellules.



**Figure 14** : Répartition de la mortalité sur une période de 30 ans aux Etats-Unis associée aux infections par les entérovirus en fonction de la tranche d'âge en valeur absolue (Histogramme bleu) et en pourcentages calculés par rapport au nombre de cas (Courbe noire). (D'après Khetsuriani et al., 2006).



**Figure 15.** Physiopathologie de l'infection par les entérovirus. L'infection se déroule en quatre phases principales : digestive et respiratoire, lymphatique, virémique permettant enfin l'atteinte des organes cibles. (D'après Mammette., 2002).

**Tableau 4** : Spectre d'hôte et tropisme cellulaire des entérovirus humains (Pallansch & Roos, 2007).

Virus	ECP sur lignée cellulaire		Pathologie chez l'animal	
	Cellules de rein de singe	Cellules Humaines	Souriceau nouveau-né	Cellules humaines
<b>Poliovirus 1-3</b>	+	+	-	+
<b>Coxsackievirus A1-24</b>	+/-	+/-	+	-
<b>Coxsackievirus B1-6</b>	+	+	+	-
<b>Echovirus 1-34</b>	+	+/-	-	-
<b>Entérovirus 68-71</b>	+	+	-	-

Des études ont montré que les poliovirus n'infectent pas le foie, les poumons, la rate ou le cœur : cependant ces cellules expriment fortement le récepteur du poliovirus qui est le CD155. Récemment Ida-Hosonuma et coll (2005) ont montré que la sensibilité des cellules aux poliovirus peut être modulée par la déficience de l'expression des récepteurs pour les interférons alpha et beta (Ida-Hosonuma *et al.*, 2005). Plusieurs facteurs tels que la voie d'inoculation, les récepteurs et les corécepteurs de surface, des facteurs protéiques cellulaires spécifiques et indispensables à la réplication virale ainsi que certains éléments du génome viral, peuvent expliquer le tropisme et la spécificité des entérovirus pour certaines cellules cibles (**Tableau 4**) (Pallansh & Roos, 2007).

### 3.2.3. Réponse immunitaire antivirale

La réponse immunitaire de l'hôte face à une infection à entérovirus peut se décomposer en deux parties ; la réponse immunitaire innée et la réponse immunitaire adaptative. La réponse immunitaire innée est peu efficace face aux virus et ne permet pas la clairance virale. Cependant, la libération de l'interféron, qui va activer plusieurs gènes, donne la première ligne de défense de l'hôte contre le virus. La réponse immunitaire innée implique les lymphocytes et les cellules « Natural Killer » mais le rôle de ces cellules dans la réponse immunitaire est encore assez mal connu.

La réponse immunitaire adaptative est plus tardive car elle nécessite la présentation d'antigènes aux cellules spécifiques, les lymphocytes B, qui vont produire des anticorps dirigés contre l'agent pathogène, et les lymphocytes T « Helper et Cytotoxiques ». Ces anticorps sont des immunoglobulines d'isotypes M, G, et A. Les IgA sont des anticorps sécrétés au niveau des muqueuses empêchent l'entérovirus de progresser dans l'organisme en le neutralisant au niveau de l'oropharynx ou de l'intestin. Les IgM apparaissent 2 à 3 semaines après le début de l'infection et persistent environ 3 mois. Enfin les IgG sont les anticorps les plus tardifs car ils sont détectés après 4 semaines d'infection mais peuvent persister toute la vie. La réponse cellulaire est orchestrée par les lymphocytes T CD4+. D'autres cellules interviennent dans la clairance virale comme les lymphocytes T CD8+ ; ces cellules interviennent dans la clairance virale cytotoxique et vont lyser les cellules infectées ou libérer des cytokines.

### 3.3. PATHOLOGIES HUMAINES À *ENTEROVIRUS*

#### 3.3.1. infections aiguës

La très grande majorité des infections aiguës est asymptomatique, paucisymptomatique ou cliniquement bénigne et ces infections ne sont documentées que sur des données épidémiologiques ou virologiques.

Parmi les infections aiguës pédiatriques non spécifique, on trouve des syndromes fébriles isolés, les infections de la sphère ORL et respiratoire, des éruptions maculeuses (Meade *et al.*, 1979 ; Abe *et al.*, 2000). Concernant les infections entraînant l'hospitalisation, on trouve les méningites lymphocytaires (Ashwell *et al.*, 1996 ; Chomel *et al.*, 2003), les encéphalites, les paralysies flasques et les infections sévères non spécifiques, rencontrées essentiellement chez les patients immunodéprimés et chez les nouveau-nés. Certain groupe d'entérovirus peuvent entraîner des syndromes cliniques plus typiques (**Tableau 5**) :

- Les *infections cutanéomuqueuses*. L'herpangine qui s'observe le plus généralement chez l'enfant âgé de 1 à 7 ans, mais elle est également fréquente chez le nouveau-né et l'adulte (Rotbart & Kirkegaard, 1992). Cliniquement, on observe un pic fébrile, associée à une pharyngite, une dysphagie et une sensation de malaise. Un quart des patients présents des vomissements associés à une douleur abdominale. Très tôt dans l'histoire de la maladie apparaissent des vésicules translucides de 1 à 4 mm de diamètre sur la partie postérieure du voile du palais, au niveau des piliers des amygdales et occasionnellement sur la muqueuse de l'oropharynx. Ces vésicules sont discrètes et entourées d'un érythème, et habituellement leur nombre ne dépasse pas une vingtaine. Les symptômes vont commencer à régresser en 4 à 5 jours et ils vont disparaître en moins d'une semaine (Rotbart & Kirkegaard, 1992). L'herpangine est classiquement causée par les coxsackievirus A notamment les sérotypes A 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 22 (Melnick & Metcalf, 1985). Le syndrome " *pied-main-bouche* " historiquement, c'est lors d'une épidémie à Toronto que l'on isola un coxsackievirus A16 dans des vésicules maculo-papuleuses des extrémités; depuis de nombreux autres entérovirus ont été impliqués dans ce syndrome (A5, A10, A19, B2, B5) (Melnick & Metcalf, 1985).



- Ce syndrome apparaît typiquement chez les enfants âgés de moins de 4 ans, mais les adultes peuvent également le développer. On assiste généralement à des épidémies familiales. Ce syndrome est modéré et cliniquement caractérisé par une inflammation de l'épithélium pharyngé associée ou non à une fièvre modérée. Des lésions vésiculeuses en foyer apparaissent sur la phase interne des lèvres et au niveau du pharynx. Des vésicules translucides de 3 à 5 mm de diamètre apparaissent également sur les doigts au niveau des zones péri-unguéales, le rebord des talons, et des lésions palmaires et plantaires peuvent également y être associée (Rotbart & Kirkegaard, 1992). Le syndrome " pied-main bouche " a déjà été associé en 1999 lors d'une épidémie à Taïwan à des atteintes cardiaques (myopéricardites) et neurologiques (encéphalites et paralysies) (Ho *et al.*, 1999).
- Les *atteintes cardiaques* sont le reflet du cardiotropisme des entérovirus, en particulier des coxsackievirus B. Ces derniers sont reconnus comme responsables des myocardites aiguës nécrosantes (Andréoletti & Wattré, 1999). La présence de foyers de nécrose des myocytes, un infiltrat inflammatoire constitué majoritairement de lymphocytes T associés à l'absence de fibrose interstitielle sont les 3 critères histologiques (classification de "Dallas") caractérisant la myocardite. Des études histopathologiques basées sur la classification de Dallas ont pu analyser l'incidence de la myocardite aiguë (diagnostic histologique), et ainsi étudier la possibilité d'une corrélation entre la prévalence de ces cardiomyopathies aiguës et celle des infections cardiaques entérovirales (Aretz *et al.*, 1986). Selon l'OMS approximativement 3,2 % des infections symptomatiques à Entérovirus seraient associées à des signes de myocardite ou de myopéricardite (Baboonian *et al.*, 1997). Les nouveau-nés (<6 mois), les femmes enceintes (premier trimestre) et les hommes âgés de 20 à 39 ans sont particulièrement susceptibles aux infections cardiaques à entérovirus et au développement d'une myocardite nécrosante, sub-aiguë, aiguë voire chronique. L'exercice physique intense et les maladies respiratoires semblent favoriser le développement des atteintes myocardiques par les entérovirus (Baboonian *et al.*, 1997). Cliniquement, les symptômes de la myocardite à entérovirus découlent de l'atteinte endomyocarditique ; fièvre, palpitations, dyspnée d'effort, tachycardie, trouble du rythme avec allongement de la cupule ST-T à l'ECG très tôt dans l'histoire de la maladie, inversion de l'onde T, séro-élévation des enzymes cardiaques. Des séquelles avec des troubles du rythme

- et des dilatations ventriculaires peuvent être observées plusieurs mois voire plusieurs années après l'épisode de myocardite aiguë (Rotbart & Kirkegaard, 1992). L'isolement du virus par culture cellulaire à partir de sang, de prélèvement de gorge ou des selles de patients souffrant de myopéricardites ne permet pas de distinguer une infection entérovirale associée (clinique ou sub-clinique) ou un portage asymptomatique (porte d'entrée oro-fécale), d'une véritable infection cardiaque (Andreoletti *et al.*, 1996). La mise en évidence d'une étiologie entérovirale dans les pathologies cardiaques nécessite inévitablement la détection du génome viral ou du virus infectieux dans le myocarde ou le liquide de péricardite. Des particules entérovirales ont été détectées dans le tissu myocardique et le liquide péricardique après autopsies de patients décédés de myopéricardites (Martino *et al.*, 1995). Le développement des techniques de RT-PCR présentant une sensibilité 100 à 1000 fois supérieure à celle des techniques de culture cellulaire a permis la détection rapide et spécifique des Entérovirus dans les cas de myocardites virales à partir de prélèvements de liquide péricardique ou de biopsies endomyocardiques. L'incidence des infections entérovirales détectées par RT-PCR dans les myocardites varie entre 20 et 80 % (en moyenne 34 %) selon les malades recrutés et les techniques utilisées (Baboonian *et al.*, 1997). Le séquençage des produits d'amplification a permis d'identifier génotypiquement les coxsackievirus B3 et B5.
- Les *infections généralisées du nouveau-né* : De manière générale, c'est la mère qui à l'origine de la contamination post-natale (59 à 68 % des cas) ; dans les autres cas il s'agira d'infections familiales ou nosocomiales. Plus la contamination a lieu tôt après la naissance plus le risque d'évolution risque d'être fatal. Si l'infection a lieu cinq à 7 jours avant l'accouchement, le titre en anticorps maternels est insuffisant et ne permet pas une protection suffisante pour éviter de développer une infection sévère multiviscérale chez le nouveau-né. Les virus responsables de ces infections post-natales sont le plus généralement des echovirus de type 11 ou des coxsackievirus B et plus rarement des coxsackievirus A. La maladie néo-natale débute généralement par une fièvre, une irritabilité, une anorexie, des signes respiratoires, encombrement des voies respiratoires supérieures, et un rash cutané présent dans 40 % des cas (Rotbart & Kirkegaard, 1992).

**Tableau 5 :** Principaux syndromes cliniques caractéristiques de différents sérotypes d'entérovirus (D'après Mammette, 2002).

Types	Syndromes spécifiques
Coxsackievirus A	Herpangine Eruptions cutanées Syndromes pied-main-bouche Conjonctive hémorragique
Coxsackievirus B	Myocardites (B1-B5) Péricardites (B1-B5) Pleurodynie (B1-B5) Hépatites Diabète juvénile ? (B4)
Echovirus	Exanthème de Boston (E16)
Entérovirus 68-71	Conjonctivites hémorragiques (Ent 70) Bronchiolites (Ent 68) Paralysie et pied-main-bouche (Ent 71)

Dans les cas d'atteintes multiviscérales, les hépatites nécrosantes associées à un syndrome de coagulation vasculaire disséminée, à une pancréatite, à une entérite nécrosante, sont responsables d'un décès dans 80 % des cas (Abzug *et al.*, 1995). Des cas de myocardites ont été également décrits avec une mortalité comprise entre 30 et 50 % des cas. Dans un petit nombre de cas, on peut observer des encéphalites (Rotbart, 1995). Cependant en l'état actuel des connaissances, l'incidence des infections post-natales à entérovirus n'est pas précisément connue. Selon les pédiatres Américains, la morbidité et la mortalité observée au cours des différents types d'infections périnatales seraient respectivement de 74 % et de 10 % (Rotbart & Kirkegaard, 1992).

- La *maladie de Bornholm* : également appelée pleurodynie, myalgie épidémique. C'est le groupe des coxsackievirus B (B1 à B5) qui est à l'origine de cette pathologie musculaire et qui peut cliniquement évoquer une pleurésie. Le début de la maladie est soudain chez 75 % des individus et commence par des maux de tête, suivie des prodromes habituels durant 7 à 10 jours. A la phase d'état, des douleurs thoraciques et abdominales liées à une atteinte des muscles du diaphragme sont associées à des maux de tête, des nausées, vomissements, une diarrhée et de la fièvre. Cette phase d'état dure en moyenne 3 à 4 jours et les symptômes vont disparaître en moins d'une semaine (Rotbart & Kirkegaard, 1992). Un certain nombre de malades peuvent ensuite présenter des myalgies chroniques au niveau des muscles périphériques ; certaines études ont montré par biologie moléculaire, la présence des entérovirus dans les muscles périphériques de patients atteints de myalgies chroniques suggérant la présence d'une infection à Entérovirus chronique de type persistante (Muir & Archard, 1994).
- Les *syndromes gastro-intestinaux*. La relation potentielle entre certains entérovirus comme les echovirus 11, 14, 18 et 19 et des diarrhées a été décrite. Cependant il arrive souvent que l'on retrouve dans les selles des malades à la fois des entérovirus mais aussi des rotavirus ou des astrovirus ; l'agent étiologique réellement responsable étant alors difficile à identifier. De plus bien souvent on retrouve chez les populations témoins autant de virus excrétés dans les selles que chez les personnes malades (Portage chronique asymptomatique de souches entérovirales) (Melnick & Metcalf, 1985). Cependant lors d'infection à echovirus ou coxsackievirus B, certains malades ont présentés des syndromes intestinaux

douloureux évoquant une appendicite et dont la régression était spontanément favorable: l'inflammation des ganglions mésentériques pourraient expliquer ces syndromes gastro-intestinaux (Rotbart & Kirkegaard, 1992).

- La *Poliomyélite Paralytique Aiguë* (PPA) est la plus ancienne des entéroviroses humaines connues. Classiquement associée aux trois sérotypes de poliovirus, seulement 1 à 2 % des personnes infectées par voie digestive développent cette forme nerveuse au cours de laquelle le poliovirus gagne le neurone moteur périphérique. Une paralysie musculaire flasque aiguë des membres concernés, ainsi qu'une atrophie musculaire survient dès la mort du neurone moteur. Une paralysie des muscles respiratoires entraîne, dans bien des cas, la mort du patient (Crainic *et al.*, 1995). En 1988, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), en collaboration avec le Rotary Club, les CDC américains et l'UNICEF, a initié un programme global d'éradication des poliovirus. En 17 ans, le nombre de cas a été réduit de 99%, passant de 350 000 en 1988 répartis dans 125 pays à 1951 cas en 2005. En 2006, seuls 4 pays étaient encore considérés comme zone d'endémie. L'Europe est devenue en 2002 la troisième région du globe, après l'Amérique et l'Océanie, déclarée indémie d'infections à poliovirus (Pallansh & Roos, 2007).
- La *méningite lymphocytaire à liquide clair* : cette infection à entérovirus est, en termes de fréquence relative, la plus importante des entéroviroses (Gaudin, 1991). Les entérovirus constituent la principale étiologie des méningites aseptiques. Elle touche généralement les enfants et adolescents, et se traduit par un syndrome méningé, parfois accompagné de fièvre, de céphalées ou de raideur de la nuque. D'évolution rapidement favorable, cette infection se présente volontiers sous la forme d'épidémie estivale (Rotbart, 1995).
- Les *encéphalites*: elles sont plus rares que les méningites, mais leurs séquelles neurologiques sont fréquentes et plus graves. Contrairement aux encéphalites à Herpesviridae, les encéphalites à Entérovirus ne sont pas focales et entraînent une dépression généralisée des fonctions neurologiques. Les prodromes sont une fièvre comprise entre 38 et 40°C, une toux, des myalgies, avec des symptômes évoquant une infection des voies aériennes supérieures. Le début des signes neurologiques est souvent brutal avec une confusion associée à une léthargie une irritabilité, une faiblesse musculaire ; un coma ou un état de mal épileptique généralisé peut

survenir. L'incidence des encéphalites à Entérovirus est à l'heure actuelle sous-estimée car le diagnostic étiologique n'est pas systématiquement établi (Rotbart, 1997).

### 3.3.2. LES INFECTIONS PERSISTANTES OU CHRONIQUES EN PATHOLOGIES HUMAINES

Pendant de nombreuses années, on pensait que les infections chroniques étaient réservées aux seuls virus à ADN et à certains rétrovirus. La preuve indiscutable de la capacité d'un virus à ARN à induire une infection chronique a été obtenue avec la découverte, en 1989, du virus de l'hépatite C. Ce phénomène de persistance virale lié à une infection chronique, concerne également les entérovirus. Ces infections persistantes sont impliquées dans le développement de maladies chroniques (Hyöty *et al.*, 1995).

L'instauration de l'infection persistante repose sur trois mécanismes complémentaires. Premièrement, la réponse immunitaire de l'hôte ne parvient pas à éliminer le virus des cellules infectées ; l'infection persistante est donc synonyme d'échappement au système immunitaire de l'hôte. Deuxièmement, les virus peuvent acquérir des caractéristiques particulières modifiant leur dynamique de réplication ; leur permettant ainsi de réguler leurs propres gènes et ceux de la cellule infectée pour atteindre un état de réplication non lytique des cellules infectées. Troisièmement, la persistance virale induit des pathologies chroniques inflammatoires ; qui contribuent à perturber le fonctionnement de la cellule de l'hôte.

Certaines pathologies humaines pourraient être liées à une infection persistante par des entérovirus. Différentes études clinico-biologiques ont documenté la présence d'une infection persistante à entérovirus dans plusieurs syndromes cliniques parmi lesquels :

- La méningo-encéphalite chronique développée au cours des déficits de l'immunité humorale chez des patients souffrant d'une agammaglobulinémie congénitale liée au chromosome X (McKinney *et al.*, 1987).
- Le syndrome post-poliomyélitique associé à la persistance du poliovirus (Leparc-Goffart *et al.*, 1996). Cette pathologie se caractérise par une fatigue, une faiblesse et des douleurs liées à une atrophie musculaire progressive chez des sujets immunocompétents 30 à 40 ans après un épisode de poliomyélite paralytique aiguë.

- Les myocardites chroniques et les cardiomyopathies dilatées (Muir, 1993 ; Andréoletti *et al.*, 2007) caractérisées par une dilatation du ventricule gauche ou bi-ventriculaire associée à une altération de la contractilité cardiaque (volume d'éjection systolique < 20 %) et des troubles du rythme. Ces pathologies le plus souvent associées aux coxsackievirus B se développeraient chez 10 à 20 % des patients atteints de myocardite virale.
- Le diabète insulino-dépendant (Hyöty *et al.*, 1995 ; Yin *et al.*, 2002). Les différentes études menées montrent les coxsackievirus B comme étant responsables de l'apparition de la pathologie. Ces virus pourraient agir par mimétisme moléculaire au niveau des cellules  $\beta$ -pancréatiques et seraient donc à l'origine d'une maladie auto-immune. Certaines théories incriminent des infections entérovirales *in utero* qui pourraient successivement avoir diminuées les seuils de tolérance immunologique (Hyöty, 2002 ; Viskari *et al.*, 2002).
- Le syndrome de fatigue chronique (Chia *et al.*, 2008 ; Kerr, 2008) se caractérise par une asthénie prolongée couplée à des douleurs musculaires persistantes. Certains auteurs ont mis en évidence la présence du génome des entérovirus dans les fibres musculaires striées (Douche-Aourik *et al.*, 2003).
- La sclérose latérale amyotrophique (SLA) (Brahic *et al.*, 1985 ; Ravits, 2005) est la maladie du motoneurone la plus fréquente chez l'adulte (Bouche, 1986). Elle est assez proche de l'atrophie musculaire progressive (Berger *et al.*, 2000).

## **4. LES ENTÉROVIRUS : DES PATHOGÈNES À TROPISME RESPIRATOIRE**

### **4.1. Données cliniques**

#### **4.1.1. Infections respiratoires hautes à entérovirus**

Différents sérotypes d'entérovirus non polio ont été isolés et identifiés dans des cas d'infections des voies respiratoires hautes (rhinites, laryngites, pharyngites). Les premières données basées sur des isollements en culture cellulaire remontent à 1967 où Ray et coll. décrivent des cas de pharyngites à coxsackievirus B4 dans une collectivité d'enfants. Plusieurs autres publications ont décrit de manière similaire des cas groupés d'infections respiratoires des voies aériennes supérieures par echovirus 1, coxsackievirus B2, B3, B5 et A2 (Leogrande & Trombetti, 1968 ; Nakayama *et al.*, 1989).

Depuis ces premières études, les infections respiratoires hautes à entérovirus sont bien documentées avec plusieurs études épidémiologiques (Nokso-Koivisto *et al.*, 2002 ; Lin *et al.*, 2004 ; Chonmaitree *et al.*, 2008). L'étude de Chonmaitree et coll. montre que les entérovirus seraient responsables de 14 % des cas d'infections respiratoires hautes chez des enfants de 6 mois à 3 ans. Les entérovirus représenteraient ainsi la troisième cause d'infection respiratoire haute après les adénovirus et les rhinovirus (Chonmaitree *et al.*, 2008). La majorité des infections des voies respiratoires supérieures sont bénignes, spontanément et rapidement résolutive (Chonmaitree *et al.*, 2008). Il n'y a pas de cas rapportés concernant des complications associant les infections respiratoires hautes par les entérovirus.

#### **4.1.2. Infections respiratoires basses à entérovirus**

Au cours des infections respiratoires basses (bronchites, pneumonies, broncho-pneumonies, bronchiolites), une colonisation de l'épithélium respiratoire pharyngé (porte d'entrée de l'infection virale), puis de l'épithélium respiratoire bronchique est observée (Chonmaitree *et al.*, 1995 ; Andréoletti, 2003). Ces infections touchent plus particulièrement les nourrissons et les enfants âgés de moins de 4 ans (Eckert *et al.*, 1967 ; Chonmaitree *et al.*, 1995 ; Andréoletti *et al.*, 2000 ; McCarthy *et al.*, 2000; Jarti *et al.*, 2004 ; Oberste *et al.*, 2004).



Historiquement, Eckert et coll. ont rapporté, en 1967, des cas de bronchiolites infantiles induites par des coxsackievirus du groupe B aux États-Unis. Il a été rapporté, par la suite, une épidémie de bronchite provoquée par echovirus 19 en Italie en 1969 (Crovati *et al.*, 1969). Enfin, une étude publiée en 1970 a rapporté des cas nosocomiaux groupés d'infections pulmonaires à echovirus 11 dans une maternité allemande (Hercik *et al.*, 1970).

Récemment, plusieurs études de cohorte incluant des nourrissons ou des jeunes enfants hospitalisés pour une bronchiolite ou un asthme exacerbé ont identifié par RT-PCR la présence du génome des entérovirus dans 8 à 25 % des échantillons respiratoires (Johnston *et al.*, 1995 ; Freymuth *et al.*, 1999 ; Andréoletti *et al.*, 2000 ; Jartti *et al.*, 2004). Andréoletti et coll. (2000) ont montré une prévalence de détection du génome entérovirale par RT-PCR de 11.9 %, soit 10 cas sur 84 enfants de moins de 1 an, venus consulter pour bronchiolite. Parmi ces 10 cas positifs, 2 présentaient une co-infection soit par le virus respiratoire syncytial soit par un adénovirus. En 2004, Jartti et coll. ont analysé les prélèvements de 293 enfants de 3 mois à 16 ans qui avaient consulté pour une pathologie respiratoire basse entre septembre 2000 et mai 2002. Sur les 293 enfants inclus dans cette étude, 72 avaient présenté une détection positive du génome viral dans leur prélèvement nasopharyngé, démontrant ainsi que les entérovirus représentaient, après le VRS et les rhinovirus, le troisième agent étiologique de la bronchiolite chez l'enfant de 3 mois à 1 an et le premier chez l'enfant de plus de 1 an (Jartti *et al.*, 2004). Par ailleurs, les deux études de Freymuth et coll. ainsi que celle de Johnston et coll. en 1995 se sont intéressées aux agents viraux responsables des cas d'exacerbation de l'asthme. Ces études montrent, par biologie moléculaire, la détection du génome des entérovirus dans 10 à 21.5% des cas étudiés, plaçant ainsi les entérovirus en deuxième position des agents étiologiques d'exacerbation de l'asthme infantile (Johnston *et al.*, 1995 ; Freymuth *et al.*, 1999). (**Tableau 6**).

Des séries de cas rapportés font état de complications broncho-pulmonaires graves voire mortelles par les entérovirus. Ces cas d'infections respiratoires compliquées touchent essentiellement les enfants en bas âge, et cela du fait de l'absence d'immunité spécifique. Parmi ces cas mortels chez les nourrissons, on peut citer celui décrit par Cheesman et coll. en 1997 concernant une pneumonie à echovirus 9 et une infection bronchopulmonaire à coxsackievirus B4 (Porres *et al.*, 1985).

**Tableau 6 :** Détection des virus respiratoires communs dans des aspirations naso-pharyngées d'enfants souffrant de bronchiolite ou d'asthme infantile.

Auteurs (Année)	Nombre de patients	Tranches d'âges (année)	Techniques virologiques utilisées				Nombre de détection positive par virus (%)							Total de positifs (%)	
			Culture	Sérologie	Immunofluorescence	PCR	VRS	Rhinovirus	Entérovirus	Parainfluenzae	Influenzae	Adénovirus	Coronavirus		Métagneumovirus
Johnston et coll. (1995)	108 (292 prélèvements)	9-11	+	+	+	+	12 (4,1)	84 (28,7)	63 (21,5)	21 (7)	21 (7)	-	38 (13)	-	226 (77)
Freyth et coll. (1999)	75 (132 prélèvements)	0,3-14	+		+	+	28 (21)	62 (47)	13 (9,8)	5 (4)	7 (5)	6 (4,5)	6 (4,5)	-	108 (82)
Andréoletti et coll. (2000)	84	0,3-14			+	+	45 (53,6)	16 (19)	10 (12)	0	0	11 (13)	0	-	63 (74)
Jarti et coll. (2004)	293	0,25-16	+	+	+	+	80 (27)	71 (24)	72 (25)	17 (6)	7 (2,5)	15 (5)	4 (1,3)	12 (4)	258 (88)
Jacques et coll. (2006)	192	0-3	+		+	+	58 (30)	40 (21)	17 (9)	3 (2)	11 (6)	1 (0,5)	0	8 (4)	138 (72,5)

Récemment Legay et coll. (2007) ont décrit un cas de pneumonie mortelle à coxsackievirus A16 chez un adulte immunocompétent, qui avait été infecté à l'âge de 77 ans par son petit fils présentant un syndrome pied-main-bouche (Legay *et al.*, 2007). D'autres cas rapportés décrivent des histoires cliniques de complications respiratoires induites par différents entérovirus tels que les entérovirus 68, 71 et coxsackievirus B2 et A21 (Barson & Reiner, 1986 ; Chang *et al.*, 1999 ; Schiff *et al.*, 2000 ; Oberste *et al.*, 2004b).

Cependant le rôle et la prévalence des infections à entérovirus dans les infections respiratoires basses pédiatriques ainsi que chez les adultes immunodéprimés restent à préciser dans des cohortes de patients cliniquement bien définis et inclus avec des critères stricts.

## **4.2. Données épidémiologiques**

### **4.2.1. Population**

Les différentes études épidémiologiques publiées ont clairement montré que 50 à 60 % de l'ensemble des infections à entérovirus, survenaient préférentiellement chez les enfants de moins de 4 ans avec un sexe ratio de 1,4 à 1,5 (Khetsuriani *et al.*, 2006 ; Antona *et al.*, 2007). En France et aux Etats-Unis, l'incidence de détection des entérovirus dans cette tranche d'âge est de 34 à 44 % avant 1 an, et de 15 à 19 % pour les enfants entre 1 et 4 ans (Khetsuriani *et al.*, 2006). Dans cette population d'enfants, les pathologies des voies respiratoires hautes et basses, au premier rang desquelles la bronchiolite (environ 20 à 40%), représentent environ 8 à 10 % de l'ensemble des infections à entérovirus (Khetsuriani *et al.*, 2006 ; Antona *et al.*, 2007). Par ailleurs, les entérovirus ont été identifiés par plusieurs auteurs comme responsables de broncho-pneumonies graves et mortelles (Cheeseman *et al.*, 1977 ; Porres *et al.*, 1985 ; Barson & Reiner, 1986 ; Birenbaum *et al.*, 1997 ; Chang *et al.*, 1999 ; Schiff *et al.*, 2000 ; Oberste *et al.*, 2004). Cependant, la distribution épidémiologique de cas groupés d'infections respiratoires à entérovirus dans une population donnée ou dans un noyau épidémiologique, n'avait jamais été explorée.

#### 4.2.2. Saisonnalité

La circulation des entérovirus montre la même tendance saisonnière dans toutes les études épidémiologiques réalisées dans les pays tempérés (Pallansch & Roos, 2007). Le nombre de cas augmente chaque année au cours de l'été, avec un pic en juillet, jusqu'au début de l'automne, puis diminue lentement. Certaines années, comme en 2004, un deuxième pic peut être observé au cours du mois d'octobre (Khetsuriani *et al.*, 2006 ; Antona *et al.*, 2007). Les infections des voies respiratoires hautes et basses à entérovirus ont une saisonnalité qui reste à préciser dans de futures études prospectives.

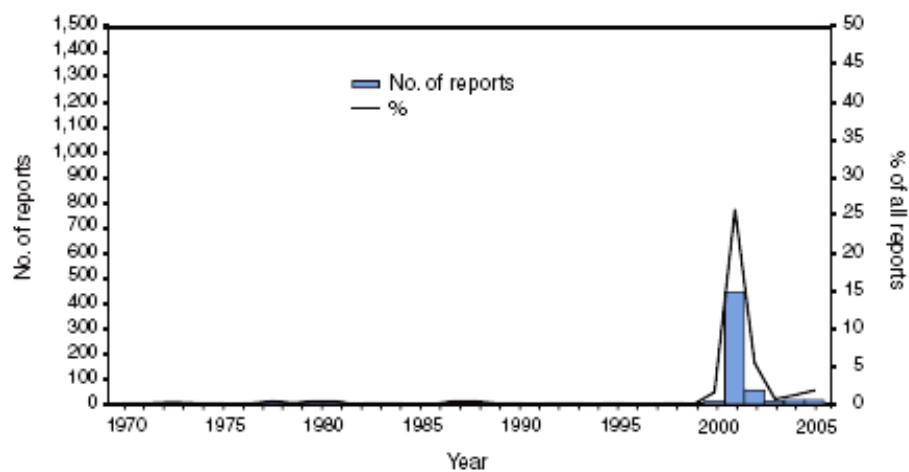
#### 4.2.3. Modes de circulation

Les études épidémiologiques ont également montré que les différents sérotypes d'entérovirus à tropisme respiratoire présentent deux modes de circulation : épidémiques et endémiques (Khetsuriani *et al.*, 2006 ; Antona *et al.*, 2007).

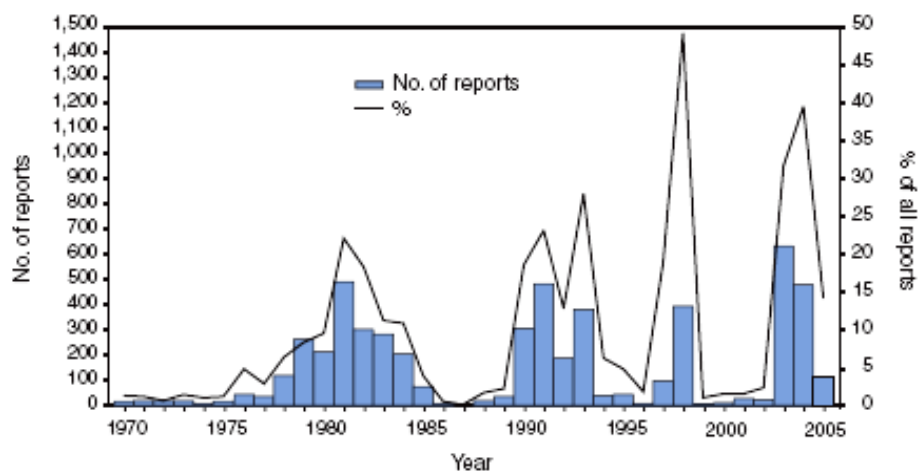
Certains sérotypes tels que les echovirus 6, 13, 30 et le coxsackievirus B5 ont un schéma de circulation de type épidémique, caractérisé par d'importantes fluctuations du nombre d'isollements au fil du temps, et entrecoupées de pics importants lors des années épidémiques (**Figure 16**).

Les sérotypes d'entérovirus à circulation de type endémique ont tendance à être stables dans le temps, avec généralement un faible nombre de cas rapportés chaque année. Il existe néanmoins quelques pics discrets visibles durant les périodes épidémiques (**Figure 17**). Parmi ces sérotypes, on trouve les Coxsackievirus A16, B2, B4. Cependant le mode de circulation des entérovirus à tropisme respiratoire reste à préciser en France et dans les pays industrialisés.

A



B



**Figure 16 :** Répartition annuelle des cas d’infections à entérovirus sur une période de 30 ans aux Etats-Unis pour deux sérotypes d’entérovirus (A circulation du sérotype echovirus 13 et en B circulation du sérotype echovirus 30) ayant une circulation temporelle de type épidémique caractérisés par d’importantes fluctuations du nombre d’isolements au fil du temps (D’après Khetsuriani et al., 2006)

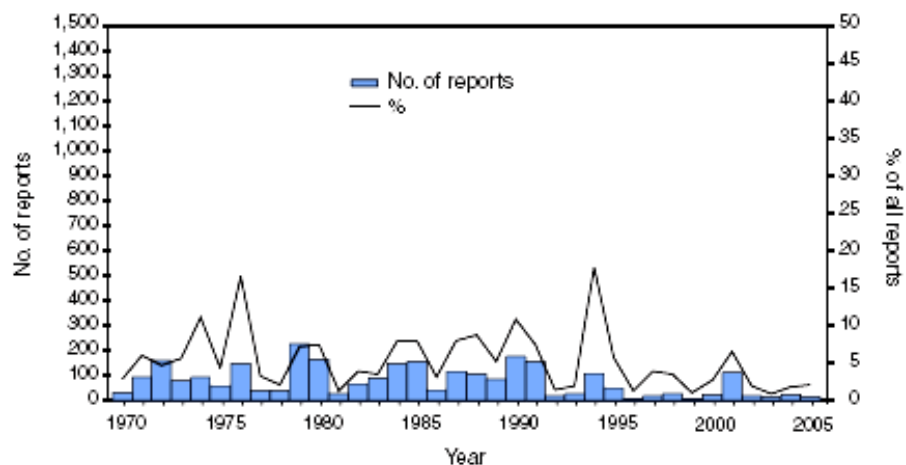
#### 4.2.4. Sérotypes identifiés

Les infections respiratoires à entérovirus sont très majoritairement observées chez les enfants de moins de 15 ans. Dans cette population, les infections respiratoires sont associées plus fréquemment aux sérotypes suivants : echovirus 6, 7, 9, 11, 13, 30 et Coxsackievirus B2, B4 et B5. Cependant, ces données sur la fréquence des sérotypes impliqués dans des d'infections des voies respiratoires ont été obtenues uniquement chez les souches d'entérovirus cultivables identifiées par les mélanges d'anticorps neutralisants. Ainsi, il serait nécessaire de réaliser une identification des entérovirus par génotypage de la protéine de capsid VP1.

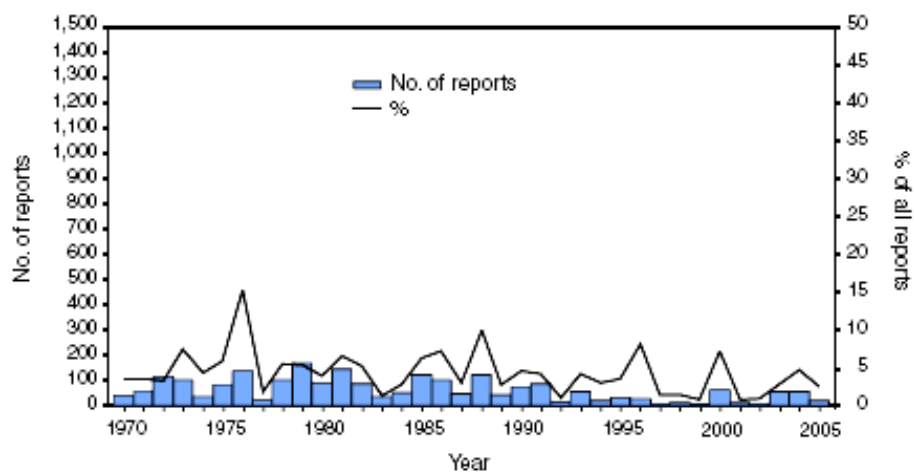
Les echovirus 6 sont souvent associés à des épidémies de méningite chez les nouveau-nés et il peut être associé à des complications à type de pneumonie. La population la plus sensible aux infections par les echovirus 6 est constituée par les enfants de moins de 1 à 4 ans (Carolane *et al.*, 1985 ; Boyd *et al.*, 1987).

Les echovirus 7 représentent entre 4 et 8 % des cas d'infections de tous types à entérovirus, et ils ont été isolés dans 7 à 9 % des seuls cas d'infections des voies respiratoires associées aux entérovirus en France entre 1999 et 2005 (Antona *et al.*, 2007). Soixante pour cent des infections respiratoires à echovirus 7 surviennent chez les enfants de moins de 1 an (Khetsuriani *et al.*, 2006 ; Antona *et al.*, 2007). La circulation des echovirus 7 présente un caractère épidémique cyclique, avec des intervalles irréguliers entre les périodes de forte et de faible activité. Cependant, les épidémies associées à echovirus 7 sont assez rares avec des pics survenant au cours de périodes de faible circulation endémique de 2 à 6 ans (Khetsuriani *et al.*, 2006). En 1984, par exemple, une épidémie nosocomiale a eu lieu dans une unité de soins intensif de néonatalogie (Wilson *et al.*, 1989).

A



B



**Figure 17 :** Répartition annuelle des cas d'infections à entérovirus sur une période de 30 ans aux Etats-Unis pour deux sérotypes d'entérovirus ayant une circulation temporelle de type endémique (A circulation du sérotype coxsackievirus B4 et en B circulation du sérotype coxsackievirus A16). Ces sérotypes ont tendance à être stables dans le temps, avec généralement un faible nombre de cas rapportés chaque année. (D'après Khetsuriani et al., 2006)

Les echovirus 9 ont souvent été associés à des épidémies d'infections communautaires (Ashwell *et al.*, 1996). Leur prévalence dans les infections respiratoires est estimée à 5 % ; celles-ci surviendraient préférentiellement dans la tranche d'âge de moins de 1 an (Khetsuriani *et al.*, 2006 ; Antona *et al.*, 2007). De manière remarquable, echovirus 9 a un schéma de circulation épidémique avec une forte augmentation du taux de détection tous les 3 à 5 ans. L'infection à echovirus 9 s'est révélée parfois fatale. Dans une série de cas d'infections communautaires pédiatriques à echovirus 9, 4,5 % des enfants de moins de 1 mois hospitalisés en réanimation, avaient développé une infection néonatale fatale dont certaines étaient multi viscérales ou respiratoires (Cheesman *et al.*, 1977 ; Ketsuriani *et al.*, 2006).

Actuellement dans le monde, les echovirus 11 représentent le sérotype le plus fréquemment détecté chez les nourrissons âgés de moins de 1 an. Ce sérotype a un schéma de circulation épidémique avec des pics survenant à intervalles irréguliers. Il est responsable de 7.6 à 18 % des cas d'infections respiratoires et touche plus particulièrement les enfants de moins de 1 an. (Antona *et al.*, 2007).

Les echovirus 13 ont un profil de circulation atypique. En effet, entre 1970 et 2000, il n'a été isolé que dans 0.5% des cas d'infections à entérovirus. Puis en 2000-2001, il est à l'origine d'une large épidémie de méningites à liquide clair à travers le monde. En France, il a provoqué 420 cas en 2000, soit 32 % de l'ensemble des entérovirus isolés cette année là. Depuis, le nombre de cas détectés a très nettement diminué de 2001 à 2007 (Antona *et al.*, 2007). Cependant, ce virus est toujours en circulation et pourrait être responsable d'infection des voies respiratoires chez les enfants âgés de 5 à 14 ans en France et aux Etats-unis (Kobayashi *et al.*, 2005 ; Antona *et al.*, 2007).

Les echovirus 30 sont de type épidémique et sont retrouvés à l'échelle planétaire (Khetsuriani *et al.*, 2006). Ils ont été souvent isolés dans des cas de méningite à liquide clair, mais ils seraient également responsables de 1 à 2 % des cas de pathologies respiratoires en France et aux Etats-Unis (Khetsuriani *et al.*, 2006 ; Antona *et al.*, 2007). Ce sérotype infecterait plutôt les enfants de plus de 1an ainsi que les sujets de plus de 15 ans (Khetsuriani *et al.*, 2006).

Le coxsackievirus B2 représente entre 6 et 7 % des cas de pathologies respiratoires. Ce sérotype d'entérovirus présente une circulation endémique avec chaque année un taux



d'isolement assez variable. Il est, après l'échovirus 11, l'entérovirus le plus souvent identifié chez les enfants de moins de 1 an (Khetsuriani *et al.*, 2006 ; Antona *et al.*, 2007).

Le coxsackievirus B4 ne connaît pas de pic épidémique. Ce virus circule de façon endémique. Très fréquemment isolé dans les cas d'infections des voies respiratoires (5 à 7%), on le détecte surtout chez les jeunes enfants où il provoque plus fréquemment que les autres sérotypes des complications (Porres *et al.*, 1985).

Le coxsackievirus B5 peut induire des pathologies cliniques similaires à celles observées avec les autres coxsackievirus B. Ce sérotype est connu pour causer des pics épidémiques d'une durée de 1 an tous les 3 à 6 ans (Khetsuriani *et al.*, 2006). Sa prévalence dans les infections des voies respiratoires varie de 1 à 2 % chez les enfants de moins de 4 ans (Antona *et al.*, 2007). (**Tableau 7**)

### **4.3. Données virologiques**

#### **4.3.1. Détection des entérovirus**

##### **4.3.1.1. Prélèvement.**

Pour les infections des voies respiratoires supérieures, les prélèvements de gorge et de nez sont les plus utiles. Le lavage nasal et l'aspiration naso-pharyngée sont des prélèvements pouvant contenir les plus hauts titres de virus et peuvent fournir un grand nombre de cellules notamment pour les techniques d'immunofluorescence. Les écouvillons naso-pharyngés sont plus faciles à obtenir et peuvent également être utilisés pour la culture (Storch, 1999). Le rendement des cultures virales peut être optimisé en combinant un frottis de gorge à un prélèvement naso-pharyngé dans le même tube de transport (Storch, 1999). Des considérations particulières s'appliquent au choix du prélèvement chez les adultes car aucune des techniques utilisées pour obtenir des échantillons naso-pharyngés chez les jeunes enfants n'est applicable aux adultes chez qui on pratique un écouvillonnage au niveau du voile du palais (Storch, 1999).

**Tableau 7 :** Données épidémiologiques et cliniques (Tranches d'âge, pourcentage d'infections respiratoires, pourcentages de complications fatales) des sérotypes d'entérovirus les plus souvent isolés (D'après Khetsuriani *et al.*, 2003 ; Khetsuriani *et al.*, 2006 ; Antona *et al.*, 2007 ; Jacques *et al.*, 2008)

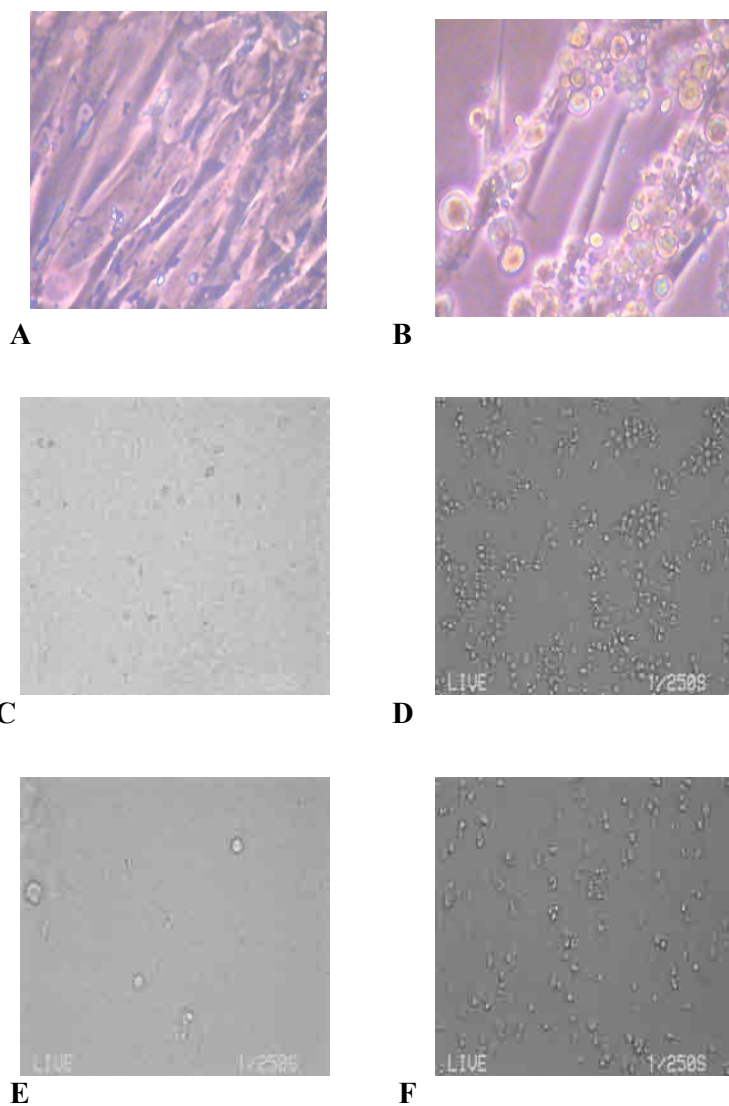
Sérotipe Identifié	Tranche d'âge la plus sensible (années)	Pourcentage d'infections respiratoires	Pourcentage de cas fatals toutes pathologies confondues	
			- de 1 mois	+ de 1 mois
echovirus 6	1-4	environ 3	18,8	4,1
echovirus 7	0-1	7 à 9	13,3	1,2
echovirus 9	0-1	environ 5	4,5	0
echovirus 11	0-1	7,6 à 18	19	3,2
echovirus 13	5-14	environ 2	-	-
echovirus 30	5-14	1 à 2	20	2,8
coxsackievirus B2	0-1	6 à 7	11,1	2,6
coxsackievirus B4	0-1	5 à 7	40	2,2
coxsackievirus B5	0-4	1 à 2	0	1,6

Pour les infections des voies respiratoires inférieures, et plus particulièrement en réanimation médicale, les aspirations trachéales et les échantillons issus de bronchoscopies, en particulier le liquide de lavage broncho-alvéolaire, sont utilisés pour l'isolement des virus par la culture (Storch, 1999). La réalisation des lavages broncho-alvéolaires et bronchiques est réservée aux pathologies graves où l'obtention d'un diagnostic étiologique est rendue nécessaire à cause de l'état clinique critique du patient (Storch, 1999).

#### **4.3.1.2. Les outils de diagnostic**

##### **4.3.1.2.1. L'isolement des entérovirus**

Cette technique reste la méthode diagnostique de référence permettant d'isoler la souche pathogène. Les prélèvements doivent être inoculés sur plusieurs lignées cellulaires, car la sensibilité d'isolement est variable en fonction des sérotypes. Les cellules Vero, Hep-2 et BGM (cellules de rein de singe) sont les cellules le plus souvent utilisées pour isoler les poliovirus, les coxsackievirus B et les echovirus. Les cellules L20B qui sont des cellules murines transfectées exprimant PVR sont utilisées pour isoler les poliovirus. Les cellules MRC-5 (fibroblastes embryonnaires de poumon humain) sont préférentiellement utilisées pour isoler les souches de coxsackievirus A cultivables, d'echovirus et d'entérovirus 68-71. Les cellules KB (carcinome du plancher de la bouche) sont plutôt utilisées pour les coxsackievirus B. D'autres lignées cellulaires telles que les cellules RD (cellules de rhabdomyosarcome), les CMK (cellules primaires de rein de singe) ou les MA104 (cellules de rein de singe) et les HUH7 (cellules d'hépatocarcinome) ont été testées pour essayer d'augmenter la spécificité d'isolement des entérovirus (Dagan & Menegus, 1986 ; Bryden, 1992 ; Kok *et al.*, 1998, Freymuth *et al.*, 2005). Il existe d'autres cellules très souvent utilisées pour l'isolement des entérovirus telle que la lignée A549 (cellules alvéolaires carcinomateuses) ou les cellules BEAS-2B (cellules épithéliales bronchique immortalisées par l'antigène T du SV40). Ces cellules ont un très bon taux d'isolement des entérovirus dont certains sérotypes sont connus pour être impliqués dans les infections respiratoires (Jartti *et al.*, 2004). L'utilisation de ces deux lignées de cellules respiratoires humaines peut permettre l'optimisation de l'isolement des entérovirus à tropisme respiratoire. Cependant, aucune lignée cellulaire n'est permissive à l'ensemble des sérotypes d'entérovirus : il est donc recommandé, dans un but diagnostique, d'utiliser deux à trois lignées cellulaires différentes.



---

**Figure 18 :** Photographies d'effets cytopathiques obtenus en 2 à 12 jours après infection de (A) cellules fibroblastiques embryonnaires humaines (MRC5) , de (C) cellules épithéliales en lignée continue (MA104) et de (E) cellules épithéliales en lignée continu (A549) par Echovirus 30. On constate en B, D et F l'apparition d'un effet cytopathique caractérisé par la présence de cellules réfringentes, rondes, se décollant du support de culture. Photographies prises au laboratoire de virologie du CHU de Reims.

L'effet cytopathique (ECP) caractéristique des entérovirus apparaît en 2 à 12 jours en fonction du sérotype et des lignées cellulaires utilisées. L'ECP se caractérise par l'apparition de cellules réfringentes, rondes, se décollant de la surface de culture (**Figure 18**). Après coloration, on peut voir une large inclusion cytoplasmique repoussant le noyau à la périphérie, classiquement en forme de « béret basque » ou en « banane ». L'intérêt de la culture est d'être applicable en principe à tous les types de prélèvements. Cet outil permet, grâce à l'isolement des souches, un suivi épidémiologique. Il existe néanmoins des limites dues au fait que certains entérovirus sont peu ou pas cultivables, particulièrement les coxsackievirus A (Nsaibia *et al.*, 2007). L'inconvénient majeur est le délai de réponse car l'isolement de l'entérovirus prend en moyenne une semaine. Il faut ensuite encore 7 jours pour réaliser le typage de la souche virale isolée.

#### 4.3.1.2.2. Outils de biologie moléculaire

Le diagnostic virologique peut également être réalisé par des techniques de biologie moléculaire, et ceci en raison d'une sensibilité supérieure à la culture et d'un délai de rendu du résultat inférieur. De plus, ces techniques permettent de détecter l'ensemble des 89 sérotypes d'entérovirus impliqués en pathologie humaine (Nix *et al.*, 2006).

Ces méthodes sont basées sur l'amplification de la région 5'NC du génome des entérovirus car cette région est très conservée au sein du genre *Enterovirus*. Cette région est donc peu sensible aux variations génétiques. Une fois cette amplification par RT-PCR réalisée, l'analyse des fragments peut se faire selon deux approches. La première consiste à déposer les produits amplifiés sur un gel d'agarose tandis que la seconde consiste en une hybridation moléculaire avec des sondes spécifiques (Takeda *et al.*, 1994). Cette technique est encore très utilisée dans les laboratoires de diagnostic. Il est à noter que si ces techniques sont capables de détecter un entérovirus dans un prélèvement, elles ne permettent pas d'identifier le sérotype incriminé. Actuellement, la détection des entérovirus se fait grâce aux techniques de RT-PCR en temps réel. Cette approche tend à remplacer les techniques d'amplification génique standard au vu des nombreux avantages qu'elle apporte (quantification de la charge virale, rapidité d'exécution et limitation des risques de contamination). Plusieurs équipes ont mis au point des techniques d'identification sur la région conservée du génome des entérovirus humains qui se trouve être la région 5'NC

(Nijhuis *et al.*, 2002 ; Kares *et al.*, 2004 ; Dierssen *et al.*, 2007 ; Seme *et al.*, 2008 ; Hymas *et al.*, 2008).

#### **4.3.2. Identification des entérovirus**

##### **4.3.2.1. Neutralisation**

Après avoir détecté dans un prélèvement un entérovirus, il est important d'en identifier le sérotype. Cette étape intervient dans le cadre de l'éradication des poliovirus mais aussi pour permettre de suivre l'épidémiologie des infections à entérovirus non polio. La méthode mise au point par Lynn et Benyesh-Melnick en 1960 (LBM) reste la méthode de référence quand à l'identification des entérovirus. Cette technique repose sur la neutralisation de la souche virale par un mélange de sérums polyclonaux hyperimmuns équins se combinant pour qu'un sérum donné soit présent dans deux ou trois mélanges différents. Le sérotype des entérovirus est ensuite identifié par le profil de neutralisation des mélanges de sérums. La séroneutralisation de Lynn Benyesh-Melnick contient deux séries de sérums : le premier constitué de 8 mélanges (A-H) permet d'identifier 42 sérotypes d'entérovirus (3 poliovirus et 39 sérotypes de l'espèce B) (Melnick *et al.*, 1963) ; le second comprenant 7 mélanges (J-P) identifie 19 sérotypes de coxsackievirus A. La séroneutralisation a plusieurs inconvénients : cette technique dépend de l'isolement de la souche par la culture cellulaire ; elle est longue et onéreuse ; enfin, certaines souches sont déclarées non typables (dans environ 10% des cas l'identification n'est pas possible (Mammette, 2002)) soit par la présence de plusieurs souches dans le même prélèvement soit à la suite de l'apparition de variants antigéniques d'un sérotype existant ou encore de nouvelles souches apparues après la date de constitution des mélanges. Actuellement les pools LBM initiaux arrivent à épuisement, et sont remplacés par ceux de l'OMS. En outre, le génotypage tend à progressivement remplacer la séroneutralisation.

##### **4.3.2.2. Le génotypage**

Actuellement, grâce aux avancées technologiques, l'identification d'un entérovirus se fait de plus en plus grâce à l'analyse de la séquence nucléotidique. Plusieurs laboratoires ont

développé des techniques d'identifications basées sur le séquençage moléculaire de différentes régions du génome des entérovirus.

La technique la plus répandue est basée sur le séquençage de la région codant la protéine de capsid VP1. La grande majorité des équipes a développé des approches d'identification basées sur cette région car elle contient un grand nombre de sites antigéniques ayant servi à la mise en place de la classification initialement basée sur le caractère phénotypique des entérovirus. Cette région du génome est très variable et permet donc de différencier les sérotypes les uns des autres. La principale difficulté de cette approche vient justement de cette grande diversité de séquences qui oblige soit à utiliser plusieurs couples d'amorces pour pouvoir amplifier et séquencer tous les sérotypes (Oberste *et al.*, 1999b ; Oberste *et al.*, 2000 ; Caro *et al.*, 2001 ; Norder *et al.*, 2001), soit à dessiner des amorces dites dégénérées qui permettent grâce à un seul couple d'amplifier l'ensemble des sérotypes d'entérovirus (Oberste *et al.*, 2003 ; Kottaridi *et al.*, 2004). Toutes les études menées sur cette région se sont révélées probantes quelle que soit la région de VP1 étudiée (Caro *et al.*, 2001 ; Norder *et al.*, 2001 ; Oberste *et al.*, 2003). Actuellement, les études portent sur l'identification directe des entérovirus à partir du prélèvement sans avoir à passer par une étape de culture préalable. Cette nouvelle approche offre un gain de temps appréciable mais aussi la capacité de détecter et d'identifier les entérovirus non cultivables (Casas *et al.*, 2001 ; Iturriza-Gomara *et al.*, 2006 ; Nix *et al.*, 2006) (**Figure 19**).

Une autre approche d'identification par séquençage initiée en 1998 par l'équipe du CDC d'Atlanta porte sur la région du génome codant la protéine de capsid VP2. Cette approche fut tout d'abord considérée comme peu intéressante car la région initialement amplifiée était interne au virus et peu soumise aux contraintes extérieures, et donc contenant peu de variations génétiques permettant la différenciation de tous les sérotypes. Très récemment, des études ont montré qu'il était néanmoins possible d'identifier les différents sérotypes d'entérovirus *via* VP2 en choisissant plus attentivement la région à séquencer. Les résultats obtenus ont été comparables à ceux obtenus avec les approches de séquençage d'une partie de la région VP1. Cette approche pourrait être particulièrement intéressante dans le cadre de l'identification de virus mosaïques présentant des recombinaisons au niveau des protéines structurales (Bousslama *et al.*, 2007 ; Nasri *et al.*, 2007 (**Figure 19**)).

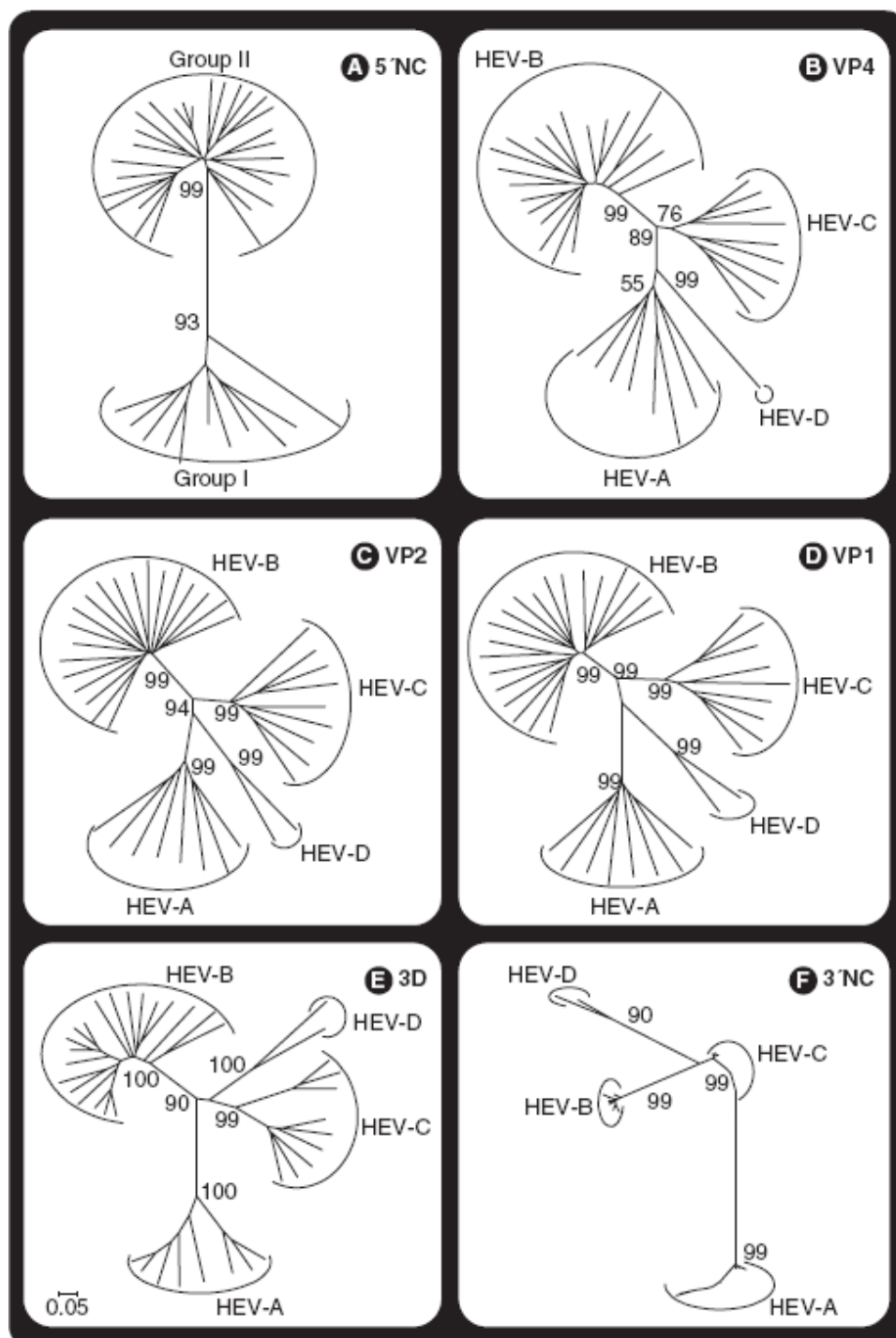
D'autres approches se développent, basées sur une identification en deux étapes. La première étape consiste à déterminer l'espèce d'entérovirus présente dans le prélèvement

grâce à la région 3'NC puis avec des amorces spécifiques d'espèce, d'identifier le sérotype en séquençant la région codant la protéine de capsid VP1 (Oberste *et al.*, 2006). Cette approche permet d'augmenter significativement la sensibilité de la technique, facilitant ainsi l'identification directe de l'entérovirus à partir du prélèvement (**Figure 19**).

Une dernière approche tend à se développer au vu des phénomènes de recombinaison décrite au sein des entérovirus. Cette technique se base sur un séquençage de la région codant la protéine de capsid VP1 des entérovirus associée à une analyse nucléotidique de la région codant l'ARN polymérase-ARN dépendante (3Dpol). Cette analyse permet alors d'identifier le sérotype d'entérovirus mais aussi de détecter la présence de phénomènes de recombinaison chez cette souche virale. Ces phénomènes de recombinaison pourraient être responsables d'une virulence particulière, de la sévérité des signes cliniques ou de l'apparition de nouveaux syndromes cliniques (Arita *et al.*, 2005).

Ces techniques de génotypage permettront une meilleure identification des souches d'entérovirus à tropisme respiratoire permettant une traçabilité des souches par leur séquence nucléotidique, ce qui aurait pour conséquence d'améliorer le suivi épidémiologique. Cela pourrait permettre la mise en place de système d'alerte épidémiologique en vue d'une optimisation de la gestion des infections communautaires et nosocomiales en milieu hospitalier lors d'infection par entérovirus à tropisme respiratoire.





**Figure 19 :** Arbres phylogénétiques de différentes régions du génome des entérovirus (5'NC (A), VP4 (B), VP2 (C), VP1 (D), 3D pol (E) et 3'NC (F)) montrant une répartition différente des souches prototypes appartenant aux 39 principaux sérotypes d'entérovirus humains (D'après Nasri et al., 2007).

#### 4.4. Données expérimentales

##### 4.4.1. Études *in vitro*

Les données qui existent sur les infections des cellules épithéliales de l'arbre respiratoire par des Picornavirus, ont été principalement obtenues chez les rhinovirus. Ces études suggèrent que l'infection virale déclenche la migration vers les voies respiratoires et l'activation locale de certaines cellules inflammatoires, comme les lymphocytes, les polynucléaires neutrophiles et les éosinophiles (Newcomb *et al.*, 2007). Ces cellules ont pu être détectées et identifiées dans des échantillons nasaux ou bronchiques de patients souffrant de bronchiolite, ou de phases d'exacerbation d'asthme associées à une infection à rhinovirus (Grünberg & Sterk, 1999 ; Donninger *et al.*, 2003).

Au cours de l'infection par les rhinovirus humains, les cellules épithéliales respiratoires vont synthétiser et sécréter des cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine 8 (IL-8), l'ENA-78 (Epithelial Neutrophil Attractant-78), l'IP-10 (IFN-gamma-inducible protein 10), RANTES et MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) (Schroth *et al.*, 1999 ; Hall *et al.*, 2005 ; Spurrell *et al.*, 2005 ; Newcomb *et al.*, 2007). Ces cytokines sont connues pour avoir une action chimio-attractante sur les polynucléaires neutrophiles, et éosinophiles, les monocytes macrophages et les lymphocytes (Grünberg & Sterk, 1999 ; Newcomb *et al.*, 2007). Une fois sur le site de l'infection, il a été montré que les macrophages pouvaient être infectés et augmenter la sécrétion de MCP-1 et IP-10 (Korpi-Steiner *et al.*, 2006 ; Hall *et al.*, 2005). De plus les lymphocytes T activés recrutés par IP-10 potentialisent *via* l'interleukine-17A (IL-17A) l'augmentation d'IL-8 et d'ENA-78 mais permettent aussi la synthèse de HBD-2 (Human Beta-Defensin 2), qui est connue pour avoir une action chimio-attractante sur les cellules dendritiques immatures et les lymphocytes T mémoires (Wiehler & Proud, 2007). Toutes ces protéines vont jouer un rôle dans le recrutement de cellules spécifiques au site de l'infection et être à l'origine du déclenchement de la réaction inflammatoire.

La synthèse des protéines, en réponse à l'infection virale, est sous le contrôle de voies de signalisation intracellulaire. Ainsi, la synthèse de la protéine IL-8 par les cellules épithéliales respiratoires humaines est contrôlée par la voie PI3 kinase/Akt, qui active le site AP-1 du promoteur en amont du gène codant l'IL-8 (Bentley *et al.*, 2007). L'activation de la

voie JAK/STAT va permettre, *via* une action autocrine ou paracrine de l'IFN de type 1, la synthèse d'IP-10 par les cellules du système réticulo-endothélial (Korpi-Steiner *et al.*, 2006).

L'ensemble de ces études permet une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la mise en place de la réponse inflammatoire de l'épithélium infecté par des picornavirus humains. Cependant, à ce jour, les mécanismes reliés à l'infection des cellules respiratoires épithéliales par les entérovirus restent entièrement à explorer.

#### 4.4.2. Études *in vivo*

La plupart des travaux d'infections expérimentales par des entérovirus réalisées chez des souris BALB/c ont eu recours à une inoculation par voie intra-péritonéale ou orale, mais paradoxalement jamais par voie aérienne (Harrath *et al.*, 2004 ; Reetoo *et al.*, 2000).

De manière intéressante, l'étude de Harrath et coll en 2004 a démontré par culture cellulaire la présence de coxsackievirus B3 dans les poumons de souris BALB/c qui avait été infectées par voie orale. Cette détection du virus répliquatif était positive 24h après l'infection, et ceci jusque 30 jours après l'ingestion du virus. En comparaison, l'étude de Reetoo et coll. (2000) qui avait infecté des souris SWR par voie intra-péritonéale, a montré que l'infection du poumon était détectable par une technique de RT-PCR, 14 jours après l'inoculation. Ces deux études démontrent que les tissus pulmonaires peuvent être infectés de manière aiguë et/ou chronique par des entérovirus humains dans des modèles de souris immunocompétentes (Harrath *et al.*, 2004 ; Reetoo *et al.*, 2000). Actuellement, il apparaît nécessaire de développer un modèle murin d'infection par voie aérienne (instillation du virus par voie intra-nasale), ce qui permettrait l'étude *in vivo* des mécanismes inflammatoires et physiopathologiques développés au cours d'une infection par des entérovirus « pneumotropes » d'origine humaine.

Très récemment, une équipe anglo-saxonne a mis au point et évalué un modèle de souris BALB/c génétiquement modifiées pour l'expression de récepteurs chimériques humain-murins pour ICAM-1. L'expression de ces récepteurs permet l'infection pulmonaire par des rhinovirus humains des différents groupes (majoritaires et minoritaires) de sérotypes suite à une inoculation par voie intra-nasale (Bartlett *et al.*, 2008). Ce modèle murin permettra de mieux comprendre les mécanismes inflammatoires développés chez l'hôte au cours des infections respiratoires basses par les picornavirus humains. Cette étude laisse

entrevoir la possibilité de développer un modèle pour des infections respiratoires basses par les entérovirus, en particulier avec les coxsackievirus A qui utilisent préférentiellement les récepteurs de type ICAM-1 pour entrer dans la cellule cible respiratoire (Shafren *et al.*, 2004).

## 5. CONCLUSIONS DES DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES

Les entérovirus sont des agents infectieux ubiquitaires qui infectent particulièrement les enfants du fait de leur absence d'immunité spécifique (Khetsuriani *et al.*, 2006). Leur mode de transmission est de type fécal-oral ou par « aérosols » (gouttelettes rhinopharyngées) (Andreoletti, 2003 ; Hot *et al.*, 2003). Si le rôle des entérovirus comme agent étiologique dans les infections respiratoires hautes et basses est maintenant reconnue en pédiatrie, les données épidémiologiques et cliniques concernant ces infections doivent encore être précisées. Ainsi, la prévalence, les données cliniques, les mécanismes physiopathologiques ainsi que les conséquences broncho-pulmonaires à long terme des infections respiratoires à entérovirus restent entièrement à explorer. Par ailleurs, bien que les rhinovirus et les entérovirus soient génétiquement très proches, il n'existe aucune étude publiée explorant les mécanismes virologiques et inflammatoires reliés à l'infection des cellules de l'épithélium bronchique par des entérovirus à tropisme respiratoire.

***TRAVAUX ORIGINAUX***

## **LES OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THÈSE :**

Le premier objectif de ce travail de thèse a été d'étudier et de préciser les données cliniques et épidémiologiques des infections respiratoires à entérovirus, chez des enfants présentant une atteinte des voies respiratoires basses. Dans ce cadre, nous avons réalisé une première étude rétrospective sur une année révolue et ceci pour préciser l'importance étiologique du rôle des entérovirus dans la bronchiolite infantile.

Dans un deuxième temps, nous avons analysé les caractéristiques épidémiologiques et cliniques des pathologies respiratoires à entérovirus dans une cohorte de 252 enfants de la région Champagne Ardenne (France), qui avaient consulté aux urgences entre 1999 et 2005. Cette étude rétrospective avait pour objectif de préciser l'importance des pathologies respiratoires à entérovirus par rapport aux autres manifestations cliniques et syndromes reliés à une infection entérovirale.

Dans une troisième partie de notre travail, nous avons étudié les mécanismes inflammatoires des voies respiratoires basses induits par les entérovirus. Pour cela, nous avons déterminé les profils et les niveaux de production de chimiokines produites par des cellules de l'épithélium bronchique infectées par des entérovirus à tropisme respiratoire. De manière originale, nous avons observé que les éosinophiles du sang périphérique recrutés au site de l'infection bronchique étaient permissifs à une infection entérovirale qui était répliquative et aboutissant à une progénie virale. Cette infection était associée à une sécrétion secondaire viro-induite de chimiokines responsables de mécanismes autocrines et paracrines « endobronchiques ». Au final, ces investigations des mécanismes cellulaires et inflammatoires nous ont permis d'aborder l'étude des mécanismes virologiques et immunologiques impliqués dans la mise en place de la réponse inflammatoire de l'épithélium après une infection par un entérovirus à tropisme respiratoire.

## I) ETUDE CLINIQUE : LE RÔLE DES *ENTÉROVIRUS* DANS LA BRONCHIOLITE DU NOURRISSON

Les rhinovirus et les entérovirus humains (*Picornaviridae*) ont été identifiés chez les enfants lors d'infections des voies respiratoires supérieure et inférieures, et ils sont considérés comme des agents étiologiques responsables de la bronchiolite du nourrisson (Couch, 2001 ; Freymuth *et al.*, 1999 ; Jartti *et al.*, 2004 ; Pallansh & Roos, 2001 ; Papadopoulos *et al.*, 2002). Seules quelques études rétrospectives ont évalué la prévalence des infections respiratoires par les picornavirus dans des cohortes de nourrissons souffrant de bronchiolite (Andréoletti *et al.*, 2000 ; Jartti *et al.* 2004 ; Papadopoulos *et al.*, 2002 ; Rakes *et al.*, 1999). Dans ces précédents rapports, les rhinovirus ou les entérovirus humains ont été détectés et identifiés par RT-PCR, soit comme pathogène viral unique soit comme étant associés au VRS ou à d'autres virus respiratoires communs. Ces données suggèrent que les picornavirus pourraient jouer un rôle important comme agent étiologique ou comme cofacteur de la bronchiolite infantile. À l'heure actuelle, le rôle des infections à rhinovirus et à entérovirus comme agent étiologique chez les nourrissons hospitalisés pour bronchiolite reste à déterminer dans des études prospectives utilisant des critères d'inclusions cliniques bien définis.

Ce premier travail a eu pour objectif d'évaluer le rôle étiologique potentiel des picornavirus à tropisme respiratoire au cours d'une étude prospective qui a inclus, entre septembre 2001 et Juin 2002, 192 enfants âgés de moins de 36 mois hospitalisés au CHU de Reims pour bronchiolite.

Au cours de cette étude, nous avons utilisé une RT-PCR et une technique d'hybridation ARN différentielle afin de détecter les rhinovirus et les entérovirus dans les aspirations nasopharyngées de 192 nourrissons hospitalisés pour bronchiolite aiguë. De plus, tous les échantillons respiratoires ont également été testés pour détecter la présence des virus respiratoires communs (Virus Respiratoire Syncytial, virus ParaInfluenza, virus Influenza A & B, et Adénovirus), ainsi que le métapneumovirus humain (HMPV) grâce à des techniques d'immunofluorescence, de culture de cellules ou par des outils de biologie moléculaire. La combinaison des outils classiques de virologie avec des tests de biologie moléculaire nous a permis de préciser la prévalence des infections respiratoires par les picornavirus, mais aussi de déterminer la fréquence des cas de co-infections virales (picornavirus associés à d'autres virus) dans la bronchiolite infantile.

En conclusion, cette première étude suggère que les picornavirus respiratoires seraient, après VRS, l'une des principales causes étiologiques de la bronchiolite chez l'enfant de moins de 26 mois (médiane 9 mois ; extrême 1-26 mois). Ces données suggèrent la nécessité de développer de nouvelles techniques moléculaires de diagnostic rapide des infections respiratoires à picornavirus en virologie médicale. L'utilisation de nouvelles approches de diagnostic rapide permettra le développement et l'utilisation clinique de nouvelles molécules anti-picornavirus, ainsi que la mise en place de mesures spécifiques (identification rapide, génotypage et isolement des enfants identifiés comme étant infectés par un entérovirus à tropisme respiratoire) afin de limiter les risques de transmission nosocomiale de ces virus dans les départements de pédiatrie.



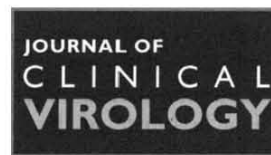
---

ARTICLE N°1:

“ASSOCIATION OF RESPIRATORY PICORNAVIRUSES WITH ACUTE  
BRONCHIOLITIS IN FRENCH INFANTS”

Jérôme Jacques, Maude Bouscambert-Duchamp, Hélène Moret, Jocelyne Carquin,  
Véronique Brodard, Bruno Lina, Jacques Motte, Laurent Andréoletti.

*Journal of Clinical Virology*, Janvier 2006



## Short communication

## Association of respiratory picornaviruses with acute bronchiolitis in French infants

Jérôme Jacques<sup>a,b</sup>, Maude Bouscambert-Duchamp<sup>a,c</sup>, Hélène Moret<sup>a,b</sup>, Jocelyne Carquin<sup>a</sup>,  
Véronique Brodard<sup>a,b</sup>, Bruno Lina<sup>c</sup>, Jacques Motte<sup>d</sup>, Laurent Andréoletti<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> *Laboratoire de Virologie, Service de Microbiologie, Hôpital Robert Debré, Avenue du Général Koenig, 51092 REIMS Cedex, France*

<sup>b</sup> *IFR 53/EA-3798 (DAT/PPCIDH), faculté de médecine de Reims, France*

<sup>c</sup> *Laboratoire de Virologie des Hospices Civils de Lyon, UMR CNRS 5537, Domaine Rockefeller, Lyon, France*

<sup>d</sup> *Service des Urgences médico-chirurgicales pédiatriques et faculté de médecine, Reims, France*

Received 26 May 2005; received in revised form 31 August 2005; accepted 21 November 2005

### Abstract

**Background:** Human rhinoviruses and enteroviruses (*Picornaviridae*) are suspected to be major viral etiological causes of bronchiolitis in infants.

**Objectives:** In the present study, we assessed the potential role of the respiratory picornaviruses as causative agents of bronchiolitis in French infants.

**Study design:** From September 2001 to June 2002, we prospectively selected 192 infants  $\leq 36$  months of age and hospitalized for acute bronchiolitis. The detection of common respiratory viruses (respiratory syncytial virus, influenza virus A and B, parainfluenza virus 1, 2, 3 and adenovirus) was performed using classical immunofluorescence antigen and cell-culture detection assays on nasopharyngeal aspirates whereas the detection of human metapneumovirus (HMPV) was performed by a real-time RT-PCR assay. The presence of rhinovirus and/or enterovirus was assessed in respiratory samples by a picornavirus RT-PCR detection assay followed by a differential Southern blotting procedure.

**Results:** A potential causative virus was detected in 72.5% of the 192 study infants. RSV (30%), rhinovirus (21%), enterovirus (9%), influenza virus A (6%) and human metapneumovirus (4%) were the most frequent causative agents detected. Rhinoviruses or enteroviruses were detected as the only evidence of respiratory viral tract infection in 57 (30%) of 192 infants, whereas rhinovirus or enterovirus occurred in mixed viral infection detected in 25 (13%) of 192 study cases (30% versus 13%,  $p < 10^{-3}$ ).

**Conclusions:** Our data suggest that respiratory picornaviruses are one of the leading etiological causes of bronchiolitis in French infants. These findings highlight the need to implement a rapid picornavirus RT-PCR detection assay for the clinical diagnosis of respiratory infections in pediatric patients with bronchiolitis.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Picornavirus; Rhinovirus; Enterovirus; Bronchiolitis; Multiple viral respiratory infection; Infants

### 1. Introduction

Human rhinoviruses and enteroviruses (*Picornaviridae*) have been identified in childhood upper and lower respiratory tract infections and they are suspected to be major viral etiological causes of bronchiolitis in infants (Freymuth et al., 1999; Pallansch and Roos, 2001; Couch, 2001; Papadopoulos

et al., 2002; Jartti et al., 2004). Only a few retrospective studies have assessed the presence of both enterovirus and human rhinovirus genomic RNA sequences in series of respiratory samples taken from infants with acute wheezing (Rakes et al., 1999; Andréoletti et al., 2000; Papadopoulos et al., 2002; Jartti et al., 2004). In these previous reports, human rhinovirus or enterovirus were identified by RT-PCR assays either as unique viral pathogens or associated with RSV or other common respiratory viruses, suggesting that these picornaviruses could play a role as etiological agent or

\* Corresponding author. Tel.: +33 3 26 78 39 93; fax: +33 3 26 78 41 34.  
E-mail address: lantheoletti@chu-reims.fr (L. Andréoletti).

as cofactor of childhood bronchiolitis. At the present time, the significance of rhinovirus and enterovirus infections as the cause of bronchiolitis in French infants hospitalized for acute wheezing remains to be determined.

In the present prospective study, we used RT-PCR and hybridization assays to perform a differential detection of rhinovirus and enterovirus RNA genomic sequences in nasopharyngeal aspirates of 192 infants hospitalized for acute bronchiolitis. To determine the causal role of these respiratory picornaviruses in bronchiolitis, all the study respiratory samples were also tested for the presence of other common respiratory viruses and human metapneumovirus (HMPV) by classical immunofluorescence antigen detection, cell culture or molecular detection assays.

## 2. Patients and methods

### 2.1. Patients

Of 465 consecutive patients admitted to the pediatric department (University Medical Hospital Center of Reims, Champagne-Ardenne, France) from September 2001 to June 2002 for acute respiratory wheezing, we prospectively selected 192 infants because: (i) they were aged 36 months or less (mean age = 8.6 months, range = 12 days–36 months), (ii) they demonstrated specific clinical signs of bronchiolitis (Anon., 2001) and (iii) they were hospitalized in the pediatric unit within 3 days of symptom onset for the first time during the study period. Infants with cystic fibrosis, bronchopulmonary dysplasia, congenital heart disease, rhinitis, chronic allergic rhinitis and otitis or with a chronic genetic or acquired-immunodepression were excluded from this study. For each study infant, informed consent was obtained from their family or their relatives. Briefly, nasopharyngeal secretions were collected using sterile physiological saline fluid with a disposable mucus extractor at time of hospital admission according to the recent European Respiratory Society guideline (Anon., 2001). Nasopharyngeal aspirate samples were then rapidly transported to the virology laboratory where they were divided in two sterile tubes. Tube 1 was used to perform the immunofluorescence detection assay of viral antigens and classical virus cell-culture detection assays, and tube 2 was immediately frozen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  prior to RT-PCR assays (Freymuth et al., 1997). Hospital's ethics committee approved the study and informed consent was obtained from parents.

### 2.2. Respiratory virus detection assays

Immunofluorescence detection assays for the detection of respiratory syncytial viruses A and B, influenza viruses, parainfluenza viruses and adenoviruses antigens were performed on tube 1. This aliquot was diluted in 3 ml of a classical viral transport medium as described previously (Freymuth et al., 1997). Moreover, 200  $\mu\text{l}$  of this diluted nasopharyngeal

secretion specimen was inoculated in duplicate onto 24-well plates covered with monolayers of continuous human diploid fibroblasts (MRC-5) or Rhesus monkey kidney (MA-104) cells as previously described (Freymuth et al., 1997). Virus isolates were typed by the standard method of virus neutralization onto cell culture for enteroviruses, and by classical immunofluorescence antigen detection assays onto infected cell monolayers for adenovirus, influenza A and B viruses, parainfluenza virus type 1, 2 and 3 and RSV as described previously (Freymuth et al., 1997).

Retrospectively, total RNA was extracted from 200  $\mu\text{l}$  of nasal aspirate sample (tube 2) using a rapid extraction protocol according to the manufacturer's recommendations (High Pure Viral Nucleic Acid Kit, Roche Diagnostics Mannheim, Germany). Nucleic acids were eluted in a final volume of 50  $\mu\text{l}$  of DEPC (diethyl-pyrocabonate) sterile water, as described by the manufacturer's recommendations and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until used. Detection of human rhinovirus and enterovirus RNA sequences was carried out using a picornavirus RT-PCR detection assay followed by a differential Southern blotting procedure as previously described (Andréoletti et al., 2000). The presence of enterovirus RNA sequences was confirmed using a commercially available kit according to the recommendations of the manufacturer (Enterovirus Consensus kit, Argene Biosoft, Varhiles, France). Moreover, HMPV RNA genomic sequences were detected by real-time RT-PCR amplification of the nucleoprotein (N) gene as described previously (Bouscambert-Duchamp et al., 2005).

### 2.3. Statistical analyses

Chi-square tests with or without Yates correction, Student's *t*-tests or Mann–Whitney tests were carried out when necessary, using the software Epi-Info 6.04 (2001, Center for Diseases Control and Prevention-World Health Organization statistical analysis software, Geneva Switzerland). *P*-values lower than 0.05 were considered as significant.

## 3. Results

A potential causative virus was detected in 72.5% of the 192 study infants (Table 1). RSV (30%), rhinovirus (21%), enterovirus (9%), influenza virus A (6%) and human metapneumovirus (4%) were the most frequent causative agents detected, resulting in 42%, 29%, 12%, 8% and 6% of 138 virus-positive cases, respectively (Table 1). Enterovirus was cultivated in 6 (3%) of the 192 specimens, allowing the identification of two ECHO 6 strains, two ECHO 13 strains, one ECHO 30 strain and one Coxsackie B2 strain by classical seroneutralization assay into cell culture (Pallansh and Roos, 2001).

Dual viral infections were found in 40 (21%) of the 192 nasopharyngeal aspirates of children with acute bronchiolitis (Table 2), and were associated with rhinovirus in 36 (90%)

Table 1  
Positive viral findings in 192 French young infants hospitalized for acute bronchitis

Virus	Virus antigen test, <i>n</i> =192	Virus culture, <i>n</i> =192	Virus PCR, <i>n</i> =192	Total (%), <i>n</i> =192
Respiratory syncytial virus	58 (30)	54 (28)	–	58 (30)
Rhinovirus	–	–	40 (17)	40 (21)
Enterovirus	–	6 (3)	17 (4)	17 (9)
Human metapneumovirus	–	–	8 (4)	8 (4)
Parainfluenza virus type 3	3 (1.6)	3 (1.6)	–	3 (2)
Influenza A virus	7 (3.6)	11 (5.7)	–	11 (6)
Influenza B virus	0	0	–	0
Adenovirus	0	1 (0.5)	–	1 (0.5)
Total (%)	68 (35)	75 (39)	65 (34)	138 (72.5)

(–) Not done. Data are presented as number of samples positive (percentage of evaluated samples).

Table 2  
Mixed virus infections detected in nasopharyngeal aspirates of 192 infants hospitalized for acute bronchitis

Virus identified in mixed infections	No. of occurrences in mixed infection	No. of occurrences with				
		Total <i>n</i>	RSV <sup>a</sup>	HRVs <sup>b</sup>	EVs <sup>c</sup>	PIV3 <sup>d</sup>
RSV <sup>a</sup>	22	–	18	4	0	0
HRVs <sup>b</sup>	36	18	–	15	1	2
EVs <sup>c</sup>	19	4	15	–	0	0
PIV3 <sup>d</sup>	1	0	1	0	–	0
HMPV <sup>e</sup>	2	0	2	0	0	–

<sup>a</sup> Respiratory syncytial virus.

<sup>b</sup> Human rhinovirus.

<sup>c</sup> Enterovirus.

<sup>d</sup> Parainfluenza virus type 3.

<sup>e</sup> Human metapneumovirus.

cases (Table 2). Co-infections with rhinovirus and RSV (45%) and an association with rhinovirus and enterovirus (37.5%) were the most common mixed infections (Table 2). Rhinovirus or enterovirus occurred in dual respiratory infection detected in 25 (13%) of the 192 infants, whereas these viruses were identified alone as the only evidence of respiratory infection in 57 (30%) of 192 study cases (13% versus 30%,  $P < 10^{-3}$ ) (Tables 1 and 2).

Comparison between age groups showed that enterovirus occurred more frequently in infant aged  $\geq 6$  months ( $P < 0.05$ ), and that RSV infected significantly more often infants aged 6–12 months ( $P < 0.05$ ). Rhinovirus respiratory infection appeared not to be significantly associated with any age group in the present study. The median age of children with respiratory picornavirus was 9 months (range = 1–26 months). Picornavirus infected cases were hospitalized for an average of 2.3 days (S.D. = 2.4); this mean duration of hospital stay was not statistically different from those observed in cases infected by other respiratory viruses ( $P > 0.5$ ).

During the present study, rhinovirus and enterovirus co-circulated during the same periods, from September 2001 to January 2002 and from March to June 2002 (Fig. 1). From November 2001 to February 2002, picornavirus respiratory infections accounted for 52% of all hospitalized bronchiolitis cases at a time where RSV was epidemic, resulting in mixed RSV and rhinovirus or enterovirus respiratory tract infections. During May 2002, a second picornavirus epidemic

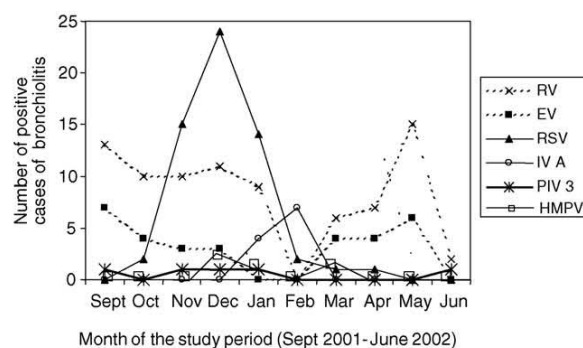


Fig. 1. Monthly distribution of bronchiolitis cases with an acute viral respiratory infection during a 10-month period (from September 2001 to June 2002). RSV: respiratory syncytial virus, IVA: influenza virus A, PIV3: parainfluenza virus 3; HMPV: human metapneumovirus; RV: rhinovirus, EV: enterovirus.

peak occurred where enterovirus and rhinovirus accounted for 99% of all hospitalized bronchiolitis cases, suggesting that these viruses might be common etiological causes of childhood bronchiolitis during spring (Fig. 1).

#### 4. Discussion

Our findings indicated that respiratory picornaviruses were the second etiological cause of bronchiolitis after RSV.

We identified rhinovirus and enterovirus as the unique viral pathogen in 21% and 9% of 192 French infants with bronchiolitis, respectively (Table 1). Only one French retrospective study had previously reported the presence of 10 (12%) and 8 (9.5%) cases of rhinovirus and enterovirus respiratory infection in a cohort of 84 infants hospitalized for acute bronchiolitis (Andréoletti et al., 2000). Our prevalence of rhinovirus infection was close to those reported in previous studies demonstrating the presence of respiratory rhinovirus infection in 18–29% of infants with acute wheezing or bronchiolitis (Freymuth et al., 1999; Papadopoulos et al., 2002; Jartti et al., 2004). Our rates of enterovirus infection were in accordance with those reported in two previous French studies (Freymuth et al., 1999; Andréoletti et al., 2000), but were lower than those reported by Jartti et al. (2004) who demonstrated 25% of enterovirus positive detection in infants with acute respiratory wheezing. Discrepancies between this recent report and our data could be explained by the differences in patient groups and their epidemiological characteristics or by the short duration of our study period encompassing less than 1 year (Fig. 1).

In the present report, it could be possible that some picornavirus infections detected by our molecular technique might not be associated with the development of the diagnosed symptomatic episode of bronchiolitis, but might be related either to an asymptomatic respiratory picornavirus shedding, or to past or future respiratory symptomatic infection (Nokso-Koivisto et al., 2002). Therefore, the exact prevalence of respiratory picornavirus infection as cause of bronchiolitis remains to be assessed in longitudinal prospective studies testing the presence of all common viral pathogens in the respiratory tract of study infants before and after the development of respiratory symptoms.

Previous studies using molecular techniques reported that 19–22% of patients with bronchiolitis had evidence of multiple viral infections (Andréoletti et al., 2000; Papadopoulos et al., 2002; Jartti et al., 2004). In the present study, dual viral infections were detected in 40 (21%) of the 192 nasopharyngeal aspirates of children with acute bronchiolitis, and were associated with rhinovirus in 36 (90%) cases; rhinovirus and RSV or rhinovirus and enterovirus being the most common identified virus pair (Table 2). These findings suggested that human picornavirus could also play a role as cofactors in the pathogenesis of childhood bronchiolitis (Papadopoulos et al., 2002; Rawlinson et al., 2003).

In conclusion, the present study suggests that respiratory picornaviruses are a leading etiological cause of bronchiolitis in French infants. New rapid and sensitive diagnostic methodologies of picornavirus respiratory infections will allow further development of new antipicornavirus drugs, as well as specific measures designed to prevent nosocomial transmission of these viruses in pediatric departments.

## Acknowledgements

This work was supported in part by grant for clinical research (EA-3798: DAT/PPCIDH) from medical university and school of medicine of Reims, France. We acknowledge Pr. F. Freymuth (laboratoire de Virologie, Centre Hospitalier Universitaire de Caen, France) for providing us reference human rhinovirus strains.

## References

- Andréoletti L, Lesay M, Dewilde A, Lambert V, Wattré P. Differential detection of Rhinoviruses and Enteroviruses RNA sequences associated with classical immunofluorescence assay detection of respiratory virus antigens in nasopharyngeal swabs from infants with bronchiolitis. *J Med Virol* 2000;61:341–6.
- Anonymous. Consensus conference on the management of infant bronchiolitis. Paris, France, 21 September 2000. Proceedings. *Arch Pediatr* 2001;8 Suppl.1s:196s.
- Bouscambert-Duchamp M, Lina B, Moret H, Trompette A, Motte J, Andréoletti L. Detection of human metapneumovirus RNA sequences in nasopharyngeal aspirates of young French children with acute bronchiolitis by real-time reverse transcriptase PCR and phylogenetic analysis. *J Clin Microbiol* 2005;43:1411–4.
- Couch RB. Rhinoviruses. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Virology, fields*. 4th ed. Philadelphia, Pennsylvania: Lippincott Williams and Wilkins Company; 2001. p. 777–95.
- Freymuth F, Vabret A, Galateau-Salle F, Ferey J, Eugene G, Petitjean J, et al. Detection of respiratory syncytial virus, parainfluenzavirus 3, adenovirus and rhinovirus sequences in respiratory tract of infants by polymerase chain reaction and hybridization. *Clin Diag Virol* 1997;8:31–40.
- Freymuth F, Vabret A, Brouard J, Toutain F, Verdon R, Petitjean J, et al. Detection of viral, *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* infections in exacerbations of asthma in children. *J Clin Virol* 1999;13:131–9.
- Jartti T, Lehtinen P, Vuorinen T, Österback R, Van den Hoogen B, Osterhaus AD, et al. Respiratory picornaviruses and respiratory syncytial virus as causative agents of acute expiratory wheezing in children. *Emerg Infect Dis* 2004;10:1095–101.
- Nokso-Koivisto J, Kinnari TJ, Lindahl P, Hovi T, Pitkäranta A. Human picornavirus and coronavirus RNA in nasopharynx of children without concurrent respiratory symptoms. *J Med Virol* 2002;66:417–20.
- Pallansh MA, Roos RP. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Virology, fields*. 4th ed. Philadelphia, Pennsylvania: Lippincott Williams and Wilkins Company; 2001. p. 723–75.
- Papadopoulos NG, Moustaki M, Tsolia M, Bossios A, Astra E, Prezerakou A, et al. Association of rhinovirus infection with increased disease severity in acute bronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:1285–9.
- Rakes GP, Aruda E, Ingram JM, Hoover GE, Zambrano JC, Hayden FG. Rhinovirus and respiratory syncytial virus in wheezing children requiring emergency care. IgE and eosinophils analysis. *Am J Crit Care Med* 1999;159:785–90.
- Rawlinson WD, Waliuzzaman Z, Carter IW, Belessis YC, Gilbert KM, Morton JR. Asthma exacerbations in children associated with rhinovirus but not human metapneumovirus infection. *J Infect Dis* 2003;15(187):1314–8.

## II) ETUDE EPIDÉMIOLOGIQUE ET CLINIQUE DES INFECTIONS RESPIRATOIRES À *ENTÉROVIRUS*

Bien que la majorité des infections humaines à entérovirus restent asymptomatiques, ces virus sont associés à des syndromes cliniques variés, allant de pathologies mineures à des maladies fébriles sévères incluant la méningite à liquide clair, l'encéphalite, la myopéricardite, la paralysie flasque aiguë et la septicémie néonatale sévère (Khetsuriani & Parashar, 2003). En outre, les entérovirus peuvent induire des maladies respiratoires non spécifiques chez les enfants ou les adultes, y compris des voies respiratoires supérieures mais aussi des infections des voies respiratoires inférieures entraînant bronchite, bronchiolite (Smyth & Openshaw, 2006) et pneumonie (Chonmaitree & Mann, 1995). Différentes souches d'entérovirus, comprenant les entérovirus 68 et 71, les Coxsackievirus A9, A16, A21, B2 et B4 et les Echovirus 9, 11 et 22, ont été isolées dans des échantillons naso-pharyngés, des aspirations trachéales, des lavages broncho-alvéolaire du poumon ou de tissus par des méthodes de culture cellulaire et identifiés comme étant la cause virale de broncho-pneumonie graves voire mortelles (Barson & Reiner, 1986 ; Birenbaum *et al.*, 1997 ; Chang *et al.*, 1999 ; Cheeseman *et al.*, 1977 ; Oberste *et al.*, 2004 ; Porres *et al.*, 1985 ; Schiff *et al.*, 2000 ; Legeay *et al.*, 2007).

Actuellement, notre compréhension de l'épidémiologie et des profils cliniques des infections respiratoire à entérovirus en pédiatrie est limitée à la prévalence et à l'importance épidémiologique de l'infections respiratoires à entérovirus comme la cause de la bronchiolite aiguë dans des cohortes d'enfants hospitalisés (Andréoletti *et al.*, 2000 ; Jartti *et al.*, 2004 ; Papadopoulos *et al.*, 2002 ; Porres *et al.*, 1985). Au cours de ces études, il n'y a pas eu d'identification des souches par sérotypage, par génotypage, ni d'analyse phylogénétique moléculaire comparative des souches d'entérovirus respiratoires. Cependant à l'heure actuelle, différentes techniques moléculaires peuvent permettre une caractérisation fiable et une comparaison phylogénétique des souches d'entérovirus par l'amplification et le séquençage partiel du gène de la protéine de capsid VP1 et/ou VP2 (Oberste *et al.*, 2003 ; Nasri *et al.*, 2007).

Cette deuxième étude a eu pour objectif de clarifier les données épidémiologiques et cliniques des infections à entérovirus chez des enfants en pédiatrie et souffrant de pathologies respiratoires.

De manière rétrospective, nous avons analysé l'épidémiologie et les caractéristiques cliniques des pathologies respiratoires pour lesquelles un entérovirus avait été diagnostiquée, et ceci dans une large cohorte française d'enfants hospitalisés ou non, ayant visité les services d'urgence de la région Champagne Ardenne (France) entre 1999 et 2005. De plus en utilisant l'amplification et le séquençage partiel du gène de la VP1, nous avons réalisé une analyse phylogénétique comparative de 79 souches d'entérovirus isolées dans des échantillons naso-pharyngés d'enfants avec des syndromes respiratoires liées à une infection à entérovirus.

En conclusion, nous avons montré que les pathologies respiratoires représentaient en termes de fréquence le deuxième type de pathologie pédiatrique à entérovirus après la méningite à liquide clair chez les nourrissons âgés de 1-12 mois. En outre, la circulation successive ou concomitante de souches génétiquement distinctes d'entérovirus indique la possibilité d'infections respiratoires répétées en pédiatrie au cours de la même saison épidémique, et suggère la possibilité d'une recombinaison génétique (intra ou inter sérotypiques) au sein des espèces d'entérovirus A ou B. La poursuite du développement de RT-PCR quantitative en temps réel associé à un génotypage permettra de réaliser un diagnostic étiologique rapide des infections respiratoires à entérovirus. La généralisation de l'utilisation de tels outils de biologie moléculaire (identification, quantification et typage rapide), pourrait permettre de prévenir la transmission nosocomiale de ces virus dans les départements de pédiatrie mais également de surveiller l'émergence de nouvelles souches d'entérovirus à tropisme respiratoire.

---

ARTICLE N°2:

“EPIDEMIOLOGICAL, MOLECULAR AND CLINICAL FEATURES OF  
ENTEROVIRUS RESPIRATORY INFECTIONS IN FRENCH CHILDREN  
BETWEEN 1999 AND 2005”

Jérôme Jacques, Hélène Moret, Delphine Minette, Nicolas Lévêque, Nicolas Jovenin, Gaetan Deslée, François Lebargy, Jacques Motte, Laurent Andreoletti.

*Journal of Clinical Microbiology*, Janvier 2008



## Epidemiological, Molecular, and Clinical Features of Enterovirus Respiratory Infections in French Children between 1999 and 2005<sup>∇</sup>

Jérôme Jacques,<sup>1,2</sup> Hélène Moret,<sup>1,2</sup> Delphine Minette,<sup>3</sup> Nicolas Lévêque,<sup>1,2</sup> Nicolas Jovenin,<sup>5</sup> Gaetan Deslée,<sup>4</sup> François Lebagry,<sup>4</sup> Jacques Motte,<sup>3</sup> and Laurent Andréoletti<sup>1,2\*</sup>

Laboratoire de Virologie, Centre Hospitalier Universitaire,<sup>1</sup> IFR 53/EA-3798 (DAT/PPCIDH), Faculté de Médecine,<sup>2</sup> Service de Pédiatrie A, Unité INSERM 666 et Faculté de Médecine,<sup>3</sup> Service de Pneumologie, Centre Hospitalier Universitaire et Faculté de Médecine,<sup>4</sup> and Département d'Information Médicale, Centre Hospitalier Universitaire et Faculté de Médecine de Reims,<sup>5</sup> Reims, France

Received 14 July 2007/Returned for modification 23 October 2007/Accepted 29 October 2007

**Enteroviruses (EVs) can induce nonspecific respiratory tract infections in children, but their epidemiological, virological, and clinical features remain to be assessed. In the present study, we analyzed 252 EV-related infection cases (median age of subjects, 5.1 years) diagnosed among 11,509 consecutive children visiting emergency departments within a 7-year period in the north of France. EV strains were isolated from nasopharyngeal samples by viral cell culture, identified by seroneutralization assay, and genetically compared by partial amplification and sequencing of the VP1 gene. The respiratory syndromes (79 [31%] of 252 EV infections) appeared as the second most common EV-induced pediatric pathology after meningitis (111 [44%] of 252 cases) (44 versus 31%,  $P < 10^{-3}$ ), contributing to lower respiratory tract infection (LRTI) in 43 (54%) of 79 EV respiratory infection cases. Bronchiolitis was the most common EV-induced LRTI (34 [43%] of 79 cases,  $P < 10^{-3}$ ) occurring more often in infants aged 1 to 12 months ( $P = 0.0002$ ), with spring-fall seasonality. Viruses ECHO 11, 6, and 13 were the more frequently identified respiratory strains (24, 13, and 11%, respectively). The VP1 gene phylogenetic analysis showed the concomitant or successive circulation of genetically distinct EV respiratory strains (species A or B) during the same month or annual epidemic period. Our findings indicated that respiratory tract infections accounted for the 30% of EV-induced pediatric pathologies, contributing to LRTIs in 54% of these cases. Moreover, the concomitant or successive circulation of genetically distinct EV strains indicated the possibility of pediatric repeated respiratory infections within the same epidemic season.**

Enteroviruses (EVs) (*Picomaviridae*) are among the most common viruses infecting human beings worldwide (13, 23, 25). Current taxonomy divides nonpolio human EV into four species (human EVs A to D), including a total of 89 serotypes (24, 38). Individual serotypes have different temporal patterns of circulation and can be associated with different clinical manifestations (24, 39). Although the majority of human EV infections remain asymptomatic, these viruses are associated with diverse clinical syndromes, ranging from minor febrile illness to severe and potentially fatal pathologies, including aseptic meningitis, encephalitis, myopericarditis, acute flaccid paralysis, and severe neonatal sepsis-like disease (24). Moreover, EV can induce nonspecific respiratory illnesses in infants or adults, including upper respiratory tract infections but also lower respiratory tract infections (LRTIs), resulting in bronchitis, bronchiolitis (37), and pneumonia (13). Different human EV strains—including EV 68 and 71, coxsackie A9, A21, B2 and B4 viruses, and echovirus 9, 11 and 22—have been isolated from nasopharyngeal samples, tracheal aspirates, bronchoalveolar lavages, or lung tissues by classical cell culture assays

and identified as the cause of severe or fatal viral bronchopneumonia (4, 6, 10, 11, 29, 32, 35). At present, our understanding of the epidemiology and clinical profile of EV pediatric respiratory infections is restricted to the prevalence and the epidemiological significance of EV respiratory infections as the cause of bronchiolitis or acute wheezing in cohorts of hospitalized infants (1, 22, 31, 33). In these reports, no serotyping identification or molecular comparative analysis of EV respiratory viral strains was performed, whereas recent molecular approaches can allow a reliable molecular characterization and a phylogenetic comparison of the EV strains by partial amplification and sequencing of the VP1 gene (30).

In the present study, we retrospectively analyzed the epidemiological and clinical features of EV-related respiratory pathologies diagnosed in a large cohort of French hospitalized and nonhospitalized children visiting emergency departments of the region Champagne Ardenne (France) between 1999 and 2005. Moreover, using partial amplification and sequencing of the VP1 gene, we carried out a phylogenetic comparative analysis of EV strains isolated from the nasopharyngeal samples of children with EV-related respiratory syndromes.

\* Corresponding author. Mailing address: Laboratoire de Virologie, Service de Microbiologie, Hôpital Robert Debré, Avenue du Général Koenig, 51092 REIMS Cedex, France. Phone: (33) 3 26 78 39 93. Fax: (33) 3 26 78 41 34. E-mail: landreoletti@chu-reims.fr.

<sup>∇</sup> Published ahead of print on 14 November 2007.

### MATERIALS AND METHODS

**Study population.** From January 1999 through December 2005, 11,509 consecutive children (mean age, 2.3 years; age range, 9 days to 15 years) attending one of the five referent pediatric emergency departments of the region Cham-

TABLE 1. Clinical features of 252 selected children with an EV infection diagnosed during the study period (1999 to 2005)

Patients subgroups <sup>a</sup>	Total no. (%)	Mean age in yr (SD)	No. of males/no. of females (ratio)	Clinical outcome (fatal/good)
Outpatients	35 (14)	4.4 (3.0)	23/12 (1.9)	0/35
Bronchiolitis	13 (37)	1.1 (1.0)	7/6 (1.2)	0/13
Flu-like illness	11 (31)	2.4 (3.0)	8/3 (2.7)	0/11
Febrile illness	6 (17)	3.2 (2.6)	3/3 (1.0)	0/6
Asthma attack	2 (6)	4.16 (2.5)	2/0	0/2
Rhinopharyngitis	1 (3)	3.2	1/0	0/1
Sore throat	1 (3)	2.4	1/0	0/1
Bronchitis	1 (3)	0.58	1/0	0/1
Inpatients	217 (86)	5.4 (3.8)	136/81 (1.7)	2/215
Meningitis	111 (51)	6.9 (3.5)	71/40 (1.8)	1/110
Febrile illness	56 (26)	4.4 (1.7)	33/23 (1.4)	0/56
Bronchiolitis	21 (10)	0.5 (0.4)	14/7 (2.0)	0/21
Sore throat	8 (4)	6.2 (3.8)	6/2 (3.0)	0/8
Flu-like illness	6 (3)	1.4 (2.1)	2/4 (0.5)	1/5
Asthma attack	4 (2)	2.8 (1.9)	4/0	0/4
Rhinopharyngitis	3 (1)	6.3 (7.2)	2/1 (2.0)	0/3
Pharyngitis	3 (1)	8.8 (4.2)	2/1 (2.0)	0/3
Rhinitis	3 (1)	1.3 (1.2)	2/1 (2.0)	0/3
Bronchitis	2 (1)	0.7 (0.7)	1/1 (1.0)	0/2
Total	252 (100)	5.1 (3.6)	159/93 (1.7)	2/250

<sup>a</sup> Outpatients, nonhospitalized infants visiting emergency departments of the region Champagne Ardenne between 1999 and 2005; inpatients, hospitalized patients visiting emergency departments of region Champagne Ardenne between 1999 and 2005.

pagne Ardenne (France) were prospectively enrolled in a north French Caucasian pediatric cohort for the exploration of viral respiratory diseases. For each child, informed consent was obtained from their family or relatives. The present study was conducted by the university medical hospital of Reims (Champagne Ardenne, France) and was approved by the hospital's ethics committee. All children underwent general, neurological, and respiratory examinations by a pediatrician, who carried out a nasopharyngeal aspirate sampling for the detection of common respiratory human viral pathogens by classical cell culture and immunofluorescence assays (17, 19). Moreover, according to the clinical symptoms observed, cerebrospinal fluid, peripheral blood, throat, or urine samples were also concomitantly sampled and tested by standard culture assays for the detection of classical human bacterial or viral pathogens, by standardized reverse transcription-PCR (RT-PCR) assays for the detection of EV strains in cases of aseptic meningitis or by standardized PCR assays for the detection of *Mycoplasma* sp. or *Chlamydia pneumoniae* in respiratory tract samples (9, 18). Among these 11,509 consecutive children enrolled in the study cohort, 252 (median age, 5.1 years; age range, 14 days to 15 years; male/female ratio, 159/93) were retrospectively selected because (i) they were aged  $\leq 15$  years; (ii) EV was the unique infectious agent detected in their nasopharyngeal samples as determined by classical cell culture assays and then identified as the etiological cause of the clinical syndrome diagnosed at the time of emergency visit; and (iii) they were free of cystic fibrosis, bronchopulmonary dysplasia, congenital heart disease, and systemic glucocorticoid treatment or with a chronic genetic or acquired immunodepression.

During the present study, 61 children were excluded because they demonstrated mixed respiratory infections ( $n = 33$ ) or because they were suffering from chronic genetic or acquired respiratory pathologies or immunological immunodepression ( $n = 28$ ) (data not shown). Table 1 presents the clinical features based on discharge diagnosis for the selected population.

**Nasopharyngeal sample collection.** Nasopharyngeal secretions were collected from all of the studied patients using 2 ml of sterile physiological saline fluid with a disposable mucus extractor at time of hospital admission (2). Nasopharyngeal wash fluids were then diluted in 3 ml of virus transport medium (0.5% bovine serum albumin, 1,500 U of penicillin, 1 ng of streptomycin, minimal essential medium, and 4.76 mg of HEPES in 2 ml of tryptose phosphate broth) and divided into aliquots into two separate sterile tubes. One tube was directly used to perform immunofluorescence detection of viral antigens and cell culture detection assays; the second tube was immediately frozen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  prior to molecular assays (17, 20).

**Classical cell culture assays for virus isolation.** For each studied patient, 200  $\mu\text{l}$  of nasopharyngeal secretion sample diluted in viral transport medium was

inoculated in duplicate onto 24-well plates covered with monolayers of continuous human diploid fibroblasts (MRC-5), rhesus monkey kidney (MA-104) and Madin-Darby cell kidney (MDCK) cells as previously described (17). Each plate was incubated for 8 days at  $37^{\circ}\text{C}$  in a 5%  $\text{CO}_2$ :95% air atmosphere. The plates were examined daily under light microscopy to detect the presence of a cytopathic effect on the cell culture monolayers. Two subcultures were performed at days 8 and 16 for each well as described above. EV isolates were typed by the standard method neutralization with EV type-specific antisera (17, 19, 26).

**RNA isolation.** Total RNA was extracted from 140  $\mu\text{l}$  of culture supernatants by using the QIAamp viral RNA minikit (Qiagen, Courtaboeuf, France), according to the manufacturer's recommendations. Nucleic acids were eluted in a final volume of 50  $\mu\text{l}$  of diethyl pyrocarbonate-sterile water, as described by the manufacturer's recommendations. The nucleic acid concentration was estimated by spectrophotometric measurement (optical density) at 260 nm before the samples were divided into aliquots and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until used (17).

**Phylogenetic comparison of partial EV VP1 capsid protein region.** RT-PCR amplification and sequencing of a part of the VP1 capsid gene were carried out as described previously (30). The sequences were manually corrected and aligned by using the computer program MEGA 3.1 (S. Kumar, K. Tamura, I. Jakobsen, and M. Nei [http://www.megasoftware.net]) with corresponding reference EV strains (GenBank accession numbers AY679736, AY208085, AB167989, AM159197, AF160024, AY875692, AM236930, AF295521, AF521340, AF521310, AB055923, DQ092796, AY227344, AF295445, AY208115, AB199314, AJ309245, AJ417364, and AY207635). The phylogenetic trees were built with the MEGA 3.1 program using the neighbor-joining method (34) as implemented in the MEGA computer program. During sequence comparisons, gaps, missing data and ambiguities in the sequences were ignored in pairwise comparisons. In the phylogenetic inference, pairwise genetic distances were calculated by using the Kimura two-parameter model of sequence evolution to account for multiple nucleotide substitutions (27). The reliability of the phylogenetic topologies (branching patterns) was determined by the bootstrap resampling test with 1,000 replicates (15, 27). VP1 sequences obtained from the study are available in the EMBL database under accession numbers AM492321 to AM492504.

**Statistical analyses.** Quantitative data are presented as means, standard deviation, and range. Qualitative data are presented as the number of observations and percentages. Chi-square tests with or without Yates' correction and analysis of variance tests were carried out when necessary to compare quantitative or qualitative data. The results were considered as statistically significant for two-sided  $P$  values of  $<0.05$ . The statistical analysis was performed with the SAS software version 8.2 (SAS Institute, Cary, NC).

## RESULTS

**Virological and clinical features of the study population.** Of 11,509 consecutive children enrolled in the study cohort, 2,444 (21%) were positive for the isolation of a human viral strain in their nasopharyngeal sample (Fig. 1A). Of these 2,444 children, 285 (11.6%) demonstrated the presence of an infectious EV strain isolated by classical cell culture assays, with annual rates of EV isolation ranging from 3 to 31% during the 7-year study period (Fig. 1). Of the 285 subjects from which an infectious EV strain had been isolated from a nasopharyngeal aspirate, 252 (88%) were selected because the detection of other common human viral or bacterial pathogens in their nasopharyngeal tracts had remained negative by classical culture or molecular assays at the time of emergency visiting (results not shown). Of these 252 EV-positive children, 111 (44%) had aseptic meningitis, 79 (31%) had upper or lower respiratory tract infections, and 62 (25%) had febrile illness (44% versus 31% versus 25% [chi-square test,  $P < 10^{-3}$ ]; 31% versus 25% [chi-square test,  $P = 0.11$ ]) (Table 1).

**Annual and seasonal variations of EV infections.** Compared to the total number of the diagnosed EV pediatric infections, the rates of EV-related respiratory syndromes ranged from 5 to 60% during the 7-year study period (Fig. 2). These rates appeared to be significantly lower in years 2000 (chi-square test,  $P = 0.0002$ ) and 2005 (chi-square test,  $P = 0.0002$ ), during

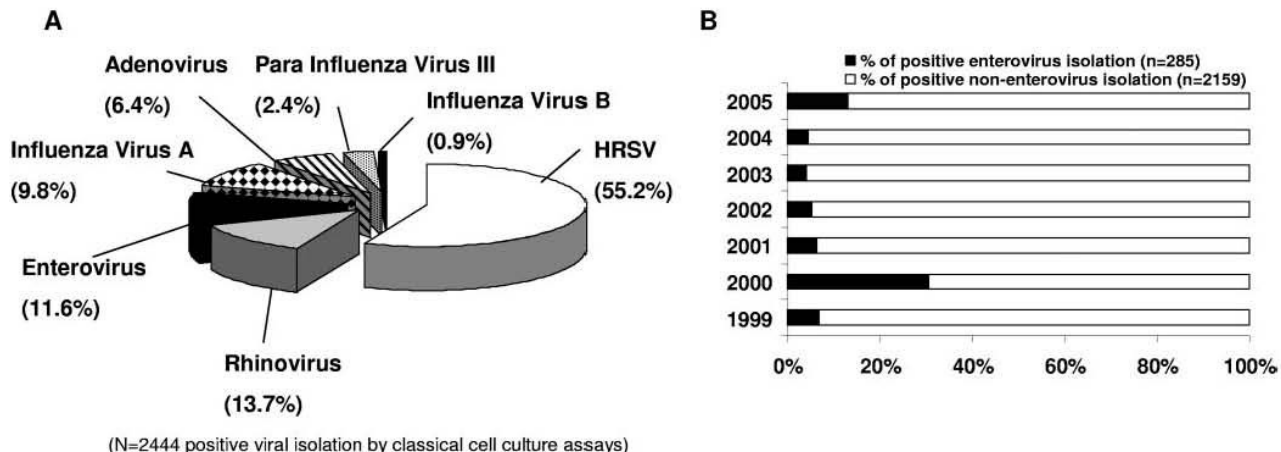


FIG. 1. Positive respiratory viral findings in the nasopharyngeal samples of 11,509 consecutive children attending one of the five referent pediatric emergency departments of the region Champagne Ardenne (France) from 1999 through 2005. (A) Distribution (%) of the positive viral isolation of human respiratory strains by classical cell culture assays in nasopharyngeal samples of 2,444 (21%) of 11,509 children during the 7-year of the study period. (B) Distribution of the annual rates of EV-positive isolation by classical cell culture assays among the 2,444 positive nasopharyngeal samples.

which epidemics of aseptic meningitis occurred in the region Champagne Ardenne (France) (Fig. 2). From 1999 to 2005, all of the EV-related respiratory infections were diagnosed from February to December. Interestingly, a peak of EV respiratory infection cases occurred in June 2000, 2001, and 2005 and in July 2002. EV respiratory infections had prominent spring-fall seasonality, with June-July period accounting for 47% of all EV infection reports (Fig. 2).

**Virological characteristics of EV strains isolated from the respiratory tract samples of the selected children.** Frequencies, ranks, and number of years reported for all of the EV strains isolated from the nasopharyngeal samples of children with respiratory and nonrespiratory tract infections are indicated in the Table 2. Echovirus 11, echovirus 6, echovirus 30, echovirus 13, and coxsackievirus B2 accounted, respectively, for 24, 13, 11, 11, and 11% of all EV respiratory syndromes

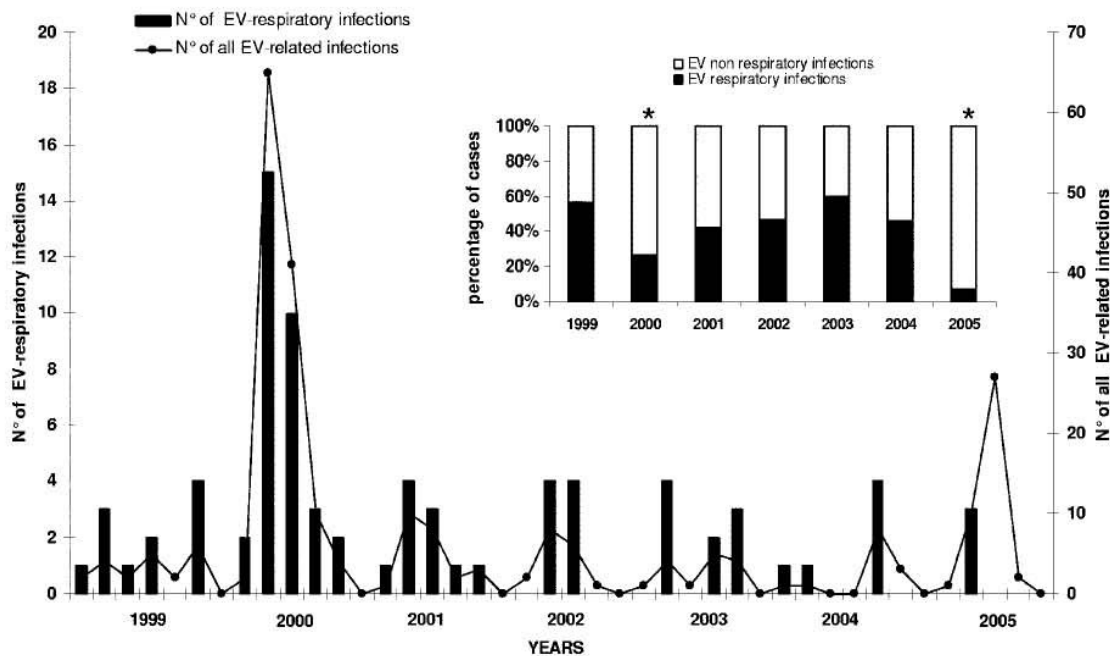


FIG. 2. Number of EV-related infections in Champagne Ardenne between 1999 and 2005. \*, Years wherein the rates of EV-related respiratory infections appeared to be significantly lower than those of other EV-induced infections (chi-square test stratified according to the years of the study period;  $P < 0.001$ ).

TABLE 2. Frequencies, ranks, and number of years reported for individual EV serotypes

EV serotype	EV-induced respiratory infections			EV-induced nonrespiratory infections <sup>a</sup>			No. of yr in which serotypes were reported
	Overall rank	Diagnosed cases with identified serotype (n = 79)		Overall rank	Diagnosed cases with identified serotype (n = 173)		
		No.	%		No.	%	
Echovirus 11	1	19	24.0	5	6	3.8	6
Echovirus 6	2	10	12.7	3	21	12.1	4
Echovirus 30	3-5	9	11.4	1	67	38.7	6
Echovirus 13	3-5	9	11.4	2	40	23.1	1
Coxsackievirus B2	3-5	9	11.4	6-7	5	2.9	3
Echovirus 7	6	6	7.6				3
Coxsackievirus B4	7-8	4	5.0	11-13	2	1.2	2
Coxsackievirus A16	7-8	4	5.0	14-17	1	0.6	4
Echovirus 3	9	3	3.8	11-13	2	1.2	3
Coxsackievirus B5	10	2	2.5	4	9	5.2	6
Echovirus 18	11-14	1	1.3	8	4	2.3	2
Coxsackievirus A9	11-14	1	1.3	14-17	1	0.6	2
Echovirus 5	11-14	1	1.3				1
Enterovirus 71	11-14	1	1.3				1
Echovirus 9				6-7	5	2.9	2
Coxsackievirus B1				9-10	3	1.7	3
Echovirus 16				9-10	3	1.7	2
Echovirus 25				11-13	2	1.2	2
Echovirus 17				14-17	1	0.6	1
Echovirus 20				14-17	1	0.6	1

<sup>a</sup> EV-induced nonrespiratory infections included meningitis and febrile illness.

(Table 2). Echovirus 7, EV 71, coxsackievirus A16, echovirus 11, coxsackievirus B4, coxsackievirus B2, echovirus 3, and coxsackievirus A9 were isolated and identified in 100% (6 of 6 isolates), 100% (1 of 1 isolates), 83% (4 of 5 isolates), 76% (19 of 25 isolates), 66% (4 of 6 isolates), 64% (9 of 14 isolates), 60% (3 of 5 isolates), and 50% (1 of 2 isolates), respectively, of samples from infants with respiratory syndromes, indicating a dominant respiratory tropism for these EV isolates (Table 2).

**Phylogenetic comparison of partial VP1 capsid protein region of EV respiratory strains.** A phylogenetic tree on partial VP1 sequences of 77 of 79 EV strains isolated from nasopharyngeal samples of children with respiratory pathologies was built, allowing identification of temporal trends and patterns of circulation of respiratory species, serotypes, and strains (Fig. 3). This phylogenetic approach demonstrated the concomitant or successive circulation of species A and B human respiratory EVs within a single French geographical area (Fig. 3). During each year of the study period (1999 to 2005), a cocirculation of genetically distinct EV respiratory serotypes occurred between February and December. Moreover, in the two clusters of strains corresponding to echovirus 7 and echovirus 11 serotypes, we observed the cocirculation of genetically distinct subgroups of strains (bootstrap values of >60%) during the same annual epidemic period (Fig. 3) (22). Finally, for each EV serotype identified as related to both respiratory and neurological pathologies in children, various nucleotide or amino acid phylogenetic analyses of VP1 gene sequences were carried out, and their results did not identify the existence of distinct subgroups of strains that might have temporarily acquired a specific respiratory or neurological tropism (not shown).

**Clinical features of EV-induced respiratory infections.** The signs and symptoms of the 79 children with different EV-induced respiratory infections are reported in the Table 3.

Three patients demonstrated a secondary bacterial respiratory infection developed during hospitalization and inducing a fatal cardiorespiratory distress in one case (Table 3). Among the 79 children with a documented EV respiratory infection, 43 (54%) had from LRTIs and 36 (46%) had upper respiratory tract infections (54 versus 46%; chi-square test,  $P = 0.27$ ). During the study period, we observed that bronchiolitis was the most frequent EV-related respiratory pathology diagnosed (43% of 79 cases) compared to flu-like illness (21% of cases), sore throat (11% of cases), or asthma attack (8% of cases) (43 versus 21 versus 11 versus 8%; chi-square test,  $P < 10^{-3}$ ) (Table 3). EV-induced bronchiolitis occurred significantly more often in infants aged 1 to 12 months than in children in other age groups (73.5 versus 26.5%; chi-square test with Yates' correction,  $P = 0.0002$ ). No EV serotype could be associated with a specific respiratory clinical manifestation (analysis of variance test,  $P > 0.5$ ).

## DISCUSSION

Our retrospective study assessed important epidemiological and clinical features of EV-related respiratory pathologies in a representative North French pediatric population (Fig. 1). Our findings indicated that EVs were respiratory pathogens with an epidemic behavior and that EV respiratory strain substantially contributed to LRTI (17% of children with EV infections), leading to hospitalization in 62% of these children (Table 1). All specimens of the present study were prospectively tested by classical cell culture and seroneutralization assays, demonstrating the infectivity of the EV strains detected in the nasopharynxes of infants at the time of the clinical diagnosis (16, 21). It is clear that our global rates of EV respiratory infections might be significantly enhanced by using RT-PCR detection

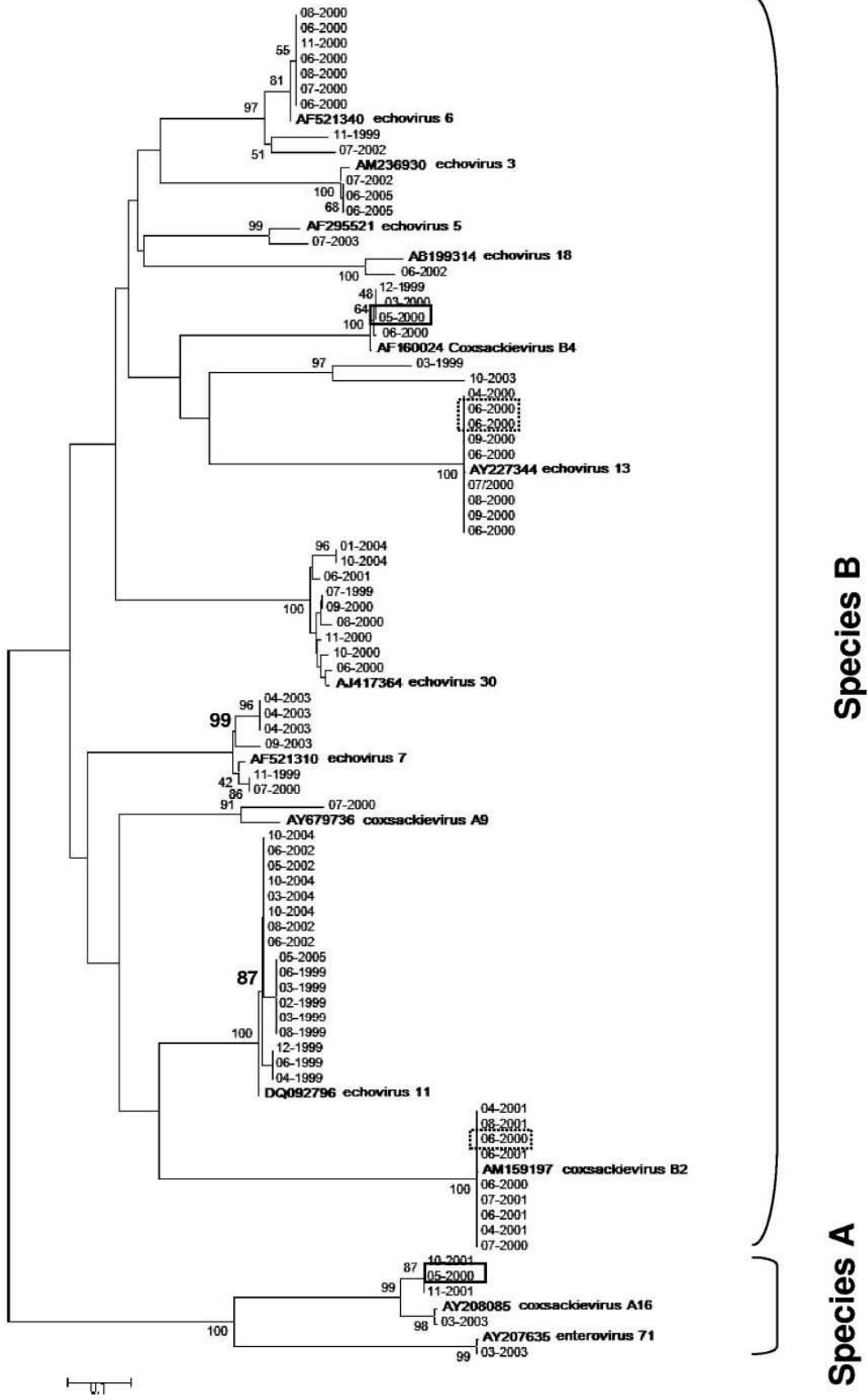


TABLE 3. Clinical signs, symptoms, and virological features of 79 pediatric patients with an EV-induced respiratory infection diagnosed during the study period (1999 to 2005)

Signs and symptoms	Total no. of patients (%)	Mean age in yr (SD)	No. of males/ no. of females	Multiple infection	Clinical outcome (fatal/good)	EV VP1 genotyping (no of strains) <sup>a</sup>
Bronchiolitis	34 (43)	0.7 (0.7)	21/13	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	0/34	Cox B2 (5), Cox B4 (2), Cox B5 (1), Cox A16 (3), Echo 3 (2), Echo 6 (5), Echo 7 (4), Echo 11 (3), Echo 13 (3), Echo 18 (1), Echo 30 (5)
Flu-like illness	17 (21)	2.1 (2.6)	10/7	<i>Moraxella catarrhalis</i>	1/16	Cox B2 (2), Cox B4 (2), Cox A9 (1), Ent 71 (1), Echo 3 (1), Echo 6 (2), Echo 11 (5), Echo 13 (1), Echo 30 (2)
Sore throat	9 (11)	5.8 (3.7)	7/2		0/9	Echo 5 (1), Echo 7 (1), Echo 6 (1), Echo 11 (4), Echo 13 (1), Echo 30 (1)
Asthma attack	6 (8)	3.6 (2.0)	6/0		0/6	Cox B2 (1), Cox A16 (1), Echo 6 (1), Echo 11 (1), Echo 13 (2)
Rhinopharyngitis	4 (5)	5.3 (5.4)	3/1		0/4	Cox B2 (1), Echo 6 (1), Echo 11 (2)
Pharyngitis	3 (4)	8.8 (4.2)	2/1		0/3	Echo 13 (2), Echo 30 (1)
Bronchitis	3 (4)	0.7 (0.5)	2/1	<i>Haemophilus influenzae</i>	0/3	Echo 7 (1), Echo 11 (2)
Rhinitis	3 (4)	1.3 (1.2)	1/2		0/3	Cox B5 (1), Echo 11 (2)
Total	79 (100)	2.4 (3.1)	52/27		1/78	

<sup>a</sup> Cox, coxsackievirus; Echo, echovirus.

assays in the nasopharyngeal aspirates of study children, allowing the detection of low levels of cultivable and noncultivable human EV strains; however, this molecular approach might have identified asymptomatic respiratory picornavirus shedding or past or future respiratory symptomatic infections (28). Moreover, our molecular features obtained by partial sequencing of the VP1 gene of the isolates demonstrated that several individual respiratory strains had specific temporal trends and patterns of circulation (Fig. 3) but that no EV serotype could be associated with a specific respiratory clinical manifestation. Finally, the EV-induced respiratory pathologies appeared as the second most common EV-induced pediatric pathology after meningitis, contributing to LRTI with spring-fall seasonality.

The present study determined that among French immunocompetent children aged  $\leq 15$  years, respiratory diseases were the second most common EV-induced pediatric pathology after aseptic meningitis (Table 1). Bronchiolitis appeared significantly as the most frequently EV induced respiratory syndrome (43% of 79 EV respiratory cases), and comparison between age groups showed that this pathology occurred more frequently in infants aged 1 to 12 months. Recent studies published by our group (21) and others (1, 22) have shown that picornaviruses, specifically EVs, were identified as the third etiological cause of bronchiolitis in infants after human respiratory syncytial virus (HRSV) and rhinoviruses, with prevalence detection rates ranging from 9 to 25% of hospitalized infants with bronchiolitis or acute wheezing. In these reports,

EV-induced bronchiolitis or acute wheezing appeared to be detected more frequently in children aged 6 months to 2 years (1, 21, 22). Our findings are in agreement with these previous studies and argue for the significant role EV respiratory strains as the etiological cause of bronchiolitis in infants aged less than 12 months (Tables 1 and 3). Whatever the exact prevalence of respiratory picornavirus infection as a cause of bronchiolitis remains to be determined in longitudinal prospective studies, testing the presence of all common viral pathogens in the respiratory tract of study infants before and after the development of respiratory symptoms.

Our findings indicated that EV respiratory diseases could be diagnosed from February to December, encompassing a part of the classical epidemic period of viral respiratory infections in French children (16, 21). These data suggested the possibility of mixed respiratory infections with EVs associated with other common respiratory viruses (1, 22). During the present study, we only identified 31 cases (13% of 285 cases) of mixed viral infection with EV in association with HRSV, human rhinovirus, or *Mycoplasma pneumoniae*. This detection of mixed respiratory infections might be significantly enhanced by the use of real-time RT-PCR or PCR assays for the detection of respiratory pathogens, which are known to significantly increase the sensitivity levels of virus or bacteria detection and to allow the detection of noncultivable or new respiratory viruses as human coronavirus, metapneumovirus, or bocavirus (3, 12). Interestingly, EV respiratory strains were characterized by substantial fluctuations in levels of circulation over 84 months,

FIG. 3. Phylogenetic tree based on partial VP1 sequences (348 pb) of 77 human EV isolates identified as the viral cause of the respiratory syndrome diagnosed in French infants between 1999 and 2005. The numbers correspond, respectively, to the month and the year of isolation (set as "month-year" in the tree) of EV strains from pediatric nasopharyngeal samples. Solid boxes indicate the cases of a cocirculation of distinct EV respiratory tropism species during the same month of the same annual epidemic season. Dotted rectangles indicate examples of cocirculation of distinct EV respiratory serotypes within the same species during the same month of the same annual epidemic season. Bootstraps in boldface indicate examples of cocirculation of phylogenetically distinct subgroups belonging to the same EV strain (bootstraps > 60%) during the same month of the same annual epidemic season.

including large peaks, which was consistent with an epidemic pattern of circulation (Fig. 2). Moreover, we observed that the annual rates of the EV respiratory infections were significantly decreased in years 2000 and 2005 and that this phenomenon was concomitant with the emergence of echovirus 13 and 30 strains, respectively, which were responsible for two aseptic meningitis outbreaks (Table 2) (5, 14). These findings suggested that the annual rates of EV respiratory infections might be significantly decreased by the emergence of EV neurotropic strains responsible for aseptic meningitis outbreaks.

In the present investigation, the phylogenetic comparison of partial VP1 capsid protein region confirmed the identification of the serotypes obtained by micro-seroneutralization and allowed us to identify temporal trends and patterns of circulation of EV respiratory serotypes and strains. This phylogenetic approach demonstrated the concomitant or successive circulation of distinct species, serotypes, or subgroups of EV strains within the same month or the same annual epidemic period (Fig. 3). Taken together, these findings indicated the possibility of successive or repeated infections by distinct EV respiratory strains during the same or successive annual epidemic periods in children (Table 2 and Fig. 3). Moreover, these molecular findings suggested the possibility of viral genetic recombination within species A and B human EVs circulating in a single geographical area and infecting concomitantly infants with a symptomatic or asymptomatic respiratory picornavirus shedding (36).

Our data found that EV respiratory diseases cannot be distinguished from HRSV- and influenza virus-induced respiratory syndromes based on clinical findings in children (Table 3) (7, 8). However, EV-related respiratory diseases might be less severe with no cases of pneumonia, no admission to an intensive care unit, and a low death rate during the study period (Tables 1 and 3). Nevertheless, EV respiratory infections were associated with a substantial clinical and economical impact, as shown by a median hospital stay of 3.5 days (not shown) and by the observation that 20% of all patients with EV-induced respiratory infections were hospitalized with the risk of nosocomial transmission of EV strains to other patients and with the risk of nosocomial infection by other viral or bacterial agents in these children. No specific underlying diseases had been identified among children with EV-associated respiratory diseases (data not shown). Whatever the clinical impact of various underlying diseases on the severity and clinical outcome of EV-induced respiratory pathologies is remains to be determined in larger prospective studies, specifically studies in infants aged less than 12 months.

Taken together, our results indicate that EVs are important etiologic agents of childhood lower respiratory tract diseases and that these viral agents can be isolated from the nasopharyngeal tracts of infants with respiratory symptoms. However, like other human picornaviruses, EVs can be isolated by cell culture systems or detected by RT-PCR assays in the nasopharynxes of infants without EV-related respiratory symptoms (28). Therefore, it would be of major interest to assess the EV genomic RNA load in respiratory samples from infants with or without respiratory symptoms by quantitative real-time RT-PCR systems. Using such approaches in further prospective studies would allow researchers to determine the significant clinical threshold of EV-RNA values quantified in the nasopharyngeal samples of infants with EV-related respiratory dis-

eases. Moreover, the use of such quantitative EV RNA detection systems would improve the management of infant and adult patients with EV-related respiratory diseases by reducing unnecessary diagnostic and therapeutic interventions and by preventing nosocomial respiratory viral infections. These further quantitative molecular assays would be also valuable particularly with regard to disease control during the EV annual epidemic season.

In conclusion, we determined that respiratory diseases were the second most common EV-induced pathology after aseptic meningitis in infants, contributing substantially to LRTIs in infants aged 1 to 12 months. Moreover, the successive or concomitant circulation of genetically distinct EV strains indicates the possibility of pediatric repeated respiratory infections during the same epidemic season and suggests the possibility of genetic recombination within species A and B human respiratory EV strains. The further development of valuable EV quantitative real-time RT-PCR assays associated with a genotyping RT-PCR assay will allow the rapid and valuable etiological diagnosis of EV childhood respiratory infections and help to prevent nosocomial transmission of these viruses in pediatric departments and also help to control the emergence of new EV respiratory strains.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the Region Champagne Ardenne (grant 7M04), France, and by a grant for clinical and virological research (EA-3798: DAT/PPCIDH) from the Medical University and School of Medicine of Reims, France.

#### REFERENCES

1. Andréoletti, L., M. Lesay, A. Dewilde, V. Lambert, and P. Watré. 2000. Differential detection of rhinovirus and enterovirus RNA sequences associated with classical immunofluorescence assay detection of respiratory virus antigens in nasopharyngeal swabs from infants with bronchiolitis. *J. Med. Virol.* 61:341–346.
2. Anonymous. 2001. Proceedings of consensus conference on the management of infant bronchiolitis in Paris, France, 21 September 2000. *Arch. Pediatr.* 8:1s–196s.
3. Arden, K. E., P. McErlean, M. D. Nissen, T. P. Sloots, and I. M. Mackay. 2006. Frequent detection of human rhinoviruses, paramyxoviruses, coronaviruses, and bocavirus during acute respiratory tract infections. *J. Med. Virol.* 78:1232–1240.
4. Barson, W. J., and C. B. Reiner. 1986. Coxsackievirus B2 infection in a neonate with incontinentia pigmenti. *Pediatrics* 77:897–900.
5. Bernit, E., X. de Lamballerie, C. Zandotti, P. Berger, V. Veit, N. Schleinitz, P. de Micco, J. R. Harlé, and R. N. Charrel. 2004. Prospective investigation of a large outbreak of meningitis due to echovirus 30 during summer 2000 in Marseille, France. *Medicine* 83:245–253.
6. Birenbaum, E., R. Handsher, J. Kuint, R. Dagan, B. Raichman, E. Mendelson, and N. Linder. 1997. Echovirus type 22 outbreaks associated with gastro-intestinal disease in a neonatal intensive care unit. *Am. J. Perinatol.* 14:469–473.
7. Bourgeois, F. T., C. Valim, J. C. Wei, A. J. McAdam, and K. D. Mandl. 2006. Influenza and other respiratory virus-related emergency department visits among young children. *Pediatrics* 118:1–8.
8. Bourgeois, F. T., K. L. Olson, J. S. Brownstein, A. J. McAdam, and K. D. Mandl. 2006. Validation of syndromic surveillance for respiratory infections. *Ann. Emerg. Med.* 47:265.
9. Brunel, D., J. Jacques, J. Motte, and L. Andreoletti. 2007. Echovirus 18 fatal leukoencephalitis in a child. *J. Clin. Microbiol.* 45:2068–2071.
10. Chang, L. Y., T. Y. Lin, K. H. Hsu, Y. C. Huang, K. L. Lin, C. Hsueh, S. R. Shih, H. C. Ning, M. S. Hwang, H. S. Wang, and C. Y. Lee. 1999. Clinical features and risk factors of pulmonary oedema after enterovirus-71-related hand, foot, and mouth disease. *Lancet* 354:1862–1866.
11. Cheeseman, S. H., M. S. Hirsch, E. W. Keller, and D. E. Keim. 1977. Fatal neonatal pneumonia caused by echovirus type 9. *Am. J. Dis. Child.* 131:1169.
12. Choi, E. H., H. J. Lee, S. J. Kim, B. W. Eun, N. H. Kim, J. A. Lee, J. H. Lee, E. K. Song, S. H. Kim, J. Y. Park, and J. Y. Sung. 2006. The association of newly identified respiratory viruses with lower respiratory tract infections in Korean children, 2000–2005. *Clin. Infect. Dis.* 43:585–592.
13. Chonmaitree, T., and L. Mann. 1995. Respiratory infections, p. 255–270. *In*

- H. A. Rotbart (ed.), Human enterovirus infections. ASM Press, Washington, DC.
14. Communicable Disease Surveillance Centre. 2000. Viral meningitis associated with increase in echovirus type 13. *Commun. Dis. Rep. CDR Wkly.* 10:277–280.
  15. Felsenstein, J. 1985. confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783–791.
  16. Freymuth, F., A. Vabret, J. Brouard, F. Toutain, R. Verdon, J. Petitjean, S. Gouarin, J. F. Duhamel, and B. Guillois. 1999. Detection of viral, *Chlamydia pneumoniae*, and *Mycoplasma pneumoniae* infections in exacerbations of asthma in children. *J. Clin. Virol.* 13:131–139.
  17. Freymuth, F., A. Vabret, F. Galateau-Salle, J. Ferey, G. Eugene, J. Petitjean, E. Gennetay, J. Brouard, M. Jokik, J. F. Duhamel, and B. Guillois. 1997. Detection of respiratory syncytial virus, parainfluenza virus 3, adenovirus and rhinovirus sequences in respiratory tract of infants by polymerase chain reaction and hybridisation. *Clin. Diagn. Virol.* 8:31–40.
  18. Ginevra, C., C. Barranger, A. Ros, O. Mory, J. L. Stephan, F. Freymuth, M. Joannes, B. Pozzetto, and F. Grattard. 2005. Development and evaluation of Chlamyge, a new commercial test allowing simultaneous detection and identification of *Legionella*, *Chlamydophila pneumoniae*, and *Mycoplasma pneumoniae* in clinical respiratory specimens by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 43:3247–3254.
  19. Hambling, M. H., P. M. Davis, and A. D. Macrae. 1963. The typing of enteroviruses in tissue culture by neutralization with composite antiserum pools. *J. Hyg.* 61:479–484.
  20. Hyypia, T., T. Puhakka, O. Ruuskanen, M. Makela, A. Arola, and P. Arstila. 1998. Molecular diagnosis of human rhinovirus infections: comparison with virus isolation. *J. Clin. Microbiol.* 36:2081–2083.
  21. Jacques, J., M. Bouscambert-Duchamp, H. Moret, J. Carquin, V. Brodard, B. Lina, J. Motte, and L. Andreoletti. 2006. Association of respiratory picornaviruses with acute bronchiolitis in French infants. *J. Clin. Virol.* 35:463–466.
  22. Jartti, T., P. Lehtinen, T. Vuorinen, R. Österback, B. Van den Hoogen, A. D. Osterhaus, and O. Ruuskanen. 2004. Respiratory picornaviruses and respiratory syncytial virus as causative agents of acute expiratory wheezing in children. *Emerg. Infect. Dis.* 10:1095–1101.
  23. Khetsuriani, N., A. Lamonte-Fowlkes, S. Oberst, and M. A. Pallansch. 2006. Enterovirus surveillance—United States, 1970–2005. *Morb. Mortal. Wkly. Rep. Surveill. Summ.* 55:1–20.
  24. Khetsuriani, N., and U. D. Parashar. 2003. Enteric viral infections, p. 1758–1766. In D. C. Dale and D. D. Federman (ed.), *Scientific American medicine*. WebMD, Inc., New York, NY.
  25. Mackie, P. L. 2003. The classification of viruses infecting the respiratory tract. *Paediatr. Respir. Rev.* 4:84–90.
  26. Melnick, J. L., N. J. Schmidt, B. Hampil, and H. H. Ho. 1977. Lyophilized combination pools of enterovirus equine antisera: preparation and test procedures for the identification of fields strains of 19 group A coxsackievirus serotypes. *Intervirology* 8:172–181.
  27. Nei, M., and S. Kumar. 2000. *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press, New York, NY.
  28. Nokso-Koivisto, J., T. J. Kinnari, P. Lindahl, T. Hovi, and A. Pitkäranta. 2002. Human picornavirus and coronavirus RNA in nasopharynx of children without concurrent respiratory symptoms. *J. Med. Virol.* 66:417–420.
  29. Oberste, M. S., K. Maher, D. Schmurr, M. R. Flemister, J. C. Lovchik, H. Peters, W. Sessions, C. Kirk, N. Chatterjee, S. Fuller, J. M. Hanauer, and M. A. Pallansch. 2004. Enterovirus 68 is associated with respiratory illness and shares biological features with both the enteroviruses and the rhinoviruses. *J. Gen. Virol.* 85:2577–2584.
  30. Oberste, M. S., W. A. Nix, K. Maher, and M. A. Pallansch. 2003. Improved molecular identification of enteroviruses by RT-PCR and amplicon sequencing. *J. Clin. Virol.* 26:375–377.
  31. Papadopoulos, N. G., M. Moustaki, M. Tsolia, A. Bossios, E. Astra, A. Prezerakou, D. Gourgiotis, and D. Kafetzis. 2002. Association of rhinovirus infection with increased disease severity in acute bronchiolitis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 165:1285–1289.
  32. Porres, E. R., J. Werthammer, N. Moss, J. M. Bernstein, and R. B. Belshe. 1985. Fatal coxsackievirus B4 infection in a neonate. *Southern Med. J.* 78:1254–1256.
  33. Rakes, G. P., E. Aruda, J. M. Ingram, G. E. Hoover, J. C. Zambrano, and F. G. Hayden. 1999. Rhinovirus and respiratory syncytial virus in wheezing children requiring emergency care: IgE and eosinophils analysis. *Am. J. Crit. Care Med.* 159:785–790.
  34. Saitou, N., and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406–425.
  35. Schiff, G. M., and J. R. Sherwood. 2000. Clinical activity of pleconaril in an experimentally induced coxsackievirus A21 respiratory infection. *J. Infect. Dis.* 181:20–26.
  36. Simmonds, P., and J. Welch. 2006. Frequency and dynamics of recombination within different species of human enteroviruses. *J. Virol.* 80:483–493.
  37. Smyth, R. L., and P. J. Openshaw. 2006. Bronchiolitis. *Lancet* 368:312–322.
  38. Stanway, G., F. Brown, P. Christian, et al. 2005. *Picornaviridae*, p. 757–778. In C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, and L. A. Ball (ed.), *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses*. Eighth report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, Amsterdam, The Netherlands.
  39. Strikas, R. A., L. Anderson, and R. A. Parker. 1986. Temporal and geographic patterns of isolates of nonpolio enteroviruses in the United States, 1970–1983. *J. Infect. Dis.* 153:346–351.



### III) INFECTION EXPÉRIMENTALE DES CELLULES BRONCHIQUES HUMAINES PAR LES *ENTÉROVIRUS*

Il a été montré que les picornavirus humains (*Picornaviridae*), incluant les rhinovirus et les entérovirus, seraient des agents étiologiques majeurs de bronchiolite et de cas d'exacerbation de l'asthme infantile (Papadopoulos *et al.*, 2002 ; Jartti *et al.*, 2004 ; Jacques *et al.*, 2006). Au cours des infections respiratoires par les rhinovirus, la présence de polynucléaires neutrophiles associés à l'augmentation du nombre de lymphocytes, d'éosinophiles dans des échantillons nasaux ou bronchique suggère que les infections respiratoires à picornavirus déclenche la migration de certaines cellules inflammatoires vers les voies respiratoires ainsi que leur activation locale (Calhoun *et al.*, 1994 ; Pizzichini *et al.*, 1998 ; Flemming *et al.*, 1999 ; Teran *et al.*, 1999 ; Van Bentem *et al.*, 2001 ; Malcolm *et al.*, 2001 ; Monto *et al.*, 2001 ; Oh *et al.*, 2002 ; Glass *et al.*, 2003). Une grande partie de la réponse cellulaire aux sites de l'inflammation des tissus est contrôlée par des gradients de facteurs chimiotactiques qui induisent la migration trans-endothéliale, et la circulation à travers la matrice extracellulaire des leucocytes (Gerard & Rollins, 2001). Les chimiokines vont réguler la migration et l'activation des globules blancs du sang et, par conséquent, jouer un rôle clé dans ces processus inflammatoires. Les membres de la famille des chimiokines CC tels que RANTES, sont des facteurs chimiotactiques et activateurs pour les éosinophiles. Les chimiokines CXC telles que l'IL-8 sont des chimio-attractants des neutrophiles, et elles sont également reconnues pour posséder une activité chimiotactique pour les éosinophiles (Gerard & Rollins, 2001). Ces chimiokines ont été détectées dans les tissus pulmonaires et les lavages bronchiques de sujets asthmatiques (Alam *et al.*, 1996 ; Teran *et al.*, 1996). En outre, il a été clairement démontré que les rhinovirus peuvent induire la production de chimiokines CC (RANTES) et CXC dans les cellules primaires de l'épithélium bronchique humain (Donninger *et al.*, 2003 ; Glass *et al.*, 2003 ; Hayden *et al.*, 2004 ; Grissel *et al.*, 2005). Les cellules épithéliales humaines semblent être une source majeure de chimiokines CC, dont RANTES (Stellato *et al.*, 1995) et de MCP-1 (Standiford *et al.*, 1991 ; Sousa *et al.*, 1994). Ces cellules de l'épithélium respiratoire sont les seules cellules cibles actuellement connues des picornavirus lors de la pénétration dans les voies respiratoires (Donninger *et al.*, 2003).

Afin d'identifier les mécanismes susceptibles de réguler le développement de l'inflammation de la muqueuse au cours de l'infection respiratoire par les entérovirus, nous avons étudié la production de chimiokines CC et CXC lors de l'infection de cellules

bronchiques humaines. Pour cela, nous avons utilisé un modèle de culture de cellules primaires bronchiques humaines (SAEC « small airway epithelial cell ») que nous avons infectées par des entérovirus identifiés préalablement comme des agents étiologiques de la bronchiolite infantile (article 2).

Les objectifs de cette troisième partie de notre travail de thèse étaient de préciser les profils et les niveaux de production des chimiokines CC et CXC par les cellules épithéliales bronchiques (SAEC) infectées par des entérovirus humains à tropisme respiratoire. Par ailleurs, nous avons également étudié la capacité des éosinophiles recrutés au site de l'infection à être infectés par ces entérovirus et à sécréter secondairement différentes chimiokines dans la lumière bronchique.

Nos résultats montrent une production sélective de RANTES, IL-8 et MCP-1 libérés par les cellules épithéliales des bronches après infection par des entérovirus à tropisme respiratoire. Cette production est associée à des mécanismes autocrines et paracrines médiés par les éosinophiles et l'IFN- $\gamma$ , ce qui explique en grande partie la migration et l'activation des cellules mononuclées (polynucléaire neutrophiles et éosinophiles) lors de la bronchiolite induite par les entérovirus. Cependant de nouvelles études, conduite à la fois chez les enfants atteints de différentes formes de maladies des voies respiratoires induites par les entérovirus et dans des modèles animaux, seront nécessaires pour corrélérer les différents paramètres histopathologiques, et inflammatoires à l'expression et la sécrétion des chimiokines CC et CXC au niveau de la muqueuse des voies respiratoires.

---

ARTICLE N°3:

“SPECIFIC PRODUCTION OF CC OR CXC CHEMOKINES BY HUMAN  
BRONCHIAL EPITHELIAL CELLS AND EOSINOPHILS INFECTED BY  
RESPIRATORY ENTEROVIRUSES”

Jérôme Jacques, Jacqueline Roux, Hélène Moret, Mourad Agouli, Nicolas  
Lévêque, Gaetan Deslée, Jacques Motte, Laurent Andréoletti.

« Manuscrit Soumis »

**(4965 Words)**

**Full-length paper**

**Full title**

**Specific Production of CC or CXC Chemokines by Human Bronchial Epithelial Cells and Eosinophils Infected by Respiratory Enteroviruses**

*Running title*

CC and CXC production by respiratory EVs

Jérôme Jacques<sup>1,2</sup>, Jacqueline Roux<sup>1,2</sup>, Hélène Moret<sup>1,2</sup>, Mourad Agouli<sup>1,2</sup>,  
Nicolas Lévêque<sup>1,2</sup>, Gaetan Deslée<sup>3</sup>, Jacques Motte<sup>4</sup> and Laurent Andréoletti<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de Virologie, Centre Hospitalier Universitaire de Reims ;

<sup>2</sup> IFR 53/EA-3798 (DAT /PPCIDH), Faculté de Médecine de Reims;

<sup>3</sup> Service de Pneumologie, Centre Hospitalier Universitaire et Faculté de Médecine de Reims;

<sup>4</sup> Service de Pédiatrie A, Centre Hospitalier Universitaire de Reims, Unité INSERM 666 et  
Faculté de Médecine de Strasbourg ;

**Footnotes:** None of the authors of the present manuscript have a commercial or other association that might pose a conflict of interest. This work was supported by the Region Champagne Ardenne (Grant n°7M04), France.

**\*Corresponding author: Pr Laurent Andréoletti (MD, PhD), Laboratoire de Virologie, Service de Microbiologie, Hôpital Robert Debré, Avenue du Général Koenig, 51092 REIMS Cedex, France.**

Tel: (33) 3 26 78 39 93; Fax: (33) 3 26 78 41 34; Electronic address: [landreoletti@chu-reims.fr](mailto:landreoletti@chu-reims.fr)

**Abstract (261 words):**

Enteroviruses (EVs) are now suspected to be important etiologic agents for childhood bronchiolitis, a syndrome characterized by peribronchial mononuclear cell infiltration and release of inflammatory mediators by basophil and eosinophil leukocytes. To identify the mechanisms that can regulate the development of airway mucosa inflammation during EV respiratory lower tract infection, we investigated the production of chemokines by EV-infected bronchial epithelial cells. Cultures of primary human small airway epithelial cell (SAEC) were infected by wild-type respiratory EV strains, demonstrating a replicative and productive infection by Coxsackievirus B5 and Echovirus 30 strains. Exposure of SAEC to gamma interferon (INF- $\gamma$ ), in combination with Coxsackievirus B5 and Echovirus 30 infection, induced a significant increase in RANTES production that was synergistic with respect to that obtained by EV-infection or INF- $\gamma$  treatment alone. We observed that the replicative infection of the SAEC by Coxsackievirus B5 and Echovirus 30 wild-type viruses induced dose and time-dependent increases in mRNA and protein secretion for RANTES, MCP-1 and IL-8. The protein secretion of these chemokines appeared to be significantly increased at 48 or 72 hours post-infection in cultures treated by low-doses of INF- $\gamma$  comparatively to mock-infected cells ( $P < 0.001$ ), and was correlated to the viral replication activity. SAEC-derived chemokines exhibited a strong chemotactic activity for normal human blood eosinophils. Furthermore, we observed an EV productive infection in eosinophils, which specifically released significant levels of RANTES and MCP-1, 24 hours post-infection. Therefore, the inflammatory process in EV-induced bronchiolitis appears to be triggered by the infection of epithelial cells and further amplified via mechanisms driven by INF- $\gamma$  and by the secretion of eosinophil chemokines.

**Key-words:** Enterovirus, airway epithelial cells, SAEC, human eosinophils, chemokines.

## Introduction:

Human picornaviruses (*Picornaviridae*), including Rhinoviruses (HRVs) and Enteroviruses (Evs), are now suspected to be an important etiologic agent for childhood acute respiratory wheezing illnesses including bronchiolitis and asthma exacerbation (24,25,43,44). In the United States and Europe, hospitalization admission rates for childhood bronchiolitis have increased substantially during recent years and are now reported to be around 30 per 1000 for children younger than 1 year (52). In addition to the clinical and epidemiological relationship between bronchiolitis in infancy and recurrent wheeze and asthma in later life (18,24,51), bronchiolitis and asthma are linked by common histopathological features characterized by profound inflammation of the airway mucosa. Along this line, necrosis of the bronchial epithelium associated with peribronchial and perivascular mononuclear cell infiltration is considered a hallmark of viral-induced bronchiolitis in humans (1,9,12). The presence of cell-specific inflammatory mediators associated with increased numbers of lymphocytes, eosinophils and neutrophils in nasal or bronchial samples of patients with HRV related acute wheezing comparatively to healthy patients, suggests that picornavirus respiratory infection triggers the migration to the airways and local activation of some inflammatory cells (4,13,17,36,37,41,45,59,61).

Much of the cellular response at sites of tissue inflammation is controlled by gradients of chemotactic factors that direct leukocyte transendothelial migration and movement through the extracellular matrix (15). The composition of this cellular response is dependent on the discrete target cell selectivity of these chemotactic molecules. Chemokines, family of small chemotactic cytokines, regulate the migration and activation of leukocytes and therefore play a key role in inflammatory and infectious processes of the lung. Members of the CC branch of the chemokine family such as RANTES are chemotactic and activator factors for eosinophils and the CXC branch of the chemokine family such as IL-8 are an important neutrophil chemoattractant, and also possess chemotactic activity for primed eosinophils (15). Among other potential important function of RANTES and MCP-1 in allergic and virus-induced inflammation are their capacity to stimulate surface IgE-surface or IgG4-positive B cells for enhanced IgE and IgG4 production (27,46), and to induce degranulation of natural killer cells and cytotoxic T cells (57,58). These chemokines are present in lung tissue and bronchial lavage fluid of asthmatic subjects (2,60). Moreover, it has been clearly demonstrated that

HRVs can induce the production of CC (RANTES) and CXC chemokines in primary human bronchial epithelial cells (8,17).

Human epithelial cells appear to be a dominant source of many CC chemokines, including RANTES (56) and MCP-1 (53,55). Respiratory epithelial cells are the primary and virtually the only cell target of viruses that enter the airways (8). Therefore, to identify the mechanisms that can regulate the development of airway mucosa inflammation in viral infection, we have investigated the production of CC chemokines by EV-infected lower airway epithelial cells. Our study demonstrate that *in vitro* infection by EV respiratory strains of human epithelial cells originating from distal portion of the bronchial tree results in the induction and secretion of a specific pattern of CC and CXC chemokines.

In the present study, we demonstrate that the chemokines produced by EV-infected bronchial epithelial cells have biological activity relevant to the pathogenesis of allergic inflammation, as they exhibit chemotaxis for blood eosinophils and as they can also induce chemotaxis for blood neutrophils and monocytes. Moreover, we show that human blood eosinophils are susceptible to EV infection and elaborate and secrete the chemokines RANTES and MCP-1 in response to a viral productive infection. Therefore, the pathologic process of inflammation in EV-induced bronchiolitis, initially triggered by the infection of lower airway epithelial cells, may be further sustained and amplified *via* autocrine mechanisms driven by the secretion of eosinophil chemokines.

## Materials and methods

### Culture of epithelial cells.

Cultures of primary human bronchial epithelial cells (small airway epithelial [SAE] cells) were initially established at Clonetics Corp. (San Diego, CA, USA) from Caucasian normal human lung tissue according to referenced procedures (31). SAE cells were positive for cytokeratin 19 and negative for alkaline phosphatase, a marker of lung type II epithelial cells. SAE cells were grown in BEGM (Clonetics Corp., San Diego, CA, USA) containing human recombinant epidermal growth factor (0.5 ng/ml), hydrocortisone (0.5 mg/ml), bovine pituitary extract, retinoic acid (0.1 ng/ml), and epinephrine (0.5 mg/ml), supplemented with gentamicin (50 mg/ml), amphotericin B (50 ng/ml), and 1% bovine serum albumin. Cells were used in the experiments between the second and the fourth passage. All cells were maintained at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> (31).

### Virus preparations.

The virus titers of wild-type respiratory EV strains responsible for bronchiolitis in hospitalized infants (23) were determined by a classical methylcellulose plaque assay in BEAS-2B cells (American Type Culture Collection, Rockville, Md., USA) stained with cristal violet dye (28,47). To inactivate replicating virus, viral strain was diluted in 1 ml of BEGM and exposed to 254-nm UV light source for 2 hours (16). No contaminating cytokines, including interleukin-1 (IL-1), tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) IL-6, IL-8, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), were found in these viral preparations. EV-conditioned medium (EV-CM) was prepared by infecting monolayers of SAE cells with EV at multiplicity of infection (MOI) of 0.1 and then incubated at 37°C in 5 % CO<sub>2</sub>. At 48 h the supernatant was collected, centrifuged at 300 g, and finally exposed to a UV light source as described for the inactivation of EV strain. Virus pools and conditioned medium were aliquoted, and stored at -70°C until used.

### Experimental design for determination of RANTES, MCP-1, and IL-8 protein release and mRNA expression in epithelial cells.

Epithelial cells grown at 90 % confluence were infected with EV strain at an MOI of 0.1 or, in dose-response experiments, at MOIs of 0.001, 0.01, 0.1, 0.5, and 1. To infect the cells, frozen EV stock was rapidly thawed and diluted with BGEM. The virus was added immediately to the well of the plate (0.1 ml of diluted virus/cm<sup>2</sup> of area) after removal of the culture medium.



After addition of virus, the plates were maintained for 2 h at 37°C, and then medium (0.5 ml/cm<sup>2</sup>) was added to the well of the plate culture. The infection was continued for the indicated times in a 37°C incubator. Supernatant were collected at 0, 6, 12, 24, 48, or 72 h, and stored at -70°C for subsequent measurement of chemokines by specific xMAP luminex ELISA detection technology (Bio-Rad, Marnes la coquettes, France). Cells were harvested from the same tissue culture flasks, and total RNA was extracted for the determination of chemokine mRNA. In other experiments, chemokine production was determined in supernatants of epithelial cells that were simultaneously infected with EV at an MOI of 0.1 and treated with IFN- $\gamma$  (100 U/ml; Roche Diagnostics, Meylan, France).

#### **ELISA for chemokines.**

Levels of immunoreactive RANTES, MCP-1, and IL8 were determined using a commercially available xMAP luminex ELISA detection technology (Bio-Rad, Marnes la coquettes, France) and carried out in the “Plateaux de Biologie Expérimentale de la Souris (PBES) de l'école normale supérieure de Lyon” according to the manufacturer's recommandations. The RANTES, MCP-1, and IL-8 xMAP luminex ELISA detection are sensitive to 2.5, 5, and 2 pg/ml, respectively, and have an intra-assay coefficient of variation of <10% and inter-assay coefficient of variation of <10%, according to the manufacturer's instructions.

#### **RT-PCR array for CC and CXC chemokines.**

Total RNA was extracted from control or EV-infected epithelial cells by the guanidinium thiocyanate method (6) with TRI Reagent® (Sigma-Aldrich Corporation, Lyon, France). Reverse transcription (RT) was performed with M-MLV (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). In brief, 15 ng of total RNA was incubated at 42°C for 30 min in 30  $\mu$ l of RT mixture (5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8.3], 1 mM deoxyribonucleoside triphosphates, RNase inhibitor [1 U/ $\mu$ l], Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase [2.5 U/ $\mu$ l], 2.5 mM random hexamers), denatured by heating at 99°C for 5 min, and rapidly cooled to 4°C. Next, PCR mixture consisting of the IQ<sup>TM</sup>SYBR<sup>®</sup>Green Supermix 2X (Bio-rad, Marnes-la-coquette, France), and 0.3  $\mu$ M sense and antisense primers for human RANTES, IL-8, MCP-1, IP-10, Eotaxin and GAPDH (19,32) was added to the RT products. PCR was carried out in a final volume of 25  $\mu$ l in an iCycler iQ Real-time PCR (Bio-rad, Marne-la-coquette, France) programmed as follows: denaturation cycle at 94°C for 15 s, annealing at 60°C for 10 s, and extension at 72°C for 15 s for a total of 40 cycles, followed in turn by a melting curve. The Ct value were analysed by Excel-software PCR array data

analysis templates, available at <http://www.superarray.com/pcrarraydataanalysis.php>. Data analysis is based on the  $\Delta\Delta C_t$  method with normalization of the raw data to either housekeeping genes. This Excel-software integrates a statistical analysis by the Student's t test (Fig.3).

### **RT-PCR detection of enterovirus genomes.**

The presence of specific EV 5'-non-coding sequences was assessed by a RT-PCR assay. Two primers (P2; nucleotide position of CVB3-Nancy genome: 164-184; 5' CAAGCACTTCTGTTTCCCCGG 3'. P3; nucleotide position of CVB3-Nancy genome: 599-580: 5' ATTGTCACCATAAGCAGCCA 3') described to anneal to the highly conserved sequences within the 5' non-coding region (5'NC) were used (67). In brief, 15 ng of total RNA was incubated at 42°C for 30 min in 30  $\mu$ l of RT mixture (5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8.3], 1 mM deoxyribonucleoside triphosphates, RNase inhibitor [1 U/ $\mu$ l], Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase [2.5 U/ $\mu$ l], 2.5 mM random hexamers), denatured by heating at 99°C for 5 min, and rapidly cooled to 4°C. Then, classical PCR amplification of cDNA was carried out using primers P2 and P3 as described previously (67). An aliquot of each amplified RT-PCR product was subjected to agarose gel electrophoresis with ethidium bromure staining (67). In parallel, GAPDH (housekeeping gene) mRNA was amplified by RT-PCR and used to check the quality of the RNA extraction (33). Extensive precautions were taken to prevent molecular contaminations.

### **Eosinophil purification.**

Citrated venous blood was obtained successively from 3 different hypereosinophilic adult patients before the beginning of a classical corticosteroid therapy for atopia (Pneumology department, Reims medical university center, France). The leukocyte-enriched buffy coats were overlaid onto ficoll-paque (PAN biotech GmbH, Deutschland) and centrifuged at 400 g for 20 min. Erythrocytes were removed by hypotonic lysis as previously described (11). Eosinophils were negatively selected with anti-CD16 immunomagnetic beads to remove neutrophils, using the MACS system (Miltenyi Biotec, Paris, France). The purity of eosinophils was consistently >99 %.

### **Immunohistochemical assays for EV infected eosinophils.**

Infection of eosinophils exposed to EV was determined by immunohistochemical staining according to the manufacturer's instructions (Vector, Paris, France). Briefly, acetone-fixed cytocentrifuged smears of EV-infected or mock-infected eosinophils were incubated for 30 min at 37°C with a monoclonal antibody (MAb) (clone 5-d8/1) directed against EV capsid viral protein 1 (VP1) or CD15 followed by incubation for 30 min at 37°C with the diluted biotinylated secondary antibody followed by VECTASTAIN ABC-AP reagent and by the substrate solution (red for the VP1 and Blue for the CD15) (Vector, Paris, France).

### **Production of RANTES and MCP-1 by human eosinophils.**

Purified eosinophils ( $2 \cdot 10^5$  cells/ml) were infected with EV at a MOI of 1 or cultured with control medium (RPMI 1640 with 2 % FCS) at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. After 12 h of incubation, the supernatants were collected and stored at -70°C until used. To determine total content of RANTES and MCP-1, eosinophils ( $2 \cdot 10^5$  cells/ml) were lysed with 2 % Triton X-100. Levels of immunoreactive RANTES and MCP-1 in supernatants and after cell lysis were determined using a commercially available xMAP luminex ELISA detection technology (Bio-Rad, Marne la coquette, France). These experiments were carried out in the "PBES de l'école normale supérieure de Lyon" according to the manufacturer's recommendations, as described above.

### **Eosinophil chemotaxis.**

Eosinophil chemotaxis was studied by using 5 µm polycarbonate membranes in Boyden microchambers as previously described (3). Briefly, 200 µl of EV-CM was placed in the lower compartment of the Boyden chamber and incubated for 3 h at 37°C in the presence of 100 µl of eosinophil suspension ( $10^5$  cells) in the upper compartment. For neutralizing studies, anti-RANTES MAb was added to the EV-CM in lower compartments (10 mg/ml; R&D Systems, Lille, France). The concentration of the neutralizing antibody was chosen based on the inhibition curve of biologic effect provided by the manufacturer (R&D Systems, Lille, France). Uninfected epithelial cell supernatant was used as a negative control, and platelet-activating factor (PAF at  $10^{-7}$  M in 200 µl of culture medium) was used as a positive control. At the end of incubation, the membranes were removed and were stained with May-Grünwald-Giemsa. Migrated eosinophils were counted in 10 random high-power fields. Two independent observers blinded to the experimental conditions read all slides. Results were expressed as mean number of eosinophils per cm<sup>2</sup> ± SD of three determinations for each set of experiments.

**Statistics.**

Data analysis was performed using the SAS software version 8.2 (SAS Institute, Cary, NC, USA). The effects of viral infection and time on chemokine protein levels were analyzed using the paired Student's *t* test and Mann-Whitney rank sum test, respectively. The comparison of levels of infectious virus production after SAE cells infection by EV strains was analyzed using the paired Student's *t* test. Results were considered as statistically significant for two-sided *P* values <0.05.

## Results

**Dynamics of SAE cells infection by wild-type respiratory EV strains.** While a lot of airways epithelial cells have been previously infected by human EV strains (7,29), no information was available about the *in vitro* susceptibility of SAE cells to respiratory EVs. Thus, in initial experiments, SAE cell cultures were inoculated with various wild-type respiratory EV strains at an MOI of 1 for 72 h, and the presence of a replicative activity infection was determined by the production of capsid VP1 protein by cytoplasmic indirect immunofluorescence staining (not shown) (33). These strains had been previously isolated from respiratory samples of infants with acute bronchiolitis by classical cell cultures assays (24), and identified by VP1 genotyping assay (40). Because our epidemiological data had previously demonstrated high prevalence of respiratory Echovirus 30 and low prevalence of respiratory Coxsackievirus B5 isolation in respiratory tract of infants with bronchiolitis, one wild-strain of each of these two viruses was selected for the present study (23). For these two respiratory wild-type strains, we tested the SAE cells infection by the release of infectious viruses in the supernatant of infected cells (Fig. 1). We observed that the two respiratory EV selected strains were capable to infect SAE cells (Fig. 1), and that the dynamics of infectious virus production appeared not to be not statistically different between these two strains ( $P>0.5$ ) (Fig. 1).

**Time course of chemokine mRNA expression levels in SAE cells after EV infection.** Time-dependent changes in the steady-state levels of chemokine mRNA were assayed by RT-PCR array in EV-infected and mock-infected SAE cells (Fig. 2). Fold difference of RANTES, MCP-1 and IL-8 mRNA levels between EV-infected and non infected SAE cells increased significantly at 12 h time point and throughout the 72 h culture, and at 24 h time point and throughout the 72 h culture for Coxsackievirus B5 and Echovirus 30 infection, respectively ( $P<0.001$ ). No significantly fold difference of IP-10 and Eotaxin mRNA levels were observed between EV-infected and non-infected SAE cells (Fig. 2).

**Synergistic and dose-effects of EVs and IFN- $\gamma$  on RANTES, MCP-1 and IL-8 production by epithelial cells.** EV infection has been shown to induce IFN activity *in vivo* and *in vitro* (20), which could modulate the expression of immunoregulatory molecules on respiratory epithelial cells (30). Therefore, we decided to investigate in our model of chemokine secretion

the concurrent effect of EV and IFN- $\gamma$ , a combination likely present in the airway mucosa of infected infants. SAE cells were infected with EV (MOI of 0.1), treated with IFN- $\gamma$ , or infected with EV and treated with IFN- $\gamma$  simultaneously. Supernatant was analyzed at 48 h for the presence of immunoreactive RANTES, MCP-1 and IL-8. Time point later than 48 h were not analyzed since cells began to be destroyed and detached from the plastic vessels as a consequence of viral infection. Since 10-fold increments of IFN- $\gamma$  (1, 10, and 100 ng/ml) have been previously shown to induce the production of comparable amounts of RANTES by bronchial epithelial cells (56), a single concentration of IFN- $\gamma$  (100 U/ml [5 ng/ml]) was chosen in our experiments. As shown in Fig. 3 A, cocubation with Echovirus 30 and IFN- $\gamma$  induced strong upregulation of RANTES secretion ( $84.02 \pm 10.1$  pg/ml) that was synergistic with respect to that obtained by EV infection or IFN- $\gamma$  treatment alone. Treatment of SAE cells either with EV at a low infectious dose associated with IFN- $\gamma$  or with IFN- $\gamma$  treatment alone induced the production of MCP-1 ( $820 \pm 77.1$  or  $702 \pm 70.7$  pg/ml, respectively) (Fig. 3A). Treatment of SAE cells with EV at a low infectious dose increased significantly the production of IL-8, whereas the IFN- $\gamma$  treatment decreased significantly the IL-8 production comparatively to the controls (Fig. 3A).

Additional experiments were conducted to characterize the generation of these chemokines in relation to EV titer and replication. To determine the effect of viral dose on RANTES, MCP-1 and IL-8 generation, different MOIs were tested in cultures of SAE cells (Fig. 3B). Infection of epithelial cells with increasing doses of virus induced a proportional increase in RANTES and IL-8 release, whereas a proportional decrease in MCP-1 release was observed (Fig. 3B). Furthermore, the requirement of infectious virus for RANTES and MCP-1 production was confirmed by the lower chemokines levels induced by UV-inactivated viruses comparatively to infectious virus in SAE cell cultures. By contrast, levels of IL-8 production were not statistically different between cultures treated by infectious and UV-inactivated viruses, demonstrating that the virus-target cell interaction was alone capable to induce significant IL-8 release (Fig. 3B).

**Time course of chemokine secretion by SAE cells after EV infection.** For the time course experiments, aliquots of culture supernatants were assayed for immunoreactive RANTES, MCP-1 and IL-8 at different time points after EV infection or after exposure of epithelial cell monolayers to control medium (Fig. 4). Starting at 24 h, a progressive increase in RANTES concentrations could be detected in supernatants of EV-infected SAE cells. On the other hand,

RANTES levels in uninfected cells remained either undetectable or at low levels of detection throughout the 72 h culture. IL-8 or MCP-1 secretion appeared in cell supernatant at the 12 or 24 h time point and peaked at 72 h in SAE cells, while constitutive secretion of these two chemokines was detected in uninfected cell cultures between 12 and 72 h time points. IL-8 and MCP-1 secretion levels in SAE cells infected cells appeared to be statistically different from those observed in uninfected cells at 72 h time point for Cocksackievirus B5 and 48 h time point for Echovirus 30 (Fig. 4).

**Bioactivity of EV- conditioned medium (CM) and contribution of epithelial cell derived RANTES to eosinophil chemotaxis.** The bioactivity of EV-infected airway epithelial cell supernatant was investigated in the context of eosinophilic inflammation. For this purpose, eosinophils isolated from the blood of normal human donors were tested in Boyden microchambers for their chemotactic response to EV-CM generated by infected SAE cells. PAF ( $10^{-7}$  M), a major eosinophil chemoattractant, was used as a positive control (3). In three separate experiments, EV-CM (Cocksackievirus B5 and Echovirus 30) from SAE cells (Fig. 5) induced 14- and 4-fold increases, respectively, in the number of migrated eosinophils compared to eosinophil migration in the presence of medium from uninfected epithelial cells. Since human RANTES has been previously shown to induce *in vitro* chemotaxis of human blood eosinophils (3), we determined the contribution of RANTES secreted by EV-infected SAE cells to the overall eosinophil chemotactic activity. Addition of neutralizing anti-RANTES MAb in concentration (10 mg/ml) sufficient to neutralize nearly 100 % of the chemotactic activity of 1 mg of recombinant human RANTES per ml, reduced significantly by approximately 90 and 85 % the eosinophil chemotaxis induced by SAE cells EV-CM (Cocksackievirus B5 and Echovirus 30), respectively ( $P < 0.001$ ) (Fig. 5).

**EV-infected eosinophils produce and secrete RANTES and MCP-1.** Following the process of transendothelial migration into the airway mucosa, the contribution of eosinophils to the inflammatory response may reflect their ability to release chemokines (38). However, factors that regulate the production and secretion of chemokines by eosinophil are not known. For this reason, we examined whether human eosinophils exposed to EV were induced to express and secrete CC chemokines. To determine if wild-type respiratory EV strains were capable to infect eosinophils, we carried out immunohistochemical assays for the detection or codetection of surface cell CD15 and intracytoplasmic viral capsid VP1 which was previously used for the surface cell staining of human polynuclear cells and for the detection of EV

infection in myocytes, respectively (22,33). Human eosinophils, isolated from the blood of atopic and untreated individuals to purity >99%, were cultured with control medium or were exposed to Echovirus 30. After 24 h, eosinophils were stained with a Mab against EV VP1 or with an isotype control. Cytospin preparations of eosinophils that were cultured in medium without virus (not shown) and also after two hours of virus- cell contact ( $T_0$  post-infection), were clearly negative (Fig. 6A), while those of eosinophils exposed to EV for 24 h show an intense cytoplasmic red immunohistochemical staining (Fig. 6A). After 8 h of exposure to EV, typical EV intracytoplasmic staining immunoreactivity was observed (not shown). Eosinophils that were stained with an isotype MAb were consistently negative (not shown). The dynamics of infectious virus production appeared to be significantly increased at 8 hours post-infection in cultures comparatively to mock-infected cells ( $P<0.001$ ), and was correlated to the viral genomic replication activity (Fig. 6B).

To determine if eosinophils were able to elaborate the two CC chemokines RANTES and MCP-1 in response to EV infection, freshly isolated eosinophils were cultured in medium or were infected with EV for 12 h. Total cellular content of RANTES and MCP-1 in uninfected eosinophils was also determined in cell lysates obtained by Triton X-100. The cell supernatant was then collected for the determination of RANTES and MCP-1 immunoreactivity by xMAP luminex ELISA. As shown in Fig. 7, uninfected eosinophils spontaneously released RANTES and MCP-1 in concentrations close to the low level of detection ( $12.7 \pm 2.1$  and  $21.00 \pm 8.2$  pg/ml, respectively; mean  $\pm$  SD). Total content of performed RANTES in cell lysates was found in the range of  $51 \pm 8.1$  pg/ml, while total MCP-1 remained at the low level of detection ( $93.2 \pm 21.6$  pg/ml). On the other hand, eosinophils that were exposed to EV for 12 h released in the culture supernatant significant amount of both RANTES ( $117.2 \pm 18.3$  pg/ml) and MCP-1 ( $1963 \pm 321$  pg/ml). These results suggest that newly synthesized rather than a stored form of RANTES and MCP-1 were secreted by the EV-infected eosinophils.



## Discussion:

Human Enteroviruses are now considered as major respiratory pathogens in infancy and early childhood responsible for respiratory wheezing illnesses including bronchiolitis and asthma exacerbation (24,25,43). In the present report we demonstrated for the first time, the capacity of some wild type EV respiratory strains, specifically Coxsackievirus B5 and Echovirus 30, to productively infect human primary lower respiratory cells (SAE cells), which are the cell target of viruses infecting lower airways during childhood bronchiolitis (8) (Fig. 1). The EV productive infection stimulated the secretion of the proinflammatory CC and CXC chemokines RANTES, MCP-1, and IL-8 from human bronchial epithelial cells. Increased steady-state mRNA levels paralleled increased chemokine secretion, and it was strictly dependent on viral replication and infectious dose for RANTES, MCP-1, whereas the virus-target cell interaction was alone capable to induce significant IL-8 release (Fig. 2 & 3B).

The profile and concentrations of the CC and CXC chemokines produced by EV infected SAE cells were characteristically cell specific. Indeed EV infection also induced the release of RANTES and IL-8 by epithelial cells isolated from other segments of the lower respiratory tract examined in this study, i.e., major bronchi (BEAS-2B) and lung (A549) (not shown). With regard to the protein concentration, EV-infected epithelial cells obtained from the distal portion of the bronchial tree (SAE) and lung (A549) cells produced significantly greater levels of RANTES and IL-8 than those from the major bronchi (BEAS-2B) cells. Cis-acting elements have been identified in the human RANTES promoter containing consensus binding sites for the nuclear factor (NF)-IL6 and NF- $\kappa$ B transcriptional activators (39). Recent observations that picornavirus (HRVs) infection induces the activation of NF-IL6 and NF- $\kappa$ B in epithelial cells indicates that these transcription factors may be involved in the viral activation of RANTES and in the airway mucosa (10). Studies addressing this possibility for human enterovirus are in progress in our laboratory.

In contrast to the production of RANTES by the infected primary respiratory bronchial epithelium (SAE cells), EVs induced a higher release of MCP-1 by the same infected cells. The production of MCP-1 by lung epithelial cells in response to TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  has been reported previously (55). In the present study, the relatively modest increase of EV-induced

MCP-1 mRNA, in comparison to the amount of protein released, suggests that expression of MCP-1 gene in epithelial cells may be controlled at several levels, including transcriptional and post-transcriptional (10,34,54). Moreover, we demonstrate for the first time that primary human epithelial cells (SAE cell) are capable to express and secrete MCP-1. Indeed, attempts by other laboratories to evidence cytokine-induced expression of MCP-1 in normal bronchial epithelial cells have been negative (5,42,62). The release of MCP-1 by the airway epithelial cells appears to be present in the distal segments of the bronchial tree, where virus-mediated necrosis of the epithelium and peribronchial cellular infiltration are associated with greater physiological changes, particularly in infants (21). The combination of IFN- $\gamma$  with a low dose of infectious virus induced a significant increase in RANTES production that was synergistic with respect to that obtained by EV infection or IFN- $\gamma$  treatment alone. Recent investigations in children have demonstrated that the acute picornavirus upper respiratory tract infection was characterized by a Th-1-like response with increased IFN- $\gamma$  production (63). Eosinophil inflammation is usually observed in the context of a Th-2-type cytokine response and not a Th-1-type response. Therefore, our findings suggest the possibility of a mechanism, Th-2 independent, mediated by epithelial CC chemokines by which IFN- $\gamma$  can promote the migration of eosinophils to the lung and airway hyper responsiveness following acute EV infection. This phenomenon was primarily described during *in vitro* RSV infection of airway epithelial cells by Olszewka-Pazdrak et al. 1998.

To confirm the biologic activity of epithelial cell-derived chemokines, we show in the present study that supernatant from cells infected with EV exhibited a strong chemotactic activity for eosinophils. Since eosinophil chemotactic activity *in vitro* is a known property of RANTES (3,26), the presence of a neutralizing anti-RANTES MAb significantly reduced eosinophil chemotaxis induced by SAE cell EV-CM (Fig.5). Furthermore our finding demonstrating that eosinophil chemotactic activity in EV-CM was only partially inhibited by anti-RANTES Mab supports the notion that other chemokines known to be secreted by the infected epithelium, including IL-8 (66), have a direct eosinophil chemotactic activity or are able to enhance chemotactic response to other agents (48). On the other hand, the primary goal of our studies was not to identify the contribution of each chemokine to the total eosinophil chemotactic activity present in the EV-infected epithelial cell supernatant but rather to demonstrate the potential relevance of this phenomenon in the generation of eosinophilic inflammation. It has been previously shown that respiratory viruses as HRV are

capable of direct stimulatory interaction with eosinophils, as indicated by the release of nitric oxide (14,49,50). In addition to the release of products such as oxygen radicals, eicosanoids, and cytoplasmic granule proteins, eosinophils can promote inflammation by virtue of their ability to elaborate proinflammatory cytokines and chemokines (38). However, factors that regulate the production and secretion of chemokines by eosinophils are not known.

In the present study, we demonstrate for the first time that human blood eosinophils were susceptible to an EV wild type respiratory strain and were able to elaborate and secrete the chemokines RANTES and MCP-1 following a productive viral infection (Fig.6). Others have shown by RT-PCR assays that blood eosinophils from hypereosinophilic individuals express MCP-1 mRNA, and secrete MCP-1 protein (64). Both RANTES mRNA and protein have been demonstrated in eosinophils infiltrating late-phase cutaneous reactions after intradermal allergen challenge and in peripheral blood eosinophils isolated from atopic subjects with eosinophilia (35) or from healthy donors (65). RANTES protein appeared to be stored within the eosinophils in association with cytoplasmic granules and to be released only after lysis of the cells (65). Thus, no experimental evidence to date indicates that inflammatory cytokines or other exogenous stimuli can regulate RANTES or MCP-1 gene transcription or protein synthesis and secretion in human eosinophils. Since the amount of RANTES and MCP-1 released by eosinophils after EV infection was much higher than that observed in cell lysates (Fig. 7), our investigations demonstrate that production and release of these chemokines is indeed inducible in EV-infected eosinophils. As a direct consequence of the eosinophil productive infection by EV (Fig. 6), the inflammatory response, initiated by airway epithelial cell chemokines, may be further sustained and amplified *via* autocrine mechanisms driven by the release of eosinophil chemokines (Fig. 7). The findings presented here suggest that the pattern, absolute levels, and relative concentrations, together with the kinetics of release of epithelial cell chemokines in bronchial area, are all factors that may significantly contribute to the various histologic and inflammatory features of EV-induced airway disease. Selective production of RANTES and the several fold-higher IL-8 and MCP-1 amount released by epithelial cells of the small bronchioles, along with autocrine and paracrine mechanisms of amplification mediated by eosinophils and IFN- $\gamma$ , may largely explain the findings of mononuclear cell infiltration and eosinophil and neutrophil migration and activation in EV-induced bronchiolitis. Future studies, both in children with different forms of EV induced airway disease and in animal models, are needed to correlate the

different parameters of histopathology, inflammation, and immune response with the expression and secretion of CC and CXC chemokines in airway mucosa.

**Acknowledgments:**

This work was supported in part by the Region Champagne Ardenne (Grant n°7M04), France and by grant for Clinical and Virological research (EA-3798: DAT/PPCIDH) from the Medical University School of Medicine, Reims, France.

## References

1. **Aherne, W., T. Bird, S. D. Court, P. S. Gardner, and J. McQuillin.** 1970. Pathological changes in virus infections of the lower respiratory tract in children. *J. Clin. Pathol.* **23**:7–18.
2. **Alam, R., J. York, M. Boyers, S. Stafford, J. A. Grant, J. Lee, P. Forsythe, T. Sim, and N. Ida.** 1996. Increased MCP-1, RANTES, and MIP-1a in bronchoalveolar lavage fluid of allergic asthmatic patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **153**:1398–1404.
3. **Alam, R., S. Stafford, P. Forsythe, R. Harrison, D. Faubion, M.A. Lett-Brown, and J.A. Grant.** 1993. RANTES is a chemotactic and activating factor for human eosinophils. *J. Immunol.* **150**:3442–3447.
4. **Calhoun, W.J., E.C. Dick, L.B. Schwartz, and W.W. Busse.** 1994. A common cold virus, rhinovirus 16, potentiates airway inflammation after segmental antigen bronchoprovocation in allergic subjects. *J Clin Invest.* **94**:2200-8.
5. **Cerri, C., D. Chimenti, I. Conti, T. Neri, P. Paggiaro, and A. Celi.** 2006. Monocyte/macrophage-derived microparticles up-regulate inflammatory mediator synthesis by human airway epithelial cells. *J Immunol.* **177**:1975-80.
6. **Chomczynski, P., and N. Sacchi.** 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156
7. **Dagan, R., and M.A. Menegus.** 1986. A combination of four cell types for rapid detection of enteroviruses in clinical specimens. *J Med Virol.* **19**:219-28.
8. **Donninger, H., R. Glashoff, H.M. Haitchi, J.A. Syce, R. Ghildyal, E. van Rensburg, and P.G. Bardin.** 2003. Rhinovirus induction of the CXC chemokine epithelial-neutrophil activating peptide-78 in bronchial epithelium. *J Infect Dis.* **187**:1809-17.
9. **Downham, M.A., P.S. Gardner, J. McQuillin, and J.A. Ferris.** 1975. Role of respiratory viruses in childhood mortality. *Br. Med. J.* **1**:235–239.
10. **Edwards MR, Hewson CA, Laza-Stanca V, Lau HT, Mukaida N, Hershenson MB, Johnston SL.** 2007 . Protein kinase R, IkappaB kinase-beta and NF-kappaB are required for human rhinovirus induced pro-inflammatory cytokine production in bronchial epithelial cells. *Mol Immunol.* **44**:1587-97.
11. **Elliott, S.R., P.J. Macardle, and H. Zola.** 1998. Removal of erythroid cells from umbilical cord blood mononuclear cell preparations using magnetic beads and a monoclonal antibody against glycophorin A. *J Immunol Methods.* **217**:121-30.
12. **Ferris, J.A., W.A. Aherne, W.S. Locke, J. McQuillin, and P.S. Gardner.** 1973. Sudden and unexpected deaths to infants: histology and virology. *Br. Med. J.* **2**:439–449.
13. **Fleming, H.E., F.F. Little, D. Schnurr, P.C. Avila, H. Wong, J. Liu, S. Yagi, and H.A. Boushey.** 1999. Rhinovirus-16 colds in healthy and in asthmatic subjects: similar changes in upper and lower airways. *Am J Respir Crit Care Med.* **160**:100-8.
14. **Furukawa, E., T. Ohrui, M. Yamaya, T. Suzuki, H. Nakasato, T. Sasaki, A. Kanda, H. Yasuda, H. Nishimura, and H. Sasaki.** 2004. Human airway submucosal glands augment eosinophil chemotaxis during rhinovirus infection. *Clin Exp Allergy.* **34**:704-11.
15. **Gerard, C., and B.J. Rollins.** 2001. Chemokines and disease. *Nat Immunol.* **2**:108-15.

16. **Gerba, C.P., D.M. Gramos, and N. Nwachuku.** 2002. Comparative inactivation of enteroviruses and adenovirus 2 by UV light. *Appl Environ Microbiol.* **68**:5167-9.
17. **Glass, W.G., H.F. Rosenberg, and P.M. Murphy.** 2003. Chemokine regulation of inflammation during acute viral infection. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* **3**:467-73.
18. **Hall, C.B., W.J. Hall, C.L. Gala, F.B. MaGill, and J.P. Leddy.** 1984. Long-term prospective study in children after respiratory syncytial virus infection. *J Pediatr* **105**:358-364.
19. **Hayashi, F., T.K. Means, and A.D. Luster.** 2003. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood.* **102**:2660-9.
20. **Hober, D., W. Chehadeh, J. Weill, C. Hober, M.C. Vantghem, P. Gronnier, and P. Wattre.** 2002. Circulating and cell-bound antibodies increase coxsackievirus B4-induced production of IFN-alpha by peripheral blood mononuclear cells from patients with type 1 diabetes. *J Gen Virol.*; **83**:2169-76.
21. **Hogg, J.C., J. Williams, J.B. Richardson, P.T. Macklem, and W.M. Thurlbeck.** 1970. Age as a factor in the distribution of lower-airway conductance and in the pathologic anatomy of obstructive lung disease. *N Engl J Med.* **282**:1283-7.
22. **Inder, S.J., Y.V. Bobryshev, S.M. Cherian, R.S. Lord, K. Masuda, C. Yutani.** 2000. Accumulation of lymphocytes, dendritic cells, and granulocytes in the aortic wall affected by Takayasu's disease. *Angiology.* **51**:565-79.
23. **Jacques, J., H. Moret, D. Minette, N. Jovenin, G. Deslée, F. Lebargy, J. Motte, and L. Andreoletti.** Epidemiological, Molecular and Clinical Features of Enterovirus Respiratory Infections in French children between 1999 and 2005. *J Clin Microbiol.* doi:10.1128/JCM.01414-07
24. **Jacques, J., M. Bouscambert-Duchamp, H. Moret, J. Carquin, V. Brodard, B. Lina, J. Motte, and L. Andreoletti.** 2006. Association of respiratory picornaviruses with acute bronchiolitis in French infants. *J Clin Virol.* **35**:463-6.
25. **Jartti, T., P. Lehtinen, T. Vuorinen, R. Osterback, B. van den Hoogen, A.D. Osterhaus, and O. Ruuskanen.** 2004. Respiratory picornaviruses and respiratory syncytial virus as causative agents of acute expiratory wheezing in children. *Emerg Infect Dis.* **10**:1095-101.
26. **Kameyoshi, Y., A. Dorschner, A. I. Mallet, E. Christopher, and J. M. Schroder.** 1992. Cytokine RANTES released by thrombin-stimulated platelets is a potent attractant for human eosinophils. *J Exp Med.* **176**:587-592.
27. **Kimata, H., A. Yoshida, C. Ishioka, M. Fujimoto, I. Lindley, and K. Furusho.** 1996. RANTES and macrophage inflammatory protein 1a selectively enhance immunoglobulin (IgE) and IgG4 production by human B cells. *J Exp Med.* **183**:2397-2402.
28. **Kisch, A.L., and K.M. Johson.** 1963. A plaque assay for respiratory syncytial virus. *Proc Soc Exp Biol Med.* **112**:583-9.
29. **Kok, T.W., T. Pryor, and L. Payne.** 1998. Comparison of rhabdomyosarcoma, buffalo green monkey kidney epithelial, A549 (human lung epithelial) cells and human embryonic lung fibroblasts for isolation of enteroviruses from clinical samples. *J Clin Virol.* **24**:11:61-5.
30. **Konno, S., K.A. Grindle, W.M. Lee, M.K. Schroth, A.G. Mosser, R.A. Brockman-Schneider, W.W. Busse, and J.E. Gern.** 2002. Interferon-gamma enhances rhinovirus-induced RANTES secretion by airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **26**:594-601.

31. **Lechner, J.F., A. Haugen, I.A. McClendon, and E.W. Pettis.** 1982. Clonal growth of normal adult human bronchial epithelial cells in a serum-free medium. *In Vitro.* **18**:633-42.
32. **Letuve, S., S. Lajoie-Kadoch, S. Audusseau, M.E. Rothenberg, P.O. Fiset, M.S. Ludwig, and Q. Hamid.** 2006. IL-17E upregulates the expression of proinflammatory cytokines in lung fibroblasts. *J Allergy Clin Immunol.* **117**:590-6.
33. **Li, Y., T. Bourlet, L. Andreoletti, J.F. Mosnier, T. Peng, Y. Yang, L.C. Archard, B. Pozzetto, and H. Zhang.** 2000. Enteroviral capsid protein VP1 is present in myocardial tissues from some patients with myocarditis or dilated cardiomyopathy. *Circulation.* **101**:231-4.
34. **Lilly, C. M., H. Nakamura, H. Kesselman, C. Nagler-Anderson, K. Asano, E. A. Garcia-Zepeda, M. E. Rothenberg, J. M. Drazen, and A. D. Luster.** 1997. Expression of eotaxin by human lung epithelial cells. *J. Clin. Invest.* **99**:1767–1773.
35. **Lim, K. G., H. C. Wan, P. T. Bozza, M. B. Resnick, D. T. W. Wong, W. W. Cruikshank, H. Kornfeld, D. M. Center, and P. F. Weller.** 1996. Human eosinophils elaborate the lymphocyte chemoattractants IL-16 (lymphocyte chemoattractant factor) and RANTES. *J.Immunol.* **156**:2566–2570.
36. **Malcolm, E., E. Arruda, F.G. Hayden, and L. Kaiser.** 2001. Clinical features of patients with acute respiratory illness and rhinovirus in their bronchoalveolar lavages. *J Clin Virol.* **21**:9-16.
37. **Monto, A.S., A.M. Fendrick, M.W. Sarnes.** 2001. Respiratory illness caused by picornavirus infection: a review of clinical outcomes. *Clin Ther.* **23**:1615-27.
38. **Moqbel, R.** 1996. Eosinophil-Derived Cytokines in Allergic Inflammation and Asthma. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **796**:209–217
39. **Nelson, P. J., H. T. Kim, W. C. Manning, T. J. Goralski, and A. M. Krensky.** 1993. Genomic organization and transcriptional regulation of the RANTES chemokine gene. *J. Immunol.* **151**:2601–2612.
40. **Oberste, M.S., W.A. Nix, K. Maher, and M.A. Pallansch.** 2003. Improved molecular identification of enteroviruses by RT-PCR and amplicon sequencing. *J Clin Virol.***26**:375-377
41. **Oh, J.W., H.B. Lee, I.K. Park, and J.O. Kang.** 2002. Interleukin-6, interleukin-8, interleukin-11, and interferon- levels in nasopharyngeal aspirates from wheezing children with respiratory syncytial virus or influenza A virus infection. *Pediatr Allergy Immunol.***13**:350–356.
42. **Olszewska-Pazdrak, B., A. Casola, T. Saito, R. Alam, S.E. Crowe, F. Mei, P.L. Ogra, and R.P. Garofalo.** 1998. Cell-specific expression of RANTES, MCP-1, and MIP-1alpha by lower airway epithelial cells and eosinophils infected with respiratory syncytial virus. *J Virol.* **72**:4756-64.
43. **Papadopoulos, N.G., M. Moustaki, M. Tsolia, A. Bossios, E. Astra, A. Prezerakou, D. Gourgiotis, and D. Kafetzis.** 2002. Association of rhinovirus infection with increased disease severity in acute bronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med.***165**:1285-9.
44. **Peck, A.J., R.C. Holman, A.T. Curns, J.R. Lingappa, J.E. Cheek, R.J. Singleton, K. Carver, and L.J. Anderson.** 2005. Lower respiratory tract infections among American Indian and Alaska Native children and the general population of U.S. children. *Pediatr Infect Dis J.* **24**:342–51.
45. **Pizzichini, M.M., E. Pizzichini, A. Efthimiadis, A.J. Chauhan, S.L. Johnston, P. Hussack, J. Mahony, J. Dolovich, and F.E. Hargreave.** 1998. Asthma and

- natural colds. Inflammatory indices in induced sputum: a feasibility study. *Am J Respir Crit Care Med.* **158**:1178-84.
46. **Rakes, G.P., E. Aruda, J.M. Ingram, G.E. Hoover, J.C. Zambrano, and F.G. Hayden.** 1999. Rhinovirus and respiratory syncytial virus in wheezing children requiring emergency care. IgE and eosinophils analysis. *Am J Crit Care Med.* **159**:785–90.
  47. **Reddel, R.R., K. Yang, J.S. Rhim, D. Brash, R.T. Su, J. F. Lechner, B.I. Gerwin, C.C. Harris, and P. Amstad.** 1989. Immortalized human bronchial epithelial mesothelial cell lines. US Patent 4,885,238 dated Dec 5
  48. **Resnick, M. B., and P. F. Weller.** 1993. Mechanisms of eosinophil recruitment. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **8**:349–355.
  49. **Sanders, S.P., E.S. Siekierski, J.D. Porter, S.M. Richards, and D. Proud.** 1998. Nitric oxide inhibits rhinovirus-induced cytokine production and viral replication in a human respiratory epithelial cell line. *J Virol.* **72**:934-42.
  50. **Sanders, S.P., J. Kim, K.R. Connolly, J.D. Porter, E.S. Siekierski, and D. Proud.** 2001. Nitric oxide inhibits rhinovirus-induced granulocyte macrophage colony-stimulating factor production in bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **24**:317-25
  51. **Sigurs, N., R. Bjarnason, F. Sigurbergsson, B. Kjellman, and B. Bjorksten.** 1995. Asthma and immunoglobulin-E antibodies after respiratory syncytial virus bronchiolitis: a prospective cohort study with matched controls. *Pediatrics* **95**:500–505.
  52. **Smyth, R.L., and P.J. Openshaw.** 2006. Bronchiolitis. *Lancet.* **368**:312-22.
  53. **Sousa, A.R., S.J. Lane, J.A. Nakhosteen, T. Yoshimura, T.H. Lee, and R.N. Poston.** 1994. Increased expression of the monocyte chemoattractant protein-1 in bronchial tissue from asthmatic subjects. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **10**:142–147.
  54. **Standiford, T.J., S.L. Kunkel, M.A. Basha, S.W. Chensue, J.P.3rd Lynch, G.B. Toews, J. Westwick, and R.M. Strieter.** 1990. Interleukin-8 gene expression by pulmonary epithelial cell line: a model for cytokine networks in the lung. *J. Clin. Invest.* **86**:1945–1953.
  55. **Standiford, T.J., S.L. Kunkel, S.H. Phan, B.J. Rollins, and R.M. Strieter.** 1991. Alveolar macrophage-derived cytokines induce monocyte chemoattractant protein expression from human pulmonary type II-like epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **266**:9912–9918.
  56. **Stellato, C., L.A. Beck, G.A. Gorgone, D. Proud, T.J. Schall, S.J. Ono, L.M. Lichtenstein, R.P. Schleimer.** 1995. Expression of the chemokine RANTES by a human bronchial epithelial cell line. Modulation by cytokines and glucocorticoids. *J. Immunol.* **155**:410–418.
  57. **Taub, D.D., J.R. Ortaldo, S.M. Turcovski-Corrales, M.L. Key, D.L. Longo, and W.J. Murphy.** 1996.  $\beta$  chemokines costimulate lymphocyte cytotoxicity proliferation and lymphokine production. *J. Leukocyte Biol.* **59**: 81–89.
  58. **Taub, D.D., T.J. Sayers, C.R. Carter, and J.R. Ortaldo.** 1995.  $\alpha$  and  $\beta$  chemokines induce NK cell migration and enhance NK cell cytotoxicity. *J. Immunol.* **155**:3877–3888
  59. **Teran, L.M., M.C. Seminario, J.K. Shute, A. Papi, S.J. Compton, J.L. Low, G.J. Gleich, and S.L. Johnston.** 1999. RANTES, macrophage-inhibitory protein 1 $\beta$ , and the eosinophil product major basic protein are released into upper respiratory secretions during virus-induced asthma exacerbations in children. *J Infect Dis.***179**:677–681.



## Figure Legends :

**Figure 1.** Dynamics of SAE cells infection by wild-type respiratory EV strains

**Legend of the figure 1:** (A) One step growth curves of enterovirus in SAE cells. (B) Example of plaques formed by supernatants of SAE cells infected by Echovirus 30 in BEAS-2B stained with crystal violet dye. \*,  $P < 0.001$  for supernatant of Echovirus 30 and Coxsackievirus B5 compared with uninfected cells.

**Figure 2.** Time course of chemokine mRNA expression levels in SAE cells after EV infection.

**Legend of the figure 2:** Expression levels of chemokine mRNA were determined in SAE cells infected with Coxsackievirus B5 (A) and Echovirus 30 (B) by RT-PCR arrays with a normalization compared to the mRNA GAPDH levels using an Excel-software provided by SuperArray Bioscience Corporation (<http://www.superarray.com/pcrarraydataanalysis.php> Frederick, MD, USA). The levels of mRNA synthesized for the chemokine RANTES, MCP-1 and IL-8 by SAE cells infected with the Coxsackievirus B5 (A) and Echovirus 30 (B) appeared to be significantly higher compared to the cells controls after 24 hours of infection (\*,  $P < 0.001$ ). No significant variation levels were observed for the other chemokines during Coxsackievirus B5 (A) and Echovirus 30 (B) course of infection.

**Figure 3.** Synergistic and doses-effects of EVs and IFN- $\gamma$  on RANTES, MCP-1 and IL-8 production by SAE cells.

**Legend of the figure 3:** (A) Epithelial cells were infected with EV (Echovirus 30) at an MOI of 0.1 and treated with IFN- $\gamma$  (100 U/ml) alone or in combination with EV. RANTES, MCP-1 and IL-8 were detected in supernatants by xMAP luminex ELISA technology (Bio-Rad, Marnes la coquettes, France) after 48 h of incubation. The results are expressed as mean  $\pm$  SD of three experiments. \*,  $P < 0.001$  compared with control.

(B) SAE cells were infected with EV (Echovirus 30) at MOIs of 1, 0.5, 0.1, 0.01 and 0.001 for 48 h. In experiments designed to determine the requirement of replicating virus for RANTES induction, SAE cells were exposed to UV-inactivated EV. Data are expressed as mean  $\pm$  SD of three experiments. \*,  $P < 0.001$  for each infectious dose compared with control or with UV-inactivated EV.

**Figure 4.** Kinetics of chemokines accumulation in supernatant from EV-infected SAE cells

**Legend of the figure 4:** Epithelial cells were infected with EV (Echovirus 30 and Coxsackievirus B5) at an MOI of 0.1 or culture medium control. After indicated time of incubation, supernatants were collected for chemokines determination by xMAP luminex ELISA (Bio-Rad, Marne la coquette, France). The production of chemokines was correlated to the genomic replication activity as demonstrated by the semi quantitative EV RNA RT-PCR detection assay (EV RNA). Expression of the housekeeping gene encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is shown for comparison to demonstrate relative equal loading of the RT-PCR mixtures for all samples. Empty squares correspond to the chemokines accumulation in supernatant from Echovirus 30-infected SAE cells; empty circles indicate the chemokines accumulation in supernatant from Coxsackievirus B5-infected SAE cells and empty diamonds represent the culture medium control. The results are expressed as mean  $\pm$  SD of three experiments. \*,  $P < 0.001$  compared with control. +,  $P < 0.05$  compared with control.

**Figure 5.** Biological activity of RANTES released by EV-infected SAE cells.

**Legend of the figure 5:** Eosinophil chemotaxis was determined in the presence of supernatant from EV-infected cells (EV-CM) or from uninfected cells. Neutralizing experiments were performed in the presence of specific anti-RANTES MAb. PAF ( $10^{-7}$  M) was used as a positive control. Results are expressed as mean  $\pm$  SD of three determinations for each set of experiments. \*,  $P < 0.001$  for EV-CM (Echovirus 30 and Coxsackievirus B5) and PAF compared with Uninfected cells; \*\*,  $P < 0.001$  for EV-CM plus anti-RANTES compared with EV-CM.

**Figure 6.** Human eosinophil infection by respiratory enteroviruses.

**Legend of the figure 6:** (A) Eosinophils were cultured with control medium or infected with EV (Echovirus 30) for 24 h. Cytospin preparations of eosinophils were stained with VP1 MAb in red or with CD15 MAb in blue; double immunostaining VP1/CD15 (VP1 MAb in red and CD15 MAb in blue) assays showed a blue perimembranar and a red intracytoplasmic staining in Echovirus 30 infected cells at 24 h after infection. In preparations of eosinophils that were exposed to EV for 24 h, a typical intracytoplasmic granular VP1 immunoreactivity was observed. (B) One step growth curves of enterovirus in human purified eosinophil infected by a respiratory Echovirus 30 strain; the release of infectious particles was

detected by plaque assay in BEAS-2B and the production of infectious viruses was correlated to the genomic replication activity as demonstrated by the semi quantitative EV RNA RT-PCR detection assay (EV RNA). Expression of the housekeeping gene encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is shown for comparison to demonstrate relative equal loading of the RT-PCR mixtures for all samples. \*,  $P < 0.001$  compared with control.

**Figure 7.** RANTES and MCP-1 production by human purified eosinophils infected by a respiratory EV strain.

**Legend of the figure 7:** Eosinophils were infected with EV (Echovirus 30) at an MOI of 1 (Eosinophil + EV) or incubated with culture medium (Eosinophil mock-infected). After 16 h, the supernatants were collected for RANTES and MCP-1 determination by ELISA. For the measurement of total content of RANTES and MCP-1, eosinophils were lysed by Triton X-100 (Eosinophil lysed). The results are expressed as mean  $\pm$  SD of three experiments using eosinophil preparations from different donors. \*,  $P < 0.001$  compared with eosinophils cultured with medium or lysed by Triton X-100.

Figure 1

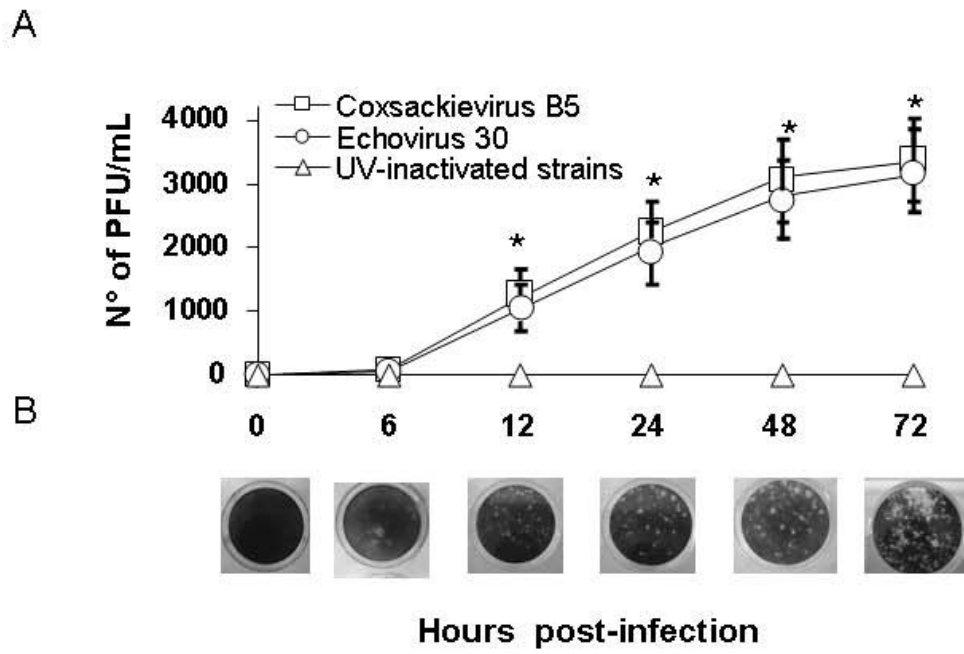
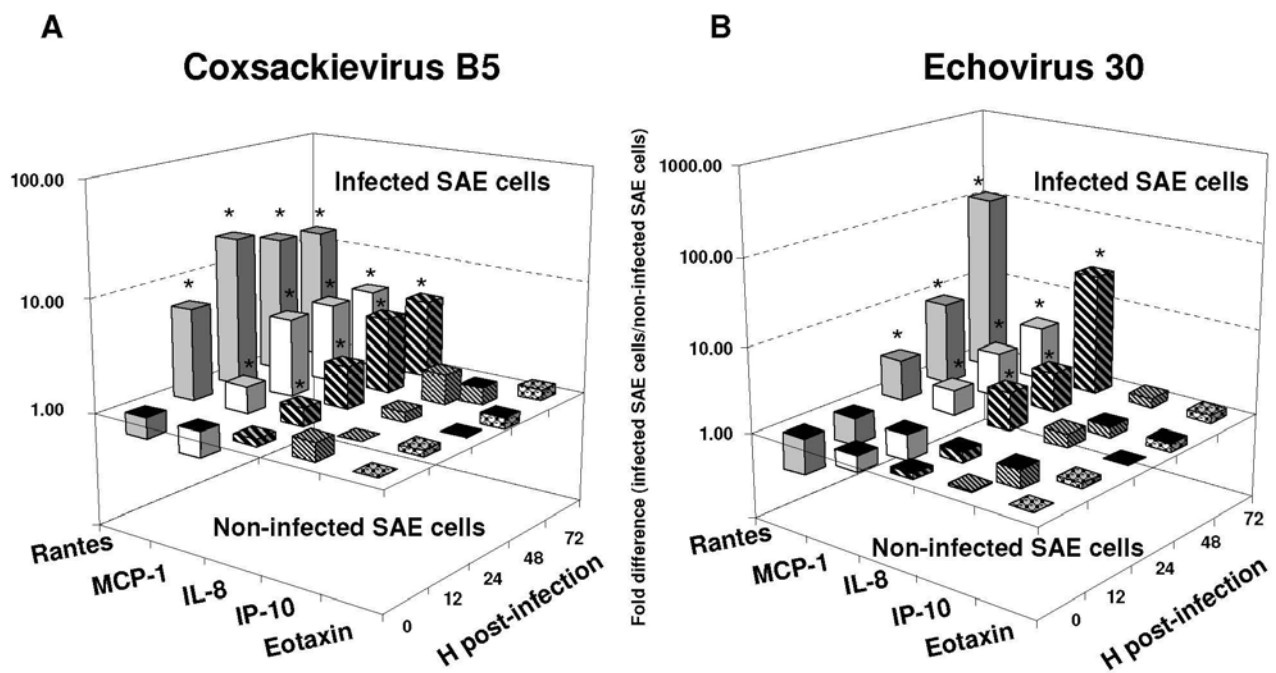


Figure 2



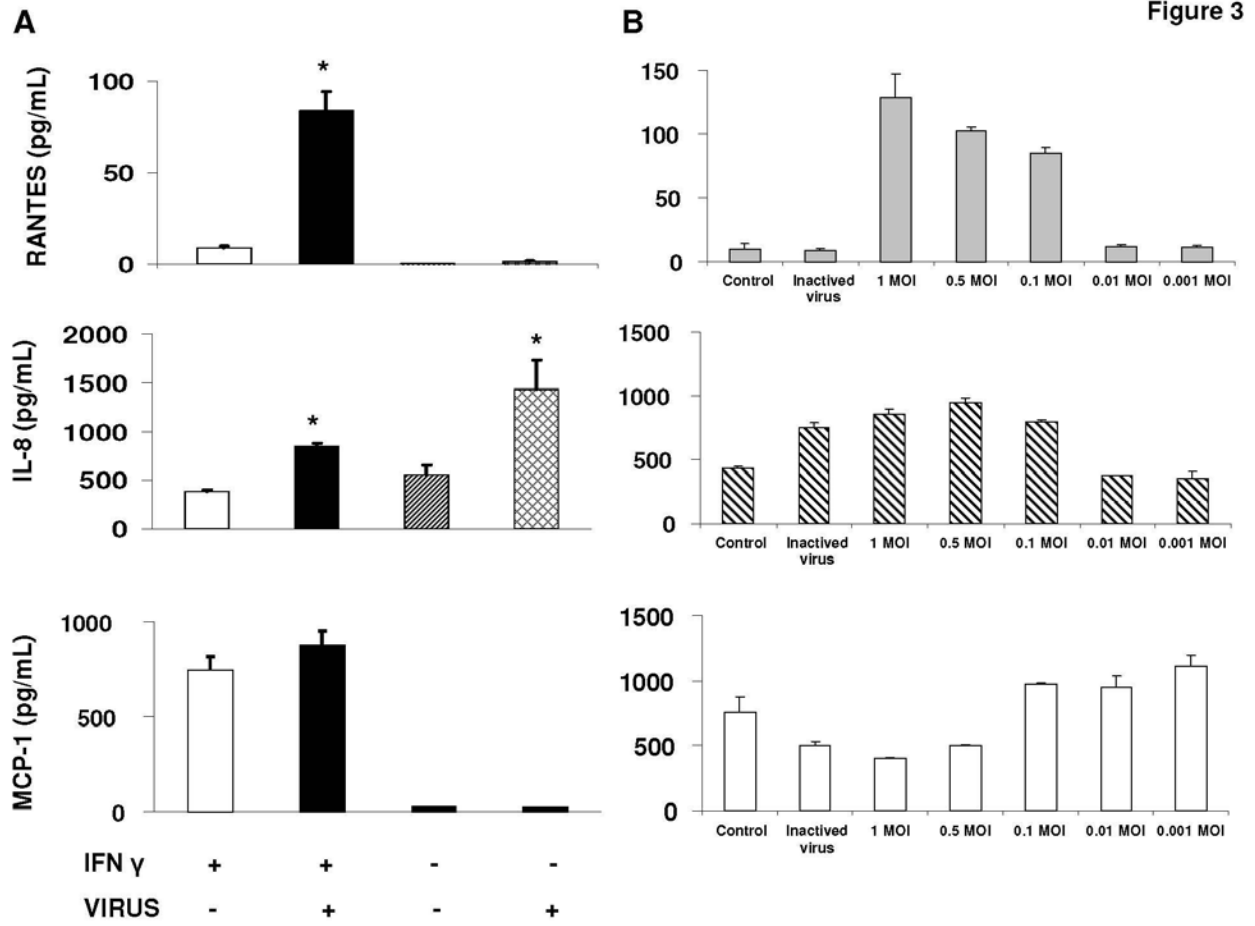


Figure 4

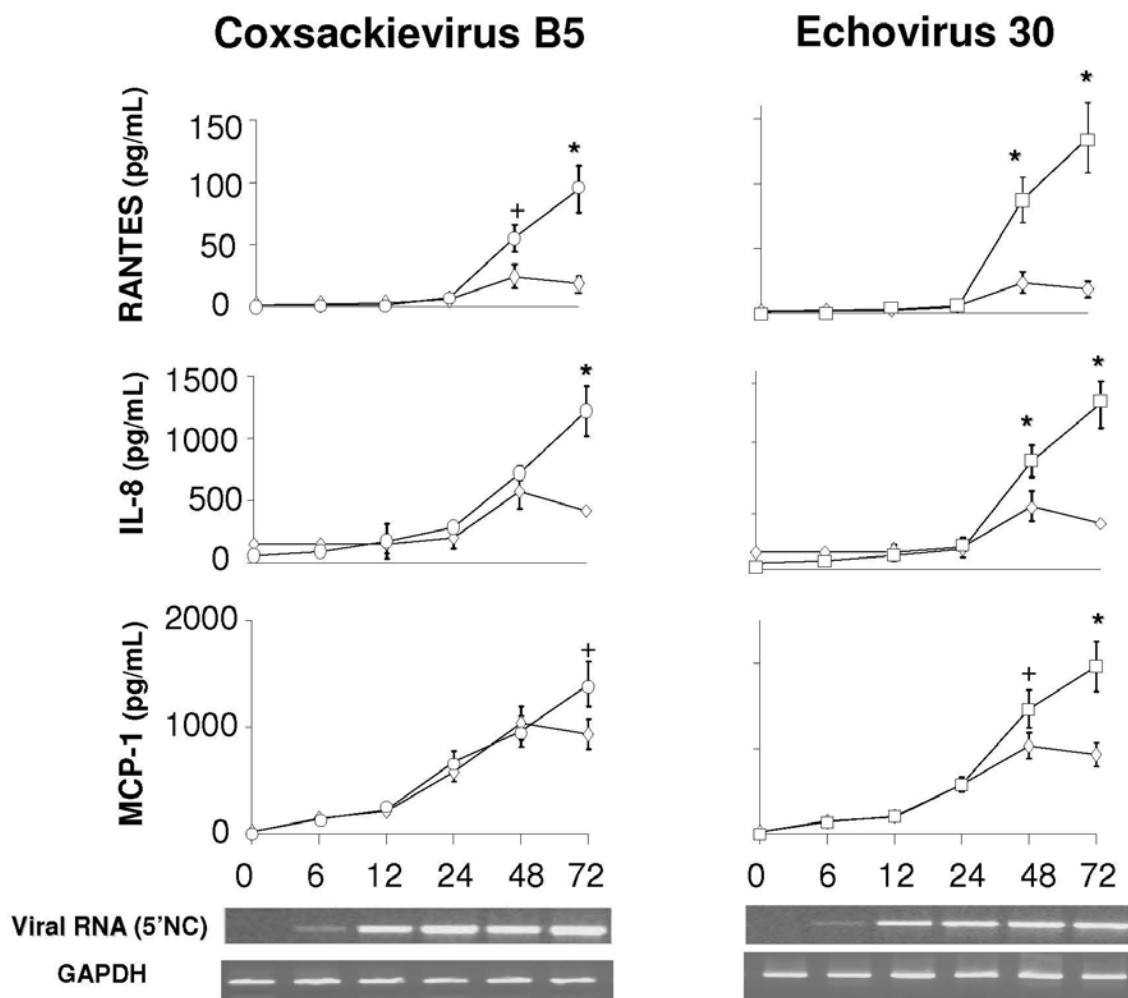


Figure 5

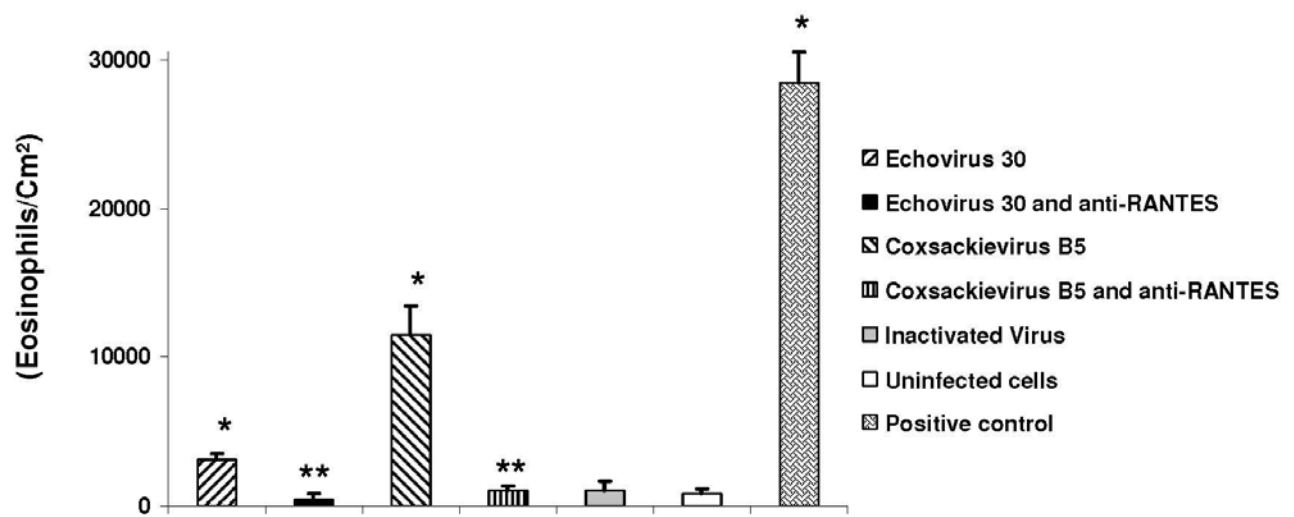
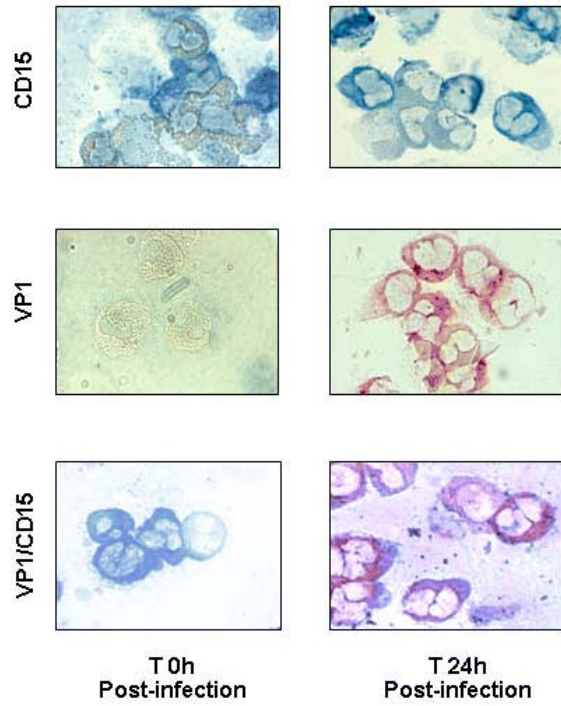




Figure 6

A



B

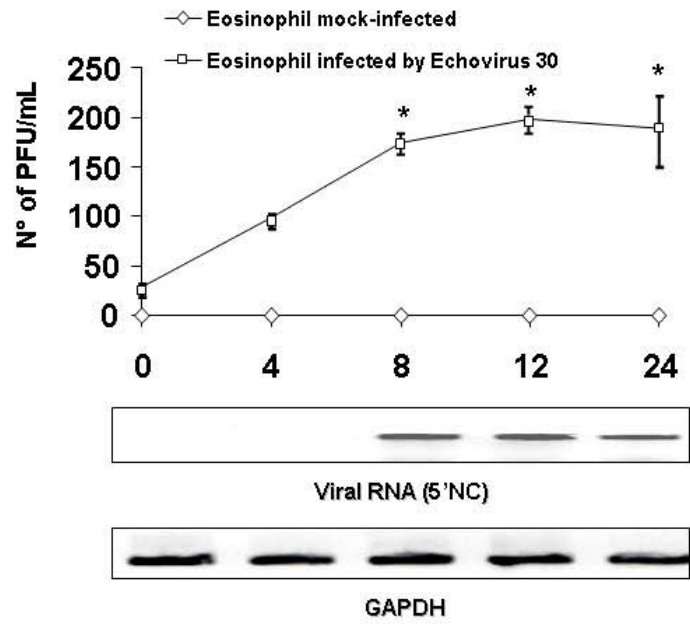
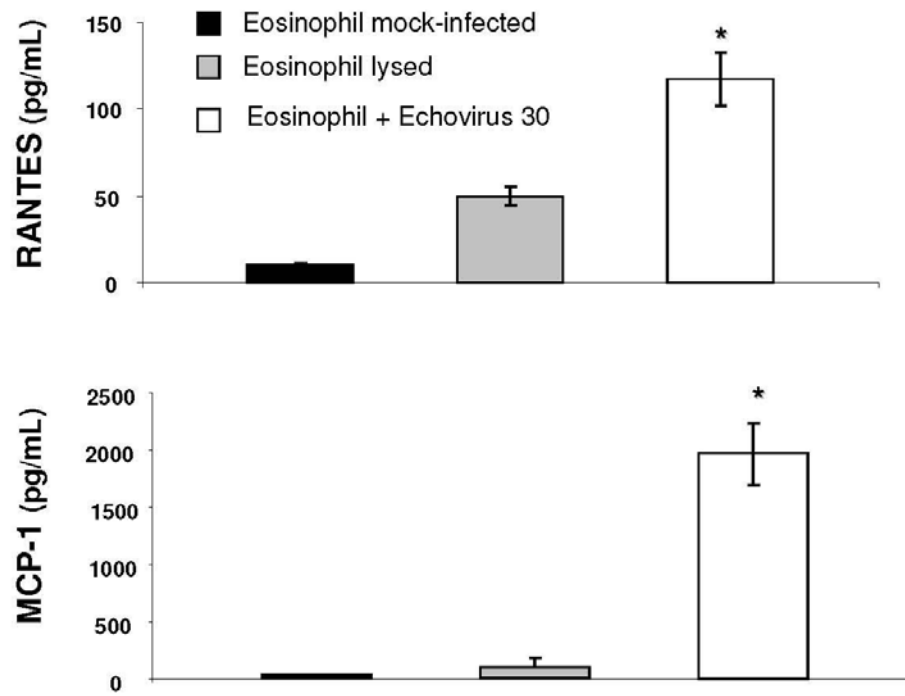


Figure 7



*DISCUSSION GENERALE*

## I) RÔLE DES ENTÉROVIRUS DANS LA BRONCHIOLITE DU NOURRISSON

Les rhinovirus et les entérovirus humains (*Picornaviridae*) ont été détectés dans le tractus respiratoire d'enfants souffrant de pathologies respiratoires hautes et basses. Ils sont considérés actuellement comme des agents étiologiques de la bronchiolite du nourrisson (Freymuth *et al.*, 1999; Pallansh & Roos, 2001; Couch, 2001; Papadopoulos *et al.*, 2002; Jartti *et al.*, 2004). Seules des études rétrospectives analysant des prélèvements respiratoires de nourrissons souffrant de bronchiolite ou d'asthme infantile ont évalué la présence de ces deux genres de picornavirus (entérovirus et rhinovirus humains) (Rakes *et al.*, 1999, Andréoletti *et al.*, 2000; Papadopoulos *et al.*, 2002, Jartti *et al.* 2004). Au cours de ces études, les rhinovirus et entérovirus humains ont été identifiés par RT-PCR soit seul ou en association avec le VRS ou à d'autres virus respiratoires communs. Ces virus pourraient donc jouer un rôle d'agent étiologique ou de cofacteur dans le développement de la bronchiolite infantile. Notre première étude avait pour objectif de préciser l'importance épidémiologique du rôle étiologique des infections respiratoires à picornavirus, chez des enfants hospitalisés en pédiatrie et souffrant de bronchiolite (Jacques *et al.*, 2006).

En utilisant une RT-PCR associée à une technique d'hybridation nous avons détectés de manière différentielle les ARN génomique des rhinovirus et des entérovirus dans les aspirations naso-pharyngées de 192 nourrissons hospitalisés pour bronchiolite aiguë. Tous les échantillons avaient été également testés par des techniques classiques de virologie afin de détecter la présence éventuelle des virus respiratoires communs (Virus Respiratoire Syncytial, virus Parainfluenza, virus Influenza A & B et Adénovirus) ainsi que le métapneumovirus humain (MPVh). L'association des techniques classiques de virologie à des tests de biologie moléculaire nous a permis de préciser la prévalence des infections respiratoires par les picornavirus, et de déterminer la fréquence des cas de co-infections virales (picornavirus associés à d'autres virus) dans la bronchiolite infantile. En France, seule une étude portant sur une cohorte de 84 enfants âgés de 1 mois à 14 ans et hospitalisés pour une bronchiolite aiguë au CHU de Lille en 1999-2000, avait révélé la présence de 10 cas (12 %) d'infections respiratoires à rhinovirus et 8 cas (9.5 %) à entérovirus (Andréoletti *et al.*, 2000). Notre prévalence de détection des rhinovirus (21%) est proche de celles publiées par différentes études, qui ont montré des infections respiratoires par ces virus chez 18 à 29 % d'enfants souffrant de bronchiolite (Freymuth *et al.*, 1999 ; Papadopoulos *et al.*, 2002 ; Jartti *et al.*, 2004). Par ailleurs, les taux d'infections respiratoires à entérovirus détectés lors de notre étude sont conformes à ceux rapportés dans deux précédentes études françaises (Freymuth *et*

*al.*, 1999 ; Andréoletti *et al.*, 2000), mais sont inférieurs à ceux rapportés par Jartti et coll. en 2004 qui ont décrit une détection positive pour les entérovirus de 25 % chez les enfants de 1 à 14 ans hospitalisés pour bronchiolite ou asthme infantile. Ces différentes études ont utilisées sur l'utilisation de techniques moléculaires et elles ont démontré que 19 à 22 % des patients présentant une bronchiolite étaient porteurs de plusieurs agents viraux au niveau de leur tractus respiratoire (Andréoletti *et al.*, 2000 ; Papadopoulos *et al.*, 2002 ; Jartti *et al.*, 2004).

Nous avons identifié les rhinovirus ou les entérovirus comme unique agent pathogène dans respectivement 21 et 9 % des 192 enfants en bas âge souffrant d'une bronchiolite, étayant ainsi l'hypothèse du rôle étiologique potentiel des picornavirus dans une proportion non négligeable de patients hospitalisés. Cependant au cours de notre étude nous n'avons pas recherché les cas d'infections par les virus Parainfluenza 4a et 4b, ainsi que par les coronavirus OC43, 229E, NL64 et HKU1 qui pourraient être impliqués dans des cas de mono ou co-infections dans les prélèvements respiratoires étudiés. Toutefois, ces différents virus respiratoires sont actuellement considérés comme agents étiologiques mineurs de bronchiolite infantile (Theamboonlers *et al.*, 2007 ; Vabert *et al.*, 2007 ; Kaplan *et al.*, 2008). De plus, aucun groupe de patients contrôle appariés sur l'âge, le sexe, le mois d'hospitalisation et exempts de toute infection ou pathologie respiratoire n'avait été sélectionné et testé dans notre étude. La prévalence exacte des infections respiratoires à picornavirus comme cause potentielle de bronchiolite reste donc à évaluer dans des études prospectives utilisant des techniques de PCR en temps réel, et qui autoriseront ainsi la détection de tous les virus respiratoires pathogènes chez des enfants immunocompétents lors des premiers stades des symptômes respiratoires ainsi que chez des enfants asymptomatiques (Lam *et al.*, 2007). Par ailleurs lors de notre étude transversale certaines infections à picornavirus détectées par notre technique moléculaire pourraient ne pas être associées au développement de l'épisode symptomatique de la bronchiolite, mais être liées à un portage viral asymptomatique (infection de type persistante) ou à une infection respiratoire symptomatique passée ou à venir (Nokso-Koivisto *et al.*, 2002). Par conséquent, la prévalence exacte des infections respiratoires par les entérovirus responsable de cas de bronchiolite infantile reste à évaluer dans de futures études longitudinales prospectives qui détermineront les niveaux d'ARN génomiques de picornavirus.

Au cours de notre étude, les cas de co-infections virales ont été détectés dans 40 (21 %) des 192 aspirations naso-pharyngées d'enfants souffrant d'une bronchiolite aiguë. Ces co-

infections impliquaient les rhinovirus dans 90 % des cas (36). Les plus fréquentes associations rapportées étaient celles-ci : rhinovirus et VRS ; ou rhinovirus et entérovirus. Ces résultats suggèrent que les picornavirus humains pourraient également jouer un rôle comme cofacteurs pathogénique dans la bronchiolite de l'enfant (Papadopoulos *et al.*, 2002 ; Rawlinson *et al.*, 2003). Lors de ces cas d'infections multiples, les picornavirus pourraient servir de co-facteurs viraux dans le déclenchement de la bronchiolite. Par conséquent, les virus à tropisme respiratoire détectés lors d'infections asymptomatiques pourraient accroître le risque d'apparition de la bronchiolite chez les enfants. De futures études cliniques longitudinales comprenant l'analyse des virus pathogènes à tropisme respiratoire par des techniques de RT-PCR quantitative chez des sujets symptomatiques et asymptomatiques, seront nécessaires pour déterminer les conséquences physiopathologiques et cliniques des co-infections dans la bronchiolite infantile. Ces futures études clinico-virologiques analysant la sévérité de la maladie et la fréquence des co-infections, permettront ainsi d'explorer l'hypothèse du rôle des picornavirus humains comme co-facteurs d'aggravation de la symptomatologie respiratoire en pédiatrie. Ces questions restent essentielles sous l'angle des mécanismes physiopathologiques des bronchiolites à répétition, d'induction d'hyperréactivité bronchique et d'asthme infantile.

En conclusion, cette première étude clinico-virologique suggère que les picornavirus respiratoires pourrait être un agent étiologique majeur de la bronchiolite chez l'enfant de moins de 26 mois (médiane 9 mois ; range 1-26 mois). Ces résultats indiquent la nécessité de développer de nouvelles techniques moléculaires de diagnostic rapide des infections respiratoires à picornavirus en virologie médicale. Ces nouvelles approches de diagnostic permettront le développement de nouvelles molécules anti-picornavirus, ainsi que la mise en place de protocoles spécifiques visant à diminuer les risques de transmission nosocomiale dans les services hospitaliers de pédiatrie.

## II) ÉTUDE ÉPIDÉMIOLOGIQUE ET CLINIQUE DES INFECTIONS RESPIRATOIRES À ENTÉROVIRUS

Les entérovirus (Picornaviridae) sont des agents viraux très communs et ubiquitaires en pathologie humaine (Chonmaitree & Mann, 1995 ; Mackie, 2003 ; Khetsuriani *et al.*, 2006). Les différents sérotypes d'entérovirus ont un schéma de circulation temporel différent et peuvent être associés à certaines manifestations cliniques (Strikas *et al.*, 1986 ; Khetsuriani & Parashar, 2003). Bien que la majorité des infections humaines à entérovirus restent asymptomatiques, ces virus sont associés à des syndromes cliniques variés tels que des pathologies mineures mais également sévères incluant des méningites, encéphalites, myocardites, des paralysies flasques aiguës ainsi que des septicémies néonatales sévères (Khetsuriani & Parashar, 2003). En outre, les entérovirus peuvent induire des pathologies respiratoires non spécifiques chez les enfants ou les adultes, telles que des infections des voies aériennes supérieures et inférieures de type bronchiolite, bronchites (Smyth & Openshaw, 2006) et pneumonies (Chonmaitree & Mann, 1995). Différents sérotypes d'entérovirus incluant les entérovirus 68 et 71, les Coxsackievirus A9, A21, B2 et B4 et les Echovirus 9, et 11, ont été isolés dans des échantillons naso-pharyngés, des aspirations trachéales, des lavages broncho-alvéolaires ou des biopsies pulmonaires par des techniques de culture cellulaire et identifiés comme étant la cause virale de broncho-pneumonies graves, voire mortelles (Cheeseman *et al.*, 1977 ; Porres *et al.*, 1985 ; Barson & Reiner, 1986 ; Birenbaum *et al.*, 1997 ; Chang *et al.*, 1999 ; Schiff *et al.*, 2000 ; Oberste *et al.*, 2004). Récemment, Legay et coll. ont décrit un cas de pneumonie mortelle à coxsackievirus A16 chez un adulte immunocompétent âgé de 77 ans, infecté par son petit fils qui avait développé un syndrome pied-main-bouche sans complications cliniques (Legay *et al.*, 2007).

Notre compréhension de l'épidémiologie et du profil clinique des infections respiratoires à entérovirus en pédiatrie était limitée à des données sur la prévalence et à l'importance épidémiologique de l'infection respiratoire à entérovirus comme cause de bronchiolite dans les cohortes d'enfants hospitalisés (Andréoletti *et al.*, 2000 ; Jartti *et al.*, 2004 ; Papadopoulos *et al.*, 2002 ; Porres *et al.*, 1985). Lors de ces précédentes études, aucune identification par sérotypage, ni analyse phylogénétique comparative des souches d'entérovirus à tropisme respiratoires n'avait été réalisée. Actuellement, l'approche moléculaire autorise une caractérisation rapide et fiable ainsi qu'une comparaison

phylogénétique des souches d'entérovirus par amplification et séquençage partiel du gène codant pour la protéine de capsid VP1 (Oberste et al., 2003).

Dans ce travail, nous avons analysé de manière rétrospective l'épidémiologie et les caractéristiques cliniques des infections respiratoires au cours desquelles un entérovirus avait été identifié comme agent étiologique d'une pathologie pédiatrique ; Cette analyse rétrospective a été menée dans une cohorte d'enfants hospitalisés ou non dans la région Champagne Ardenne (France) entre 1999 et 2005. Tous les enfants qui se présentaient aux urgences pédiatriques avaient été prélevés au niveau respiratoire et ceci quelque soit leurs signes cliniques. Nous avons ensuite sélectionné les cas où seul un entérovirus avait été isolé, et typé en culture cellulaire, et identifié comme la cause étiologique de la pathologie diagnostiquée. Les cas de co-infections virales ainsi que les cas où l'entérovirus n'était pas typable ont été exclus. En utilisant l'amplification et le séquençage partiel du gène codant la protéine de capsid VP1, nous avons réalisé une analyse phylogénétique comparative des souches d'entérovirus isolées dans des échantillons naso-pharyngés d'enfants présentant des symptômes respiratoires liés à une infection à entérovirus. Cette étude nous a permis d'évaluer l'importance épidémiologique et clinique des pathologies respiratoires liées à une infection à ce virus dans une population du Nord de la France. Ces résultats confirment que les entérovirus sont des pathogènes respiratoires avec un mode de circulation de type épidémique et que ces souches d'entérovirus peuvent contribuer au développement d'infections des voies respiratoires basses vues aux urgences pédiatriques (17% des enfants ayant des infections à entérovirus) induisant une hospitalisation dans 62% de ces cas. En utilisant la culture cellulaire et séroneutralisation, nous avons ainsi pu démontrer le pouvoir infectieux des souches d'entérovirus détectées dans le naso-pharynx des enfants au moment du diagnostic clinique (Freythuth *et al.*, 1999 ; Jacques *et al.*, 2006). Il est évident que le nombre global d'infections respiratoires à entérovirus détecté aurait pu être considérablement supérieur en utilisant une technique de RT-PCR. En effet la sensibilité des techniques moléculaires permet l'identification des infections à picornavirus asymptomatiques, passées ou à venir (Nokso-Koivisto *et al.*, 2002). Il est intéressant de constater qu'aucun sérotype d'entérovirus (identification par les pools de Melnick et séquençage VP1) n'est apparu comme significativement associé à une manifestation clinique respiratoire particulière.

Notre étude rétrospective a permis de déterminer que parmi les enfants immunocompétents âgés de moins de 15 ans, les maladies respiratoires sont la deuxième pathologie la plus fréquente induite par les entérovirus, après la méningite à liquide clair



(Jacques et al. 2008). La bronchiolite a été le syndrome respiratoire le plus souvent induit par un entérovirus (43% des 79 cas) et la comparaison entre les groupes d'âges montre que cette pathologie est plus fréquente chez les enfants âgés de 1 à 12 mois. Des études récentes publiées dans notre laboratoire (Jacques *et al.*, 2006 ; Andréoletti *et al.*, 2000) ainsi que par d'autres équipes (Jartti *et al.*, 2004) ont montré que les picornavirus et plus spécifiquement les entérovirus sont identifiés comme étant la troisième cause étiologique de la bronchiolite chez les enfants hospitalisés, avec une prévalence comprise entre 9 et 25 %. Dans ces publications la bronchiolite induite par les entérovirus semble être plus fréquemment détectée chez les enfants âgés de 6 mois à 2 ans (Andréoletti *et al.*, 2000 ; Jartti *et al.*, 2004 ; Jacques *et al.*, 2006). Les résultats de notre étude sont en accord avec ces différentes études et supportent l'hypothèse du rôle majeur des entérovirus à tropisme respiratoire comme cause étiologique de la bronchiolite chez les enfants âgés de moins de 12 mois. Néanmoins, la prévalence exacte de l'infection respiratoire à entérovirus comme cause de bronchiolite reste à évaluer dans d'autres études prospectives longitudinales au cours desquelles la présence de tous les virus pathogènes respiratoires humains pourrait être détectée par biologie moléculaire quantitative avant et après le développement des symptômes respiratoires.

Nos résultats indiquent que les pathologies respiratoires liées à un entérovirus sont diagnostiquées principalement durant la période de février à décembre, englobant une partie de la période d'épidémie pour les infections respiratoires virales chez les enfants en France (Freythuth *et al.*, 1999 ; Jacques *et al.*, 2006). Ces données suggèrent l'éventualité de pathologies respiratoires associant une infection à entérovirus à d'autres viroses respiratoires saisonnières (Andréoletti *et al.*, 2000 ; Jartti *et al.*, 2004). Au cours de notre étude, 31 cas sur 285 (13%) ont été identifiés comme infections virales multiples, associant l'isolation d'un entérovirus et d'un VRS ou d'un rhinovirus. Cette détection des infections respiratoires multiples ainsi que des agents pathogènes respiratoires communs pourrait être considérablement améliorée par l'utilisation de RT-PCR ou de PCR en temps réel. Ces techniques moléculaires sont connues pour augmenter la sensibilité de la détection des virus et des bactéries communs et pour permettre la détection des virus non cultivables ou de nouveaux virus respiratoires tels que les coronavirus humains, les métapneumovirus et les bocavirus (Arden *et al.*, 2006 ; Choi *et al.*, 2006).

Nous avons observés que les souches d'entérovirus respiratoires sont caractérisées par d'importantes fluctuations dans leur niveau de circulation (Khetsuriani et al., 2006 ; Jacques et al., 2008). Les taux annuels d'infections respiratoires à entérovirus observés ont été

significativement diminués au cours des années 2000 et 2005 ; ce phénomène a été concomitant de l'émergence respective des echovirus 13 et 30, responsables d'épidémie de méningites aseptiques (Communicable Disease Surveillance Centre, 2000 ; Bernit *et al.*, 2004). Nos résultats suggèrent que les taux annuels des infections respiratoires à entérovirus seraient modulés par l'émergence de souches à forts potentiels neurotropes et responsables d'épidémies de méningite aseptique.

Dans cette seconde étude, la comparaison phylogénétique d'une partie du gène codant la protéine de capsid VPI a confirmé l'identification des sérotypes obtenus par micro-séroneutralisation et nous a permis d'identifier des tendances temporelles pour la circulation des sérotypes d'entérovirus respiratoires. Cette approche a démontré la circulation phylogénétique concomitante ou successive d'espèces, sérotypes ou sous-groupes distincts d'entérovirus durant le même mois ou la même période épidémique annuelle. L'ensemble de ces résultats indique la possibilité d'infections répétées ou successives de souches distinctes d'entérovirus à tropisme respiratoire, au cours de la même période ou d'une même épidémie annuelle. En outre, ces observations suggèrent également la possibilité de recombinaisons génétiques au sein des espèces A ou B d'entérovirus (recombinaisons intra sérotypique) circulant dans une même zone géographique et infectant les nourrissons (Lukashev *et al.*, 2005 ; Simmonds & Welch, 2006).

Nos données ont montré que, sous l'angle clinique, les pathologies respiratoires induites par les entérovirus ne peuvent être distinguées de celles induites par les rhinovirus ou la grippe (Bourgeois *et al.*, 2006a ; Bourgeois *et al.*, 2006b). Toutefois, les maladies respiratoires à entérovirus pourraient s'avérer moins sévères car nous n'avons pas observé de cas de pneumonies, ni de cas d'admissions en unité de soins intensifs ainsi qu'un très faible taux de mortalité au cours de la période étudiée. Les infections respiratoires à entérovirus sont néanmoins associées à un séjour à l'hôpital de 3,5 jours en moyenne responsable d'un nombre d'hospitalisation non négligable (n=50). De plus, 20% des infections respiratoires à entérovirus ont conduit à une hospitalisation avec un risque de transmission nosocomiale des ces agents infectieux à d'autres patients, et d'infections par d'autres agents bactériens ou viraux (Freythuth *et al.*, 1999 ; Andréoletti *et al.*, 2000 ; Jarttiet *et al.*, 2004, Jacques *et al.*, 2006 ; Antona *et al.*, 2007). Enfin, aucune autre pathologie sous-jacente n'a été recensée chez les enfants présentant un syndrome respiratoire induit par un entérovirus.

Nos données indiquent que les entérovirus sont des agents étiologiques potentiellement importants chez l'enfant responsables d'infections des voies respiratoires inférieures. Ils peuvent être isolés du nasopharynx d'enfants présentant des symptômes respiratoires de bronchiolite. A l'instar des rhinovirus humains, les entérovirus peuvent également être isolés par des systèmes de culture cellulaire ou détectés par RT-PCR dans le naso-pharynx d'enfants sans symptômes respiratoires (Nokso-Koivisto *et al.*, 2002). Par conséquent, il serait essentiel d'évaluer la charge virale des entérovirus par RT-PCR quantitative en temps réel dans des échantillons naso-pharyngés d'enfants, avec ou sans symptômes respiratoires. Ainsi, il serait peut-être possible de déterminer un seuil clinique de charge virale pour les picornavirus dans les échantillons naso-pharyngés de nourrissons présentant une pathologie respiratoire. En outre, l'utilisation de ces systèmes quantitatifs de détection des entérovirus permettrait d'améliorer le suivi des nourrissons et des patients adultes atteints de pathologies respiratoires à entérovirus, et ceci en réduisant les investigations diagnostiques et les thérapeutiques inutiles ainsi qu'en prévenant la survenue de potentielles infections nosocomiales respiratoires au cours des hospitalisations.

Concernant le géotypage, la technique la plus répandue est basée sur le séquençage de la région codant la protéine de capsid VP1. La grande majorité des équipes a développé des approches d'identification basées sur cette région, car elle contient un grand nombre de sites antigéniques ayant servi à la mise en place de la classification initiale, basée sur le caractère phénotypique des entérovirus (Racaniello, 2007). Néanmoins, des études très récentes ont montré qu'il était possible d'identifier les différents sérotypes d'entérovirus via la région codant la protéine de capsid VP2 et permettrait également d'identifier des recombinaisons inter sérotypiques dans la région VP3-VP1 au sein de l'espèce B (Nasri *et al.*, 2007). Les résultats obtenus sont comparables à ceux obtenus avec les approches de séquençage d'une partie de la région VP1 (Nasri *et al.*, 2007). Par ailleurs, au vue des phénomènes de recombinaisons décrits au sein des entérovirus (Lukashev *et al.*, 2005), une approche basée sur un séquençage de la région codant la protéine de capsid VP1 des entérovirus, associée à une analyse nucléotidique de la région codant l'ARN polymérase-ARN dépendante (3Dpol), permettrait alors d'identifier le sérotype d'entérovirus tout en identifiant la possibilité de recombinaisons génétiques entre la région capsidale et la région non capsidale chez les souches virales.

Actuellement, le développement des outils de diagnostic moléculaire des entérovirus s'oriente vers une automatisation de l'ensemble des étapes, de l'extraction à la révélation de l'amplification moléculaire par hybridation. Cette automatisation passe par l'utilisation

d'extracteurs automatiques d'acides nucléiques couplés à des automates de PCR. La dernière évolution en date allant dans ce sens est le GeneXpert® qui permet, grâce à un seul appareil et à une cartouche contenant tout les réactifs, de réaliser l'extraction et la détection des entérovirus (Seme *et al.*, 2008). De plus, des systèmes de « biopuces » sont à envisager pour la détection, la quantification et génotypage des entérovirus humains. Ces techniques moléculaires permettront de mieux caractériser les infections respiratoires actives à entérovirus responsables de pathologies aiguës. Ces nouvelles approches amélioreront la prise en charge thérapeutique des patients, et la prévention du risque d'infection nosocomiale conduisant ainsi à une diminution des coûts des soins hospitaliers liés aux infections respiratoires à entérovirus.

En conclusion de cette seconde partie, nous avons pu préciser que les maladies respiratoires liées aux entérovirus étaient des pathologies très fréquentes et qu'elles notament chez les nourrissons âgés de 1-12 mois. La circulation successive ou concomitante de souches génétiquement distinctes d'entérovirus indique la possibilité d'infections respiratoires répétées en pédiatrie au cours d'une même saison épidémique, suggérant ainsi la possibilité d'une recombinaison génétique intra et inter sérotypique au sein des espèces d'entérovirus A ou B. La poursuite du développement des techniques de RT-PCR quantitatives en temps réel associées à un génotypage permettra d'effectuer un diagnostic étiologique rapide des infections respiratoires à entérovirus. Cette approche permettrait de prévenir les risques de transmissions nosocomiales de ces virus dans les départements de pédiatrie et autorisera le contrôle épidémiologique de l'apparition de nouvelles souches d'entérovirus respiratoires.

### III) INFECTION EXPÉRIMENTALE DES CELLULES BRONCHIQUES HUMAINES PAR LES ENTÉROVIRUS.

Aux États-Unis et en Europe, les taux d'admissions des cas de bronchiolites infantiles ont sensiblement augmenté au cours de ces dernières années et ils sont maintenant estimés autour de 30 pour 1000 chez les enfants de 1 an (Smyth & Openshaw, 2006). Des études cliniques et épidémiologiques montrent une corrélation entre la bronchiolite chez le nourrisson et l'apparition de l'asthme infantile (Hall *et al.*, 1984 ; Sigurs *et al.*, 1995 ; Jacques *et al.*, 2006). La bronchiolite et l'asthme sont liés par des caractéristiques histopathologiques communes caractérisées par une inflammation profonde de la muqueuse des voies respiratoires. Une des caractéristiques de la bronchiolite viro-induite est la nécrose de l'épithélium bronchique associée à une infiltration péribronchique et périvasculaire de cellules mononuclées (Aherne *et al.*, 1970 ; Ferris *et al.*, 1973 ; Downham *et al.*, 1975). L'augmentation du nombre de lymphocytes, de polynucléaires neutrophiles et éosinophiles médiateurs de l'inflammation dans des échantillons nasaux ou bronchiques de patients atteints d'infections aiguës à rhinovirus, par comparaison à des sujets sans pathologie connue, suggère que les infections à picornavirus déclenchent la migration de ces cellules vers les voies respiratoires et l'activation locale de certaines cellules inflammatoires (Calhoun *et al.*, 1994 ; Pizzichini *et al.*, 1998 ; Flemming *et al.*, 1999 ; Teran *et al.*, 1999 ; Van Bentem *et al.*, 2001 ; Malcolm *et al.*, 2001 ; Monto *et al.*, 2001 ; Oh *et al.*, 2002 ; Glass *et al.*, 2003).

Au site tissulaire de l'inflammation la majorité de la réponse cellulaire est contrôlée par des gradients de facteurs chimiotactiques induisant la migration trans-endothéliale et la circulation à travers la matrice extracellulaire de leucocytes (Gerard & Rollins, 2001). La qualité de cette réponse cellulaire dépend de la cellule cible et des molécules chimiotactiques. Les chimiokines vont réguler la migration et l'activation des globules blancs du sang et par conséquent jouer un rôle clef dans les processus inflammatoires et infectieux du poumon. Les membres de la famille des chemokines CC tels que RANTES ont une activité comme facteurs chimiotactiques et sont activatrice pour les éosinophiles ; les chemokines CXC telles que l'IL-8 sont d'importants chémo-attractants des polynucléaires neutrophiles et possèdent une activité chimiotactique pour les éosinophiles (Gerard & Rollins, 2001). Parmi les autres fonctions potentiellement importantes de RANTES et de MCP-1 dans l'allergie et l'inflammation viro-induite on retrouve leur capacité à stimuler la production d'IgE de surface ou d'IgG4 par les cellules B (Kimata *et al.*, 1996) et à induire la dégranulation des cellules

Natural Killer et des cellules T cytotoxiques (Taub *et al.*, 1995 ; Taub *et al.*, 1996). Ces chimiokines sont présentes dans les tissus pulmonaires et les lavages bronchiques de sujets asthmatiques (Alam *et al.*, 1996 ; Teran *et al.*, 1996). De plus, il est clairement démontré que les rhinovirus peuvent induire la production de RANTES et de chimiokines CXC dans les cellules primaires de l'épithélium bronchique humain (Donninger *et al.*, 2003 ; Glass *et al.*, 2003 ; Hayden *et al.*, 2004 ; Grissel *et al.*, 2005).

Les cellules épithéliales humaines sont une source majeure de chimiokines CC dont RANTES (Stellato *et al.*, 1995) et MCP-1 (Standiford *et al.*, 1991 ; Sousa *et al.*, 1994). Les cellules de l'épithélium respiratoire sont les cibles des picornavirus qui infectent les voies respiratoires (Donninger *et al.*, 2003). Par conséquent afin d'identifier les mécanismes susceptibles de régler le développement de l'inflammation de la muqueuse des voies respiratoires lors de l'infection virale, nous avons étudié la production de chimiokines par des cellules de l'épithélium des voies respiratoires inférieures infectées par des entérovirus. Notre étude *in vitro* démontre que l'infection de cellules épithéliales humaines provenant de la partie distale de l'arbre bronchique par des souches d'entérovirus à tropisme respiratoire résulte en l'induction de la sécrétion d'un profil spécifique de chimiokines CC et CXC.

Notre étude montre pour la première fois la capacité de certaines souches cliniques d'entérovirus à tropisme respiratoire, à savoir coxsackievirus B5 et echovirus 30 à infecter des cellules primaires humaines bronchiques (cellules SAE) qui représentent les cellules cibles du virus lors d'infections des voies respiratoires de l'enfant (Donninger *et al.*, 2003). L'infection productive à entérovirus stimule la sécrétion de chimiokines pro-inflammatoires CC et CXC (RANTES, MCP-1 et IL-8) à partir des cellules de l'épithélium bronchique humain. Au cours de l'infection par les entérovirus, on observe une augmentation des niveaux d'ARN messager de ces chimiokines associée à une sécrétion de ces protéines. Ces modulations dans la synthèse et la production de RANTES et MCP-1 sont strictement dépendantes de la réplication virale et de la dose infectieuse, alors que l'interaction virus-cellule est à elle seule capable d'induire d'importantes libérations d'IL-8.

Le profil et la quantité des chimiokines CC et CXC produites ont été caractéristiques du type de cellules infectées par des entérovirus à tropisme respiratoire. Ainsi, l'infection virale induit la libération de chimiokines de types RANTES et IL-8 par des cellules épithéliales isolées d'autres segments du tractus respiratoire inférieur, dont les cellules des grandes bronches (BEAS-2B) et du poumon (A549). Concernant la quantité de protéines sécrétées, les

cellules épithéliales de la partie distale de l'arbre bronchique (SAE) et du poumon (A549) infectées par les entérovirus, produisent significativement plus de chimiokines RANTES et IL-8 que celles issues des grandes bronches (BEAS-2B) (données non présentées).

Des éléments agissant en cis-activateur de la transcription et contenant des sites consensus de liaison pour le facteur nucléaire (NF)-IL6 et NF-kB, ont été identifiés dans le promoteur humain de RANTES (Nelson *et al.*, 1993). Des observations récentes montrent que l'infection à picornavirus induit l'activation de (NF)-IL6 et de NF-kB dans les cellules épithéliales et dans la muqueuse des voies respiratoires. Ces facteurs de transcription responsables de la synthèse de RANTES peuvent donc être associés à l'activation virale (Edwards *et al.*, 2007).

Les entérovirus induisent une sécrétion importante de MCP-1 par les cellules SAE. La production de MCP-1 par les cellules épithéliales des poumons (A549), en réponse au TNF- $\alpha$  et à l'IL-1  $\beta$ , avait déjà été démontrée précédemment (Standiford *et al.*, 1991). Nous avons observé une augmentation relativement modeste des ARN messagers de MCP-1 induite par les entérovirus, en comparaison de la quantité de protéine libérée, suggérant que l'expression de MCP-1 dans les cellules épithéliales pourrait être contrôlée au niveau transcriptionnel ou post-transcriptionnel (Lilly *et al.*, 1997 ; Standiford *et al.*, 1990 ; Edwards *et al.*, 2007). En outre notre étude montre pour la première fois que des cellules primaires de l'épithélium humain (cellules SAE) sont capables de sécréter MCP-1. En effet, l'expression de MCP-1 dans les cellules de l'épithélium bronchique normale s'était avérée négative dans d'autres études (Olszewka-Pazdrak *et al.* 1998 ; Cerri *et al.*, 2006 ; Wang *et al.*, 2007).

Il est intéressant de constater que la combinaison d'IFN- $\gamma$  et d'une faible dose de virus infectieux induit une augmentation significative de la production de RANTES, et ceci de manière synergique vis à vis de la production obtenue par l'infection à entérovirus ou le traitement par l'IFN- $\gamma$  seul. Des études récentes ont montré que chez des enfants atteints d'une infection des voies respiratoires à picornavirus, il existe une réponse de type Th-1 suite à l'augmentation d'IFN- $\gamma$  (Wimalasundera *et al.*, 1997). Or l'augmentation du nombre d'éosinophiles lors de l'inflammation est habituellement observée dans le contexte d'une réponse de type Th-2 et non de type Th-1. Par conséquent, nos résultats suggèrent la possibilité d'un mécanisme indépendant d'une réponse Th-2, et impliquant la production de chimiokines CC au niveau de l'épithélium respiratoire grâce à l'IFN- $\gamma$ . Ceci pourrait alors favoriser la migration des éosinophiles dans les poumons et les voies respiratoires suite à l'infection par des

entérovirus. Ce phénomène a été décrit au cours de l'infection de cellules de l'épithélium respiratoire par le VRS (Olszewka-Pazdrak *et al.* 1998). Afin de confirmer l'activité biologique des chimiokines secrétées par les cellules épithéliales, nous avons montré que le surnageant de cellules infectées par les entérovirus présentait une forte activité chimiotactique pour les éosinophiles, partiellement neutralisée par l'adjonction d'anticorps anti-RANTES (Figure 5). L'activité chimiotactique *in vitro* de RANTES sur les éosinophiles avait déjà été mise en valeur lors de précédentes études (Kameyoshi *et al.*, 1992 ; Alam *et al.*, 1993). L'activité chimiotactique du milieu de culture sur les éosinophiles n'étant que partiellement inhibée par les anticorps anti-RANTES. Ces résultats suggèrent que d'autres chimiokines connues comme étant sécrétées par l'épithélium infecté par les entérovirus, y compris l'IL-8 (Zhu *et al.*, 1997), auraient également une activité chimiotactique vis-à-vis des éosinophiles (Resnick *et al.*, 1993).

Notre étude montre pour la première fois que les éosinophiles du sang humain sont sensibles aux entérovirus respiratoires isolés de patients, et sont capables d'élaborer et de sécréter des chimiokines de types RANTES et MCP-1. Ces mécanismes ont été induits par une infection virale productive. D'autres équipes ont montré par RT-PCR que les éosinophiles sanguins provenant de patients présentant une hyper-éosinophilie exprimaient les ARN messager de MCP-1 et sécrétaient ces protéines (Wong *et al.*, 2005). Préalablement, la présence d'ARN messagers et la sécrétion de protéines de type RANTES ont été mis en évidence chez des éosinophiles isolés de sujets atypiques (Lim *et al.*, 1996) ou à partir de donneurs sains (Ying *et al.*, 1996). La protéine RANTES serait stockée dans les éosinophiles au niveau des granules cytoplasmiques et libérée seulement après lyse des cellules (Ying *et al.*, 1996). Aucune preuve expérimentale n'indique à ce jour que les cytokines pro-inflammatoires ou stimuli exogènes réglementent la synthèse ou la sécrétion de RANTES ou de MCP-1 au niveau des éosinophiles humains. De plus les quantités de RANTES et MCP-1 libérées par les éosinophiles, après l'infection à entérovirus, se sont révélées être beaucoup plus élevées que celles observées après la lyse des éosinophiles. Nos données montrent que la production et la libération de ces chimiokines par les éosinophiles sont spécifiquement induites par l'infection virale (Figure 7).

Suite à l'infection des voies aériennes basses par les entérovirus, la réponse inflammatoire initiée par les cellules épithéliales pourrait donc être soutenue et amplifiée via des mécanismes autocrines, secondaires à la libération de chimiokines par les éosinophiles et infectés par les entérovirus. Ainsi la libération sélective de RANTES, d'IL-8 et de MCP-1 par les cellules épithéliales des bronchioles associée à des mécanismes autocrines et paracrines



médiés par les éosinophiles et l'IFN- $\gamma$ , pourraient expliquer en grande partie la migration et l'activation des cellules de type polynucléaires neutrophiles et des éosinophiles lors de la bronchiolite induite par les entérovirus. De nouvelles études expérimentales seront utiles pour identifier l'ensemble des chimiokines sécrétées par les éosinophiles lors de l'infection par un entérovirus, ainsi que pour explorer les modifications des fonctions cellulaires secondaires à l'infection entérovirale.

***CONCLUSION GENERALE***

Notre travail de thèse a permis de préciser l'importance des picornavirus et plus spécifiquement celles des entérovirus non polio à tropisme respiratoire comme cause étiologique potentielle de la bronchiolite infantile. Par ailleurs, nous avons montré que les infections respiratoires représentaient en fréquence le deuxième type de pathologies pédiatriques à entérovirus après la méningite à liquide clair chez les nourrissons âgés de 1-12 mois. La circulation successive ou concomitante de souches génétiquement distinctes d'entérovirus indique la possibilité d'infections respiratoires répétées en pédiatrie au cours d'une même saison épidémique, et suggère ainsi la possibilité de recombinaisons génétiques intra ou inter sérotypiques au sein des espèces d'entérovirus A ou B. La poursuite du développement de techniques de RT-PCR quantitative en temps réel associées à un génotypage permettra de réaliser un diagnostic étiologique rapide des infections respiratoires à entérovirus. Cette combinaison d'approches diagnostiques et épidémiologiques, pourrait permettre de prévenir la transmission nosocomiale de ces virus dans les départements de pédiatrie mais également de surveiller l'apparition de nouvelles souches d'entérovirus à tropisme respiratoire.

Les résultats de notre étude expérimentale montrent une production sélective de RANTES, IL-8 et MCP-1 libérées par les cellules épithéliales des bronchioles et ceci après l'infection par des entérovirus à tropisme respiratoire. Cette production est associée à des mécanismes autocrines et paracrines médiés par les éosinophiles et l'IFN- $\gamma$  expliquant en grande partie la migration et l'activation des cellules mononucléaires (polynucléaires neutrophiles et éosinophiles) lors de la bronchiolite induite par des entérovirus. Cependant, de nouvelles études, à la fois chez les enfants atteints de différentes formes de maladies des voies respiratoires induites par les entérovirus et dans des modèles expérimentaux murins, seront nécessaires afin de corréliser les différents paramètres histopathologiques de l'inflammation, au type de réponse immunitaire induite par l'expression et la sécrétion de chimiokines CC et CXC au niveau de l'épithélium respiratoire.

*PERSPECTIVES*

De nouvelles études clinico-virologiques chez les enfants atteints d'infections des voies respiratoires par les entérovirus sont nécessaires afin de corrélérer les différents paramètres histologiques, inflammatoires et la sécrétion de chimiokines CC et CXC dans les voies respiratoires. Au cours d'études prospectives, il serait nécessaire d'analyser les aspirations naso-pharyngées d'enfants souffrant d'infections respiratoires à entérovirus afin de doser les niveaux de sécrétion des chimiokines et de mesurer en parallèle les charges virales. L'objectif final serait d'identifier et de valider certains marqueurs immunologiques ou virologiques en pratique clinique, permettant ainsi d'avoir de nouveaux outils prédictifs ou diagnostiques spécifiques des infections respiratoires infantiles par les entérovirus.

Très récemment, une équipe anglo-saxonne a mis au point et évalué un modèle de souris BALB/c génétiquement modifié pour l'expression de récepteurs chimériques humains–murins pour ICAM-1. L'expression de ces récepteurs permet l'infection pulmonaire par différents groupes et sérotypes de rhinovirus humains (majoritaires et minoritaires) chez ces souris inoculées par voie intra-nasale (Bartlett *et al.*, 2008). Ce modèle murin va permettre de mieux comprendre les mécanismes inflammatoires développés chez l'hôte au cours des infections respiratoires basses par les picornavirus humains. L'étude des infections respiratoires basses par entérovirus à tropisme respiratoire, utilisant préférentiellement les récepteurs de type ICAM-1 tels que les coxsackievirus A. Ce modèle permettrait également de confirmer les observations *in vitro* obtenues lors d'infection de cellules respiratoires humaines tant par les rhinovirus que par les entérovirus.

Par ailleurs l'utilisation de ce modèle expérimental permettra l'étude des caractéristiques génétiques et phénotypiques des différentes espèces et sérotypes d'entérovirus humains impliqués dans les infections respiratoires basses. Il est donc actuellement impossible de prédire le tropisme respiratoire ainsi que la sévérité des symptômes cliniques liés à l'émergence de souches d'entérovirus pneumotropes, potentiellement responsables d'épidémies. C'est pourquoi il serait intéressant d'étudier les caractères génétiques et phénotypiques des souches d'entérovirus isolées dans des cas d'infections respiratoires basses, et diagnostiquées chez des sujets immunocompétents. Ces futures études permettraient la validation de nouveaux outils pour l'évaluation du tropisme respiratoire et de la virulence des souches d'entérovirus (voir Annexe II, page 187).

*REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES*

## Références bibliographiques

- Abe O, Kimura H, Minakami H, Akami M, Inoue M, Saito A, and Otsuki K.  
Outbreak of gastroenteritis caused by echovirus type 6 in an orphanage in Japan.  
J Infect. 2000; 41:285-6.
- Abzug MJ, Keyserling HL, Lee ML, Levin MJ, Rotbart HA.  
Neonatal enterovirus infection: virology, serology, and effects of intravenous immune globulin.  
Clin Infect Dis. 1995; 20:1201-1206
- Agol VI.  
The 5'-untranslated region of picornaviral genomes.  
Adv Virus Res. 1991; 40:103-80.
- Agol VI, Paul AV, Wimmer E.  
Paradoxes of the replication of picornaviral genomes.  
Virus Res. 1999; 62:129-47.
- Aherne W, Bird T, Court S D, Gardner P S, McQuillin J.  
Pathological changes in virus infections of the lower respiratory tract in children.  
J. Clin. Pathol. 1970; 23:7-18.
- Alam R, York J, Boyers M, Stafford S, Grant J A, Lee J, Forsythe P, Sim T, Ida N.  
Increased MCP-1, RANTES, and MIP-1a in bronchoalveolar lavage fluid of allergic asthmatic patients.  
Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1996; 153:1398-1404.
- Alam R, Stafford S, Forsythe P, Harrison R, Faubion D, Lett-Brown MA, Grant JA.  
RANTES is a chemotactic and activating factor for human eosinophils.  
J. Immunol. 1993; 150:3442-3447.

## Références bibliographiques

Anderson JP, Daifuku R, Loeb LA.

Viral error catastrophe by mutagenic nucleosides.

Annu Rev Microbiol 2004; 58:183-205.

Andersson P, Edman K, Lindberg AM.

Molecular analysis of the echovirus 18 prototype. Evidence of interserotypic recombination with echovirus 9.

Virus Res. 2002; 85:71-83.

Andino R, Rieckhof GE, Achacoso PL, Baltimore D.

Poliovirus RNA synthesis utilizes an RNP complex formed around the 5'-end of viral RNA.

EMBO J. 1993; 12:3587-98.

Andréoletti L.

Entérovirus.

Encycl Méd Chir, Maladies infectieuses, 8-056-A-10,2003, pages 12.

Andréoletti L, Lesay M, Deschildre A, Lambert V, Dewilde A, Wattré P.

Differential detection of rhinoviruses and enteroviruses RNA sequences associated with classical immunofluorescence assay detection of respiratory virus antigens in nasopharyngeal swabs from infants with bronchiolitis.

J Med Virol. 2000; 61:341-6.

Andréoletti L, Wattré P.

Le rôle des coxsackievirus B dans les pathologies cardiaques humaines.

Virologie. 1999; 3:309-21.



## Références bibliographiques

Andréoletti L, Ventéo L, Douche-Aourik F, Canas F, Lorin de la Grandmaison G, Jacques J, Moret H, Jovenin N, Mosnier JF, Matta M, Duband S, Pluot M, Pozzetto B, Bourlet T.

Active Coxsackieviral B infection is associated with disruption of dystrophin in endomyocardial tissue of patients who died suddenly of acute myocardial infarction.

J Am Coll Cardiol. 2007 4; 50:2207-14.

Anonymous.

Consensus conference on the management of infant bronchiolitis.

Paris, France, 21 September 2000. Proceedings. Arch Pediatr 2001; 8 suppl: 1s-196s.

Antona D, Lévêque N, Chomel JJ, Dubrou S, Levy-Bruhl D, Lina B.

Surveillance of enteroviruses in France, 2000-2004.

Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2007; 26:403-12.

Arden KE, McErlean P, Nissen MD, Sloots TP, Mackay IM.

Frequent detection of human rhinoviruses, paramyxoviruses, coronaviruses, and bocavirus during acute respiratory tract infections.

J Med Virol. 2006; 78:1232-40.

Arita M, Zhu SL, Yoshida H, Yoneyama T, Miyamura T, Shimizu H.

A Sabin 3-derived poliovirus recombinant contained a sequence homologous with indigenous human enterovirus species C in the viral polymerase coding region.

J Virol. 2005; 79:12650-7.

Arnold E, Luo M, Vriend G, Rossmann MG, Palmenberg AC, Parks GD, Nicklin MJ, Wimmer E.

Implications of the picornavirus capsid structure for polyprotein processing.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1987; 84:21-5.

## Références bibliographiques

Ashwell MJ, Smith DW, Phillips PA, Rouse IL.

Viral meningitis due to echovirus types 6 and 9: epidemiological data from Western Australia.

Epidemiol Infect. 1996; 117:507-12.

Baboonian C, Davies MJ, Booth JC, Mc Kenna WJ. Coxsackie B viruses and human heart disease; In: Tracy S, Chapman NM, Mahy BWJ eds. The Coxsackie B viruses. Berlin-Heidelberg: Springer Verlag, 1997: 31-52

Bailly JL, Borman AM, Peigue-Lafeuille H, Kean KM.

Natural isolates of ECHO virus type 25 with extensive variations in IRES sequences and different translational efficiencies.

Virology. 1996; 215:83-96.

Baltera RF Jr, Tershak DR.

Role of amino acid residue 187 of poliovirus polypeptide 2C in determining the guanidine trait.

Intervirology. 1992; 33:165-72.

Baranowski E, Ruiz-Jarabo C M, Escarmis C, Domingo E.

Variabilité et évolution des populations virales : bilan et implications.

Méd. Trop., 1999 ; 59:430-434.

Barclay W, Li Q, Hutchinson G, Moon D, Richardson A, Percy N, Almond JW, Evans DJ.

Encapsidation studies of poliovirus subgenomic replicons.

J Gen Virol. 1998; 79:1725-34.

Barco A, Carrasco L.

A human virus protein, poliovirus protein 2BC, induces membrane proliferation and blocks the exocytic pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.

EMBO J. 1995 17; 14:3349-64.

## Références bibliographiques

Barco A, Feduchi E, Carrasco L.

Poliovirus protease 3C(pro) kills cells by apoptosis.

Virology. 2000 20; 266:352-60.

Barson WJ and Reiner CB.

Coxsackievirus B2 infection in a neonate with incontinentia pigmenti.

Pediatrics. 1986; 77:897-900.

Barton DJ, Flanagan JB.

Synchronous replication of poliovirus RNA: initiation of negative-strand RNA synthesis requires the guanidine-inhibited activity of protein 2C.

J Virol. 1997; 71:8482-9.

Basavappa R, Syed R, Flore O, Icenogle JP, Filman DJ, Hogle JM.

Role and mechanism of the maturation cleavage of VP0 in poliovirus assembly: structure of the empty capsid assembly intermediate at 2.9 Å resolution.

Protein Sci. 1994; 3:1651-69.

Bartlett NW, Walton RP, Edwards MR, Aniscenko J, Caramori G, Zhu J, Glanville N, Choy KJ, Jourdan P, Burnet J, Tuthill TJ, Pedrick MS, Hurle MJ, Plumpton C, Sharp NA, Bussell JN, Swallow DM, Schwarze J, Guy B, Almond JW, Jeffery PK, Lloyd CM, Papi A, Killington RA, Rowlands DJ, Blair ED, Clarke NJ, Johnston SL.

Mouse models of rhinovirus-induced disease and exacerbation of allergic airway inflammation.

Nat Med. 2008; 14:199-204.

Belnap DM, Filman DJ, Trus BL, Cheng N, Booy FP, Conway JF, Curry S, Hiremath CN, Tsang SK, Steven AC, Hogle JM.

Molecular tectonic model of virus structural transitions: the putative cell entry states of poliovirus.

J Virol. 2000b; 74:1342-54.

## Références bibliographiques

Belnap DM, McDermott BM Jr, Filman DJ, Cheng N, Trus BL, Zuccola HJ, Racaniello VR, Hogle JM, Steven AC.

Three-dimensional structure of poliovirus receptor bound to poliovirus.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2000a; 97:73-8.

Belsham GJ & Sonenberg N.

Picornavirus RNA translation; roles of cellular proteins.

Trends. Microbiol. 2000; 8, 330-5.

Bentley JK, Newcomb DC, Goldsmith AM, Jia Y, Sajjan US, Hershenson MB.

Rhinovirus activates interleukin-8 expression via a Src/p110beta phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in human airway epithelial cells.

J Virol. 2007; 81:1186-94.

Bernit E, de Lamballerie X, Zandotti C, Berger P, Veit V, Schleinitz N, de Micco P, Harlé JR, Charrel RN.

Prospective investigation of a large outbreak of meningitis due to echovirus 30 during summer 2000 in Marseilles, France.

Medicine (Baltimore). 2004; 83:245-53.

Birenbaum E, Handsher R, Kuint J, Dagan R, Raichman B, Mendelson E, Linder N.

Echovirus type 22 outbreaks associated with gastro-intestinal disease in a neonatal intensive care unit.

Am J Perinatol. 1997; 14:469-73.

Blomqvist S, Bruu AL, Stenvik M, Hovi T.

Characterization of a recombinant type 3/type 2 poliovirus isolated from a healthy vaccinee and containing a chimeric capsid protein VP1.

J. Gen. Virol. 2003; 84:573-580.

## Références bibliographiques

Boege U, Ko DS, Scraba DG.

Toward an in vitro system for picornavirus assembly: purification of mengovirus 14S capsid precursor particles.

J Virol. 1986; 57:275-84.

Bolanaki E, Kottaridi C, Markoulatos P, Margaritis L, Katsorichis T.

Evolution of 2B and 2C genomic parts of species B coxsackie viruses. Phylogenetic study and comparison with other regions.

Virus Genes 2006; 32:249-259.

Borman AM, Deliat FG, Kean KM.

Sequences within the poliovirus internal ribosome entry site segment control viral RNA synthesis.

EMBO J. 1994; 13:3149-3157.

Bouche P.

La sclérose latérale amyotrophique (maladie du motoneurone).

Encyl. Med. Chir. (Paris, France), Neurologie, 5, 20p.

Bourgeois FT, Valim C, Wei JC, McAdam AJ, Mandl KD.

Influenza and other respiratory virus-related emergency department visits among young children.

Pediatrics. 2006; 118:1-8.

Bourgeois FT, Olson KL, Brownstein JS, McAdam AJ, Mandl KD.

Validation of syndromic surveillance for respiratory infections.

Ann Emerg Med. 2006; 47:265.

## Références bibliographiques

Bouscambert–Duchamp M, Lina B, Moret H, Trompette A, Motte J, Andréoletti L.

Detection of human metapneumovirus RNA sequences in nasopharyngeal aspirates of young French children with acute bronchiolitis by real-time reverse transcriptase PCR and phylogenetic analysis.

J Clin Microbiol 2005; 43:1411-4.

Bousslama L, Nasri D, Chollet L, Belguith K, Bourlet T, Aouni M, Pozzetto B, Pillet S.

Natural recombination event within the capsid genomic region leading to a chimeric strain of human enterovirus B.

J Virol. 2007; 81:8944-52.

Boyd MT, Jordan SW, Davis LE.

Fatal pneumonitis from congenital echovirus type 6 infection.

Pediatr Infect Dis J. 1987; 6:1138-9.

Brahic M, Smith RA, Gibbs CJ Jr, Garruto RM, Tourtellotte WW, Cash E.

Detection of picornavirus sequences in nervous tissue of amyotrophic lateral sclerosis and control patients.

Ann Neurol. 1985; 18:337-43.

Bryden AS.

Isolation of enteroviruses and adenoviruses in continuous simian cell lines.

Med Lab Sci. 1992; 49:60-5.

Brown B, Oberste MS, Maher K, Pallansch MA.

Complete genomic sequencing shows that polioviruses and members of human enterovirus species C are closely related in the noncapsid coding region.

J Virol. 2003; 77:8973-84.

## Références bibliographiques

Brunel D, Jacques J, Motte J, and Andreoletti L.

Echovirus 18 Fatal Leukoencephalitis in a Child.

J Clin Microbiol. 2007; 45:2068-71.

Calhoun WJ, Dick EC, Schwartz LB, Busse WW.

A common cold virus, rhinovirus 16, potentiates airway inflammation after segmental antigen bronchoprovocation in allergic subjects.

J Clin Invest. 1994; 94:2200-8.

Campanella M, de Jong AS, Lanke KW, Melchers WJ, Willems PH, Pinton P, Rizzuto R, van Kuppeveld FJ.

The coxsackievirus 2B protein suppresses apoptotic host cell responses by manipulating intracellular Ca<sup>2+</sup> homeostasis.

J Biol Chem. 2004 30; 279:18440-50.

Caro V, Guillot S, Delpeyroux F, Crainic R.

Molecular strategy for 'serotyping' of human enteroviruses.

J. Gen. Virol. 2001; 82:79-91.

Carolane DJ, Long AM, McKeever PA, Hobbs SJ, Roome AP.

Prevention of spread of echovirus 6 in a special care baby unit.

Arch Dis Child. 1985; 60:674-6.

Casas I, Palacios GF, Trallero G, Cisterna D, Freire MC, Tenorio.

Molecular characterization of human enteroviruses in clinical samples: comparison between VP2, VP1, and RNA polymerase regions using RT nested PCR assays and direct sequencing of products.

J. Med. Virol. 2001. 65:138-148.

## Références bibliographiques

Cerri C, Chimenti D, Conti I, Neri T, Paggiaro P, Celi A.

Monocyte/macrophage-derived microparticles up-regulate inflammatory mediator synthesis by human airway epithelial cells.

J Immunol. 2006; 177:1975-80.

Chan YF and A Sazaly.

Phylogenetic evidence for inter-typic recombination in the emergence of human enterovirus 71 subgenotypes.

BMC Microbiol. 2006; 6:74-84.

Chang LY, Lin TY, Hsu KH, Huang YC, Lin KL, Hsueh C, Shih SR, Ning HC, Hwang MS, Wang HS, Lee CY.

Clinical features and risk factors of pulmonary oedema after enterovirus-71-related hand, foot, and mouth disease.

Lancet. 1999; 354:1862-6.

Cheeseman SH, Hirsch MS, Keller EW, Keim DE.

Fatal neonatal pneumonia caused by Echovirus type 9.

Am J Dis Childr. 1977; 131:1169.

Chevaliez S, Szendroi A, Caro V, Balanant J, Guillot S, Berencsi G, Delpeyroux F.

Molecular comparison of echovirus 11 strains circulating in Europe during an epidemic of multisystem hemorrhagic disease of infants indicates that evolution generally occurs by recombination.

Virology 2004; 325:56-70.

Chia JK, Chia AY.

Chronic fatigue syndrome is associated with chronic enterovirus infection of the stomach.

J Clin Pathol. 2008; 61:43-8.



## Références bibliographiques

Choi EH, Lee HJ, Kim SJ, Eun BW, Kim NH, Lee JA, Lee JH, Song EK, Kim SH, Park JY, Sung JY.

The association of newly identified respiratory viruses with lower respiratory tract infections in Korean children, 2000-2005.

Clin Infect Dis. 2006; 43:585-92.

Chomczynski P and N Sacchi.

Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.

Anal. Biochem. 1987; 162, 156.

Chomel JJ, Antona D, Thouvenot D, Lina B.

Three echovirus serotypes responsible for outbreak of aseptic meningitis in Rhone-Alpes region, France.

Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2003; 22:191-3.

Chonmaitree, T., and L. Mann.

Respiratory infections. In: Rotbart HA (Ed) Human Enterovirus Infections.

ASM Press, 1995. Washington DC. pp. 255-270.

Chonmaitree T, Revai K, Grady JJ, Clos A, Patel JA, Nair S, Fan J, Henrickson KJ.

Viral upper respiratory tract infection and otitis media complication in young children.

Clin Infect Dis. 2008 15; 46:815-23.

Colston E, Racaniello VR.

Poliovirus variants selected on receptor-expressing cells identify capsid residues that expand receptor recognition.

J Virol. 1995; 69:4823-9.

## Références bibliographiques

Communicable Disease Surveillance Centre.

Viral meningitis associated with increase in echovirus type 13.

Commun Dis Rep CDR Wkly. 2000; 10:277-280.

Couch RB. 2001. Rhinovuses.

p. 777-795. In: Knipe D.M, Howley P.M. (eds). Virology, Fields. 4th Edit. : Lippincott Williams and Wilkins company, Philadelphia, Pennsylvania.

Crainic R, Couillin P, Blondel B, Cabau N, Boué A, Horodniceanu F.

Natural variation of poliovirus neutralization epitopes.

Infect Immun. 1983; 41:1217-25.

Crainic R, Delpeyroux F, Georgescu M, et al.

La poliomyélite: une maladie neurologique provoquée par un virus entérotrope.

Ann. Instit. Pasteur, 1995; 6:75-85.

Crovari P, Chiossi FM, Vannucci A.

On an episode of acute respiratory disease caused by ECHO 19 virus.

G Ig Med Prev. 1969; 10:163-75.

Cuervo NS, Guillot S, Romanenkova N, Combiescu M, Aubert-Combiescu A, Seghier M, Caro V, Crainic R, Delpeyroux F.

Genomic features of intertypic recombinant Sabin poliovirus strains excreted by primary vaccinees.

J. Virol. 2001; 75:5740-5751.

Dagan, R., and M.A. Menegus.

A combination of four cell types for rapid detection of enteroviruses in clinical specimens.

J Med Virol. 1986; 19:219-28.

## Références bibliographiques

Dahourou G, Guillot S, Le Gall O, Crainic R.

Genetic recombination in wild-type poliovirus.

J Gen Virol. 2002; 83:3103-10.

Dierssen U, Rehren F, Henke-Gendo C, Harste G, Heim A.

Rapid routine detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid by a one-step real-time RT-PCR assay.

doi:10.1016/j.jcv.2007.11.016

Doedens JR & Kirkegaard K.

Inhibition of cellular protein secretion by poliovirus proteins B and 3A.

E.M.B.O. J. 1995; 14:894-907.

Doedens JR, Giddings TH Jr, Kirkegaard K.

Inhibition of endoplasmic reticulum-to-Golgi traffic by poliovirus protein 3A: genetic and ultrastructural analysis.

J Virol. 1997; 71:9054-64.

Domingo E, Holland JJ.

RNA virus mutations and fitness for survival.

Annu Rev Microbiol. 1997; 51:151-78.

Domingo E, & Holland JJ.

Mutations and rapid evolution of RNA viruses

(ed. S., M. S.) (Raven Press, New York, 1994).

Domingo E, Baranowski E, Nunez JI, Ruiz-Jarabo CM, Sierra S, Molina N, Sobrino F.

Cuasiespecies y evolucion molecular de virus.

Rev Sci Tech. Off. int.Epiz., 2000a ; 19:55-63.

## Références bibliographiques

Domingo E, Biebricher C, Eigen M, Holland JJ.

Quasispecies and RNA virus evolution: principles and consequences,

Landes Bioscience, Austin, 2000b; 221 pages.

Domingo E, Davila M, Ortin J.

Nucleotide sequence heterogeneity of the RNA from a natural population of foot-and-mouth-disease virus.

Gene, 1980; 11:333-346.

Domingo E, Mateu MG, Martínez MA, Dopazo J, Moya A, Sobrino F.

Genetic variability and antigenic diversity of foot-and-mouth disease virus.

In

Applied Virology Research.

Eds.

E. Kurkstak, R. G. Marusyk, S. A. Murphy, M. H. V. Van- Regenmortel

New York, Plenum Publishing Co., 1990, 233-266.

Domingo E, Webster RG, Holland JJ.

Origin and Evolution of Viruses,

Academic Press, San Diego, 1999. 499 pages.

Donninger H, Glashoff R, Haitchi HM, Syce JA, Ghildyal R, van Rensburg E, Bardin PG.

Rhinovirus induction of the CXC chemokine epithelial-neutrophil activating peptide-78 in bronchial epithelium.

J Infect Dis. 2003; 187:1809-17.

Douche-Aourik F, Berlier W, Féasson L, Bourlet T, Harrath R, Omar S, Grattard F, Denis C, Pozzetto B.

Detection of enterovirus in human skeletal muscle from patients with chronic inflammatory muscle disease or fibromyalgia and healthy subjects.

## Références bibliographiques

J Med Virol. 2003; 71:540-7.

Downham MA, Gardner PS, McQuillin J, Ferris JA.

Role of respiratory viruses in childhood mortality.

Br. Med. J. 1975; 1:235-239.

Eckert HL, Portnoy B, Salvatore MA, Ressler R.

Group B, Coxsackie virus infection in infants with acute lower respiratory disease.

Pediatrics. 1967; 39:526-31.

Edwards MR, Hewson CA, Laza-Stanca V, Lau HT, Mukaida N, Hershenson MB, Johnston SL.

Protein kinase R, IkappaB kinase-beta and NF-kappaB are required for human rhinovirus induced pro-inflammatory cytokine production in bronchial epithelial cells.

Mol Immunol. 2007; 44:1587-97.

Eigen M.

Viral quasispecies.

Sci Am. 1993; 269:42-9.

Elliott SR, Macardle PJ, Zola H.

Removal of erythroid cells from umbilical cord blood mononuclear cell preparations using magnetic beads and a monoclonal antibody against glycophorin A.

J Immunol Methods. 1998; 217:121-30.

El-Sageyer MM, Szendroi A, Hutter E, et al.

Characterization of an echovirus type 11' (prime) epidemic strain causing haemorrhagic syndrome in newborn babies in Hungary.

Acta Virol. 1998; 2:157-66.

Eriksson U, Ricci R, Hunziker L, Kurrer MO, Oudit GY, Watts TH, Sonderegger I, Bachmaier K, Kopf M, Penninger JM.

## Références bibliographiques

Dendritic cell-induced autoimmune heart failure requires cooperation between adaptive and innate immunity.

Nat Med. 2003; 9:1484-90.

Evans DJ, Almond JW.

Cell receptors for picornaviruses as determinants of cell tropism and pathogenesis.

Trends Microbiol. 1998; 6:198-202. Review.

Felsenstein, J.

Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap.

Evolution. 1985; 39:783-791. doi:10.2307/2408678

Ferris JA, Aherne WA, Locke WS, McQuillin J, Gardner PS.

Sudden and unexpected deaths to infants: histology and virology.

Br. Med. J. 1973; 2:439-449.

Filman DJ, Syed R, Chow M, Macadam AJ, Minor PD, Hogle JM.

Structural factors that control conformational transitions and serotype specificity in type 3 poliovirus.

EMBO J. 1989; 8:1567-79.

Fleming HE, Little FF, Schnurr D, Avila PC, Wong H, Liu J, Yagi S, Boushey HA.

Rhinovirus-16 colds in healthy and in asthmatic subjects: similar changes in upper and lower airways.

Am J Respir Crit Care Med. 1999; 160:100-8.

## Références bibliographiques

Freymuth F, Vabret A, Brouard J, Toutain F, Verdon R, Petitjean J, Gouarin S, Duhamel JF, Guillois B.

Detection of viral, Chlamydia pneumoniae and Mycoplasma pneumoniae infections in exacerbations of asthma in children.

J Clin Virol 1999; 13:131-9.

Freymuth F, Vabret A, Galateau Salle F, Ferey J, Eugene G, Petitjean J, Gennetay E, Brouard J, Jokik M, Duhamel JF, Guillois B.

Detection of respiratory syncytial virus, parainfluenzavirus 3, adenovirus and rhinovirus sequences in respiratory tract of infants by polymerase chain reaction and hybridization.

Clin Diag Virol 1997; 8:31-40.

Freymuth F, Vabret A, Rozenberg F, Dina J, Petitjean J, Gouarin S, Legrand L, Corbet S, Brouard J, Lebon P.

Replication of respiratory viruses, particularly influenza virus, rhinovirus, and coronavirus in HuH7 hepatocarcinoma cell line.

J Med Virol. 2005; 77:295-301.

Fricks CE, Hogle JM.

Cell-induced conformational change in poliovirus: externalization of the amino terminus of VP1 is responsible for liposome binding.

J Virol. 1990; 64:1934-45.

Furione M, Guillot S, Otelea D, Balanant J, Candrea A, Crainic R.

Polioviruses with natural recombinant genomes isolated from vaccine-associated paralytic poliomyelitis.

Virology. 1993; 196:199-208.

Furukawa E, Ohru T, Yamaya M, Suzuki T, Nakasato H, Sasaki T, Kanda A, Yasuda H, Nishimura H, Sasaki H.

Human airway submucosal glands augment eosinophil chemotaxis during rhinovirus infection.

Clin Exp Allergy. 2004; 34:704-11.

## Références bibliographiques

Gamarnick AV, Andino R.

Interactions of viral protein 3Cd and poly(rC)-binding protein with the 5' untranslated region of the poliovirus genome.

J Virol. 2000; 74, 2219-26.

Gamarnick AV, Andino R.

Switch from translation to RNA replication in a positive-stranded RNA virus.

Genes Dev. 1998; 12, 2293-2304.

Gantzer C, Maul A, Audic JM, Schwartzbrod L.

Detection of infectious enteroviruses, enterovirus genomes, somatic coliphages, and Bacteroides fragilis phages in treated wastewater.

Appl Environ Microbiol 1998;64: 4307-4312

Gaudin OG. Enterovirus.

In

Encyclopédie de Médecine et Chirurgie.

Editions techniques eds, Paris. 1991 ; pp1-8.

Georgescu MM, Delpeyroux F, Crainic R.

Tripartite genome organization of a natural type 2 vaccine/nonvaccine recombinant poliovirus. 1

J Gen Virol. 1995; 76:2343-8.

Gerard C, and B.J. Rollins.

Chemokines and disease.

Nat Immunol. 2001; 2:108-15.

Gerba CP, Goyal SM, LaBelle RL, Cech I, Bodgan GF.

Failure of indicator bacteria to reflect the occurrence of enteroviruses in marine waters.

Am J Public Health. 1979; 69:1116-9.



## Références bibliographiques

Gerba CP, Gramos DM, Nwachuku N.

Comparative inactivation of enteroviruses and adenovirus 2 by UV light.

Appl Environ Microbiol. 2002; 68:5167-9.

Ginevra C, Barranger C, Ros A, Mory O, Stephan JL, Freymuth F, Joannes M, Pozzetto B, Grattard F.

Development and evaluation of Chlamylege, a new commercial test allowing simultaneous detection and identification of Legionella, Chlamydomphila pneumoniae, and Mycoplasma pneumoniae in clinical respiratory specimens by multiplex PCR.

J Clin Microbiol. 2005; 43:3247-54

Glass WG, Rosenberg HF, Murphy PM.

Chemokine regulation of inflammation during acute viral infection.

Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2003; 3:467-73.

Greve JM, Davis G, Meyer AM, Forte CP, Yost SC, Marlor CW, Kamarck ME, McClelland A.

The major human rhinovirus receptor is ICAM-1.

Cell. 1989; 56:839-47.

Grünberg K, Sterk PJ.

Rhinovirus infections: induction and modulation of airways inflammation in asthma.

Clin Exp Allergy. 1999; 29 Suppl 2:65-73.

Hall CB, Hall WJ, Gala CL, MaGill FB, Leddy JP.

Long-term prospective study in children after respiratory syncytial virus infection.

J Pediatr 1984; 105:358-364.

## Références bibliographiques

Hall DJ, Bates ME, Guar L, Cronan M, Korpi N, Bertics PJ.

The role of p38 MAPK in rhinovirus-induced monocyte chemoattractant protein-1 production by monocytic-lineage cells.

J Immunol. 2005 15; 174:8056-63.

Hambling MH, Davis PM, Macrae AD.

The typing enteroviruses in tissue culture by neutralization with composite antiserum pools.

J Hyg (lond). 1963; 61:479-84.

Hanecak R, Semler BL, Anderson CW, et al.

Proteolytic processing of poliovirus polypeptides: antibodies to polypeptide P3-7c inhibit cleavage at glutamine-glycine pairs.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1982; 79:3973-7.

Harrath R, Douche-Aourik F, Bourlet T, Ismail A, Omar S, Aouni M, Pozzetto B.

Model of coxsackievirus B3 persistent infection in orally-inoculated BALB/c mouse.

Ann Biol Clin (Paris). 2004; 62:33-9.

Hayashi F, Means TK, Luster AD.

Toll-like receptors stimulate human neutrophil function.

Blood. 2003; 102:2660-9.

He Y, Bowman VD, Mueller S, Bator CM, Bella J, Peng X, Baker TS, Wimmer E, Kuhn RJ, Rossmann MG.

Interaction of the poliovirus receptor with poliovirus.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2000; 97:79-84.

Hellen CU, Lee CK, Wimmer E.

Determinants of substrate recognition by poliovirus 2A proteinase.

J Virol. 1992; 66:3330-8.

## Références bibliographiques

Hellen CU, Wimmer E.

Translation of encephalomyocarditis virus RNA by internal ribosomal entry.

Curr Top Microbiol Immunol. 1995; 203:31-63. Review.

Hercík L, Huml M, Mimra J, Nájemník J, Procházka D, Venderová E.

Epidemic of respiratory tract diseases in newborn infants due to ECHO 11 virus.

Zentralbl Bakteriol [Orig]. 1970; 213:18-27.

Hirst GK.

Genetic recombination with Newcastle disease virus, polioviruses, and influenza.

Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1962; 27:303-9.

Hober D, Chehadeh W, Weill J, Hober C, Vantighem MC, Gronnier P, Wattré P.

Circulating and cell-bound antibodies increase coxsackievirus B4-induced production of IFN-alpha by peripheral blood mononuclear cells from patients with type 1 diabetes.

J Gen Virol. 2002; 83:2169-76.

Hogg JC, Williams J, Richardson JB, Macklem PT, Thurlbeck WM.

Age as a factor in the distribution of lower-airway conductance and in the pathologic anatomy of obstructive lung disease.

N Engl J Med. 1970; 282:1283-7.

Hogle JM, Chow M, Filman DJ.

Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution.

Science. 1985; 229:1358-65.

Hogle JM.

Poliovirus cell entry: common structural themes in viral cell entry pathways.

Annu Rev Microbiol. 2002; 56:677-702.

## Références bibliographiques

Holland J, Domingo E.

Origin and evolution of viruses.

Virus Genes. 1998; 16:13-21.

Hot D, Legeay O, Jacques J, Gantzer C, Caudrelier Y, Guyard K, Lange M, Andréoletti L.

Detection of somatic phages, infectious enteroviruses and enterovirus genomes as indicators of human enteric viral pollution in surface water.

Water Res. 2003; 37:4703-10.

Hovi T, Cantell K, Huovilainen A, Kinnunen E, Kuronen T, Lapinleimu K, Poyry T, Roivainen M, Salama N, Stenvik M, et al.

Outbreak of paralytic poliomyelitis in Finland: widespread circulation of antigenically altered poliovirus type 3 in a vaccinated population.

Lancet. 1986; 1:1427-32.

Hughes PJ, North C, Minor PD, Stanway G.

The complete nucleotide sequence of coxsackievirus A21.

J Gen Virol. 1989; 70:2943-52.

Hymas WC, Aldous WK, Taggart EW, Stevenson JB, Hillyard DR.

Description and validation of a novel real-time rt-PCR enterovirus assay.

Clin Chem. 2008; 54:406-13.

Hyöty H, Hiltunen M, Knip M, Laakkonen M, Vähäsalo P, Karjalainen J, Koskela P, Roivainen M, Leinikki P, Hovi T, et al.

A prospective study of the role of coxsackie B and other enterovirus infections in the pathogenesis of IDDM. Childhood Diabetes in Finland (DiMe) Study Group.

Diabetes. 1995; 44:652-7.

## Références bibliographiques

Hyöty H.

Enterovirus infections and type 1 diabetes.

Ann Med. 2002; 34:138-47.

Hyypia T, Puhakka T, Ruuskanen O, Makela M, Arola A, Arstila P.

Molecular diagnosis of human rhinovirus infections: comparison with virus isolation.

J Clin Microbiol. 1998; 36:2081-2083.

Ida-Hosonuma M, Iwasaki T, Yoshikawa T, Nagata N, Sato Y, Sata T, Yoneyama M, Fujita T, Taya C, Yonekawa H, Koike S.

The alpha/beta interferon response controls tissue tropism and pathogenicity of poliovirus.

J Virol. 2005; 79:4460-9.

Inder SJ, Bobryshev YV, Cherian SM, Lord RS, Masuda K, Yutani C.

Accumulation of lymphocytes, dendritic cells, and granulocytes in the aortic wall affected by Takayasu's disease.

Angiology. 2000; 51:565-79.

Ion-Nedelcu N, Strebel PM, Toma F, Biberi-Moroceanu S, Combiescu M, Persu A, Aubert-Combiescu A, Plotkin SA, Sutter RW.

Sequential and combined use of inactivated and oral poliovirus vaccines: Dolj District, Romania, 1992-1994.

J Infect Dis. 1997; 175:S241-6.

Iturriza-Gómara M, Megson B, Gray J.

Molecular detection and characterization of human enteroviruses directly from clinical samples using RT-PCR and DNA sequencing.

J Med Virol. 2006; 78:243-53.

## Références bibliographiques

Jacobson SJ, Konings DA & Sarnow P.

Biochemical and genetic evidence for a pseudoknot structure at the 3' terminus of the poliovirus RNA genome and its role in viral RNA amplification.

J Virol. 1993; 67:2961-71.

Jacques J, Bouscambert-Duchamp M, Moret H, Carquin J, Brodard V, Lina B, Motte J, Andréoletti L.

Association of respiratory picornaviruses with acute bronchiolitis in French infants.

J Clin Virol. 2006; 35:463-6.

Jacques J, Moret H, Minette D, Lévêque N, Jovenin N, Deslée G, Lebargy F, Motte J, Andréoletti L.

Epidemiological, Molecular and Clinical Features of Enterovirus Respiratory Infections in French children between 1999 and 2005.

J Clin Microbiol. 2008; 46:206-13.

Jartti T, Lehtinen P, Vuorinen T, Osterback R, van den Hoogen B, Osterhaus AD, Ruuskanen O.

Respiratory picornaviruses and respiratory syncytial virus as causative agents of acute expiratory wheezing in children.

Emerg Infect Dis. 2004; 10:1095-101.

Johnson KL, Sarnow P.

Three poliovirus 2B mutants exhibit noncomplementable defects in viral RNA amplification and display dosage-dependent dominance over wild-type poliovirus.

J Virol. 1991; 65:4341-9.

Johnston SL, Pattemore PK, Sanderson G, Smith S, Lampe F, Josephs L, Symington P, O'Toole S, Myint SH, Tyrrell DA, et al.

Community study of role of viral infections in exacerbations of asthma in 9-11 year old children.

BMJ. 1995 13; 310:1225-9.

## Références bibliographiques

Junttila N, Leveque N, Kabue JP, Cartet G, Mushiya F, Muyembe-Tamfum JJ, Trompette A, Lina B, Magnius LO, Chomel JJ, Norder H.

New enteroviruses, EV-93 and EV-94, associated with acute flaccid paralysis in the Democratic Republic of the Congo.

J Med Virol. 2007; 79:393-400.

Kaplan NM, Dove W, Abd-Eldayem SA, Abu-Zeid AF, Shamooh HE, Hart CA.

Molecular epidemiology and disease severity of respiratory syncytial virus in relation to other potential pathogens in children hospitalized with acute respiratory infection in Jordan.

J Med Virol. 2008; 80:168-74.

Kameyoshi Y, Dorschner A, Mallet AI, Christopher E, Schroder JM.

Cytokine RANTES released by thrombin-stimulated platelets is a potent attractant for human eosinophils.

J Exp Med. 1992; 176:587-592.

Kares S, Lönnrot M, Vuorinen P, Oikarinen S, Taurianen S, Hyöty H.

Real-time PCR for rapid diagnosis of entero- and rhinovirus infections using LightCycler.

J Clin Virol. 2004; 29:99-104.

Kerr JR.

Enterovirus infection of the stomach in chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis.

J Clin Pathol. 2008; 61:1-2.

Khetsuriani N, Lamonte-Fowlkes A, Oberst S, Pallansch MA.

Enterovirus surveillance-United States, 1970-2005.

MMWR Surveill Summ 2006; 55:1-20

## Références bibliographiques

Khetsuriani, N., and U.D. Parashar.

Enteric viral infections.

In

Scientific American medicine

Eds.

Dale DC, Federman DD,

New York, NY: WebMD, Inc. 2003; 1758-66.

Kimata H, Yoshida A, Ishioka C, Fujimoto M, Lindley I, Furusho K.

RANTES and macrophage inflammatory protein 1a selectively enhance immunoglobulin (IgE) and IgG4 production by human B cells.

J Exp Med. 1996; 183:2397-2402.

King AM, Underwood BO, McCahon D, Newman JW, Brown F.

Biochemical identification of viruses causing the 1981 outbreaks of foot and mouth disease in the UK.

Nature, 1981; 293:479-480.

Kisch AL and KM Johson.

A plaque assay for respiratory syncytial virus.

Proc Soc Exp Biol Med. 1963; 112:583-9.

Kirkegaard K, Baltimore D.

The mechanism of RNA recombination in poliovirus.

Cell. 1986; 7;47:433-43.

Kitamura N, Semler BL, Rothberg PG, Larsen GR, Adler CJ, Dorner AJ, Emini EA, Hanecak R, Lee JJ, van der Werf S, Anderson CW, Wimmer E.

Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA.

Nature. 1981; 291:547-53.



## Références bibliographiques

Kliewer S, Dasgupta A.

An RNA polymerase II transcription factor inactivated in poliovirus-infected cells copurifies with transcription factor TFIID.

Mol Cell Biol. 1988; 8:3175-82.

Kobayashi K, Haruta T, Kubota M, Akiyoshi K, Suga T, Ito M.

Clinical spectrum in hospitalized children with echovirus type 13 infection.

Pediatr Int. 2005; 47:185-9.

Kok TW, Pryor T, Payne L.

Comparison of rhabdomyosarcoma, buffalo green monkey kidney epithelial, A549 (human lung epithelial) cells and human embryonic lung fibroblasts for isolation of enteroviruses from clinical samples.

J Clin Virol. 1998; 24; 11:61-5.

Konno S, Grindle KA, Lee WM, Schroth MK, Mosser AG, Brockman-Schneider RA, Busse WW, Gern JE.

Interferon-gamma enhances rhinovirus-induced RANTES secretion by airway epithelial cells.

Am J Respir Cell Mol Biol. 2002; 26:594-601.

Korpi-Steiner NL, Bates ME, Lee WM, Hall DJ, Bertics PJ.

Human rhinovirus induces robust IP-10 release by monocytic cells, which is independent of viral replication but linked to type I interferon receptor ligation and STAT1 activation.

J Leukoc Biol. 2006; 80:1364-74.

Kottaridi C, Bolanaki E, Markoulatos P.

Amplification of Echoviruses genomic regions by different RT-PCR protocols--a comparative study.

Mol Cell Probes. 2004; 18:263-9.

## Références bibliographiques

Kyriakopoulou Z, Kottaridi C, Dedepsidis E, Bolanaki E, Levidiotou-Stefanou S, Markoulatos P.

Molecular characterization of wild-type polioviruses isolated in Greece during the 1996 outbreak in Albania.

J. Clin. Microbiol. 2006; 44:1150-1152.

Lama J, Sanz MA, Carroscio L.

Genetic analysis of poliovirus protein 3AB abrogate its permeabilizing activity.

FEBS Lett. 1998; 367:5-11.

Lechner JF, Haugen A, McClendon IA, Pettis EW.

Clonal growth of normal adult human bronchial epithelial cells in a serum-free medium.

In Vitro. 1982; 18:633-42.

Lee CK, Wimmer E.

Proteolytic processing of poliovirus polyprotein: elimination of 2A pro-mediated, alternative cleavage of polypeptide 3CD by in vitro mutagenesis.

Virology. 1988; 166:405-14.

Legay F, Lévêque N, Gacouin A, Tattevin P, Bouet J, Thomas R, Chomel JJ.

Fatal coxsackievirus A-16 pneumonitis in adult.

Emerg Infect Dis. 2007; 13:1084-6.

Le Guyader F, Estes MK, Kopecka H, Le Cann P, Pommepeuy M.

Apport de la biologie moléculaire pour détecter les virus entériques humains dans les coquillages.

Virologie, 2000;4, 3, 241-247.

## Références bibliographiques

Leparc-Goffart I, Julien J, Fuchs F, Janatova I, Aymard M, Kopecka H.

Evidence of presence of poliovirus genomic sequences in cerebrospinal fluid from patients with postpolio syndrome.

J Clin Microbiol. 1996; 34:2023-6.

Leogrande G, Trombetti E.

On an epidemic episode of acute respiratory disease due to Echo-1 virus in a children's community.

Nuovi Ann Ig Microbiol. 1968; 19: Suppl:576-84.

Letuve S, Lajoie-Kadoch S, Audusseau S, Rothenberg ME, Fiset PO, Ludwig MS, Hamid Q.

IL-17E upregulates the expression of proinflammatory cytokines in lung fibroblasts.

J Allergy Clin Immunol. 2006; 117:590-6.

Li Y, Bourlet T, Andreoletti L, Mosnier JF, Peng T, Yang Y, Archard LC, Pozzetto B, Zhang H.

Enteroviral capsid protein VP1 is present in myocardial tissues from some patients with myocarditis or dilated cardiomyopathy.

Circulation. 2000; 101:231-4.

Lilly CM, Nakamura H, Kesselman H, Nagler-Anderson C, Asano K, Garcia-Zepeda EA, Rothenberg ME, Drazen JM, Luster AD.

Expression of eotaxin by human lung epithelial cells.

J. Clin. Invest. 1997; 99:1767-1773.

Lim KG, Wan HC, Bozza PT, Resnick MB, Wong DTW, Cruikshank WW, Kornfeld H, Center DM, Weller PF.

Human eosinophils elaborate the lymphocyte chemoattractants IL-16 (lymphocyte chemoattractant factor) and RANTES.

J.Immunol. 1996; 156:2566-2570.

## Références bibliographiques

Lin TY, Huang YC, Ning HC, Tsao KC.

Surveillance of respiratory viral infections among pediatric outpatients in northern Taiwan.

J Clin Virol. 2004; 30:81-5.

Lindberg AM, Andersson P, Savolainen C, Mulders MN, Hovi T.

Evolution of the genome of human enterovirus B: incongruence between phylogenies of the VP1 and 3CD regions indicates frequent recombination within the species.

J. Gen. Virol. 2003; 84:1223-1235.

Lipskaya GY, Muzychenko AR, Kutitova OK, Maslova SV, Equestre M, Drozdov SG, Bercoff RP, Agol VI.

Frequent isolation of intertypic poliovirus recombinants with serotype 2 specificity from vaccine-associated polio cases.

J Med Virol. 1991; 35:290-6.

Lukashev AN, Ivanova OE, Eremeeva TP, Gmyl LV.

Analysis of Echovirus 30 Isolates from Russia and New Independent States Reveals Frequent Recombination and Re-emergence of Ancient Lineages.

J Clin Microbiol. 2008; 46:665-70.

Lukashev AN, Lashkevich VA, Ivanova OE, Koroleva GA, Hinkkanen AE, Ilonen J.

Recombination in circulating Human enterovirus B: independent evolution of structural and non-structural genome regions.

J Gen Virol. 2005; 86:3281-90.

Lukashev AN, Lashkevich VA, Koroleva GA, Ilonen J, Hinkkanen AE.

Recombination in uveitis-causing enterovirus strains.

J. Gen. Virol. 2004; 85:463-470.

## Références bibliographiques

Lukashev AN, Lashkevich VA, Ivanova OE, Koroleva GA, Hinkkanen AE, Ilonen J.

Recombination in circulating enteroviruses.

J. Virol. 2003; 77:10423-10431.

Mackie PL.

The classification of viruses infecting the respiratory tract.

Paediatr Respir Rev. 2003; 4:84-90.

Malcolm E, Arruda E, Hayden FG, Kaiser L.

Clinical features of patients with acute respiratory illness and rhinovirus in their bronchoalveolar lavages.

J Clin Virol. 2001; 21:9-16.

Mammette A.

Virologie Médicale.

Collection AZAY, Presses Universitaires de Lyon. 2002.

Martin J, Samoilovich E, Dunn G, Lackenby A, Feldman E, Heath A, Svirchenvskaia E, Cooper G, Yermalovich M, Minor PD.

Isolation of an intertypic poliovirus capsid recombinant from a child with vaccine-associated paralytic poliomyelitis.

J. Virol. 2002; 76:10921-10928.

Martino T.A, Liu P, Petric P, Sole M.

Enteroviral myocarditis and dilated cardiomyopathy: a review of clinical and experimental studies.

In

Human enterovirus infections

Ed.

Rotbart HA.

Washington DC: ASM press, 1995: 291-351

## Références bibliographiques

Mateu MG.

Antibody recognition of picornaviruses and escape from neutralization: a structural view.

Virus Res. 1995; 38:1-24.

McCarthy PL, Klig JE, Kennedy WP, Kahn JS.

Fever without apparent source on clinical examination, lower respiratory infections in children, and enterovirus infections.

Curr Opin Pediatr. 2000; 12:77-95. Review.

McClelland A, de Bear J, Yost SC, Meyer AM, Marlor CW, Greve JM.

Identification of monoclonal antibody epitopes and critical residues for rhinovirus binding in domain 1 of intercellular adhesion molecule 1.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1991; 88:7993-7.

McKinney RE Jr, Katz SL, Wilfert CM.

Chronic enteroviral meningoencephalitis in agammaglobulinemic patients.

Rev Infect Dis. 1987; 9:334-56.

Meade RH, Chang TW.

Zoster-like eruption due to echovirus 6.

Am J Dis Child. 1979; 133:283-4.

Melchers WJ, Hoenderop JG, Bruins Slot HJ, Pleij CW, Pilipenko EV, Agol VI, Galama JM.

Kissing of the two predominant hairpin loops in the coxsackie B virus 3' untranslated region is the essential structural feature of the origin of replication required for negative-strand RNA synthesis.

J Virol. 1997; 71:686-96.

## Références bibliographiques

Melnick JL, Cockburn WC, Dalldorf G, et al.

Picornavirus group.

Virology. 1963; 19, 114-6.

Melnick JL, Metcalf TG.

Distribution of viruses in the water environment,

In

Genetically altered viruses and the environment.

Eds.

Fields B et al.

New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1985, 95-102

Melnick JL, Schmidt NJ, Hampil B, Ho HH.

Lyophilized combination pools of enterovirus equine antisera: preparation and test procedures for the identification of field strains of 19 group A coxsackievirus serotypes.

Intervirology 1977; 4:172-81.

Melnick JL.

Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses and newer enteroviruses.

In

Fields,

Eds.

B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M., et al.

Virology, Raven Press, second edition, 1996; 549-605.

Mendelsohn CL, Wimmer E, Racaniello VR.

Cellular receptor for poliovirus: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily.

Cell. 1989; 56:855-65.

## Références bibliographiques

Minor P, Brown F, Domingo E, et al.

Picornaviridae.

In

Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. Sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.

eds.

Murphy, F.A., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., et al.

New-York: Springer-Verlag. 1995; 329-36.

Minor PD, John A, Ferguson M, Icenogle JP.

Antigenic and molecular evolution of the vaccine strain of type 3 poliovirus during the period of excretion by a primary vaccinee.

J Gen Virol. 1986; 67:693-706.

Minor PD.

Polio eradication, cessation of vaccination and re-emergence of disease.

Nat Rev Microbiol. 2004; 2:473-82.

Mirand A, Henquell C, Archimbaud C, Peigue-Lafeuille H, Bailly JL.

Emergence of recent echovirus 30 lineages is marked by serial genetic recombination events.

J. Gen. Virol. 2007; 88:166-176.

Mirmomeni MH, Hughes PJ, Stanway G.

An RNA tertiary structure in the 3' untranslated region of enteroviruses is necessary for efficient replication.

J Virol. 1997; 71:2363-70.

Molla A, Paul AV, Schmid M, et al.

Studies on dicistronic polioviruses implicate viral proteinase 2A pro in RNA replication.

Virology. 1993; 196:739-47.



## Références bibliographiques

Monto AS, Fendrick AM, Sarnes MW.

Respiratory illness caused by picornavirus infection: a review of clinical outcomes.

Clin Ther. 2001; 23:1615-27.

Moqbel, R.

Eosinophil-Derived Cytokines in Allergic Inflammation and Asthma.

Ann. N. Y. Acad. Sci. 1996; 796:209-217

Morens DM, Pallansch MA.

Epidemiology.

In

Human enterovirus infection.

eds.

Rotbard, H.A.

Washington, American Society for Microbiology, 1995; pp 3-23.

Muir P.

Enteroviruses and heart disease.

Br J Biomed Sci. 1993; 50:258-71.

Nakayama T, Urano T, Osano M, Hayashi Y, Sekine S, Ando T, Makinom S.

Outbreak of herpangina associated with Coxsackievirus B3 infection.

Pediatr Infect Dis J. 1989; 8:495-8.

Nasri D, Bouslama L, Omar S, Saoudin H, Bourlet T, Aouni M, Pozzetto B, Pillet S.

Typing of human enterovirus by partial sequencing of VP2.

J Clin Microbiol. 2007a; 45:2370-9.

## Références bibliographiques

Nasri D, Bouslama L, Pillet S, Bourlet T, Aouni M, Pozzetto B.

Basic rationale, current methods and future directions for molecular typing of human enterovirus.

Expert Rev Mol Diagn. 2007b; 7:419-34.

Nei, M., and S. Kumar.

Molecular evolution and phylogenetics.

New York ,Oxford University press. 2000; ISBN13: 978-0-19-513585-5.

Nelson PJ, Kim HT, Manning WC, Goralski TJ, Krensky AM.

Genomic organization and transcriptional regulation of the RANTES chemokine gene.

J. Immunol. 1993; 151:2601-2612.

Neufeld KL, Richards OC, Ehrenfeld E.

Purification, characterization, and comparison of poliovirus RNA polymerase from native and recombinant sources.

J Biol Chem. 1991; 266:24212-9.

Newcomb DC, Sajjan US, Nagarkar DR, Goldsmith AM, Bentley JK, Hershenson MB.

Cooperative effects of rhinovirus and TNF- $\alpha$  on airway epithelial cell chemokine expression.

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2007; 293:L1021-8.

Nijhuis M, van Maarseveen N, Schuurman R, Verkuijlen S, de Vos M, Hendriksen K, van Loon AM.

Rapid and sensitive routine detection of all members of the genus enterovirus in different clinical specimens by real-time PCR.

J Clin Microbiol. 2002; 40:3666-70.

## Références bibliographiques

Nix WA, Oberste MS, Pallansch MA,.

Sensitive, semi-nested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens.

J. Clin. Microbiol. 2006; 44:2698–2704.

Nokso-Koivisto J, Kinnari TJ, Lindalh P, Hovi T, Pitkäranta A.

Human picornavirus and coronavirus RNA in nasopharynx of children without concurrent respiratory symptoms.

J Med Virol 2002; 66:417-420.

Nomoto A, Kitamura N, Golini F, Wimmer E.

The 5'-terminal structures of poliovirion RNA and poliovirus mRNA differ only in the genome-linked protein VPg.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1977; 74:5345-9.

Norder H, Bjerregaard L, Magnius LO.

Homotypic echoviruses share aminoterminal VP1 sequence homology applicable for typing.

J Med Virol. 2001; 63:35-44.

Norder H., Bjerregaard L., Magnius LO., Lina B., Aymard M., Chomel, J.-J.

Sequencing of 'untypable' enteroviruses reveals two new types, EV-77 and EV-78, within human enterovirus type B and substitutions in the BC loop of the VP1 protein for known types.

J. Gen. Virol. 2003; 84:827-836.

Novak JE, Kirkegaard K.

Improved method for detecting poliovirus negative strands used to demonstrate specificity of positive-strand encapsidation and the ratio of positive to negative strands in infected cells.

J Virol. 1991; 65:3384-7.

## Références bibliographiques

Nsaibia S, Wagner S, Rondé P, Warter JM, Poindron P, Aouni M, Dorchies OM.

The difficult-to-cultivate coxsackieviruses A can productively multiply in primary culture of mouse skeletal muscle.

Virus Res. 2007; 123:30-9.

Oberste MS, Maher K, Pallansch MA.

Molecular phylogeny of all human enterovirus serotypes based on comparison of sequences at the 5' end of the region encoding VP2.

Virus Res. 1998; 58:35-43.

Oberste M, Schnurr D, Maher K, al-Busaidy S, Pallansch M.

Molecular identification of new picornaviruses and characterization of a proposed enterovirus 73 serotype.

J. Gen. Virol. 2001; 82:409-416.

Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Pallansch MA.

Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification.

J Virol. 1999a; 73:1941-8.

Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Flemister MR, Brown BA, Pallansch MA.

Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1.

J Clin Microbiol. 1999b; 37:1288-93.

Oberste MS, Maher K, Michele SM, Belliot G, Uddin M, Pallansch MA.

Enteroviruses 76, 89, 90 and 91 represent a novel group within the species Human enterovirus A.

J Gen Virol. 2005; 86:445-51.

## Références bibliographiques

Oberste MS, Michele SM, Maher K, Schnurr D, Cisterna D, Junttila N, Uddin M, Chomel JJ, Lau CS, Ridha W, al-Busaïdy S, Norder H, Magnus LO, Pallansch MA.

Molecular identification and characterization of two proposed new enterovirus serotypes, EV74 and EV75.

J Gen Virol. 2004a; 85:3205-12.

Oberste MS, Maher K, Schnurr D, Flemister MR, Lovchik JC, Peters H, Sessions W, Kirk C, Chatterjee N, Fuller S, Hanauer JM, Pallansch MA.

Enterovirus 68 is associated with respiratory illness and shares biological features with both the enteroviruses and the rhinoviruses.

J Gen Virol 2004b; 85:2577-84.

Oberste MS, Peñaranda S, Pallansch MA.

RNA recombination plays a major role in genomic change during circulation of coxsackie B viruses.

J Virol. 2004c; 78:2948-55.

Oberste MS, Maher K, Flemister MR, Marchetti G, Kilpatrick DR, Pallansch MA.

Comparison of classic and molecular approaches for the identification of untypeable enteroviruses.

J. Clin. Microbiol. 2000; 38:1170-1174.

Oberste MS, Nix WA, Maher K, Pallansch MA.

Improved molecular identification of enteroviruses by RT-PCR and amplicon sequencing.

J. Clin. Virol. 2003; 26:375-377.

Oberste MS, Maher K, Williams AJ, Dybdahl-Sissoko N, Brown BA, Gookin MS, Peñaranda S, Mishrik N, Uddin M, Pallansch MA.

Species-specific RT-PCR amplification of human enteroviruses: a tool for rapid species identification of uncharacterized enteroviruses.

J Gen Virol. 2006; 87:119-28.

## Références bibliographiques

Oberste MS, Maher K, Nix WA, Michele SM, Uddin M, Schnurr D, Al-Busaidy S, Akoua-Koffi C, Pallansch MA.

Molecular identification of 13 new enterovirus types, EV79-88, EV97, and EV100-101, members of the species Human Enterovirus B.

Virus Res. 2007; 128:34-42.

Oh JW, Lee HB, Park IK, Kang JO.

Interleukin-6, interleukin-8, interleukin-11, and interferon- levels in nasopharyngeal aspirates from wheezing children with respiratory syncytial virus or influenza A virus infection.

Pediatr Allergy Immunol. 2002; 13:350-356.

Ohman T, King SL, Krithivas A, Cunningham J, Dickeson SK, Santoro SA, Bergelson JM.

Echoviruses 1 and 8 are closely related genetically, and bind to similar determinants within the VLA-2 I domain.

Virus Res. 2001; 76:1-8.

Olszewska-Pazdrak B, Casola A, Saito T, Alam R, Crowe SE, Mei F, Ogra PL, Garofalo RP.

Cell-specific expression of RANTES, MCP-1, and MIP-1alpha by lower airway epithelial cells and eosinophils infected with respiratory syncytial virus.

J Virol. 1998; 72:4756-64.

Oprisan, G., M. Combiescu, S. Guillot, V. Caro, A. Combiescu, F. Delpeyroux, and R. Crainic.

Natural genetic recombination between co-circulating heterotypic enteroviruses.

J. Gen. Virol. 2002; 83:2193-2200.

Palacios G, Oberste MS.

Enteroviruses as agents of emerging infectious diseases.

J Neurovirol. 2005; 11:424-33.

## Références bibliographiques

Pallansch MA &Roos R.

Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackiviruses, Echoviruses, and newer enterovirus.

In

Fields Virology, 5th ed, vol. 1.

Eds.

D. M. Knipe and P. M. Howley

Philadelphia, Pa, Lippincott Williams and Wilkins. 2007; 839-893.

Papadopoulos NG, Moustaki M, Tsolia M, Bossios A, Astra E, Prezerakou A, Gourgiotis D, Kafetzis D.

Association of rhinovirus infection with increased disease severity in acute bronchiolitis.

Am J Respir Crit Care Med. 2002; 165:1285-9.

Pariante N, Airaksinen A, Domingo E.

Mutagenesis versus inhibition in the efficiency of extinction of foot-and-mouth disease virus.

J Virol 2003; 77:7131-8.

Pariante N, Sierra S, Lowenstein PR, Domingo E.

Efficient virus extinction by combinations of a mutagen and antiviral inhibitors.

J Virol 2001; 75:9723-30.

Paul AV, van Boom JH, Filippov D, Wimmer E.

Protein-primed RNA synthesis by purified poliovirus RNA polymerase.

Nature. 1998; 393:280-284.

Peck AJ, Holman RC, Curns AT, Lingappa JR, Cheek JE, Singleton RJ, Carver K, Anderson LJ.

Lower respiratory tract infections among American Indian and Alaska Native children and the general population of U.S. children.

Pediatr Infect Dis J. 2005; 24:342-51.

## Références bibliographiques

Pelletier J, Sonenberg N.

Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from the poliovirus RNA.

Nature. 1988; 334:320-5.

Pfeiffer JK, Kirkegaard K.

A single mutation in poliovirus RNA-dependent RNA polymerase confers resistance to mutagenic nucleotide analogs via increased fidelity.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 10; 100:7289-94.

Pfeiffer JK, Kirkegaard K.

Increased fidelity reduces poliovirus fitness and virulence under selective pressure in mice.

PLoS Pathog. 2005;1:e11

Pierangeli A, Bucci M, Pagnotti P, et al.

Mutational analysis of the 3'-terminal extra-cistronic region of poliovirus RNA: secondary structure is not only requirement for minus strand RNA replication.

FEBS Lett. 1995; 374:327-32.

Pilipenko EV, Poperechny KV, Maslova SV, et al.

Cis-element, oriR, involved in the initiation of (-) strand poliovirus RNA : a quasi-globular multi-domain RNA structure maintained by tertiary "kissing" interactions.

EMBO J. 1996; 15:5428-36.

Pizzichini MM, Pizzichini E, Efthimiadis A, Chauhan AJ, Johnston SL, Hussack P, Mahony J, Dolovich J, Hargreave FE.

Asthma and natural colds. Inflammatory indices in induced sputum: a feasibility study.

Am J Respir Crit Care Med. 1998; 158:1178-84.



## Références bibliographiques

Porres ER, Werthammer J, Moss N, Bernstein JM, Belshe RB.

Fatal coxsackievirus B4 infection in a neonate.

Southern Med J. 1985; 78:1254-6.

Porter AG.

Picornavirus non structural proteins: emerging roles in virus replication and inhibition of host cell functions.

J Virol. 1993; 69:7169-79.

Prabhakar BS, Haspel MV, McClintock PR, Notkins AL.

High frequency of antigenic variants among naturally occurring human Coxsackie B4 virus isolates identified by monoclonal antibodies.

Nature. 1982 25; 300:374-6.

Racaniello VR.

Picornaviridae: the viruses and their replication.

In

Fields Virology, 5th ed, vol. 1

Eds

D. M. Knipe and P. M. Howley.

Philadelphia, Pa, Lippincott Williams and Wilkins,. 2007; 795-838.

Rakes GP, Aruda E, Ingram JM, Hoover GE, Zambrano JC, Hayden, FG.

Rhinovirus and respiratory syncytial virus in wheezing children requiring emergency care. IgE and eosinophils analysis.

Am J of Crit Care Med 1999; 159:785-90.

Rakoto-Andrianarivelo M, Rousset D, Razafindratsimandresy R, Chevaliez S, Guillot S, Balanant J, Delpeyroux F.

High frequency of human enterovirus species C circulation in Madagascar.

J Clin Microbiol. 2005; 43:242-9.

## Références bibliographiques

Ravits J.

Sporadic amyotrophic lateral sclerosis: a hypothesis of persistent (non-lytic) enteroviral infection.

Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord. 2005; 6:77-87.

Rawlinson WD, Waliuzzaman Z, Carter IW, Belessis YC, Gilbert KM, Morton JR.

Asthma exacerbations in children associated with rhinovirus but not human metapneumovirus infection.

J Infect Dis 2003 15; 187:1314-8.

Ray CG, Plexico KL, Wenner HA, Chin TD.

Acute respiratory illness associated with Coxsackie B4 virus in children.

Pediatrics. 1967; 39:220-6.

Reddel, R.R., K. Yang, J.S. Rhim, D. Brash, R.T. Su, J. F. Lechner, B.I. Gerwin, C.C. Harris, and P. Amstad.

1989. Immortalized human bronchial epithelial mesothelial cell lines. US Patent 4,885,238 dated Dec 5

Reetoo KN, Osman SA, Illavia SJ, Cameron-Wilson CL, Banatvala JE, Muir P.

Quantitative analysis of viral RNA kinetics in coxsackievirus B3-induced murine myocarditis: biphasic pattern of clearance following acute infection, with persistence of residual viral RNA throughout and beyond the inflammatory phase of disease.

J Gen Virol. 2000; 81:2755-62.

Resnick MB, and PF Weller.

Mechanisms of eosinophil recruitment.

Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 1993; 8:349-355.

## Références bibliographiques

Rohll JB, Percy N, Ley R, et al.

The 5'-untranslated regions of picornavirus RNAs contain independent functional domains essential for RNA replication and translation.

J Virol. 1994; 65:4735-40.

Rombaut B, Vrijnsen R, Boeyé A.

New evidence for the precursor role of 14 S subunits in poliovirus morphogenesis.

Virology. 1990; 177:411-4.

Rotbart HA, Kirkegaard.

Picornavirus pathogenesis: viral access, attachment and entry into susceptible cells. Sem

Virol. 1992; 3:483-499.

Rotbart, H.A.

Meningitis and encephalitis.

In

Enterovirus infections.

Eds

Rotbart, H.A.

Washington, American Society for Microbiology. 1995; 271-289.

Rotbart HA.

Viral meningitis and the aseptic meningitis syndrome.

In

Infections of the central nervous system.

Eds

Scheld WM, Withley RJ, Durack TD.

Philadelphia. Lippincott-Raven, 1997 : 23-46

## Références bibliographiques

Rousset D, Rakoto-Andrianarivelo M, Razafindratsimandresy R, Randriamanalina B, Guillot S, Balanant J, Maucière P, Delpeyroux F.

Recombinant vaccine-derived poliovirus in Madagascar.

Emerg Infect Dis. 2003; 9:885-7.

Rowlands DJ, Clarke BE, Carroll AR, Brown F, Nicholson BH, Bittle JL, Houghten RA, Lerner RA.

Chemical basis of antigenic variation in foot-and-mouth disease virus.

Nature, 1983; 306:694-697.

Rubinstein SJ, Hammerle T, Wimmer E, et al.

Infection of Hela cells with poliovirus results in modification of a complex that binds the rRNA promoter.

J Virol, 1992; 66:3062-68.

Rueckert RR.

Picornaviridae: the viruses and their replication.

In

Fundamental virology, third edition.

Eds

Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, R.M., et al.

Philadelphia, Lipincott-Raven publishers. 1996; 609-654.

Saitou, N., and M. Nei.

The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees.

Mol Biol Evol. 1987; 4:406-25.

Salako MA, Carter MJ, Kass GE.

Coxsackievirus protein 2BC blocks host cell apoptosis by inhibiting caspase-3.

J Biol Chem. 2006 16; 281:16296-304.

## Références bibliographiques

Sanders SP, Siekierski ES, Porter JD, Richards SM, Proud D.

Nitric oxide inhibits rhinovirus-induced cytokine production and viral replication in a human respiratory epithelial cell line.

J Virol. 1998; 72:934-42.

Sanders SP, Kim J, Connolly KR, Porter JD, Siekierski ES, Proud D.

Nitric oxide inhibits rhinovirus-induced granulocyte macrophage colony-stimulating factor production in bronchial epithelial cells.

Am J Respir Cell Mol Biol. 2001; 24:317-25

Sandoval IV & Carosco L.

Poliovirus infection and expression of the poliovirus protein 2B provoke the disassembly of the Golgi complex, the organelle target for the antipoliovirus drug Ro-090179.

J Virol. 1997; 71:4679-93.

Santi J, Hyypia T, Kinnunen L, Salminen M.

Evidence of recombination among enteroviruses.

J. Virol. 1999; 73:8741-8749.

Sarnow P.

Role of the 3'-end sequences in infectivity of poliovirus transcripts made in vitro.

J Virol. 1989; 63:467-70.

Schiff GM, and JR Sherwood.

Clinical activity of pleconaril in an experimentally induced coxsackievirus A21 respiratory infection.

J Infect Dis. 2000; 181:20-6.

Schroth MK, Grimm E, Frindt P, Galagan DM, Konno SI, Love R, Gern JE.

Rhinovirus replication causes RANTES production in primary bronchial epithelial cells.

Am J Respir Cell Mol Biol. 1999; 20:1220-8.

## Références bibliographiques

Seme K, Mocilnik T, Komlos KF, Doplihar A, Persing DH, Poljak M.

GeneXpert Enterovirus assay: one-year experience in a routine laboratory setting and evaluation on three proficiency panels.

J. Clin. Microbiol. 2008. doi:10.1128/JCM.01694-07

Seth P, Fitzgerald DJ, Willingham MC, Pastan I.

Role of a low-pH environment in adenovirus enhancement of the toxicity of a *Pseudomonas* exotoxin-epidermal growth factor conjugate.

J Virol. 1984; 51:650-5.

Shafren DR, Au GG, Nguyen T, Newcombe NG, Haley ES, Beagley L, Johansson ES, Hersey P, Barry RD.

Systemic therapy of malignant human melanoma tumors by a common cold-producing enterovirus, coxsackievirus a21.

Clin Cancer Res. 2004; 1; 10:53-60.

Sigurs N, Bjarnason R, Sigurbergsson F, Kjellman B, Bjorksten B.

Asthma and immunoglobulin-E antibodies after respiratory syncytial virus bronchiolitis: a prospective cohort study with matched controls.

Pediatrics 1995; 95:500-505.

Simmonds P and J Welch.

Frequency and dynamics of recombination within different species of human enteroviruses.

J Virol. 2006; 80:483-93.

Skinner MA, Racaniello VR, dunn, G. et al.

New model for the secondary structure of the 5'non-coding RNA of poliovirus is supported by biochemical and genetic data that also show that RNA secondary structure is important in neurovirulence.

J Mol Biol. 1989; 207:379-92.

## Références bibliographiques

Smyth RL, and PJ Openshaw.

Bronchiolitis.

Lancet. 2006; 368: 312-322.

Sobrinho F., Saiz M., Jimenez-Clavero M. A., Nunez J. I., Rosas M. F., Baranowski E., Ley V.

Footand-mouth disease virus: a long known virus, but a current threat.

Vet. Res., 2001; 32:1-30.

Sousa AR, Lane SJ, Nakhosteen JA, Yoshimura T, Lee TH, Poston RN.

Increased expression of the monocyte chemoattractant protein-1 in bronchial tissue from asthmatic subjects.

Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 1994; 10:142-147.

Spurrell JC, Wiehler S, Zaheer RS, Sanders SP, Proud D.

Human airway epithelial cells produce IP-10 (CXCL10) in vitro and in vivo upon rhinovirus infection.

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2005; 289:L85-95.

Standiford TJ, Kunkel SL, Basha MA, Chensue SW, Lynch JP.3rd, Toews GB, Westwick J, Strieter RM.

Interleukin-8 gene expression by pulmonary epithelial cell line: a model for cytokine networks in the lung.

J. Clin. Invest. 1990; 86:1945-1953.

Standiford TJ, Kunkel SL, Phan SH, Rollins BJ, Strieter RM.

Alveolar macrophage-derived cytokines induce monocyte chemoattractant protein expression from human pulmonary type II-like epithelial cells.

J. Biol. Chem. 1991. 266:9912-9918.

## Références bibliographiques

Stanway G, Brown F, Christian P, Hovi T, Hyypiä T, King AMQ, Knowles NJ, Lemon S.M., Minor P.D., Pallansch M.A., Palmenberg A.C., Skern T.

Picornaviridae.

In

Virus Taxonomy. Eighth report of the international committee on the taxonomy of viruses.

Eds

Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A.

Amsterdam, Elsevier Academic Press, 2005 pp. 757-778.

Staunton DE, Merluzzi VJ, Rothlein R, Barton R, Marlin SD, Springer TA.

A cell adhesion molecule, ICAM-1, is the major surface receptor for rhinoviruses.

Cell. 1989; 56:849-53.

Stellato C, Beck LA, Gorgone GA, Proud D, Schall TJ, Ono SJ, Lichtenstein LM, Schleimer RP.

Expression of the chemokine RANTES by a human bronchial epithelial cell line. Modulation by cytokines and glucocorticoids.

J. Immunol. 1995; 155:410-418.

Storch GA.

Respiratory infections.

In

Essentials of Diagnostic Virology,

New York, Churchill-Livingstone, 1999. p:61-63

Strikas RA, Anderson L, Parker RA.

Temporal and geographic patterns of isolates of nonpolio enteroviruses in the United States, 1970-1983.

J Infect Dis. 1986; 153:346-51.



## Références bibliographiques

Svitkin YV, Maslova SV & Agol VLI.

The genomes of attenuated and virulent poliovirus strains differ in their in vitro translation efficiency.

Virology. 1985; 147:243-52.

Taboga O, Tami C, Carrillo E, Nunez JI, Rodriguez A, Saiz JC, Blanco E, Valero ML, Roig X, Camarero JA, Andreu D, Mateu MG, Giralt E, Domingo E, Sobrino F, Palma ELA.

Large-scale evaluation of peptide vaccines against foot-and-mouth disease: lack of solid protection in cattle and isolation of escape mutants.

J. Virol., 1997; 71: 2606-2614.

Takeda N, Sakae K, Agboatwalla M, Isomura S, Hondo R, Inouye S.

Differentiation between wild and vaccine-derived strains of poliovirus by stringent microplate hybridization of PCR products.

J Clin Microbiol. 1994; 32:202-4.

Taub DD, Ortaldo JR, Turcovski-Corrales SM, Key ML, Longo DL, Murphy WJ.

$\beta$ chemokines costimulate lymphocyte cytotoxic proliferation and lymphokine production.

J. Leukocyte Biol. 1996. 59: 81-89.

Taub DD, Sayers TJ, Carter CR, Ortaldo JR.

$\alpha$  and  $\beta$  chemokines induce NK cell migration and enhance NK cell cytotoxicity.

J. Immunol. 1995; 155:3877-3888

Teran LM, Seminario MC, Shute JK, Papi A, Compton SJ, Low JL, Gleich GJ, Johnston SL.

RANTES, macrophage-inhibitory protein 1 $\beta$ , and the eosinophil product major basic protein are released into upper respiratory secretions during virus-induced asthma exacerbations in children.

J Infect Dis. 1999; 179:677-681.

## Références bibliographiques

Teran LM, Noso N, Carroll M.

Eosinophil recruitment following allergen challenge is associated with the release of the chemokine RANTES into asthmatic airways.

J. Immunol. 1996; 157:1806-1812.

Theamboonlers A, Samransamruajkit R, Thongme C, Amonsin A, Chongsrisawat V, Poovorawan Y.

Human coronavirus infection among children with acute lower respiratory tract infection in Thailand.

Intervirology. 2007; 50:71-7.

Tosteson MT, Chow M.

Characterization of the ion channels formed by poliovirus in planar lipid membranes.

J Virol. 1997; 71:507-11.

Toyoda H, Kohara M, Kataoka Y, Suganuma T, Omata T, Imura N, Nomoto A.

Complete nucleotide sequences of all three poliovirus serotype genomes. Implication for genetic relationship, gene function and antigenic determinants.

J Mol Biol. 1984; 174:561-85.

Vabret A, Dina J, Gouarin S, Petitjean J, Tripey V, Brouard J, Freymuth F.

Human (non-severe acute respiratory syndrome) coronavirus infections in hospitalised children in France.

J Paediatr Child Health. 2007. doi: 10.1111/j.1440-1754.2007.01246.

Van Benten IJ, KleinJan A, Neijens HJ, Osterhaus AD, Fokkens WJ.

Prolonged nasal eosinophilia in allergic patients after common cold.

Allergy. 2001; 56:949-56.

## Références bibliographiques

Van Kuppeveld FJ, Hoenderop JGJ, Smeets RLL, et al.

Coxsackievirus protein 2B modifies endoplasmic reticulum membrane and plasma membrane permeability and facilitates virus release.

EMBO J. 1997; 16:3519-32.

Vignuzzi M, Stone JK, Arnold JJ, Cameron CE, Andino R.

Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population.

Nature. 2006 19; 439:344-8.

Viskari HR, Roivainen M, Reunanen A, Pitkaniemi J, Sadeharju K, Koskela P, Hovi T, Leinikki P, Vilja P, Tuomilehto J, Hyöty H.

Maternal first-trimester enterovirus infection and future risk of type 1 diabetes in the exposed fetus.

Diabetes. 2002; 51:2568-71.

Wang H, Yi T, Zheng Y, He S.

Induction of monocyte chemoattractant protein-1 release from A549 cells by agonists of protease-activated receptor-1 and -2.

Eur J Cell Biol. 2007; 86:233-42.

Ward CD, Flanagan JB.

Determination of the poliovirus RNA polymerase error frequency at eight sites in the viral genome.

J Virol. 1992; 66:3784-93.

Wiehler S, Proud D.

Interleukin-17A modulates human airway epithelial responses to human rhinovirus infection.

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2007; 293:L505-15.

## Références bibliographiques

Wilson CW, Stevenson DK, Arvin AM.

A concurrent epidemic of respiratory syncytial virus and echovirus 7 infections in an intensive care nursery.

Pediatr Infect Dis J. 1989; 8:24-9.

Wimalasundera SS, Katz DR, Chain BM.

Characterization of the T cell response to human rhinovirus in children: implications for understanding the immunopathology of the common cold.

J Infect Dis. 1997; 176:755-9

Wimmer E, Hellen CU, Cao X.

Genetics of poliovirus.

Ann Rev Gen. 1993; 27:353-436.

Wong CK, Wang CB, Ip WK, Tian YP, Lam CW.

Role of p38 MAPK and NF-kB for chemokine release in coculture of human eosinophils and bronchial epithelial cells.

Clin Exp Immunol. 2005; 139:90-100.

Xiang W, Harris KS, Alexander L, Wimmer E.

Interaction between the 5'-terminal cloverleaf and 3AB/3CDpro of poliovirus is essential for RNA replication.

J Virol. 1995; 69:3658-67.

Xiang W, Paul AV, Wimmer E.

RNA signals in Enterovirus and Rhinovirus genome replication.

Sem Virol. 1997; 8:256-73.

Yang CF, Chen HY, Jorba J, Sun HC, Yang SJ, Lee HC, Huang YC, Lin TY, Chen PJ, Shimizu H, Nishimura Y, Utama A, Pallansch M, Miyamura T, Kew O, Yang JY.

Intratypic recombination among lineages of type 1 vaccine-derived poliovirus emerging during chronic infection of an immunodeficient patient.

J. Virol. 2005; 79:12623-12634.

## Références bibliographiques

Yin H, Berg AK, Tuvemo T, Frisk G.

Enterovirus RNA is found in peripheral blood mononuclear cells in a majority of type 1 diabetic children at onset.

Diabetes. 2002; 51:1964-71.

Ying S, Meng Q, Taborda-Barata L, Corrigan CJ, Barkans J, Assoufi B, Moqbel R, Durham SR, Kay AB.

Human eosinophils express messenger RNA encoding RANTES and store and release biologically active RANTES protein.

Eur J Immunol. 1996; 26:70-76.

Ypma-Wong MF, Dewalt PG, Jonhson VH, et al.

Protein 3CD is the major poliovirus proteinase responsible for cleavage of the P1 capsid precursor.

Virology. 1998; 66:265-70.

Zhang G, Wilsden G, Knowles NJ, McCauley JW.

Complete nucleotide sequence of a coxsackie B5 virus and its relationship to swine vesicular disease virus.

J Gen Virol. 1993; 74:845-53.

Zhu Z., Tang W, Gwaltney JM Jr, Wu Y, Elias JA.

Rhinovirus stimulation of interleukin-8 in vivo and in vitro: role of NF-kappaB.

Am J Physiol. 1997; 273:L814-24.

Zoll GJ, Melchers WJ, Kopecka H, Jambroes G, van der Poel HJ, Galama JM.

General primer-mediated polymerase chain reaction for detection of enteroviruses: application for diagnostic routine and persistent infections.

J Clin Microbiol. 1992; 30:160-5.

*ANNEXES*

**ANNEXE 1 :**

**“AUTRES TRAVAUX CONCERNANT LES INFECTIONS À ENTÉROVIRUS  
PUBLIÉS PAR LE CANDIDAT”**

**ANNEXE 2 :**

**“ PROJET DE RECHERCHE POST DOCTORAL SUR LES INFECTIONS  
RESPIRATOIRES PAR LES ENTÉROVIRUS HUMAINS ”**



**Abstract:**

Enteroviruses (EV) (*Picornaviridae*) are among the most common viruses infecting human beings worldwide. These viral agents are associated with a wide range of human pathologies, including upper respiratory but also lower respiratory tract infections resulting in bronchitis, pneumonia or bronchiolitis in adults or in infants.

In the first study, we assessed the potential role of the respiratory picornaviruses as causative agents of bronchiolitis in 192 infants  $\leq 36$  months of age and hospitalized for acute bronchiolitis. The detection of common respiratory viruses (respiratory syncytial virus, influenza virus A and B, parainfluenza virus I, II, III, and adenovirus) was performed using classical immunofluorescence antigens and cell culture detection assays in nasopharyngeal aspirates whereas the detection of human metapneumovirus (HMPV) rhinoviruses and enteroviruses was performed by molecular techniques. A potential causative virus was detected in 72.5 % of the 192 study infants. RSV (30%), rhinovirus (21%), enterovirus (9%), influenza virus A (6%) and human metapneumovirus (4%) were the most frequent causative agents detected. Rhinoviruses or enteroviruses were detected as the only evidence of respiratory viral tract infection in 57 (30%) of 192 infants, whereas rhinovirus or enterovirus occurred in mixed viral infection detected in 25 (13%) of 192 study cases (30 vs. 13%,  $p < 10^{-3}$ ). Our data suggest that respiratory picornaviruses are one of the leading etiological causes of bronchiolitis in French infants.

In the second part our investigations, we analysed 252 EV-related infection cases (median age, 5.1 years) diagnosed among 11,509 consecutive children visiting emergency departments within a 7-year period in the North of France. EV strains were isolated from nasopharyngeal samples by viral cell culture, identified by seroneutralization assay and genetically compared by partial amplification and sequencing of the VP1 gene. The respiratory syndromes (79 (31%) of 252 EV infections) appeared as the second more frequent EV induced paediatric pathologies after meningitis (111 (44%) of 252 cases) (44 vs. 31%,  $P < 10^{-3}$ ), contributing to lower respiratory tract infection (LRTI) in 43 (54%) of 79 EV respiratory infection cases. Bronchiolitis was the most frequent EV induced LRTI (34 (43%) of 79 cases,  $P < 10^{-3}$ ) occurring more often in infants aged 1-12 months ( $P = 0.0002$ ) with spring-fall seasonality. Viruses ECHO 11, 6 and 13 were the more frequently identified respiratory strains (24, 13 and 11%, respectively). The VP1 gene phylogenetic analysis showed the concomitant or successive circulation of genetically distinct EV respiratory strains (species A or B) during the same month or annual epidemic period. Our findings indicated that respiratory tract infections accounted for appreciatively 30% of EV-induced paediatric pathologies, contributing to LRTIs in 54% of these cases. Moreover, the concomitant or successive circulation of genetically distinct EV strains indicated the possibility of paediatric repeated respiratory infections within the same epidemic season.

To identify the mechanisms that can regulate the development of airway mucosa inflammation during EV respiratory lower tract infection, we investigated the production of chemokines by EV-infected bronchial epithelial cells. Cultures of primary human small airway epithelial cell (SAEC) were infected by wild-type respiratory EV strains, demonstrating a replicative and productive infection by Coxsackievirus B5 and Echovirus 30 strains. Exposure of SAEC to gamma interferon ( $\text{INF-}\gamma$ ), in combination with Coxsackievirus B5 and Echovirus 30 infection, induced a significant increase in RANTES production that was synergistic with respect to that obtained by EV-infection or  $\text{INF-}\gamma$  treatment alone. We observed that the replicative infection of the SAEC by Coxsackievirus B5 and Echovirus 30 wild-type viruses induced dose and time-dependent increases in mRNA and protein secretion for RANTES, MCP-1 and IL-8. The protein secretion of these chemokines appeared to be significantly increased at 48 or 72 hours post-infection in cultures treated by low-doses of  $\text{INF-}\gamma$  comparatively to mock-infected cells ( $P < 0.001$ ), and was correlated to the viral replication activity. SAEC-derived chemokines exhibited a strong chemotactic activity for normal human blood eosinophils. Furthermore, we observed an EV productive infection in eosinophils, which specifically released significant levels of RANTES and MCP-1, 24 hours post-infection. Therefore, the inflammatory process in EV-induced bronchiolitis appears to be triggered by the infection of epithelial cells and further amplified via mechanisms driven by  $\text{INF-}\gamma$  and by the secretion of eosinophil chemokines.

Altogether, our findings suggest that EVs are a common cause of respiratory tract infections in paediatric patients, where they can induce the release of chemokines by bronchial epithelial cells, which may significantly contribute to the various histologic and inflammatory features of EV-induced airway disease.

Jérôme JACQUES

## Étude Épidémiologique, Virologique et Physiopathologique des Infections Respiratoires Basses par les Entérovirus en Pédiatrie.

---

### Résumé:

Les entérovirus (*Picornaviridae*) sont des agents infectieux communs divisés en 5 espèces (Poliovirus et Entérovirus humains A à D) qui regroupent actuellement 89 sérotypes. Ces virus à ARN positif simple brin, sont responsables de syndromes infectieux variés incluant des infections des voies respiratoires hautes ou basses chez l'adulte ou l'enfant. Actuellement l'importance épidémiologique, les caractéristiques cliniques ainsi que les mécanismes physiopathologiques des infections respiratoires par les entérovirus restent à préciser.

La première partie de notre travail a eu pour objectif d'évaluer le rôle étiologique potentiel des picornavirus à tropisme respiratoire chez 192 enfants âgés de moins de 36 mois et hospitalisés pour bronchiolite. Un agent viral a été identifié chez 138 (72.5%) des 192 enfants étudiés. Les virus les plus fréquemment détectés étaient respectivement le Virus Respiratoire Syncytial (VRS) (30%), les Rhinovirus (RVH) (21%), les entérovirus (EV) (9%), et les Métapneumovirus humains (MPVh) (4%). Les RVH et les EV sont apparus comme étant la seule cause de l'infection virale de l'arbre respiratoire dans 57 (30%) des 192 jeunes enfants, tandis qu'une co-infection avec du RVH ou du EV a été détectée dans 25 (13%) des 192 jeunes enfants (30 vs. 13%,  $P < 10^{-3}$ ). Ces données suggèrent que les picornavirus (RVH et EV) à tropisme respiratoire seraient l'une des principales causes virales de bronchiolite en France.

Dans une seconde étude, nous avons analysé 252 cas d'infections pédiatriques à EV diagnostiqués chez 11509 enfants. Les souches d'EV ont été isolées dans des échantillons naso-pharyngés grâce à la culture virale, et identifiées par séroneutralisation. Les syndromes respiratoires (79 (31%) des 252 infections à EV) associés à une infection par un EV sont apparus comme étant la deuxième plus fréquente pathologie pédiatrique après la méningite (111 (44%) des 252 cas) (44 vs 31%,  $p < 10^{-3}$ ). Les EVs ont contribué aux infections respiratoires basses dans 54 % des 79 cas d'infection à EV. La bronchiolite a été la pathologie la plus souvent diagnostiquée dans les infections respiratoires à EV (34 (43%) des 79 cas,  $p < 10^{-3}$ ), survenant le plus souvent chez les enfants âgés de 1-12 mois ( $P = 0.0002$ ). Les echovirus 11, 6 et 13 ont été les souches les plus fréquemment identifiées dans les infections respiratoires (24, 13 et 11%, respectivement). L'analyse phylogénétique du gène codant pour la protéine de capside VP1 a révélé la circulation concomitante ou successive de souches distinctes EV à tropisme respiratoire au cours du même mois ou de la période épidémique. Ces résultats indiquent que les infections des voies respiratoires représentent 30% des cas des infections pédiatriques à entérovirus. De plus, la circulation concomitante ou successive de souches génétiquement distinctes d'EV indique la possibilité d'infections respiratoires répétées au sein de la même saison épidémique, et suggère la possibilité de mécanismes de recombinaison génétique entre des souches d'EV d'espèces A ou B.

Afin d'identifier les mécanismes qui peuvent réguler le développement de l'inflammation des muqueuses respiratoires au cours de l'infection des voies aériennes basses par les EVs, nous avons étudié les profils et les niveaux de production de « CC et CXC chimiokines » de cellules épithéliales pulmonaires humaines primaires (SAEC), infectées par deux souches sauvages d'EV à tropisme respiratoire. L'exposition des SAEC à l'interféron gamma ( $INF-\gamma$ ) et aux virus sauvages de type Cocksackie B5 ou ECHO 30 induit une augmentation significative de la production de RANTES qui est synergique par rapport celle obtenue par l'infection virale ou par l' $INF-\gamma$  seul. Nous avons observé que l'infection répliquative des entérovirus dans les SAEC induisait une augmentation dose et temps-dépendante des ARNm, et des protéines RANTES, MCP-1 et l'IL-8. La sécrétion de ces chimiokines est significativement augmentée à 48 ou 72 heures suivant l'infection dans les cultures traitées par de faibles doses d' $INF-\gamma$ , et ceci comparativement aux cellules non infectées ( $P < 0,001$ ). Les chimiokines produites par les SAEC en réponse à l'infection virale ont montrés une forte activité chimiotactique pour les éosinophiles humains du sang périphérique. En outre, nous avons observé une infection productive par les entérovirus à tropisme respiratoire dans les éosinophiles. Ceux-ci ont spécifiquement sécrété des niveaux significatifs de RANTES et MCP-1, et ceci 24 heures après l'infection. Par conséquent, le processus inflammatoire induit par les entérovirus semble être déclenché par l'infection de cellules épithéliales, et amplifié par des mécanismes déclenchés par l' $INF-\gamma$  ainsi que par la sécrétion de chimiokines par les éosinophiles recrutés dans la lumière bronchique.

En conclusion, nos travaux indiquent que les EVs sont une cause fréquente d'infection des voies respiratoires chez les enfants, et qu'ils sont capables d'induire au cours de l'infection des cellules de l'épithélium bronchique, une sécrétion spécifique de chimiokines de type RANTES, MCP-1 et IL-8. Ces résultats suggèrent l'importance du rôle des entérovirus dans le développement de pathologies respiratoires chez les enfants immunocompétents.