



Réf : ...../UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/2018

**MEMOIRE DE FIN D'ETUDES**  
**EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER**

**Domaine : SNV      Filière : Sciences Biologiques**

**Spécialité : Microbiologie appliquée**

**Présenté par : AMMI Zohra**

***Thème***

***Détection des Entérovirus par isolement sur culture cellulaire et par amplification génique à partir du Liquide céphalo-rachidien en cas de méningite virale.***

**Soutenu le : 21 / 07 / 2019**

**Devant le jury composé de :**

*Nom et prénom*

*Grade*

Chafika MOUHOUB

Pr

UAMOB

Présidente

Abdelwahab RAI

MCB

UAMOB

Promoteur

Dahbia Leila ANES-BOULAHBAL

Dr. Médecine V.

IPA

Co-promotrice

Hocine REMINI

MCB

UAMOB

Examineur

Sidali SELLAMI

Dr. Médecine

IPA

Invité

**Année Universitaire : 2018/2019**

# *Remerciements*

## Remerciements

*En préambule à ce manuscrit, je souhaiterais adresser mes remerciements les plus sincères aux personnes qui m'ont apporté leur aide et qui ont contribué, de près ou de loin, à l'élaboration de ce mémoire.*

*Je tiens à remercier sincèrement mon promoteur Dr. **RAI Abdelwahab**, Maître de conférences à l'université de Bouira, de m'avoir encadrée, formée, dirigée et surtout de m'avoir fait confiance. Veuillez trouver ici l'expression de toute ma reconnaissance et de mon profond respect.*

*Un grand remerciement à Dr. **ANES-BOULAHBAL Dahbia Leila**, responsable du LNR pour la surveillance de la poliomyélite en Algérie, pour son accueil chaleureux au sein du laboratoire, ses précieux conseils et orientations. Je la remercie infiniment pour l'aide et le temps qu'elle a bien voulu me consacrer, pour sa générosité sans limite et la grande patience dont elle a su faire preuve malgré ses charges professionnelles.*

*Mes remerciements les plus chaleureux aux membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger mon travail de fin d'étude. Toute ma gratitude et mes remerciements à Mme. **MOUHOUB Chafika**, président du jury, Mr. **REMINI Hocine** d'avoir consacré du temps à l'analyse et l'évaluation de ce travail scientifique.*

*Je tiens à remercier vivement les membres du laboratoire, messieurs **LOUZRI Amine**, **SELLAMI Sid Ali** et madame **CHIKHAOUI Souhila**, pour leur soutien, patience et de leur aide toute au long de mon stage pratique. Sa m'a fait très plaisir de travailler avec eux et de profiter de leur expérience.*

*Mes sincères remerciement à Dr. **BENBETKA Chahrazed** et Dr. **AMMI Nassima** pour m'avoir donné l'opportunité de faire ce stage à l'IPA.*

*Sans oublier de remercier Dr. **BENMAHFOUD Soumia** pharmacienne assistante en microbiologie au LNR VIH/SIDA et Dr. **KHardine Ahmad Fayez** assistant en biologie moléculaire au Laboratoire des Arbovirus et virus émergeants, pour leur disponibilité et leur aide.*

*Je remercie également, Madame **Amina**, secrétaire au niveau du laboratoire, pour son amour et son soutien dans les moments difficiles, Madame **Lynda**, ingénieur du laboratoire pour sa disponibilité et son aide.*

*Et pour finir, j'aimerais remercier tous mes enseignants au niveau de l'université de Bouira.*

# *Dédicace*

## *Dédicace*

*À mes très chers parents ;*

*Aucune dédicace, aucun mot, ne saurait exprimer réellement mon profond amour, mon respect et ma vive gratitude. Veuillez trouver dans ce manuscrit le fruit de toutes vos peines et vos sacrifices.*

*À mes chers frères, Riadh et Aymane. Je vous souhaite tout le bonheur et toute la réussite.*

*À mes adorables cousines Houda, Nihal et Bouchera,*

*À mes chers grands parents, que dieu les garde,*

*À tous mes Oncles et Tantes,*

*À mes chères amies, Khaoula, Imane, Loubna, Farah et Sana.*

*À tous mes collègues de ma Promotion en « Microbiologie Appliquée ».*

# *Liste des tableaux*

**Liste des tableaux :**

|   |    |
|---|----|
| <b>Tableau I.</b> Espèces virales appartenant au genre <i>Enterovirus</i> infectant l'homme et noms correspondants de l'ancienne nomenclature ..... | 04 |
| <b>Tableau II.</b> Les différentes pathologies associées aux entérovirus humains.....   | 17 |
| <b>Tableau III.</b> Les amorces utilisées dans la réaction de la RT-PCR classique .....   | 30 |
| <b>Tableau IV.</b> Les amorces utilisées dans la réaction de la RT-PCR en temps réel .....  | 33 |
| <b>Tableau V.</b> Les amorces dégénérées utilisées pour le séquençage .....   | 35 |
| <b>Tableau VI.</b> Des amorces spécifiques utilisées pour le séquençage .....   | 36 |
| <b>Tableau VII.</b> Comparaison des résultats obtenus par la RT-PCR classique et par la RT-PCR en temps réel .....                                  | 45 |



# *Liste des figures*

**Liste des figures :**

|  |    |
|--|----|
| <b>Figure 01.</b> Représentation schématique de l'organisation du génome d'un EV et le rôle des différentes protéines .....            | 06 |
| <b>Figure 02.</b> Structure tridimensionnelle de la capsid du Entérovirus EV-A71 .....   | 07 |
| <b>Figure 03.</b> Traduction et maturation des protéines virales .....   | 09 |
| <b>Figure 04.</b> Cycle de réplication des entérovirus dans la cellule cible permissive .....  | 11 |
| <b>Figure 05.</b> Un effet cytopathique (ECP) caractéristique des virus coxsackie B sur des cellules rénales d'un singe africain ..... | 12 |
| <b>Figure 06.</b> Physiopathologie des infections à Entérovirus .....  | 14 |
| <b>Figure 07.</b> Le liquide céphalorachidien ou cérébrospinal.....  | 16 |
| <b>Figure 08.</b> Cellules RD observées sous microscope optique inversé .....  | 22 |
| <b>Figure 09.</b> Cellules Vero observées sous microscope optique inversé .....  | 22 |
| <b>Figure 10.</b> Lignée cellulaire Vero arrivée au laboratoire dans une grande flasque .....  | 23 |
| <b>Figure 11.</b> Conservation des cellules dans de l'azote liquide à -196°C .....   | 23 |
| <b>Figure 12.</b> Protocole de la Trypsination .....   | 24 |
| <b>Figure 13.</b> Tubes de culture cellulaire RD.....  | 25 |
| <b>Figure 14.</b> Tubes de culture cellulaire Vero .....   | 25 |
| <b>Figure 15.</b> Incubation des tubes contenant les lignées cellulaires en suspension dans l'étuve à 36°C .....                       | 25 |
| <b>Figure 16.</b> Isolement des EV en culture cellulaire .....   | 26 |
| <b>Figure 17.</b> Le principe de la Rétro-transcription en utilisant le random hexamère (rH) ....                                      | 29 |
| <b>Figure 18.</b> Le thermocycleur 2720 « Applied Biosystems ». RT-PCR classique.....  | 30 |
| <b>Figure 19.</b> Principe de la PCR .....   | 31 |
| <b>Figure 20.</b> Migration électrophorétique (80 V) à l'aide d'un générateur .....  | 32 |
| <b>Figure 21.</b> Le thermocycleur ABI 7500 « Applied Biosystems » utilisé pour la réaction de la RT-PCR en temps réel .....           | 33 |
| <b>Figure 22.</b> Principe de la RT-PCR en utilisant des sondes d'hydrolyse .....  | 34 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figure 23.</b> Le protocole de la purification selon le kit Invitrogen .....   | 36 |
| <b>Figure 24.</b> Le principe de séquençage selon la méthode de Sanger .....  | 38 |
| <b>Figure 25.</b> Effet cytopathique (ECP) caractéristique des EV sur des cellules RD .....   | 39 |
| <b>Figure 26.</b> Résultats de la migration électrophorétique sur gel d'agarose (2%).....   | 41 |
| <b>Figure 27.</b> Résultats (02) de la migration électrophorétique sur gel d'agarose (2%).....                                      | 42 |
| <b>Figure 28.</b> Résultats obtenues par la RT-PCR en temps réel (1).....   | 43 |
| <b>Figure 29.</b> Résultats obtenues par la RT-PCR en temps réel (2).....   | 43 |
| <b>Figure 30.</b> Résultats obtenues par la RT-PCR en temps réel (3).....   | 44 |
| <b>Figure 31.</b> Résultats obtenues par la RT-PCR en temps réel (4).....   | 44 |
| <b>Figure 32.</b> Comparaison des résultats de la détection des EV obtenus par isolement sur culture cellulaire et par RT-PCR ..... | 46 |
| <b>Figure 33.</b> Résultats obtenus par RT- PCR classique après amplification génique à partir de surnagent de culture .....        | 48 |
| <b>Figure 34.</b> Résultats obtenus par RT- PCR en temps réel après amplification génique à partir de surnagent de culture .....    | 48 |

# *Liste des abréviations*

**Liste des abréviations :**

|                |   |
|----------------|---|
| <b>ABI :</b>   | Applied Biosystem.                        |
| <b>ADNc :</b>  | Acide Désoxyribonucléique complémentaire. |
| <b>ARNm :</b>  | Acide Ribonucléique messenger.            |
| <b>BLAST:</b>  | Basic Local Alignment Search Tool.        |
| <b>CAR:</b>    | Coxsackievirus-Adenovirus Receptor.       |
| <b>CMK:</b>    | Primary Cynomolgus Monkey Kidney cells.   |
| <b>CN :</b>    | Contrôle Négatif.                         |
| <b>CP :</b>    | Contrôle Positif.                         |
| <b>CV :</b>    | Coxsackievirus.                           |
| <b>ddNTP :</b> | di désoxy Nucléotide Triphosphate.        |
| <b>DMEM :</b>  | Dulbecco's Modified Eagle Medium.         |
| <b>DMSO :</b>  | Di Méthyle Sulfoxyde.                     |
| <b>dNTP :</b>  | Désoxy-ribonucléotides Triphosphates.     |
| <b>DTT :</b>   | Dithiothréitol.                           |
| <b>E :</b>     | Echovirus.                                |
| <b>ECHO</b>    | Enteric Cytopathogenic Human Orphan.      |
| <b>ECP</b>     | Effet Cytopathique.                       |
| <b>EDTA :</b>  | Ethylène Diamine Tétra Acétique.          |
| <b>Hep-2 :</b> | Cellules épithéliales humaines type 2.    |
| <b>HEV :</b>   | Entérovirus Humains.                      |
| <b>ICAM :</b>  | InterCellular Adhesion Molecule.          |
| <b>Ig :</b>    | Immunoglobuline.                          |
| <b>IPV :</b>   | Inactivated Polio Vaccine.                |
| <b>IRES :</b>  | Internal Ribosomal Entry Site.            |
| <b>IRM :</b>   | Imagerie par Résonance Magnétique.        |

|                |  |
|----------------|--|
| <b>kDa :</b>   | Kilo Dalton.                                   |
| <b>MEGA :</b>  | Molecular Evolutionary Genetics Analysis.      |
| <b>MEM :</b>   | Minimal Essential Medium.                      |
| <b>MRC-5 :</b> | Medical Research Council cell strain five.     |
| <b>NC :</b>    | Non Codante.                                   |
| <b>NCBI :</b>  | National Center for Biotechnology Information. |
| <b>NPHEV :</b> | Entérovirus humains Non Poliomyélitiques.      |
| <b>OPV :</b>   | Oral Polio Vaccine.                            |
| <b>ORF :</b>   | Open Reading Frame.                            |
| <b>P1-3 :</b>  | Proteins 1-3.                                  |
| <b>PABP :</b>  | Poly-A Binding Protein.                        |
| <b>PBS :</b>   | Phosphate Buffer Salin.                        |
| <b>PCBP :</b>  | Poly-C Binding Protein.                        |
| <b>Pol :</b>   | Polymérase.                                    |
| <b>pU :</b>    | Poly Uridylation.                              |
| <b>PV :</b>    | Poliovirus.                                    |
| <b>PVR :</b>   | Poliovirus Receptor.                           |
| <b>RD :</b>    | Rhabdomyosarcoma.                              |
| <b>rH :</b>    | random Hexamère.                               |
| <b>rpm :</b>   | rotation par minute.                           |
| <b>RT :</b>    | Rétro transcription.                           |
| <b>SNC :</b>   | Système nerveux central.                       |
| <b>SVF :</b>   | Sérum de Veau Fœtal.                           |
| <b>TAE :</b>   | Tris Acétate.                                  |
| <b>Taq :</b>   | <i>Thermus aquaticus</i> .                     |
| <b>VP1-4 :</b> | Virion Proteins 1-4.                           |
| <b>VPg :</b>   | Virion Protein genome.                         |

# *Glossaire*

## Glossaire :

| <b>Terme</b>  | <b>Définition</b>   |
|---|---|
| <b>Amorces dégénérées (code génétique dégénéré)</b> | Un même acide aminé peut être codé par plusieurs codons différents.   |
| <b>Lignée cellulaire</b>                            | C'est une population homogène de cellules, stables après des mitoses successives et ayant en théorie une capacité illimitée de division.  |
| <b>Milieu de croissance</b>                         | C'est un milieu enrichi avec 10% de sérum de veau fœtal permettant une croissance cellulaire rapide.  |
| <b>Milieu de survie</b>                             | C'est un milieu contenant une faible concentration (2%) de sérum de veau fœtal utilisé pour maintenir les cellules à un faible taux de croissance et maintenir leur métabolisme pendant la période de réplication virale.       |
| <b>MMLV</b>   | Transcriptase inverse M-MLV est un ADN polymérase recombinant qui synthétise un brin d'ADN complémentaire à partir d'ARN simple brin, d'ADN ou d'un hybride ARN-ADN. Elle est codée par le virus de la leucémie murine Moloney. |
| <b>Passage aveugle</b>                              | Consiste au passage des suspensions cellulaires déjà inoculées (Passage 0) vers des cellules fraîches de mêmes lignées cellulaire (Passage 0+1).  |
| <b>Ponction lombaire</b>                            | C'est un examen médical à visée diagnostique ou thérapeutique, qui consiste à prélever du liquide céphalo-rachidien entre deux vertèbres du bas du dos.   |
| <b>SYBR-Safe</b>                                    | C'est un composé à base de cyanine surtout utilisé comme colorant pour acides nucléiques en biologie moléculaire.   |



# *Sommaire*

**Remerciements**

**Dédicace**

**Liste des abréviations**

**Liste des tableaux**

**Liste des figures**

**Glossaire**

**Introduction** ..... 01

**Chapitre I : Synthèse bibliographique**

**I. Historique** ..... 03

**II. Généralités sur les Entérovirus humains** ..... 04

1. Classification..... 04

2. Structure des entérovirus..... 05

    2.1. *Génome et protéines virales*..... 05

    2.2. *Capside* ..... 06

3. Propriétés physico-chimiques ..... 07

4. Evolution génomique ..... 07

5. Cycle infectieux des Entérovirus ..... 08

6. Effet de la multiplication virale sur la cellule hôte ..... 11

**III. Infections humaines à Entérovirus** ..... 13

1. Epidémiologie et transmission ..... 13

2. Physiopathologie des infections à Entérovirus ..... 13

3. Pathologie humaine à Entérovirus ..... 14

    3.1. *Atteintes neuro-méningées* ..... 15

    3.2. *Autres atteintes* ..... 16

**IV. Diagnostic virologique** ..... 18

---

|  |           |
|--|-----------|
| 1. Prélèvement et conservation des échantillons.....               | 18        |
| 2. Diagnostic direct .....   | 19        |
| 2.1. Recherche du virus par isolement sur culture cellulaire ..... | 19        |
| 2.2. Recherche du génome virale par RT-PCR .....                   | 19        |
| 3. Diagnostic indirect .....                                       | 20        |
| <b>V. Prévention et vaccination .....</b>                          | <b>20</b> |

## Chapitre II : Matériel et Méthodes

|  |           |
|--|-----------|
| <b>I. Prélèvement .....</b>                        | <b>22</b> |
| <b>II. Isolement sur culture cellulaire .....</b>  | <b>22</b> |
| 1. Préparation de la culture cellulaire .....      | 23        |
| 1.1. Congélation des lignées cellulaires .....     | 23        |
| 1.2. Décongélation des cellules .....              | 23        |
| 1.3. Trypsination et numération cellulaire .....   | 24        |
| 2. Inoculation .....                               | 25        |
| 3. Lecture de l'effet cytophatique .....           | 26        |
| <b>III. Amplification génique .....</b>            | <b>27</b> |
| 1. Extraction de l'ARN viral .....                 | 27        |
| 1.1. Méthode manuelle .....                        | 27        |
| 1.2. Extraction sur colonne de silice .....        | 27        |
| 2. RT-PCR classique .....                          | 29        |
| 2.1. Transcription inverse .....                   | 29        |
| 2.2. Amplification .....                           | 29        |
| 2.3. Révélation des produits d'amplification ..... | 31        |
| 2.3.1. Préparation du gel d'agarose .....          | 31        |
| 2.3.2. Migration électrophorétique .....           | 31        |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.3.3. Visualisation et interprétation des résultats ..... | 31        |
| 3. RT- PCR en Temps réel .....                             | 32        |
| 3.1. Préparation de mélange réactionnel .....              | 33        |
| 3.2. Amplification et lecture des résultats.....           | 33        |
| <b>IV. Identification moléculaire des isolats .....</b>    | <b>35</b> |
| 1. Amplification .....                                     | 35        |
| 2. Purification des produits d'amplification .....         | 36        |
| 3. Deuxième amplification .....                            | 37        |
| 4. Précipitation de l'ADN et séquençage .....              | 37        |
| 5. Analyse phylogénétique .....                            | 38        |

### **Chapitre III : Résultats et Discussion**

|  |           |
|--|-----------|
| <b>I. Isolement sur culture cellulaire .....</b>         | <b>39</b> |
| <b>II. Amplification génique .....</b>                   | <b>41</b> |
| 1. A partir de LCR .....                                 | 41        |
| 2. A partir de surnageant de culture .....               | 48        |
| <b>III. Identification moléculaire des isolats .....</b> | <b>49</b> |
| <b>Conclusion .....</b>                                  | <b>50</b> |

### **Références bibliographiques**

**Annexes**

**Résumé**

**Abstract**

**ملخص**

# *Introduction*

## Introduction

Les Entérovirus humains (HEV) sont des agents pathogènes très communs en médecine humaine et vraisemblablement responsables d'infections très fréquentes puisque estimées à près de 1 milliard chaque année dans le monde (**Andreoletti et al., 2009**).

Le genre *Enterovirus* (EV), de la famille des Picornaviridae, est constitué de petits virus (20 à 30 nm) non enveloppés à acide ribonucléique (ARN) simple brin de polarité positive (**Fleury, 2002 ; Apostol et al., 2012 ; Grosjean et al., 2016**). Il est divisé en quatre espèces (HEV A, B, C, D), regroupant plus de 120 sérotypes (**Afifi et al., 2009 ; Renois et al., 2014**). Ces virus sont très résistants dans le milieu extérieur et se transmettent principalement par voie fécale-orale, mais également par voie aérienne (**Mammette, 2002 ; Wells et Coyne, 2019**).

La grande diversité d'espèces et la variabilité génétique leur permettent d'infecter différents organes induisant des syndromes infectieux aigus d'ordre neurologiques, respiratoires, cutanés, musculaires, cardiaques, maternofoetals ou périnataux (**Bessaoud et al., 2008 ; Renois et al., 2014**). Les EV sont considérés comme l'une des principales causes d'infections virales chez l'enfant et l'adulte. La plupart de ces virus infectent l'homme par le tractus gastro-intestinal en provoquant des symptômes bénins. Cependant, plusieurs EV peuvent envahir le système nerveux central (SNC) et entraîner une maladie grave, notamment une méningo-encéphalite, une myélite, une paralysie, une myocardite. Les EV sont maintenant reconnus comme la cause la plus fréquente des méningites aiguës (**Zhou et al., 2009 ; Dahee et al., 2015 ; Harvala et al., 2018**) notamment les entérovirus humains non polio (NPHEV) en représentant 80% à 92% de tous les cas des méningites aseptiques dans lesquels l'agent pathogène est identifié (**Huang et Shih, 2015 ; Opanda et al., 2016**).

Afin de déterminer les relations entre les HEV et les différents syndromes cliniques, des méthodes standard de la détection et d'identification des EV sont basées sur l'isolement du virus sur culture cellulaire suivi du sérotypage des virus isolés par des techniques de séroneutralisation en utilisant des antisérums spécifiques. Cette procédure prend beaucoup de temps et demande beaucoup de travail, ainsi la disponibilité d'antisérums spécifiques devient progressivement limitée. Plusieurs techniques de détection rapide du génome de l'EV dans des échantillons cliniques, la plupart basées sur

une amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) dans le génome en région 5' non-codante du génome ont été développées (Nijhuis *et al.*, 2002 ; Graham et Murdoch, 2005 ; Apostol *et al.*, 2012). Cependant ces méthodes ne permettent pas l'identification des sérotypes et la caractérisation génétique des virus détectés au-delà du genre. Ainsi, lorsque des informations sur le sérotype sont nécessaires, l'isolement du virus sur culture cellulaire reste la technique la plus appropriée. Pour surmonter les problèmes liés à l'antisérum spécifique, des tentatives ont été faites pour développer de nouvelles méthodes de typage d'EVs par amplification PCR et séquençage partiel dans la région VP1 du génome (Norder *et al.*, 2003 ; Oberste *et al.*, 2003 ; Shabani *et al.*, 2018).

Le but de la présente étude est d'évaluer le potentiel diagnostique des techniques d'amplification disponibles pour détecter l'EV dans des LCR prélevés chez des patients présentant un diagnostic de méningite aseptique et de comparer les résultats à ceux obtenus par culture cellulaire.

# *Synthèse bibliographique*



## I. Historique

L'histoire des EV commence avec celle de la poliomyélite (en grec, *polios*: gris et *myelos*: moelle). Cette maladie est connue en Egypte depuis environ 4000 ans: des sujets présentant une amyotrophie des membres inférieurs sont représentés sur des stèles ou des bas-reliefs (**Mammette, 2002**). Les premiers signes cliniques de la poliomyélite ont été décrits en 1800, chez des patients souffrants de paralysie avec fièvre. En 1840, d'autres études ont montré que les douleurs spécifiques de la maladie étaient dues à une atteinte des neurones moteurs de la corne antérieure de la moelle épinière. En 1908, Landsteiner démontre la nature virale en inoculant l'extrait de la moelle épinière d'un enfant décédé de poliomyélite au singe (**Mammette, 2002**). En 1909, Landsteiner et Popper découvraient que l'agent étiologique de la poliomyélite paralytique aiguë était le Poliovirus (PV) (**Kristensson, 1999**).

En 1936, Sabin et Olitsky réalisent la première culture *in vitro* de poliovirus à partir de tissus nerveux embryonnaires humains. Puis en 1949, Enders étend la culture du poliovirus à des tissus non nerveux (**Prescott et al., 2010**). En 1955, un vaccin antipoliomyélique à virus inactivé est mis au point par Salk, puis un second vaccin à virus atténué est développé par Sabin en 1965. Rapidement, avec l'essor des techniques de virologie, il apparaît que le poliovirus fait partie d'un groupe beaucoup plus important de virus. En 1948, Dallford et Sickles, travaillant sur des souriceaux nouveau-nés comme modèle d'étude de la poliomyélite, isolent les premiers coxsackievirus. Puis, dans le courant des années 50, de nouveaux virus distincts, à la fois des poliovirus et des coxsackievirus, sont isolés sur différents continents, à partir de prélèvements de patients sains ou souffrants de méningites (**Melnick, 1996 ; Hyypia et al., 1997**). Ces nouveaux virus, ne semblant pas être associés à une maladie connue, furent baptisés Echovirus (ECHO : *Enteric Cytopathogenic Human Orphan*, ci-après echovirus). En 1955, un comité de recherche est formé pour étudier les echovirus. En 1957, comprenant que les ECHO, polio et coxsackievirus forment un seul groupe viral, le comité de recherche définit le genre *Enterovirus* (**Committee on the Enteroviruses et al., 1957**).

## II. Généralités sur les Entérovirus humains

### 1. Classification

Les entérovirus humains appartiennent à la famille des Picornaviridae et à l'ordre des Picornavirales, ils sont associés aux rhinovirus dans le genre *Enterovirus* (Zhou *et al.*, 2009 ; Cameron *et al.*, 2010 ; Harvala *et al.*, 2018). A l'origine, la classification des EV, basée sur les caractères antigéniques et le pouvoir pathogène, distingue les poliovirus (PV-1 à 3) et les entérovirus non poliomyélitiques : coxsackievirus A (CV-A), coxsackievirus B (CV-B), echovirus et entérovirus (EV-68 à 108). Actuellement, la classification est fondée sur des critères génétiques, comportant quatre groupes d'entérovirus humains (A, B, C et D) (Tableau I). L'espèce Poliovirus n'existe plus et les PV ont été intégrés dans l'espèce EV-C (Afifi *et al.*, 2009 ; Pasquier *et al.*, 2013 ; Ibrahim, 2014 ; Abbasi *et al.*, 2018).

Les recombinaisons potentielles intra- et inter-espèces pendant l'évolution et la découverte de nouveaux virus font que la classification des EV est régulièrement reconsidérée (Bousslama *et al.*, 2007 ; Lauber et Gorbalenya, 2012).

**Tableau I.** Espèces virales appartenant au genre *Enterovirus* infectant l'homme et noms correspondants de l'ancienne nomenclature. D'après Pasquier *et al.*, (2013).

|   | Genre <i>Enterovirus</i>   |
|---|--|
| Espèces   | Souches (ancienne dénomination des espèces)  |
| <i>Human enterovirus</i><br>A<br>(+de 21 sérotypes) | <i>Human coxsackievirus</i> A (CV-A2), 3-8, 10, 12, 14 et 16<br><i>Human enterovirus</i> 71 (EV-71), 76, 89, 90, 91, 92  |
| <i>Human enterovirus</i><br>B<br>(+de 59 sérotypes) | <i>Human coxsackievirus</i> B1 (CV-B1), 2 à 6<br><i>Human coxsackievirus</i> A9 (CV-A9)<br><i>Human coxsackievirus</i> 1 (EV-1), 2-27, 29-33<br><i>Human coxsackievirus</i> 69 (EV-69), 73-75, 77-88, 93, 97, 98, 100, 101, 106, 107 |
| <i>Human enterovirus</i><br>C<br>(+de 19 sérotypes) | <i>Human coxsackievirus</i> A1 (CV-A1), 11, 13, 17, 19-22, 24, 95, 96, 99, 102, 104, 105, 109<br><i>Human poliovirus</i> 1 (PV-1), 2 et 3  |

|  |   |
|--|---|
| <i>Human enterovirus</i><br><i>D</i> (+de 2 sérotypes) | <i>Human enterovirus</i> 68 (EV-68), 70, 94 |
|--|---|

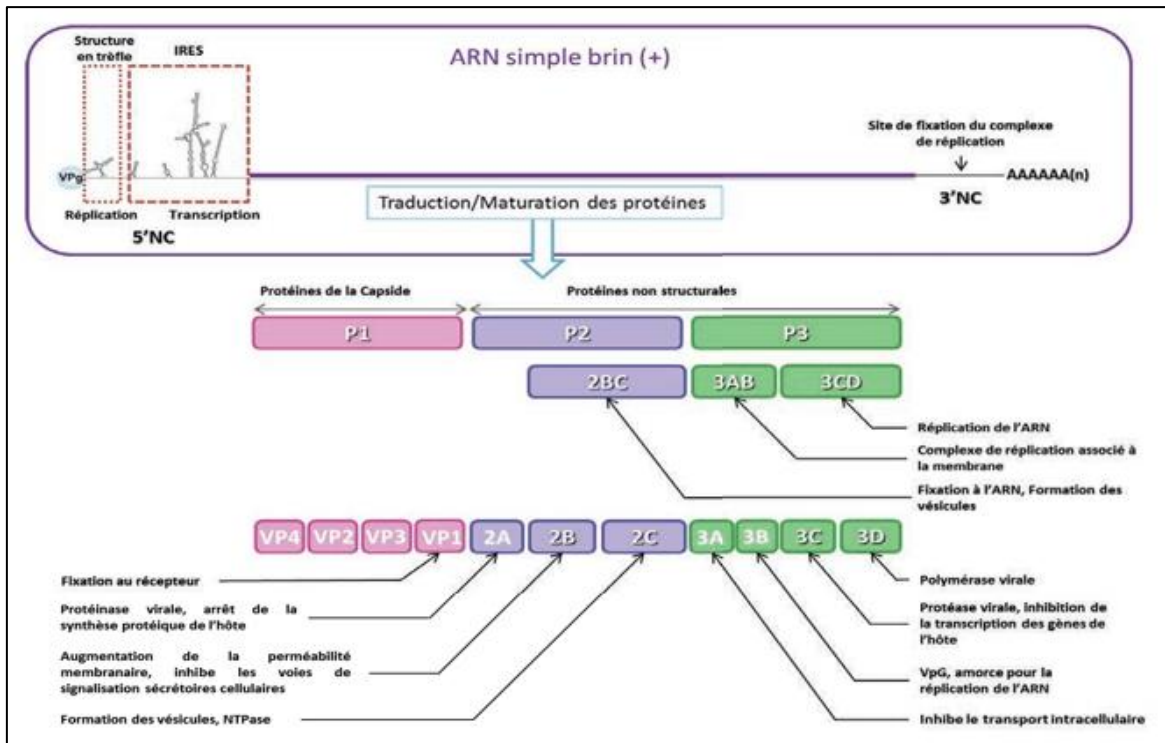
## 2. Structure des entérovirus

Les EV sont des virus nus c'est-à-dire non enveloppés, de forme sphérique avec un diamètre de 24 à 30 nm. Ce sont des particules simples constituées d'une capsidie protéique qui entoure un ARN génomique monocaténaire non segmenté de polarité positive (**Grosjean et al., 2016 ; Abbasi et al., 2018**).

### 2.1. Génome et protéines virales

Leur génome est un ARN simple brin de polarité positive d'environ 7500 nucléotides (**Thompson et Peersen, 2004**). Il est composé de deux régions non codantes (NC) à ses extrémités 5' et 3' encadrant une région codante (**Figure 1**). L'extrémité 5' est non coiffée et va former une structure secondaire appelée IRES (*Internal Ribosome Entry Site*). Elle permet de traduire directement l'ARN viral en protéines (**Kempf et Barton, 2008 ; Filbin et Kief, 2009 ; Cameron et al., 2010**). Cette région 5'NC régule non seulement la transcription mais également la réplication et contribue au contrôle de la pathogenèse virale et au tropisme tissulaire (**Fernandez-Miragall et al., 2009**). Elle est hautement conservée au niveau nucléotidique entre les différentes espèces d'EV et présente un intérêt majeur pour leur détection moléculaire (**Renois et al., 2014**).

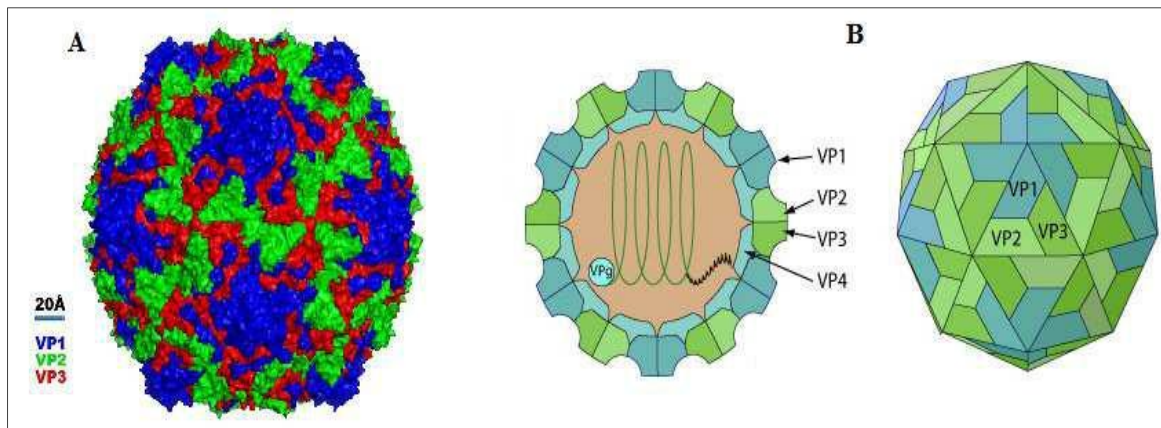
La région 3'NC possède une structure secondaire impliquée dans le contrôle de l'initiation de la synthèse de l'ARN. Elle possède également une séquence polyadénylée d'environ 75 nucléotides nécessaire à l'infectivité du génome viral. Une fois traduite, la région codante du génome est à l'origine d'une polyprotéine subdivisée en trois régions : P1, P2 et P3, correspondant aux trois précurseurs des protéines virales. La région P1 code les protéines structurales de capsidie (VP4, VP2, VP3 et VP1) (**Oberste et al., 2004 ; Hassel, 2015**), alors que les régions P2 et P3 codent les protéines non structurales impliquées dans la traduction et la maturation des protéines (protéases 2A, 3C, 3CD) et dans la réplication du génome viral (2B, 2C, 3AB, 3B<sup>VPg</sup>, protéase 3CD, et polymérase 3D) (**Renois et al., 2014 ; Abbasi et al., 2018**).



**Figure 1.** Représentation schématique de l'organisation du génome d'un EV et le rôle des différentes protéines (Renois, 2012). Le génome des EV est composé d'un seul cadre ouvert de lecture ORF (*Open Reading Frame*) encadré par deux régions non codantes (5'NC et 3'NC). L'ORF est composé des régions génomiques P1, P2 et P3 qui codent les différentes protéines virales structurales (P1) et non structurales (P2 et P3). Les régions non codantes possèdent des structures secondaires dues aux repliements de la molécule d'ARN, impliquées dans la traduction (IRES en 5') et la réplication du génome viral.

## 2.2. La capsid

La capsid des EV présente une structure d'un icosaèdre d'environ 30 nm, elle est composée de 60 protomères identiques ou capsomères. Chacun est formé de 4 protéines structurales : VP1 (34 kDa), VP2 (30 kDa), VP3 (26 kDa) et VP4 (7 kDa), ces quatre protéines forment une sous unité ou protomère, 5 protomères se combinent pour former un pentamère et 12 pentamères constituent la capsid (Figure 2) (Racaniello et Howley, 2007 ; Conrad, 2012 ; Grosjean *et al.*, 2016). Sa structure tridimensionnelle et les interactions qu'elle établit avec des récepteurs cellulaires ont été résolues pour un certain nombre d'EV par cristallographie. Malgré des différences dans les séquences en acides aminés et des subtilités structurales d'un type ou d'un genre, l'architecture de la capsid est fondamentalement conservée (Volle, 2014).



**Figure 2.** Structure tridimensionnelle de la capside du Entérovirus EV-A71 (Hassel, 2015). (A) La capside et les protéines de structure VP1-4. (B) Les protéines VP1, VP2 et VP3 sont exhibés à la surface de la capside et VP4 est en position interne.

### 3. Propriétés physico-chimiques

Les EV résistent dans le milieu extérieur, à l'alcool à 70°, à l'éther, au désoxycholate de sodium et aux détergents. Ils sont stables pendant plusieurs semaines à 4°C et se conservent à des températures de -20°C à -80°C pendant plusieurs années en gardant leur pouvoir infectieux. En effet, la capacité de résistance au pH bas du milieu leur permet de franchir la barrière stomacale, de se multiplier dans le tube digestif et d'être excrétés en grande quantité dans les matières fécales pendant plusieurs semaines après l'infection (Melnick, 1996 ; Mammette, 2002 ; Conrad, 2012).

L'absence d'enveloppe chez les EV les rend relativement résistants à l'action des agents physicochimiques. Les EV sont détruits par les oxydants (hypochlorite de soude), le formol 0,3 % et la betapropionalactone. Aussi comme d'autres agents infectieux, ils sont sensibles à l'exposition à la lumière ultra-violette (UV). Cette méthode est notamment utilisée pour traiter des surfaces exposées à des produits biologiques contaminés et difficilement nettoyables ou accessibles (Mammette, 2002 ; Renois, 2012).

### 4. Evolution génomique

Grace à la grande diversité des EV; des phénomènes de mutations et de recombinaisons surviennent au cours de leur replication. Ces mécanismes d'évolution génétique permettent au virus de s'adapter aux modifications de l'environnement et aux diverses pressions de sélection, modifiant ainsi leur capacité infectieuse et répllicative (Renois *et al.*, 2014). Les mutations spontanées apparaissent au cours des étapes de replication, elles sont dues au fort taux d'erreur de l'ARN polymérase virale ARN

dépendante, de plus la longueur de leur génome (7500 bases) augmente la probabilité de cet erreur. Les phénomènes de recombinaison génétique sont quant à eux plus rares et à l'origine d'échange de matériel génétique entre deux souches entérovirales d'une même espèce au cours de l'infection d'une même cellule cible (**Renois *et al.*, 2014**).

Cette variabilité du génome des EV est une propriété fondamentale à la base de la diversité de ce genre viral, de son évolution, de sa pathogénicité et de ses caractéristiques épidémiologiques (**Bousslama *et al.*, 2007 ; Bessaoud *et al.*, 2008**).

## 5. Cycle infectieux des Entérovirus

Le cycle de multiplication se déroule totalement dans le cytoplasme. La durée de ce cycle varie entre 5 et 10 heures. Elle dépend de plusieurs paramètres comme la température, le pH, les cellules hôtes et la multiplicité d'infection (**Racaniello et Howley, 2007**). Le cycle infectieux peut être décrit en plusieurs phases successives (**Figure 4**).

### 5.1. Une phase précoce

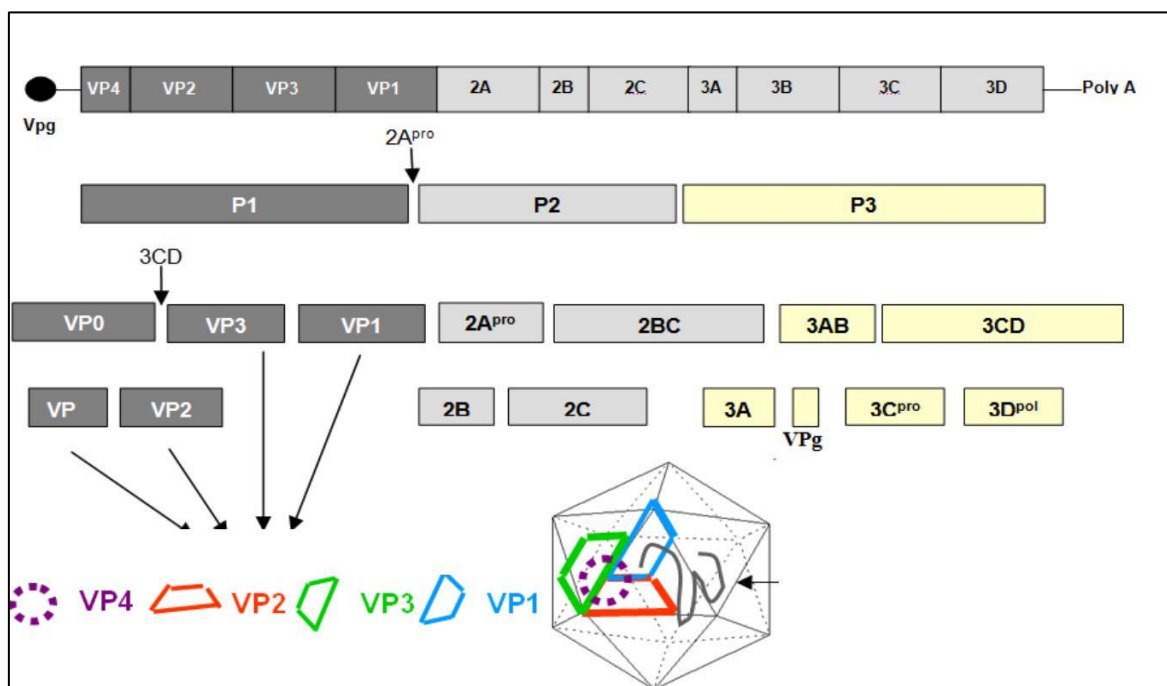
La phase précoce correspond à l'attachement du virus à son récepteur cellulaire et la libération du génome dans le cytoplasme. Compte tenu de leur diversité, les EV utilisent une grande variété de récepteurs cellulaires. On peut distinguer trois principaux récepteurs appartiennent à la superfamille des immunoglobulines : *Poliovirus receptor* (PVR), ICAM-1 et CAR. La spécificité du récepteur et sa distribution cellulaire et tissulaire peuvent moduler le tropisme viral et les manifestations pathologiques (**Fleury, 2009 ; Ibrahim, 2014**).

### 5.2. Une phase répllicative

Au cours de la phase répllicative, le génome viral est traduit, répliqué et de nouvelles particules infectieuses sont assemblées. Cette phase constitue le cœur du cycle viral, elle se traduit par de profondes modifications de la morphologie et de l'organisation intracellulaire, que l'on nomme effet cytopathique (ECP). Ces modifications, induites par les protéines virales, génèrent un environnement cellulaire propice à la multiplication virale (**Volle, 2014**).

### 5.2.1. La traduction

Une fois le génome est libéré après l'attachement du virus sur les récepteurs de la cellule cible, il peut être traduit en protéines virales, après clivage de la protéine VPg liée à l'extrémité 5' du génome par une protéase cellulaire. Par ailleurs, aucune protéine virale n'est importée dans la cellule via la capsid virale. A la différence de la majorité des ARNm cellulaires, le génome des EV ne contient pas de coiffe pour initier la traduction. A la place, l'élément IRES dans la R5'NC permet l'initiation interne de la traduction (Pelletier et Sonenberg, 1988 ; Kottaridi *et al.*, 2006 ; Filbin et Kief, 2009). Les EV, comme tous les picornavirus, synthétisent leurs protéines par traduction d'une longue phase ouverte de lecture ou ORF, suivie de clivages protéolytiques successifs de la polyprotéine virale ainsi produite (Ibrahim, 2014). Le premier clivage est réalisé par la protéase 2A<sub>pro</sub>, qui va libérer la protéine précurseur P1. Le deuxième clivage est réalisé par la protéase 3C<sub>pro</sub> qui sépare les protéines précurseurs P2 et P3. Les 3 peptides sont secondairement clivés par ces mêmes protéases pour donner les différentes protéines virales (Figure3) (Volle, 2014).



**Figure3.** Traduction et maturation des protéines virales (Hober *et al.*, 2013). La traduction du génome donne une polyprotéine divisée en quatre protéines structurales (gris foncé) et sept protéines non structurales (gris clair et jaune). Les sites de clivage par les protéinases virales sont indiqués par des flèches. Les quatre protéines structurales adoptent une symétrie icosaédrique avec VP1, VP2 et VP3 situées à la surface extérieure de la capsid et VP4 à la surface interne. L'ARN génomique simple brin est situé à l'intérieur de la capsid.

### 5.2.2. La réplication

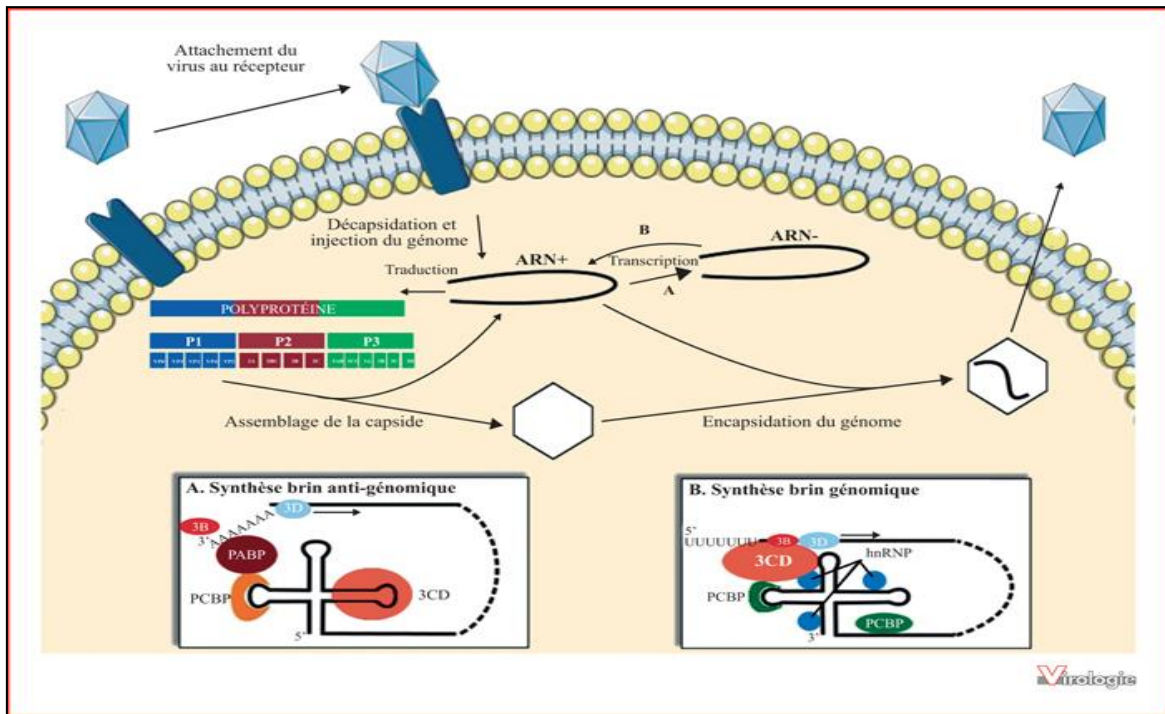
Lorsque suffisamment de protéines virales sont produites, une bascule de la traduction vers la réplication du génome viral aurait lieu (**Gamarnik et Andino, 2000**). En effet le génome des EV n'est pas seulement un ARN, c'est aussi la matrice qui permet la synthèse d'un antigénome de polarité négative, lequel servira de matrice pour la réplication du génome viral (**Steil et Barton, 2009**). Ces deux processus de la réplication et la traduction ne peuvent pas avoir lieu simultanément sur le même brin (+) car la polymérase 3Dpol est incapable de répliquer un ARN en cours de traduction (**Ibrahim, 2014**).

La synthèse du brin de polarité négative met en jeu des interactions protéines protéines entre le complexe d'initiation PCBP (Poly-C Binding Protein /3CD) lié au premier domaine de la région 5'NC en feuille de trèfle « *Cloverleaf* » et la protéine PABP (*Poly-A Binding Protein*) fixée sur la queue poly-A 3'NC. Ceci permet la circularisation du génome viral et la formation d'un complexe de préinitiation. Une protéine Vpg (3B) et après poly uridylation (Vpg-pUpU) va s'hybrider sur la queue poly A et servir d'amorce pour la synthèse de l'antigénome (-) via la polymérase 3Dpol (**Paul et al., 1998 ; Renois et al., 2014**). Les brins anti-génomiques vont servir de matrices pour la synthèse des ARN viraux de polarité positive par la 3Dpol (**Thompson et Peersen, 2004 ; Volle, 2014**).

### 5.3. Une phase de libération

Cette phase de libération consiste à l'assemblage des sous unités protéiques et à l'encapsidation de l'ARN génomique. Les particules virales s'accumulent ensuite dans le cytoplasme sous forme de vésicules puis sont libérées par lyse cellulaire (**Renois et al., 2014**) au cours de laquelle la protéine virale 2B serait impliquée (**Van Kuppeveld et al., 1997**).

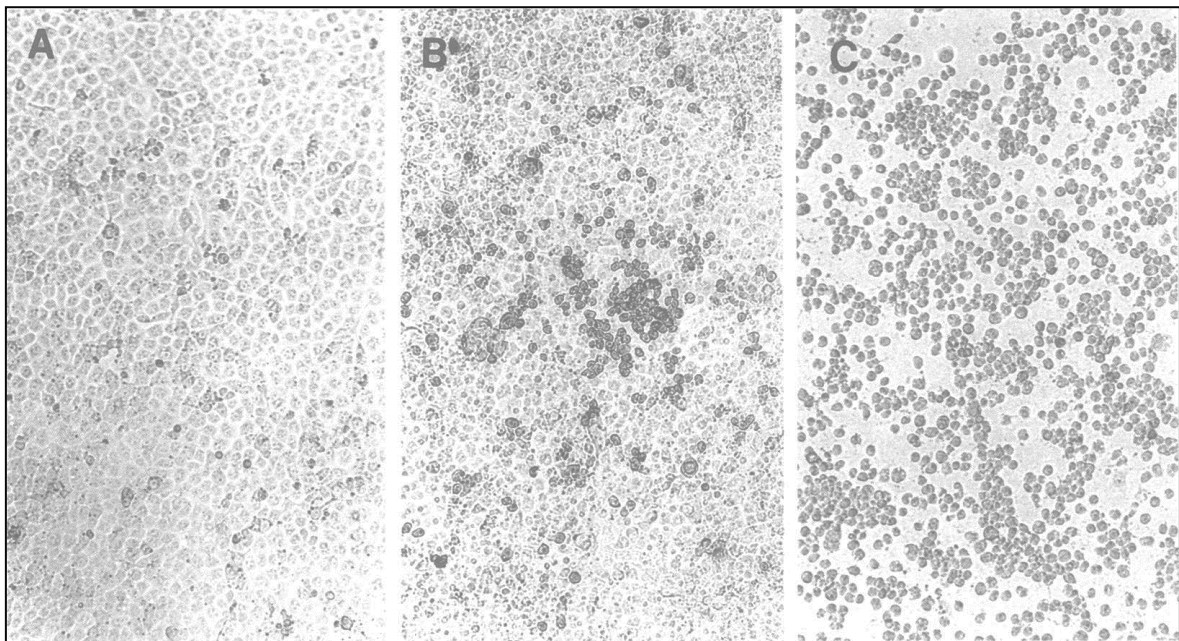




**Figure 4.** Cycle de réplication des entérovirus dans la cellule cible permissive (Renois *et al.*, 2014). Après fixation à ses récepteurs cellulaires, le virus subit une première étape de décapsidation et le matériel génétique est relargué au niveau du cytoplasme cellulaire. C'est là que se dérouleront les étapes de traduction des protéines virales et d'amplification du génome. Les brins d'ARN néo-synthétisés pourront ensuite rentrer à nouveau dans un cycle de réplication ou aboutir à la formation de nouvelles particules virales.

## 6. Effet de la multiplication virale sur la cellule hôte

Les cellules infectées par les EV développent d'importants changements morphologiques caractéristiques appelés effets cytopathiques (ECP) (Fleury, 2009). Ces changements qui apparaissent dès les premières heures de l'infection incluent une condensation de la chromatine, une déformation du noyau, la prolifération des vésicules membranaires par accumulation des lipides dont la synthèse est stimulée, le changement de la perméabilité membranaire suite à l'augmentation de la concentration intracellulaire de  $Ca^{2+}$ , la fuite des composants intracellulaires et le dessèchement de la cellule entière. En microscopie optique, les changements morphologiques les plus notables sont l'arrondissement et le détachement des cellules adhérentes du récipient de culture cellulaire. Ces modifications pourraient favoriser la lyse cellulaire et faciliter la propagation virale (Doedens *et al.*, 1994).



**Figure 5.** Effet cytopathique (ECP) caractéristique des virus coxsackie B sur des cellules rénales d'un singe africain (Menegus et Hollick, 1982). (A) Cellules non infectées par le virus ; (B) Début d'un ECP sur les cellules infectées par le virus ; (C) Un ECP à 100% du à l'infection de toutes les cellules par le virus.

### III. Infections humaines à entérovirus

#### 1. Epidémiologie et transmission

Les EV sont des pathogènes largement ubiquitaires. L'homme est le seul hôte et réservoir naturel des EV impliqués en pathologie humaine (**Fleury, 2002 ; Palacios et Oberste, 2005**). Leur mode de transmission est principalement de type fécal-oral via les mains sales, les objets souillés par la salive ou les matières fécales, ce qui explique une prévalence élevée des infections pendant la petite enfance. La voie aérienne peut également intervenir dans la transmission des EV via la dispersion de gouttelettes rhinopharyngées contaminant l'épithélium respiratoire et conjonctival. Ce mode de transmission pourrait être privilégié par des souches d'EV ayant une prédilection pour le système respiratoire (**Andreoletti et al., 2009 ; Pasquier et al., 2013**).

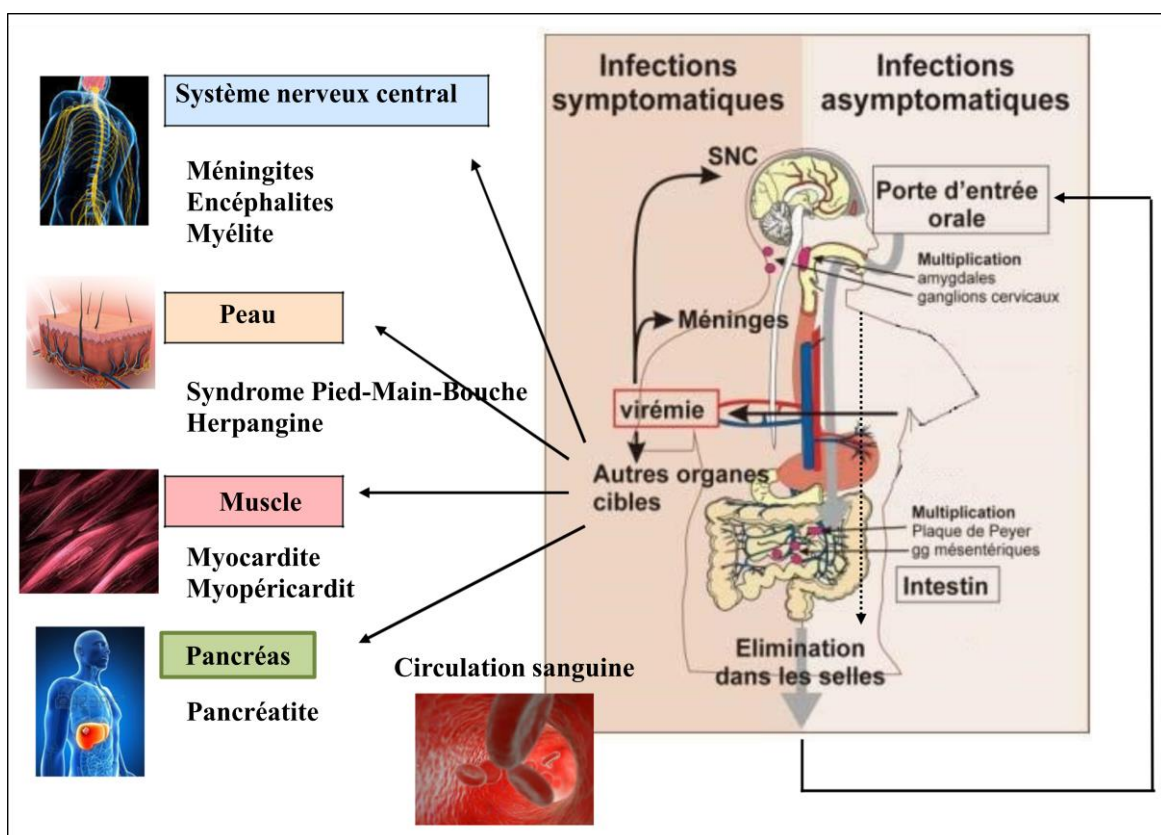
Dans les pays tempérés où le niveau sanitaire est élevé, les infections à EV peuvent être sporadiques mais elles évoluent volontiers sur un mode épidémique, voire pandémique durant les périodes estivo-automnales. Durant ces phases épidémiques, plusieurs sérotypes d'EV sont amenés à co-circuler. Ces épidémies se manifestent surtout sous forme de méningites chez l'enfant. Dans les pays en voie de développement où les conditions sanitaires sont favorables à une large transmission ; les infections à EV sont endémiques. Enfin, le non-respect des règles d'hygiène universelles (désinfection et lavage des mains en particulier) est à l'origine d'infections nosocomiales, notamment pour les coxsackievirus B (CV-B) et l'échovirus 11 (E-11), particulièrement redoutable chez le nouveau-né (**Mammette, 2002 ; Andreoletti et al., 2009 ; Harvala et al., 2011**).

#### 2. Physiopathologie générale

Les EV contaminent l'organisme au niveau de la bouche et des voies respiratoires, puis, des sites primaires de réplication s'établissent au sein des tissus lymphoïdes des muqueuses intestinales (plaques de Peyer) et de la gorge (amygdales) (**Mammette 2002 ; Smura et al., 2010**). A partir de ces sites primaires, les EV se propagent vers les ganglions régionaux, cervicaux et mésentériques (phase lymphatique). Il s'en suit une phase virémique au cours de laquelle le virus se multiplie dans les cellules du système réticulo-endothélial (sites secondaires de réplication), avant de gagner les cellules cibles spécifiques de la pathologie viro-induite (cerveau, méninges, cœur, peau...) (**Melnick, 1996 ; Prescott et al., 2010**). L'infection entraîne la sécrétion d'anticorps circulants neutralisants

protecteurs uniquement contre le sérotype responsable (**Mammette, 2002**). Les atteintes tissulaires consécutives à la virémie nécessitent un franchissement par le virus de l'endothélium vasculaire irriguant ces tissus (**Smura et al., 2010**).

La période d'incubation recouvrant ces différentes phases est d'environ 7 à 14 jours, avec des extrêmes allant de 2 à 35 jours. La grande diversité des EV les rend responsables de plusieurs syndromes cliniques, il peut s'agir d'une infection inapparente, d'une maladie modérée avec sensation de malaise, fièvre et maux de gorge, ou d'une maladie sévère avec méningites. La guérison peut survenir sans séquelles quel que soit l'aspect clinique (**Collier et Oxford, 2000**).



**Figure 6.** Physiopathologie des infections à Entérovirus (**Hassel, 2015**). L'infection se déroule en quatre phases principales: digestive ou respiratoire, lymphatique, virémique permettant l'atteinte des organes cibles.

### 3. Pathologie humaine

Les EV sont des agents pathogènes communs responsables d'infections très fréquentes puisque estimées à près de 1 milliard chaque année dans le monde (**Palacios et Oberste, 2005 ; Renois, 2012**). Ils sont responsables d'un large panel de pathologies humaines allant de l'infection asymptomatique, voire sub-clinique (majorité des cas),

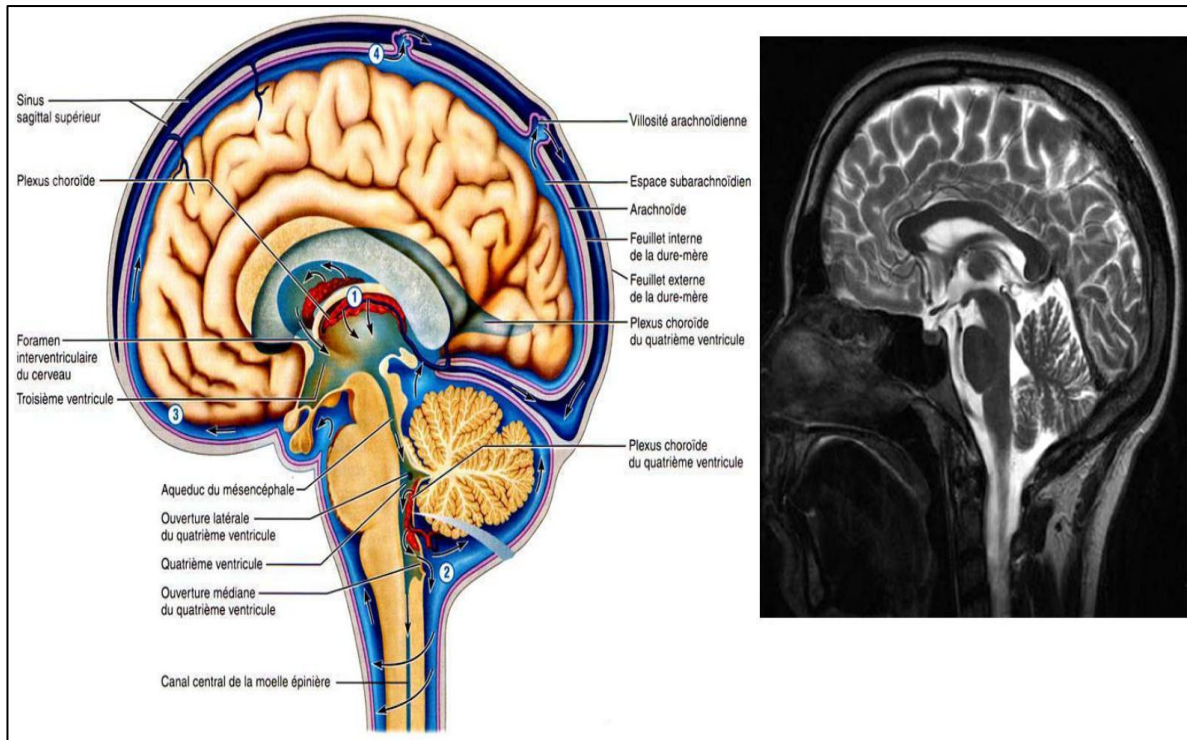
jusqu'à des atteintes multiviscérales mortelles chez le nourrisson ou des infections aiguës fulminantes chez l'adulte. Dans les autres cas, les EV sont responsables d'infections subaiguës ou aiguës dont les séquelles et le pronostic seront variables en fonction des sérotypes, de la dose virale infectieuse, de l'organe cible, de l'âge, du sexe, et du statut immunitaire de l'individu (**Julien et al., 1999**). Le tropisme viral et donc par conséquent les organes cibles infectés, varient en fonction du sous-groupe des EV et des sérotypes viraux (**Pasquier et al., 2013**) (**Tableau II**).

### 3.1. Atteintes neuroméningées

De nombreux sérotypes d'EV peuvent infecter le système nerveux central (SNC) mais le caractère neurotrope et la neurovirulence varient selon le génotype (**Huang et Shih, 2015**). Le poliovirus (espèce EV-C) est le sérotype neurotrope le plus connu en raison des nombreuses épidémies de paralysies flasques occasionnées dans le passé. Parmi les autres EV, l'échovirus 30 (EV-B) et l'EV-A71 (EV-A) sont particulièrement neurotropes et épidémiques (**Collier et Oxford, 2000 ; Owino et Chu, 2019**). Les atteintes du SNC par les EV se manifestent sous la forme de trois entités cliniques principales : les méningites aiguës (dites aseptiques), les encéphalites et les poliomyélites (**Piqueur et al., 2009 ; Volle, 2014**).

#### *Les méningites aseptiques*

Les méningites aseptiques ou aiguës sont des inflammations des méninges au niveau de l'espace sous arachnoïdien, causées par beaucoup d'EV et particulièrement ceux de l'espèce EV-B : echovirus et coxsackievirus B (**Michos et al., 2007 ; Dalwai et al., 2010 ; Wang et al., 2014**). La durée des symptômes (céphalées, fièvre, somnolence, raideur de nuque, photosensibilité, nausées, vomissements...) chez un malade atteint de méningite à EV est d'environ une semaine, cependant, la plupart des adultes présentent des symptômes qui peuvent perdurer deux semaines. Le pronostic des méningites à EV, hormis chez le nouveau-né de moins de 15 jours, est très favorable avec généralement une absence de séquelles neurologiques à long terme (**Rotbart et Hayden, 2000**). Le virus est retrouvé très rapidement après le début des symptômes dans le liquide céphalorachidien (LCR) (**Figure7**). La charge virale dans le LCR dépend de l'âge des patients et du sérotype de l'EV en cause (**Volle et al, 2014**).



**Figure 7.** Le liquide céphalorachidien ou cérébrospinal (Volle, 2014). (A) Le liquide céphalorachidien (LCR) baigne le cerveau et la moelle épinière. Son rôle est d'amortir les chocs et de participer au maintien de l'homéostasie cérébrale. Il est principalement produit par le plexus choroïde et circule dans les ventricules cérébraux et les espaces sous arachnoïdiens au niveau des méninges. Situation et circulation du liquide cérébrospinal (flèches). (B) Radiographie IRM (coupe sagittale), les liquides (LCR et interstitiel) apparaissent en claire.

### 3.2. Autres atteintes

Les EV peuvent atteindre de nombreux autres tissus tels que la peau, les yeux, le cœur, le foie, le pancréas ou les muscles. Les infections de la peau et des muqueuses provoquent le syndrome pied-main-bouche et l'herpangine. Les infections à EV-D70 et CV-A24 peuvent causer des conjonctives hémorragiques aiguës, caractérisées par une incubation de courte durée. Les symptômes sont une augmentation excessive du larmoiement, des douleurs oculaires, un œdème périorbitaire et une rougeur de la conjonctive (Yin-Murphy, 1984). Les EV peuvent être à l'origine de myocardites, de symptômes respiratoires (Andreoletti *et al.*, 2009). De nombreux travaux suggèrent un lien entre les infections à EV et la survenue du diabète insulino-dépendant mais les mécanismes pathogéniques ne sont pas établis (Kondrashova et Hyöty, 2014).

**Tableau II.** Les différentes pathologies associées aux entérovirus humains. D'après Pasquier *et al.*, (2013).

|                                   | PV | CV-A              | CV-B       | E                               | EV 68-71 |
|-----------------------------------|----|-------------------|------------|---------------------------------|----------|
| Atteintes neurologiques           | +  | +                 | +          | +                               | +        |
| Encéphalites                      |    |                   | +          | +                               | +        |
|                                   |    |                   | 2          | 2, 6, 11,19                     | 71       |
| Paralysies                        | +  |                   |            | +                               | +        |
|                                   |    |                   |            |                                 | 70-71    |
| Méningites                        | +  | +                 | +          | +                               | +        |
|                                   |    | 7, 9              | 2, 3, 4, 5 | 4, 6, 7, 9,<br>11,13, 30,<br>31 | 70, 71   |
| Atteintes respiratoires           |    | +                 | +          | +                               | +        |
| Pleurodynie (maladie de Bornholm) |    |                   | +          |                                 |          |
| Pneumopathie                      |    | +                 | +          |                                 | +        |
|                                   |    | 9, 16             | 4, 5       |                                 | 68       |
| Pharyngite                        |    | +                 | +          | +                               | +        |
| Herpangine                        |    | +                 |            |                                 |          |
|                                   |    | 1-6, 8, 10,<br>22 |            |                                 |          |
| Rhinite                           |    | +                 |            |                                 |          |
|                                   |    | 21, 24            |            |                                 |          |
| Atteintes cardiaques              |    |                   | +          |                                 |          |
| Myocardite                        |    |                   | +          |                                 |          |
| Péricardite                       |    |                   | +          |                                 |          |
| Atteintes digestives              |    | +                 | +          | +                               |          |
| Diarrhée                          |    | +                 |            | +                               |          |
|                                   |    | 18, 20-22,<br>24  |            |                                 |          |
| Pancréatite                       |    | +                 | +          |                                 |          |
|                                   |    | 9                 | 5          |                                 |          |

|                                 |   |    |   |    |    |
|---------------------------------|---|----|---|----|----|
| Autres atteintes                | + | +  | + | +  | +  |
| Syndrome mains-pieds-bouche     |   | +  |   |    | +  |
|                                 |   | 16 |   |    | 71 |
| Conjonctivite hémorragique      |   | +  |   |    | +  |
|                                 |   | 24 |   |    | 70 |
| Exanthème de Boston             |   |    |   | +  |    |
|                                 |   |    |   | 16 |    |
| Syndrome de fatigue post-virale |   |    | + |    |    |
| Diabète insulino-dépendant      |   |    | + |    |    |

CVA-B : coxsackie A-B ; E : echovirus ; EV : enterovirus ; PV : Poliovirus.

#### IV. Diagnostic virologique

Comme pour la plupart des virus, le diagnostic virologique est basé sur la mise en évidence de l'un des constituants de la structure du virus (diagnostic virologique direct) ou sur la mise en évidence de la réponse du système immunitaire de l'hôte vis-à-vis de l'infection virale (diagnostic virologique indirect). En raison de la diversité antigénique des EV et de la possibilité de réactions croisées, le diagnostic indirect a un intérêt limité dans le cas des infections à EV. En revanche, une meilleure connaissance de la structure du génome des EV a permis le développement des techniques directes par détection du génome viral.

##### 1. Prélèvement et conservation des échantillons

Les prélèvements doivent être précoces et réalisés à partir d'un prélèvement de gorge (au tout début de l'infection), de selles (où la présence virale est prolongée) et, selon le tableau clinique constaté, de LCR, de vésicules ou d'un prélèvement conjonctival (**Fleury, 2002**). Au laboratoire les échantillons biologiques destinés à la biologie moléculaire doivent être conservés à -80°C pour préserver l'intégrité du génome. Les autres prélèvements peuvent être conservés à -20°C (**Agut et al., 2007**).



## 2. Diagnostic direct

### 2.1. Recherche du virus par isolement sur culture cellulaire

La plupart des isolements sont obtenus après inoculation de cellules cultivées en monocouche ou en suspension. Les cellules cultivées sont généralement de 3 types : cellules hétéroplœides en lignée continue à partir de cellules cancéreuses, cellules diploïdes à partir de cellules embryonnaires, cellules obtenues directement d'un tissu (primo-explantation). Après une incubation, la mise en évidence de la multiplication virale est possible. Elle s'effectue par un examen en contraste de phase de nappe cellulaire à la recherche d'un effet cytopathique (ECP) caractéristique des EV. Ces ECP se traduisant par l'apparition de grandes cellules réfringentes se généralisant à l'ensemble du tapis cellulaire 2 à 12 jours après l'inoculation (**Grosjean et al., 2011**).

Pour confirmer que le virus isolé dans des cultures cellulaires est un EV, il est possible d'effectuer un test rapide à l'aide d'un antigène spécifique de groupe partagé par la plupart des sérotypes d'EV et situé dans la protéine VP1 (**Samuelson et al., 1990 ; Bourlet et al., 1998 ; Apostol et al., 2012**).

### 2.2. Recherche du génome viral par RT-PCR

La technique de Reverse Transcription (RT) PCR est une méthode d'amplification en ciblant des séquences localisées dans la région 5' NC, hautement conservée chez les EV (**Capaul et Gorgievski-Hrisoho, 2005 ; Hymas et al., 2008 ; Pillet et al., 2010 ; Harvala et al., 2018**). Elle permet un diagnostic étiologique rapide (en moins de 48 h) des infections à EV et cela quel que soit le type de prélèvement. C'est donc une technique universelle à variantes selon le type de sondes et le mode de révélation du produit d'amplification. Les amorces les plus souvent choisies sont localisées dans la région 5' non codante (**Nijhuis et al., 2002 ; Zoll et al., 2009 ; Pillet et al., 2010 ; Leveque et al., 2012**).

Récemment, l'amplification et le séquençage moléculaire des séquences codant une partie des gènes des protéines de capsid VP1 ou VP4/VP2, permettent de réaliser une identification génotypique des souches d'EV. Cette approche technique est particulièrement utile quand la souche est non cultivable et elle permet de réaliser des études d'épidémiologie moléculaire (suivi épidémiologique des souches, identifications des infections nosocomiales...) (**Oberste et al., 1999a ; Oberste et al., 1999b ; Bendig et al., 2001 ; Nix et al., 2006 ; Tsai et al., 2011 ; Ibrahim et al., 2014 ; Shabani et al., 2018**).

### 3. Diagnostic indirect

La technique de référence est la réaction de séroneutralisation du pouvoir infectieux viral sur culture cellulaire, en principe spécifique de type, bien que des réactions croisées soient possibles. Les techniques immuno-enzymatiques ou la fixation du complément, d'utilisation plus aisée, sont mal standardisées et donnent de fréquentes réactions croisées. La détection des IgM fait appel aux mêmes techniques (après séparation des IgG/IgM par gel filtration ou chromatographie échangeuses d'ions pour la séroneutralisation) mais elle est peu pratiquée (Fleury, 2002 ; Agut *et al.*, 2007).

### V. Prévention des infections et développement d'un vaccin

Aucun EV, y compris le virus polio, n'est sensible aux antiviraux et il n'existe pas de vaccin sauf pour la polio. Le contrôle de ces infections dépend des mesures d'hygiène, tout particulièrement celles permettant de réduire la transmission oro-fécale (Weil *et al.*, 2019). Ceci implique non seulement de traiter correctement l'eau, la nourriture et les évacuations d'eaux usées, mais aussi les mesures individuelles comme le lavage des mains et la désinfection appropriée de matériel potentiellement contaminé (Collier et Oxford, 2000).

La prophylaxie de la poliomyélite grâce à une immunisation active par le vaccin de poliovirus inactivés (IPV; « *Inactivated Polio Vaccine* »; Salk, 1955). Il contient des poliovirus inactivés des trois sérotypes. On recommande deux injections à 2 et 4 mois chez le nourrisson, pour obtenir une immunisation de base, avec rappels à 11 mois, 6 ans, entre 11-13 ans, 25 ans, 45 ans, 65 ans puis tous les 10 ans. Le vaccin oral (OPV, « *Oral Polio Vaccine* »; Sabin 1961 monovalent et 1963 trivalent) contient des virus atténués de trois types capables de se multiplier. Ceux-ci mutent occasionnellement en types sauvages et peuvent alors provoquer une poliomyélite vaccinale. L'OPV est utilisé pour l'éradication des Poliovirus sauvages et n'est plus employé, dans les pays où le Poliovirus est éradiqué, que comme vaccination de protection locale en cas de réintroduction d'un virus sauvage (Arita *et al.*, 2005 ; OMS, 2006 ; Prescott *et al.*, 2010 ; Kayser *et al.*, 2017).

# *Matériel et Méthodes*

Le travail a été réalisé au niveau de l'**Institut Pasteur d'Alger (IPA)**, laboratoire des Entérovirus, Laboratoire National de Référence OMS pour la surveillance de la Poliomyélite en Algérie, du 23/02/2019 au 20/06/2019. Son objectif principal est **« L'évaluation de la détection des Entérovirus par isolement sur culture cellulaire et par des techniques de biologie moléculaire, à partir de LCR en cas de méningite virale ».**

Objectifs spécifiques :

- Comparer les résultats de la PCR classique et de la PCR en temps réel à la culture cellulaire ;
- Comparer le résultat final rendu de la PCR classique à celui de la PCR en temps réel ;
- Identifier les souches isolées à partir de la culture cellulaire, par une technique moléculaire de génotypage.

## I. Prélèvement

Des échantillons de LCR (50) ont été prélevés de patients avoir une méningite virale. Le prélèvement a été effectué par une ponction lombaire\* afin de recueillir le LCR, entre la 3ème et la 4ème ou entre la 4ème et la 5ème vertèbre lombaire. Ensuite, les LCR ont été transportés au laboratoire dans des conditions réfrigérés (glacière à 4°C), considérés comme prélèvements fragiles.

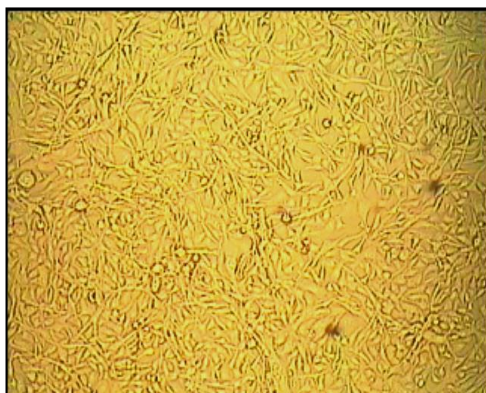
Les EV, sont mis en évidence par isolement sur culture cellulaire, par RT-PCR classique et par RT-PCR en temps réel, en respectant les bonnes pratiques microbiologiques (OMS, 2005).

## II. Isolement sur culture cellulaire

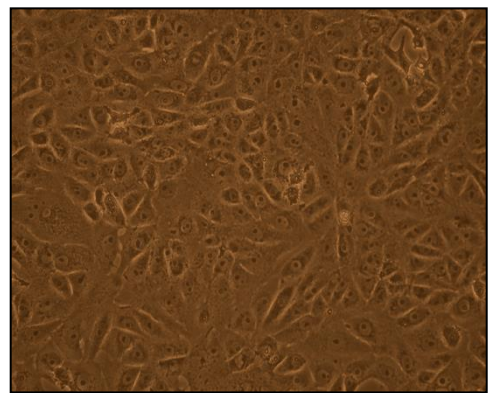
Les virus sont mis en évidence par inoculation sur des cultures *in vitro* de cellules **RD, Vero**. Ces cellules, dont la subculture est possible pendant un temps à priori infini, sont en effet sensibles à l'infection de la plupart des entérovirus.

**Les lignées cellulaires\* RD**, dérivées de Rhabdomyosarcome humain (tumeur maligne développée à partir du tissu musculaire strié squelettique), elles sont hautement sensibles aux Poliovirus, Echovirus et certains autres Entérovirus, tous producteurs d'ECP caractéristique (**Figure 08**).

**Les lignées cellulaires Vero** (*Verda Reno* = Rein vert en espéranto), dérivées des cellules épithéliales de rein d'un singe vert africain, sont sensibles aux Entérovirus non poliomyélitiques, tous producteurs d'ECP caractéristique (**Figure 09**).



**Figure 08.** Cellules RD observées sous microscope optique inversé.



**Figure 09.** Cellules Vero observées sous microscope optique inversé.

## 1. Préparation de la culture cellulaire

### 1.1. Congélation des lignées cellulaires

Les lignées cellulaires, une fois arrivées au laboratoire (**Figure 10**), sont reproduites et conservées dans des cryotubes additionnés d'un cryoconservateur [Démethyl sulphoxyde (DMSO)] dans de l'azote liquide à  $-196^{\circ}\text{C}$  (**Figure 11**).



**Figure 10.** Lignée cellulaire Vero arrivée au laboratoire dans une grande flasque.



**Figure 11.** Conservation des cellules dans de l'azote liquide à  $-196^{\circ}\text{C}$ .

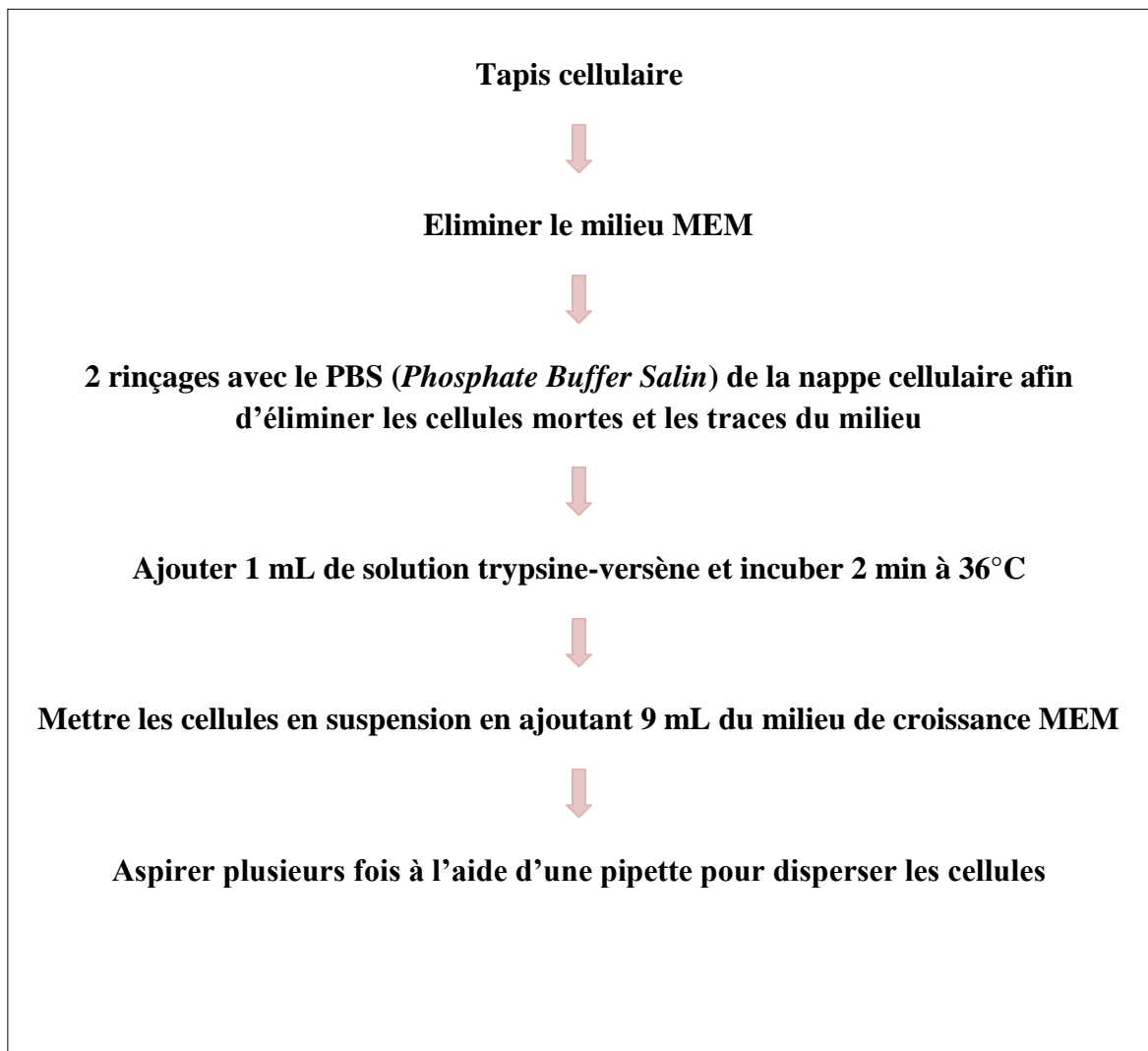
### 1.2. Décongélation des cellules

En vue d'utilisation, la lignée cellulaire est décongelée dans un bain marie à  $36^{\circ}\text{C}$  quelques secondes, puis cultivée dans une boîte en plastique de 25 mL ( $75\text{ cm}^2$ ) avec un milieu de croissance\* complet : *Minimum Eagle Media* « MEM », supplémenté de 1% pénicilline-streptomycine, 1% de Glutamine, et de 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) (**Annexe 1**). Le milieu est renouvelé 6 à 8 heures après, pour remplacer l'ancien milieu, contenant le DMSO, considéré comme toxique pour les cellules en activité.

### 1.3. Trypsination et numération cellulaire

#### 1.3.1. La trypsination

La trypsination a pour but de dissocier le tapis cellulaire pour obtenir des cellules individualisées qui, mises en présence d'un milieu de croissance reformeront un tapis. Pour se faire, une solution stérile de trypsine-versène (EDTA) est utilisée. Cette technique est réalisée selon le protocole décrit (**Figure 12**).



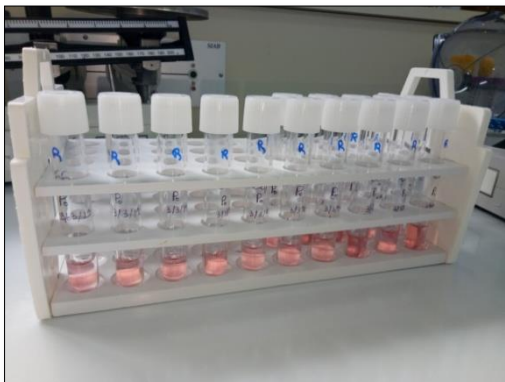
**Figure 12.** Protocole de la Trypsination.

#### 1.3.2. La numération cellulaire

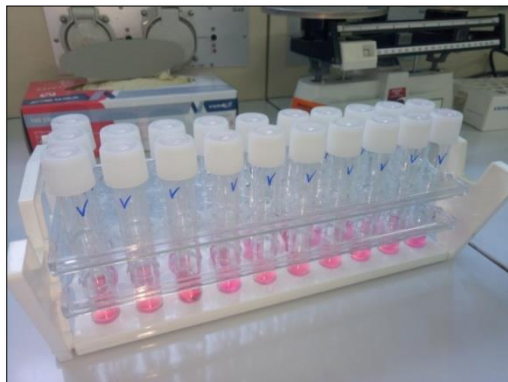
La numération permet de connaître le nombre de cellules vivantes dans la suspension en diluant un volume de 0.2 mL de cette suspension avec 0.2 mL de bleu de Trypane (colore les cellules mortes en bleu). Ensuite, la numération est réalisée à l'aide d'un

Haemocytomètre (Cellule de Neubauer) sous un microscope optique inversé dont la technique est détaillée (voir **Annexe 2**).

Une concentration d'au moins  $10^5$  cellules/mL est répartie dans chaque tube. Enfin, les tubes sont incubés pendant 48 h dans une étuve à  $36^{\circ}\text{C}$  (**Figures 13, 14, 15**).



**Figure 13.** Tubes de culture cellulaire RD.



**Figure 14.** Tubes de culture cellulaire Vero.



**Figure 15.** Incubation des tubes contenant les lignées cellulaires en suspension dans l'étuve à  $36^{\circ}\text{C}$ .

## 2. Inoculation

Après 48 heures et quand la confluence des tubes est d'au moins 70%, le milieu de croissance contenu dans les tubes est remplacé par du milieu de survie\* DMEM. (Dulbecco's Modified Eagle Medium) à 2% de SVF.

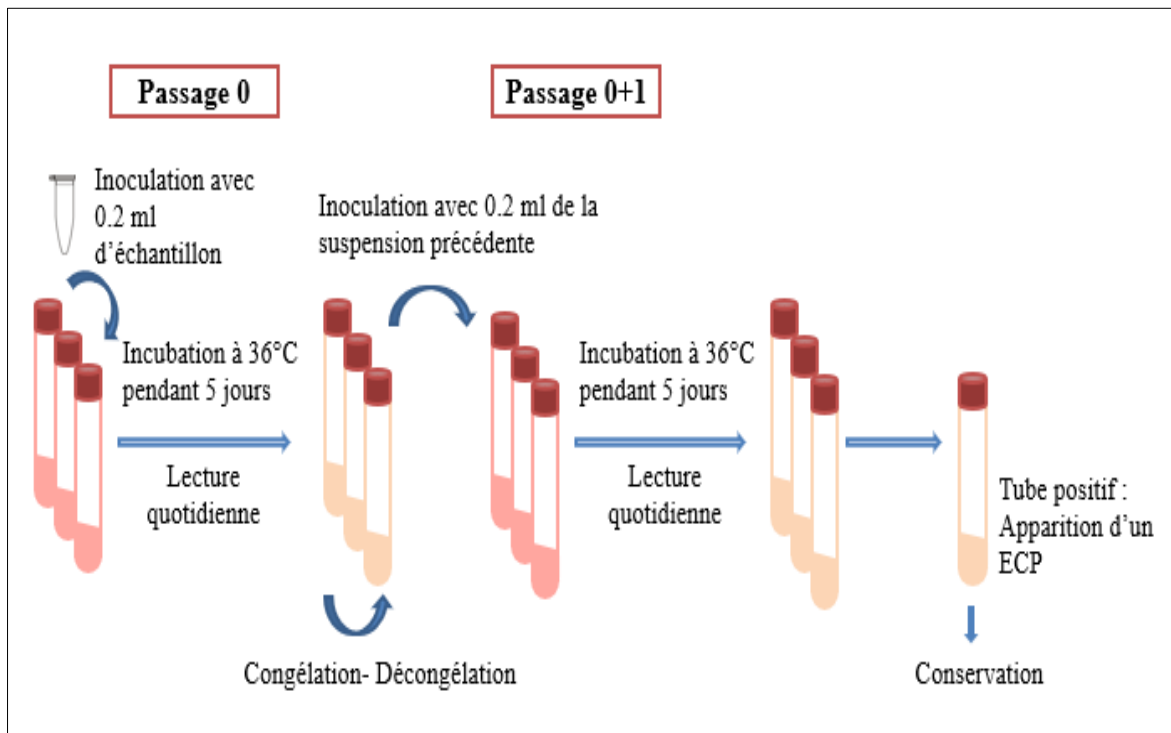
Dans un premier temps, chaque échantillon de LCR est inoculé dans 2 tubes de cellules RD et 2 tubes de cellules Vero à raison de 0.2 mL par tube, puis incubé dans une étuve à  $36^{\circ}\text{C}$ . Ceci constitue le passage 0 (P0).



Une lecture quotidienne des tubes au microscope inversé est réalisée pendant 5 jours. Si les tubes ne présentent aucun ECP ; un passage aveugle\* (P0+1) est réalisé dans de nouveaux tubes après une étape de congélation- décongélation des tubes précédents à (-20°C).

Les passages permettent :

- ✓ La dilution des éventuelles substances toxiques pour les cultures cellulaires au cours de chaque passage ;
- ✓ La mise en évidence des virus à multiplication lente sur culture cellulaire ;
- ✓ La confirmation des ECP du passage précédent.



**Figure 16.** Isolement des EV en culture cellulaire (originale).

### 3. Lecture de l'ECP

L'ECP est révélé sous microscope optique inversé après un ou plusieurs passages. Il est marqué par une première phase d'arrondissement des cellules (formes réfringentes), puis une lyse rapide de la nappe cellulaire. Les isolats produisant des ECP typiques des entérovirus ont été confirmés par biologie moléculaire.

### III. Amplification génique

L'amplification génique est une réaction qui permet d'amplifier *in vitro* une région spécifique d'un acide nucléique donné afin d'obtenir une quantité suffisante pour le détecter et l'étudier.

#### 1. Extraction de l'ARN viral

L'extraction a été réalisée en utilisant deux méthodes :

##### 1.1. Méthode manuelle

La méthode manuelle, a été réalisée selon le protocole suivant, d'après **Casas *et al.*, (1995)**:

- *Préparation du mélange d'extraction*

Le mélange d'extraction est composé de 150  $\mu\text{L}$  de l'échantillon à analyser, additionné de 600  $\mu\text{L}$  Tampon de Lyse à pH neutre dont leur composition est détaillée (**voir Annexe 3**) et de 5  $\mu\text{L}$  Glycogène (10 mg/mL), préalablement homogénéisé et incubé pendant 15 mn à température ambiante. Le mélange contient également 600  $\mu\text{L}$  d'isopropanol et le tout est incubé pendant 30 mn à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

- *Procédure*

- Centrifuger le mélange d'extraction (14000 g/10 mn/4°C) ;
- Eliminer le surnageant et ajouter 1 mL de 70% éthanol froid au culot ;
- Centrifuger le mélange obtenu (14000 g/10 mn/4°C) ;
- Eliminer le surnageant et ajouter 1 mL Ethanol froid à 100% au culot ;
- Centrifuger (14000 g/5 mn/4°C) ;
- Eliminer le surnageant et laisser sécher ;
- Dissoudre le culot dans 30  $\mu\text{L}$  de 1 mM DTT (Dithiothréitol).

##### 1.2. Extraction sur colonne de silice

La deuxième méthode d'extraction de l'ARN cellulaire s'est faite à l'aide du coffret « QIAamp® Viral RNA » en utilisant la méthode d'extraction sur colonne de silice dont le protocole est comme suit :

1. Dans un microtube de 1.5 mL, déposer 560  $\mu$ L de **Tampon de Lyse** à pH neutre et 5.6  $\mu$ L d'ARN carrier préalablement préparé (**voir Annexe 4**) dont le rôle est de faire décanter les molécules d'ARN issues de la lyse, puis ajouter 140  $\mu$ L du LCR.
2. Agiter pendant 15 secondes et incuber 10 min à température ambiante.
3. Ajouter 560  $\mu$ L d'éthanol (96-100%) puis mélanger sur un agitateur - 15 s.
4. Préparer le système colonne de silice + tube collecteur.
5. Pipeter 630  $\mu$ L du lysat et les transférer dans la colonne de silice.
6. Centrifuger à 6000 g (8000 rpm) pendant 1 minute.
7. Après centrifugation, le filtrat est jeté et volume restant du lysat (630  $\mu$ L) est transféré dans la même colonne de silice puis centrifugé 6000 g (8000 rpm) pendant 1 minute.
8. Après centrifugation, la colonne est placée dans un nouveau tube collecteur.
9. Ouvrir délicatement la colonne y ajouter 500  $\mu$ L de la première **solution de lavage** et centrifuger à 6000 g (8000 rpm) pendant 1 minute.
10. Après centrifugation placer la colonne dans un nouveau tube collecteur de 2 mL et jeter celui contenant le filtrat.
11. Ouvrir délicatement la colonne y ajouter 500  $\mu$ L de la deuxième **solution de rinçage**, refermer et centrifuger à vitesse maximale (20000 g ; 14000 rpm).
12. Après centrifugation placer la colonne dans un nouveau tube collecteur de 2 mL et centrifuger à vitesse maximale (20000 g ; 14000 rpm) pendant 1 mn pour éliminer tous les résidus de l'éthanol.
13. Placer la colonne de silice dans le microtube libellé et jeter le tube collecteur contenant le filtrat.
14. Ouvrir délicatement la colonne y ajouter 50  $\mu$ L de **solution d'élution** bien au centre de la colonne.
15. Incuber 1 minute à température ambiante.
16. Centrifuger à 6000 g (8000 rpm) pendant 1 minute.

L'ARN ainsi extrait peut être conservé à  $-80^{\circ}\text{C}$  ou être immédiatement transcrit en ADN complémentaire (ADNc) par rétro transcription (RT).

## 2. RT- PCR classique

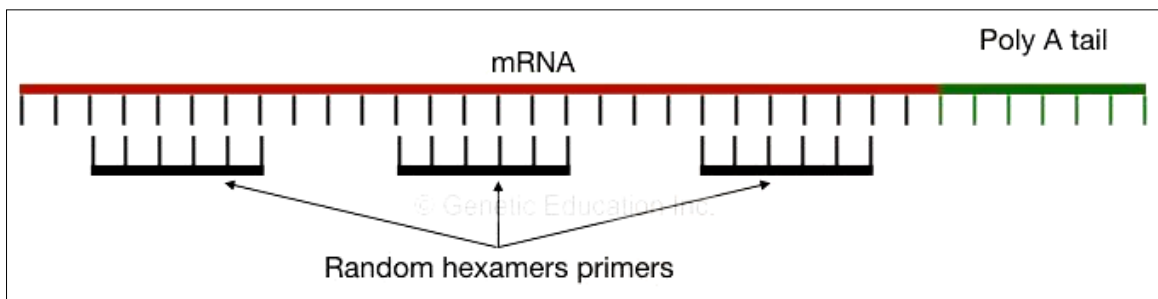
L'amplification des échantillons extraits a été réalisée en deux étapes : une étape de transcription inverse, puis une étape d'amplification PCR. Au préalable, il a été nécessaire d'établir un protocole expérimental, c'est à dire:

- ✓ Choisir le gène à amplifier et les amorces permettant cette amplification ;
- ✓ Déterminer les conditions expérimentales de la RT/PCR (température, durée, mélange réactionnel).

### 2.1. Transcription inverse

Le but de cette étape est de transcrire l'ARN viral en ADNc après une étape de dénaturation qui se fait en 5 min à 97°C. L'ADNc est synthétisé à partir de l'ARN extrait à l'aide d'un random hexamère (rH) à 10 mM (**Figure 17**).

Le volume réactionnel : 20 µL. Contient : 3.5 µL de tampon (x10) ; 3.5 µL de MgCl<sub>2</sub> (50mM) ; 1.25 µL de rH ; 1µL de dNTP (10mM) ; 1 µL de MMLV\* (200 U/µL) transcriptase inverse (Promega) ; 4.75 µL d'H<sub>2</sub>O stérile (RNase free) et 5 µL d'ARN extrait dénaturé. La rétro-transcription s'effectue à 37°C pendant 1 h. Les hybrides ARN-ADN sont ensuite dénaturés, et la reverse transcriptase est inactivée par un choc thermique (2 min dans la glace). Le produit final est un ADNc monocaténaire néosynthétisé (à la substitution de U par T). Il peut être conservé à -20°C ou être directement amplifié par PCR.



**Figure 17.** Le principe de la Rétro-transcription en utilisant le random hexamère (rH).

### 2.2. Amplification

La PCR permet d'amplifier le fragment d'ADNc. Pour réaliser cette PCR, 1 µL d'ADNc sont ajoutés à 24 µL du mélange réactionnel contenant : 12.5 µL de Taq polymérase ; 0.5 µL de chaque amorce (amorce sens + amorce anti-sens) et 10.5 µL

d'H<sub>2</sub>O. L'amplification est effectuée durant 30 cycles de : 30 secondes à 94°C pour la dénaturation, 30 secondes à 55°C pour l'hybridation et 45 secondes à 72°C pour l'élongation suivie d'une longue élongation de 7 mn, dans un thermocycleur 2720 « Applied Biosystems » (**Figure 18**).

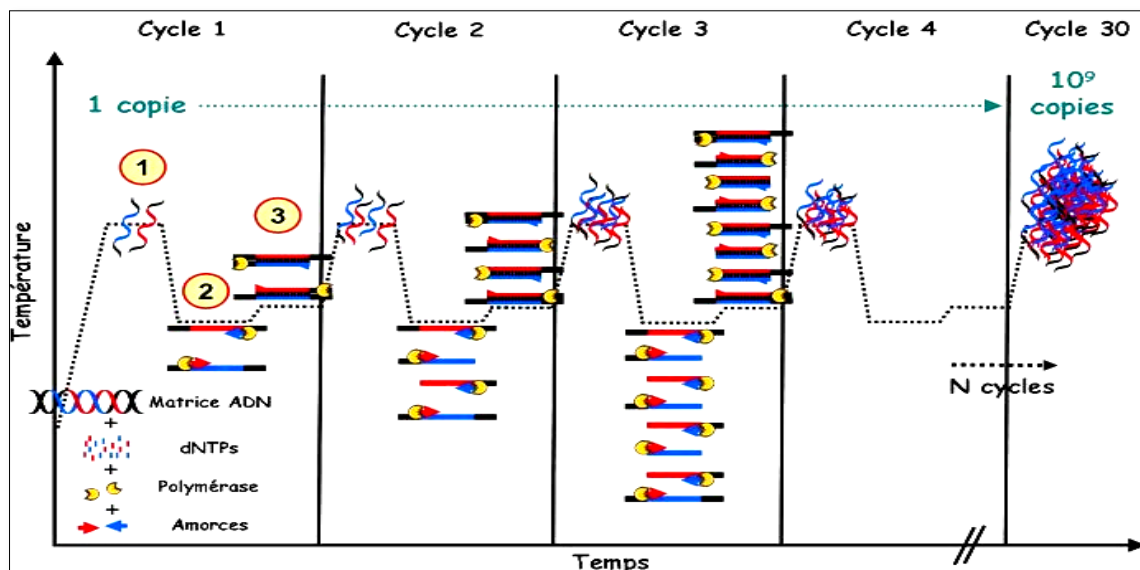
Quatre couples d'amorces ont été testées, seule la série sélectionnée est décrite dans le **tableau III**. L'amorce (EV1/EV2) s'hybride dans la région 5' NC du génome des EV, ce qui permet d'obtenir un amplicon d'environ 113 nucléotides.

**Tableau III.** Les amorces utilisées dans la réaction de la RT-PCR classique. D'après **Rotbart *et al.*, (1994)**.

| Amorce          | Séquence                         | Position |
|-----------------|----------------------------------|----------|
| Sens (EV2)      | 5'-TCCGGCCCCTGAATGCGGCTAATCC-3'  | 446-470  |
| Anti-sens (EV1) | 5'-ACACGGACACCCAAAGTAGTCGGTCC-3' | 533-559  |



**Figure 18.** Le thermocycleur 2720 « Applied Biosystems » utilisé pour la RT-PCR classique.



**Figure 19.** Principe de la PCR. Un cycle de PCR débute par la dénaturation des doubles brins (1). Il est suivi par l'hybridation des amorces spécifiques de la région à amplifier (2) permettant alors l'action de la polymérase et la synthèse du brin complémentaire (3). Au cours de la PCR, les cycles sont répétés un certain nombre de fois afin d'aboutir à une amplification conséquente des séquences d'intérêt.

### 2.3. Révélation des produits d'amplification

#### 2.3.1. Préparation du gel d'agarose

La préparation du gel d'agarose à 2% est faite dans un flacon en ajoutant 0.6 g d'agarose en poudre (Invitrogen®) dans 30 mL du tampon Tris-Acétate-EDTA (TAE) généralement au pH 8,0. Le mélange est chauffé au four micro-onde jusqu'à dissolution complète de l'agarose après quoi, on le laisse refroidir. Ensuite, nous ajoutons 2-3  $\mu\text{L}$  d'un révélateur SYBR-Safe\*. Dans une cuve, les peignes séparateurs (08 ou 12 dents) sont alignés, le gel est coulé et laissé à température ambiante pour son refroidissement. Les peignes sont ensuite retirés après refroidissement.

#### 2.3.2. Migration électrophorétique

La migration électrophorétique est effectuée comme suit :

- ✓ Dans le premier puits, déposer le marqueur de poids préparé (1 $\mu\text{L}$  tampon de charge ; 1 $\mu\text{L}$  de marqueur de poids pour permettre d'estimer la taille du fragment amplifié et 4 $\mu\text{L}$  de TAE) ;
- ✓ Les autres puits contiendront 6 $\mu\text{L}$  de chaque échantillon présumé amplifier et dans l'ordre de numérotation ;

- ✓ Les témoins négatif et positif sont déposés dans les deux derniers puits ;
- ✓ La migration électrophorétique a été effectuée pendant 50-60 mn sous une tension de 80 V ;
- ✓ Observer la migration du colorant de charge de la cathode vers l'anode.



**Figure 20.** Migration électrophorétique à l'aide d'un générateur sous une tension de 80V.

### 2.3.3 Visualisation et interprétation des résultats

Les différents fragments amplifiés sont visualisés en fin de migration à l'aide d'un transilluminateur. La lecture des résultats se fait sous UV en comparant la taille des bandes de différents échantillons à celle des bandes du marqueur du poids moléculaire et des témoins positif et négatif. Le contrôle positif est dit positif, si la bande migre à la bonne taille. Le contrôle négatif est dit négatif si aucune bande ne migre. Un échantillon est considéré positif si la bande apparaît à la bonne taille. Un échantillon est considéré négatif si aucune bande n'apparaît et si seulement des bandes parasites apparaissent.

## 3. RT-PCR en Temps réel

Les RT-PCR en temps réel ont été réalisées avec le thermocycleur ABI 7500 « Applied Biosystems » (**Figure 21**). Le coffret « One-step RT-PCR (Invitrogen) » a été utilisé pour la réalisation des réactions de RT-PCR à l'aide des amorces complémentaires à la région 5'NC (**Tableau IV**). Ceci permet la synthèse d'ADNc et son amplification en une seule étape.

### 3.1. Préparation de mélange réactionnel

Dans chaque tube, le mélange réactionnel est composé de :

- ✓ Master Mix One-step RT-PCR : 10  $\mu$ L;
- ✓ Amorce sens : 0.6  $\mu$ L ; Amorce anti-sens : 1.7  $\mu$ L ;
- ✓ Sonde : 0.4  $\mu$ L ; H<sub>2</sub>O : 2.3  $\mu$ L.

Le mélange réactionnel est distribué à raison de 15  $\mu$ L par tube, auquel est rajouté 5  $\mu$ L de l'échantillon extrait pour un volume total de 20  $\mu$ L.

**Tableau IV.** Les amorces utilisées dans la réaction de la RT-PCR en temps réel. D'après *Verstrepen et al., (2001)*.

| Amorce    | Séquence                   |
|-----------|----------------------------|
| Sens      | 5'-CCCTGAATGCGGCTAATCC-3'  |
| Anti-sens | 5'-ATTGTCACCATAAGCAGCCA-3' |



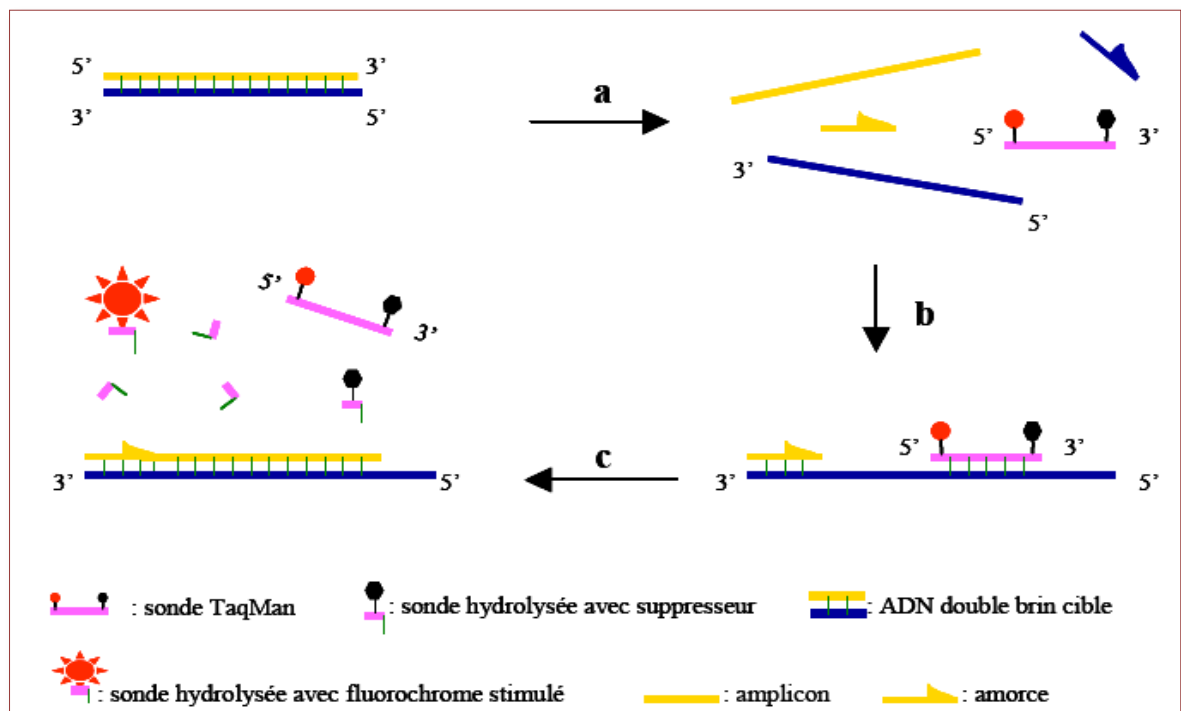
**Figure 21.** Le thermocycleur ABI 7500 « Applied Biosystems » utilisé pour la réaction de la RT-PCR en temps réel.

### 3.2. Amplification et lecture des résultats

La RT-PCR en temps réel se fait comme suit : transcription inverse de 30 mn à 50°C, suivie d'une étape de dénaturation de 5 mn à 95°C. L'étape d'amplification est réalisée en 40 cycles de dénaturation de 10 s à 95°C, et d'hybridation de 30 s à 60°C.



Si le gène cible existe dans le milieu, les amorces et les sondes s'y fixent ; la polymérase, par ses activités polymérasique et 5'-exonucléasique, permet l'élongation du néo-brin et l'hydrolyse de la sonde. La sonde hydrolysée, du fait de l'éloignement du fluorochrome émetteur (reporter) (ex : 6-carboxyfluorocein) fixé à l'extrémité 5' de la sonde et du second fluorochrome suppresseur (quencher) (ex : 6-carboxy-tetramethyl-rhodamine) présent à l'extrémité 3', émet une fluorescence captée et traduite en signal électrique par les photomultiplicateurs (**Figure 22**). La quantité de fluorescence est proportionnelle à la quantité des produits de PCR dans le milieu.



**Figure 22.** Principe de la RT-PCR en utilisant des sondes d'hydrolyse (Poitras et Houde, 2002). (a) Durant l'étape de dénaturation, la sonde est libre en solution. (b) À la température d'appariement, la sonde et les amorces s'hybrident à leurs séquences cibles respectives et la proximité des fluorochromes permet l'inhibition de la fluorescence. La polymérisation débute. (c) La polymérase déplace et hydrolyse la sonde. Le fluorochrome émetteur est libéré de l'environnement du suppresseur permettant ainsi l'émission de la fluorescence.

#### IV. Identification moléculaire des isolats

La méthode de typage moléculaire utilisée pour identifier les isolats obtenus en culture cellulaire repose sur l'amplification des séquences situées dans une région hypervariable des entérovirus VP1. Elles sont utilisées pour détecter spécifiquement le génome d'un EV (**Oberste *et al.*, 2010**). Le séquençage enzymatique des fragments d'ADN amplifiés est effectué selon la méthode de Sanger.

##### 1. Amplification

Une première amplification a été réalisée en utilisant des amorces dégénérées\* (**Tableau V**). Le milieu réactionnel est composé de :

- ✓ Taq polymérase ; 25 µL
- ✓ Amorce sens (10mM) ; 2.5 µL
- ✓ Amorce anti-sens (10mM) ; 2.5 µL
- ✓ H2O ultra-pure ; 18 µL.

Le mélange réactionnel est distribué à raison de 48 µL par tube, auquel est rajouté 2µL de l'ADNc pour un volume total de 50 µL. L'amplification est effectuée durant 35 cycles de : 30 secondes à 95°C pour la dénaturation, 20 secondes à 60°C pour l'hybridation et 15 secondes à 72°C pour l'élongation suivie d'une longue élongation de 2 mn, dans un thermocycleur 2720 « Applied Biosystems ». Les produits de PCR sont révélés par migration sur gel d'agarose (1%) avant d'être purifiés.

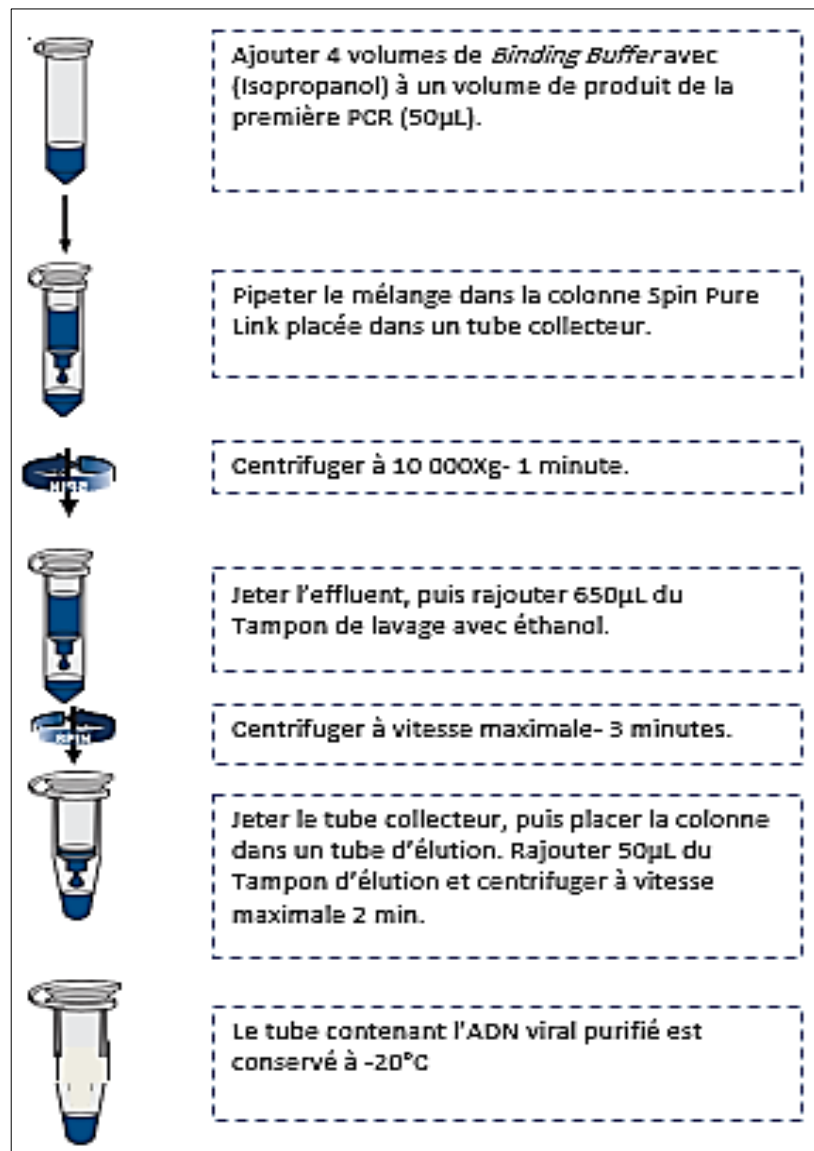
**Tableau V.** Les amorces dégénérées utilisées pour le séquençage (**Nix *et al.*, 2006**)

| Amorce | Séquence                                   | Localisation |
|--------|--|--------------|
| AN 89  | 5'- <i>CCAGCACTGACAGCAGYNGARAYNGG</i> -3'  | 2602-2627    |
| AN 88  | 5'- <i>TACTGGACCACCTGGNGGNAYRWACAT</i> -3' | 2977-2951    |

La séquence indiquée en italique est la partie non dégénérée de l'amorce.  
**N** : G ou A ou T ou C ; **R** : G ou A ; **W** : A ou T ; **Y** : T ou C.

## 2. Purification des produits d'amplification

Une purification des fragments d'ADN amplifiés est réalisée par un traitement enzymatique, dont le protocole est décrit dans la figure suivante, dégradant les amorces et les dNTP restants en première PCR (**Figure 23**).



**Figure 23.** Le protocole de la purification selon le kit Invitrogen.

### 3. Deuxième amplification

Les échantillons sont amplifiés à nouveau en utilisant des amorces non dégénérées (des amorces spécifiques) et marqués en utilisant un kit de marquage « *Big Dye Terminator Cycle Sequencing* » (Applied Biosystems). Les amorces utilisées sont représentées dans le **tableau VI** ci-après.

Le milieu réactionnel de 10  $\mu$ L est composé de :

- ✓ Des ddNTP marqués par un composé fluorescent « Dye » : 1  $\mu$ L
- ✓ Amorce sens ou anti-sens (10mM) : 0.4  $\mu$ L ;
- ✓ Tampon : 2  $\mu$ L ;
- ✓ H<sub>2</sub>O ultra-pure : 5.1  $\mu$ L ;
- ✓ ADN pure : 1.5  $\mu$ L.

L'amplification s'effectue dans un thermocycleur selon le programme suivant : 1mn à 96°C, puis 15 cycles de : 10 s à 96°C, 5 s à 50°C, 1 mn-15 s à 60°C, 5 cycles de : 10 s à 96°C, 5 s à 50°C, 1 mn-30 s à 60°C, 5 cycles de : 10 s à 96°C, 5 s à 50°C, 2 mn à 60°C et un cycle à 4°C (refroidissement).

**Tableau VI.** Des amorces spécifiques utilisées pour le séquençage. D'après **Nix et al., (2006)**.

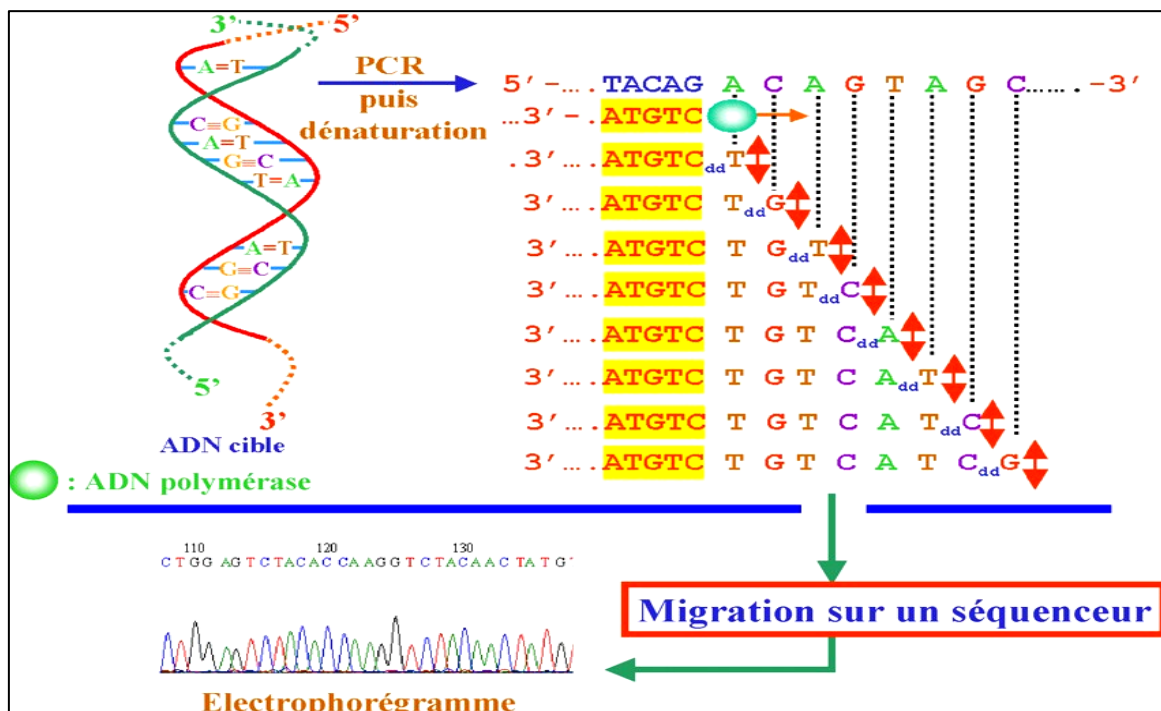
| Amorce | Séquence              | Localisation |
|--------|-----------------------|--------------|
| AN232  | 5'-CCAGCACTGACAGCA-3' | 2602-2616    |
| AN233  | 5'-TACTGGACCACCTGG-3' | 2977-2963    |

\*AN 232 est la partie « non dégénérée d'AN89.

\*AN 233 est la partie « non dégénérée d'AN88.

### 4. Précipitation de l'ADN et séquençage

L'ADN obtenu est ensuite précipité par 80  $\mu$ L d'éthanol à 80%, centrifugé 2500 rpm/35mn, lavé avec de l'éthanol à 70% et centrifugé une deuxième fois à 3500 rpm/ 5mn. Ensuite, le culot est séché par centrifugation à 1000 rpm dans une centrifugeuse plaque inversée. Le culot sec est suspendu dans une solution de formamide, agité 15-20 mn, puis introduit dans un séquenceur « ABI Prism 3100 DNA séquenceur, Applied Biosystems ». Le principe du séquençage est décrit dans la figure suivante :



**Figure 24.** Le principe de séquençage selon la méthode de Sanger (Lamoril *et al.*, 2008). Après dénaturation du produit amplifié par séquençage, l'un des deux brins s'hybride à une amorce spécifique. L'incorporation aléatoire d'un ddNTP à la place d'un dNTP ne permet plus la polymérisation par l'ADN polymérase. L'extension s'arrête. À la fin de la réaction de séquence effectuée selon des cycles thermiques identiques à ceux de la PCR (on parle de PCR asymétrique, une seule amorce étant utilisée au lieu de deux), nous avons des fragments de taille différente. Ces fragments sont soumis à migration dans un champ électrique. Il s'agit le plus souvent d'une électrophorèse capillaire. Chaque ddNTP étant marqué par un fluorophore différent, un signal lumineux sera généré, spécifique de la base didéoxy incorporée. Les signaux lumineux sont analysés par un logiciel spécifique, et le résultat de l'analyse peut être lu, par exemple, sous forme d'un électrophorégramme de lecture facile.

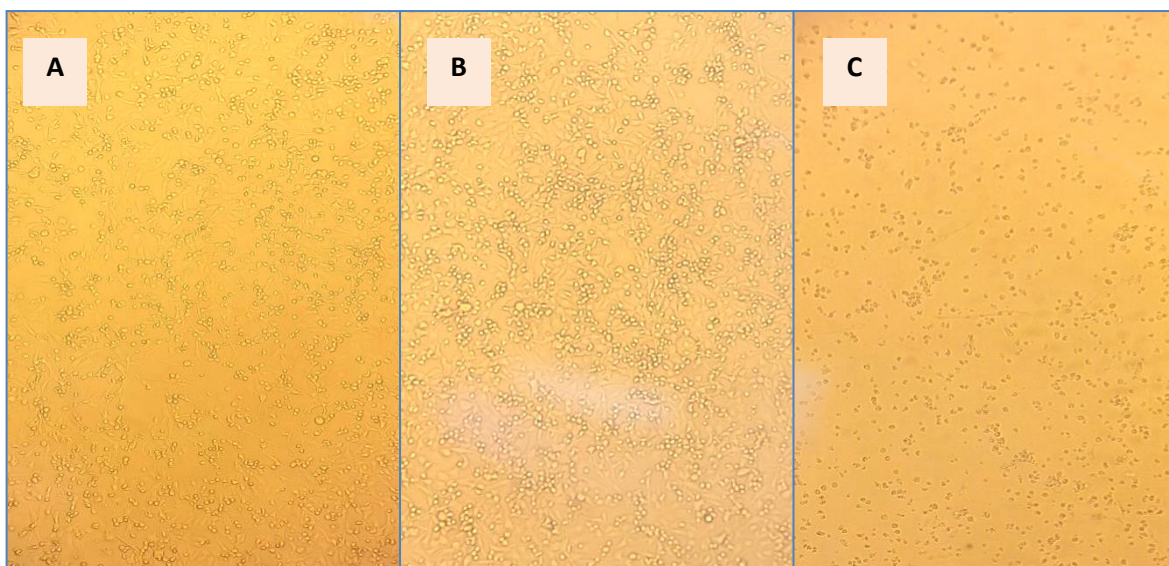
## 5. Analyse phylogénétique

Les séquences obtenues sont alignées en utilisant le MEGA-6 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0), puis comparées aux séquences disponibles auprès du *National Center for Biotechnology Information* (NCBI : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) en utilisant l'algorithme BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

# *Résultats et Discussion*

## I. Isolement sur culture cellulaire

Trois résultats positifs ont été observés sur la lignée cellulaire RD sur un total de 50 échantillons de LCR. Durant les sept premiers jours de lecture (P0), l'observation microscopique n'a révélé aucune différence morphologique entre les cultures infectées et les contrôles négatifs (lignée non inoculée). Au passage aveugle (P0+1), la viabilité cellulaire est moins importante pour les cellules infectées par rapport aux témoins. Les cellules se sont arrondies, sont devenues réfringentes et une destruction du tapis cellulaire ont été observé dans les cultures infectées (**Figure 25**).



**Figure 25.** Un effet cytopathique (ECP) caractéristique des EV sur des cellules RD. (A) ECP à 50% sur les cellules infectées par le virus ; (B) ECP à 75% sur les cellules infectées par le virus ; (C) Un ECP à 100% du à l'infection de toutes les cellules RD par le virus.

Deux lignées cellulaires ont été utilisées dont l'intérêt est d'augmenter la chance d'isoler le virus vu qu'il n'y a pas de lignée cellulaire permettant l'isolement de tous les EV (**Hamza et al., 2011**). La lignée cellulaire RD semble être plus sensible aux EV de nos échantillons par rapport aux cellules Vero, ce qui est trouvé aussi dans l'étude de **Melnick, (1996)**.

Dans la littérature, plusieurs études ont montrées que les EV se développent bien sur les cellules RD, les cellules Hep-2 (cellules épithéliales humaines type 2) et les cellules MRC-5 (cellules embryonnaires humaines). Selon **Johnston et Siegel, (1990)** ; **Affi et al., (2009)** ; la lignée cellulaire RD s'est avérée être la lignée cellulaire la plus sensible pour l'isolement des EV.

Les résultats de cette partie démontrent un faible taux de détection des EV à partir du LCR (**6%**). Des résultats similaires ont été observés précédemment dans l'étude de **de**

**Crom et al., (2011)**, où seulement 10 échantillons sur 116 (8.6 %) ont donné un résultat positif. Cette faible sensibilité de détection serait due à plusieurs raisons telles que :

Le moment où le prélèvement a été réalisé par rapport au stade de la maladie et de ce fait, sa charge en particules virales actives. Egalement, la perte de la viabilité virale due à un acheminement non conforme des LCR, considérés comme des prélèvements fragiles. D'après **Meri et al., (1998)**, le transport des LCR à des températures ambiantes (> 4°C) peut entraîner une perte de viabilité des virus. Ainsi, un transport prolongé affectera principalement les résultats de la culture cellulaire des virus dans les échantillons à faible titre virale, en particulier dans le LCR.

La difficulté de croissance et de propagation de certains EV en culture cellulaire peut en être également la cause. Selon **Harvala et al. (2018)** ; les EV de l'espèce A, y compris EV-A71, ont une faible croissance en culture cellulaire. Ainsi, l'EV-D68 qui requiert des températures d'incubations inférieures à celles normalement appliquées pour les EV. Une autre étude de **Read et al., (1997)**, démontre que les coxsackievirus de types A1-A6 ne peuvent pas être cultivés en culture cellulaire. Des techniques moléculaires peuvent être particulièrement utiles pour diagnostiquer les infections du SNC causées par ces virus.

La sensibilité des lignées cellulaires utilisées vis-à-vis du virus (présence des récepteurs pour le virus) peut également être l'une des raisons majeures des résultats faussement négatifs pour les cultures des EV. Les EV sont susceptibles de reconnaître une large gamme de récepteurs membranaires. Certains sont spécifiques à un petit nombre d'EV, d'autres à l'inverse semblent ubiquitaires et sont utilisés par de nombreux géotypes (**Volle, 2014**). Dans ce contexte, une étude d'isolement des EV sur culture cellulaire a été effectuée par **Johnston et Siegel, (1990)** dont ils ont utilisé 2 lignées cellulaires (RD et Hep-2), leurs résultats ont démontré que les cellules RD sont plus sensibles pour les Echovirus et les coxsackie virus A. Par contre, la lignée cellulaire Hep-2 est remarquablement sensible aux coxsackie virus B. Une autre étude de **Menegus et Hollick, (1982)** a démontré que les cellules Vero sont plus sensibles aux coxsackie-virus B par rapport aux cellules CMK (*Primary cynomolgus monkey kidney cells*) et que d'autres prélèvements contenant des Echovirus et des coxsackie virus A ont été tous positifs sur les cellules CMK, mais seulement 35% l'ont été sur les cellules Vero.

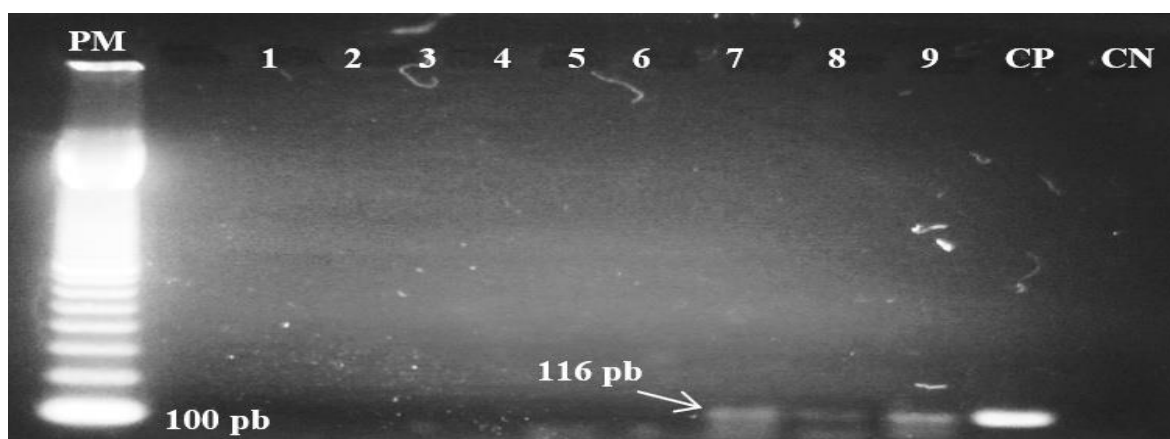


Egalement, il est connu que la charge virale des LCR est faible et très difficile à détecter comparativement aux autres prélèvements, qui montrent généralement des proportions de détection plus élevées, ce qui est trouvé dans l'étude de **Meri *et al.*, (1998)**, en supposant que les patients atteints de méningite aseptique au cours d'une épidémie estivale représentent des vrais cas positifs. Le taux d'isolement du virus dans les prélèvements de selles et de gorge était de 72%, 44% respectivement, alors que seulement 24% des LCR était positifs. Dans une autre étude de **Shabani *et al.*, (2018)** où le sérum des patients a été utilisé pour la détection de l'EV, ils ont constaté que pour les mêmes patients ; le sérum donne de bons résultats, voire meilleurs que le LCR, en tant qu'outil de diagnostic de l'infection systémique à EV.

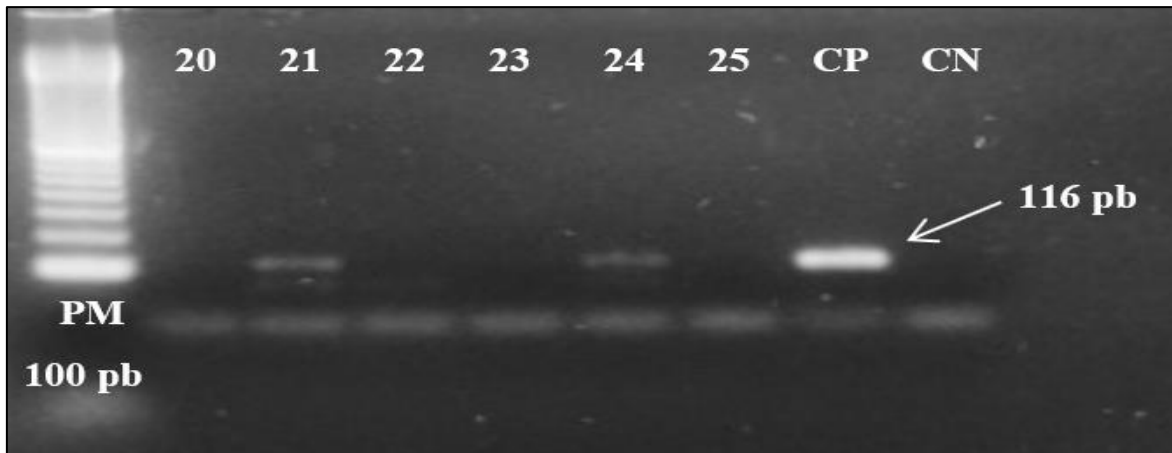
## II. Amplification génique

### 1. A partir de LCR

Pour la RT-PCR classique, 13 résultats positifs sur 50 échantillons de LCR (26%) ont été obtenus sur gel d'agarose. Certains présentent des bandes à très faible intensité par rapport au témoin positif. Les meilleurs résultats pour l'amplification du génome virale par cette technique ont été obtenus en utilisant le couple d'amorces EV1/EV2. Il a permis d'obtenir un fragment amplifié de 116 pb avec une température d'hybridation de 55°C. Les autres couples d'amorces n'ont pas donné des résultats satisfaisants. Les résultats de la RT-PCR classique après migration électrophorétique sont illustrés dans les **figures 26, 27** ainsi dans **l'annexe 5**.

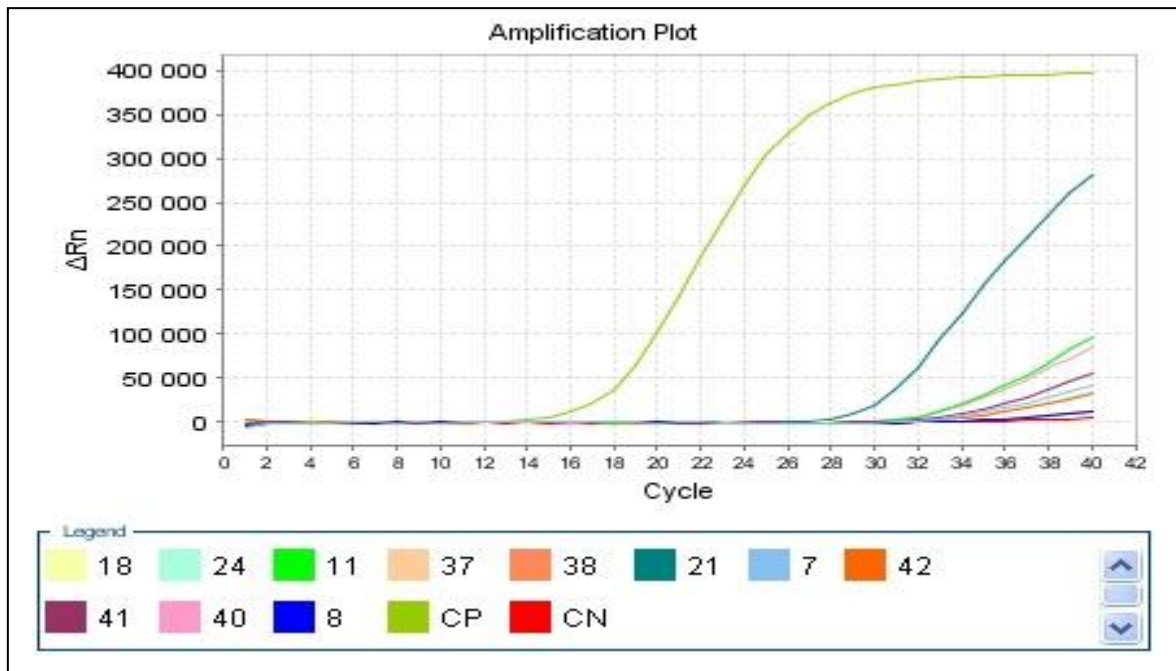


**Figure 26.** Résultats de la migration électrophorétique sur gel d'agarose (2%). La figure montre les résultats de l'amplification d'une séquence des EV par RT-PCR classique. Pas de migration pour les échantillons de 1-6 (Résultats négatifs). Apparition des bandes électrophorétique de 116 pb pour les échantillons de 7-9. Contrôle positif (CP) : validé. Contrôle négatif (CN) : validé. PM : Poids Moléculaire de 100 pb.

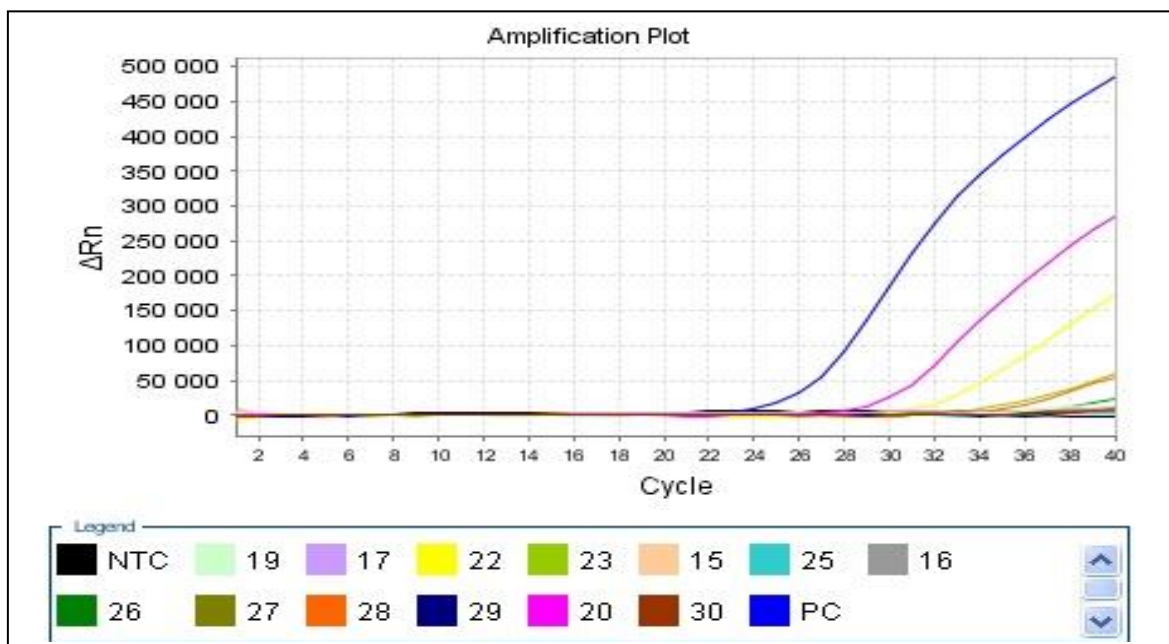


**Figure 27.** Résultats (02) de la Migration électrophorétique sur gel d'agarose (2%). La figure montre les résultats de l'amplification d'une séquence des EV par RT-PCR classique. Pas de migration pour les échantillons 20, 22, 23, 25 (Résultats négatifs). Apparition des bandes électrophorétique de 116 pb pour les échantillons 21, 24. Contrôle positif (CP) : validé. Contrôle négatif (CN) : validé. PM : Poids Moléculaire de 100 pb.

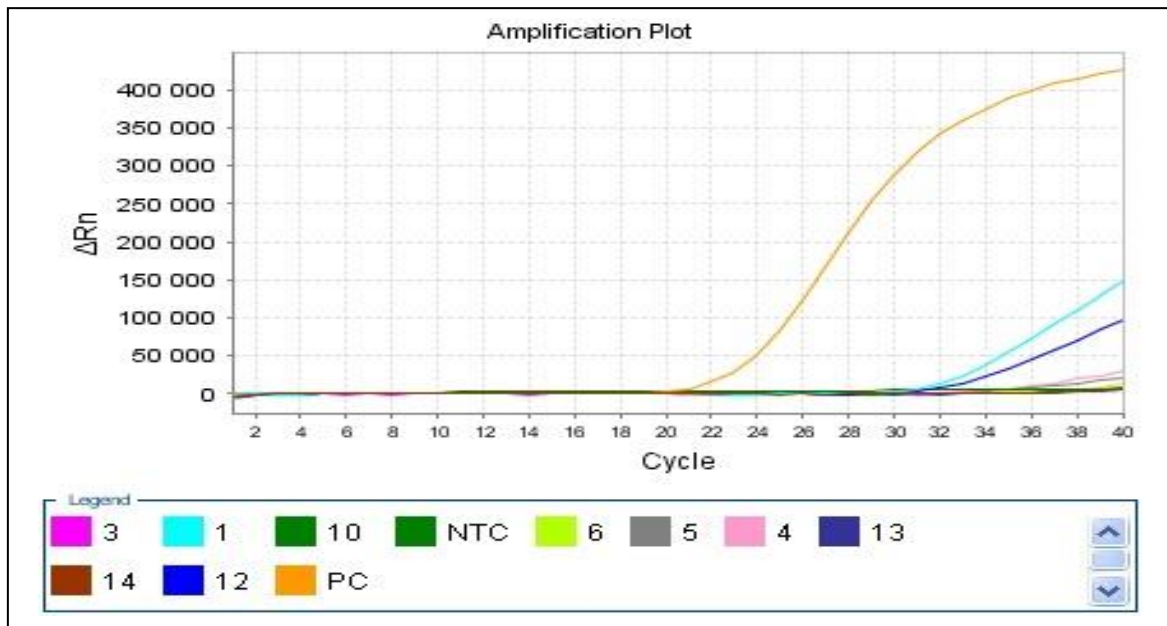
La RT-PCR en temps réel a permis de détecter le génome viral dans 35 LCR sur 50 (70%) en utilisant toujours des amorces ciblant la région 5'NC. Dans la PCR en temps réel, l'évolution de la fluorescence émise est suivie pendant la réaction d'amplification à l'aide d'un indicateur de la production des amplicons durant chaque cycle (**Figures 28, 29, 30, 31**). Par contre, dans une PCR conventionnelle, les amplicons ne sont détectés qu'à la toute fin du processus (**Poitras et Houde, 2002**). Certains échantillons positifs n'ont été détectés qu'après le trentième cycle d'amplification (sur les 40 cycles de la réaction), ceci peut être expliqué par la faible charge virale en EV dans le LCR et la sensibilité de cette technique (**Rotbart *et al.*, 1994**).



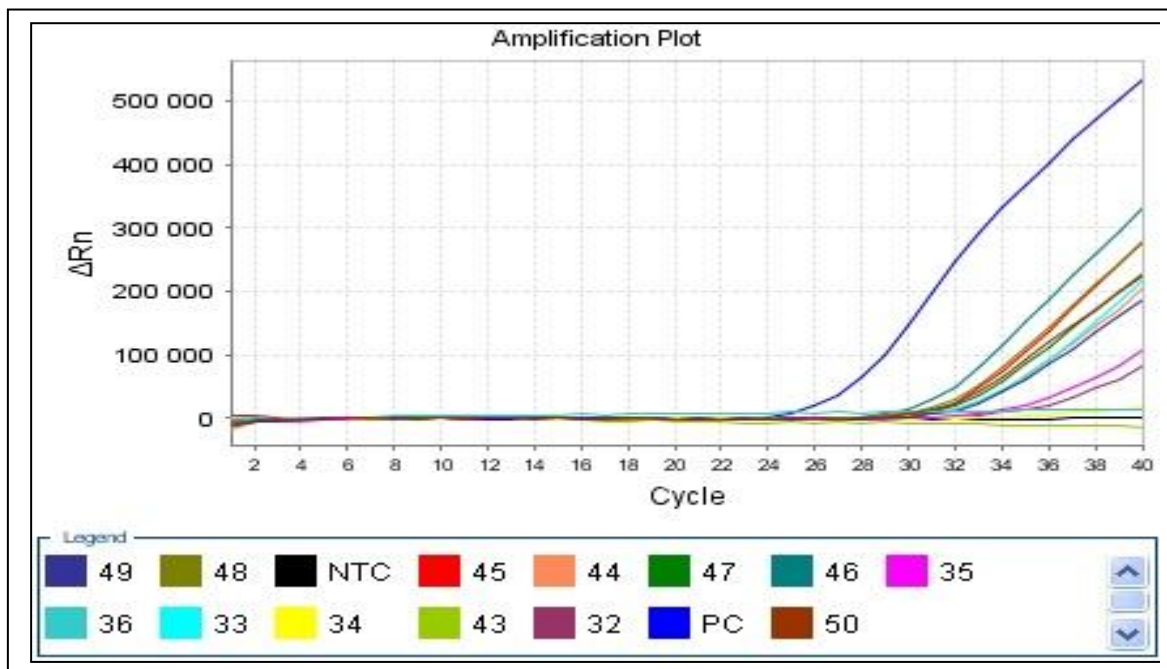
**Figure 28.** Résultats obtenues par la RT-PCR en temps réel (1). Dans la PCR en temps réel, la fluorescence augmente de manière exponentielle à chaque cycle. Dans cet exemple (1), les échantillons positifs 7, 11, 18, 21, 24, 37, 38, 40, 41, 42, 8 (+/-) croisent le seuil de détection après 28-30 cycles. Contrôle positif est fortement positif, contrôle négatif est négatif (aucune fluorescence détectée).



**Figure 29.** Résultats obtenus par la RT-PCR en temps réel (2). Dans la PCR en temps réel, la fluorescence augmente de manière exponentielle à chaque cycle. Dans cet exemple (2), les échantillons positifs 20, 22, 23, 28 croisent le seuil de détection après 28-32 cycles. Les échantillons 19, 26 sont plus ou moins positifs. Les échantillons 15, 16, 17, 27, 29, 30 sont négatifs (aucune fluorescence détectée).. Contrôle positif est positif, contrôle négatif est négatif.



**Figure 30.** Résultats obtenus par la RT-PCR en temps réel (3). Dans cet exemple (3), les échantillons positifs 1, 4, 5, 12 croisent le seuil de détection après 30 cycles. Les échantillons 3, 6, 10, 13, 14, 2 sont négatifs (aucune fluorescence détectée). Contrôle positif est positif, contrôle négatif est négatif.



**Figure 31.** Résultats obtenus par la RT-PCR en temps réel (4). Dans la PCR en temps réel, la fluorescence augmente de manière exponentielle à chaque cycle. Dans cet exemple (4), les échantillons positifs 32, 33, 35, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 croisent le seuil de détection après 28-32 cycles. L'échantillon 34 est plus ou moins positif. Les échantillons 36, 43 sont négatifs (aucune fluorescence détectée). Contrôle positif est positif, contrôle négatif est négatif.

En plus des échantillons détectés par la RT-PCR classique, 20 échantillons ont été détectés aussi par la RT-PCR en temps réel (**Tableau VII**).

**Tableau VII.** Comparaison des résultats obtenus par la RT-PCR classique et par la RT-PCR en temps réel.

| <b>RT-PCR</b> | <b>Echantillons positifs</b> | <b>Taux de détection</b> |
|---------------|------------------------------|--------------------------|
| Classique     | 15                           | 30%                      |
| En temps réel | 35                           | 70%                      |

D'après les résultats présentés dans le tableau précédent, nous pouvons déduire que la RT-PCR en temps réel est plus sensible pour la détection des EV à partir des échantillons de LCR comparativement à la RT-PCR classique. Plusieurs raisons peuvent expliquer cette différence de sensibilité :

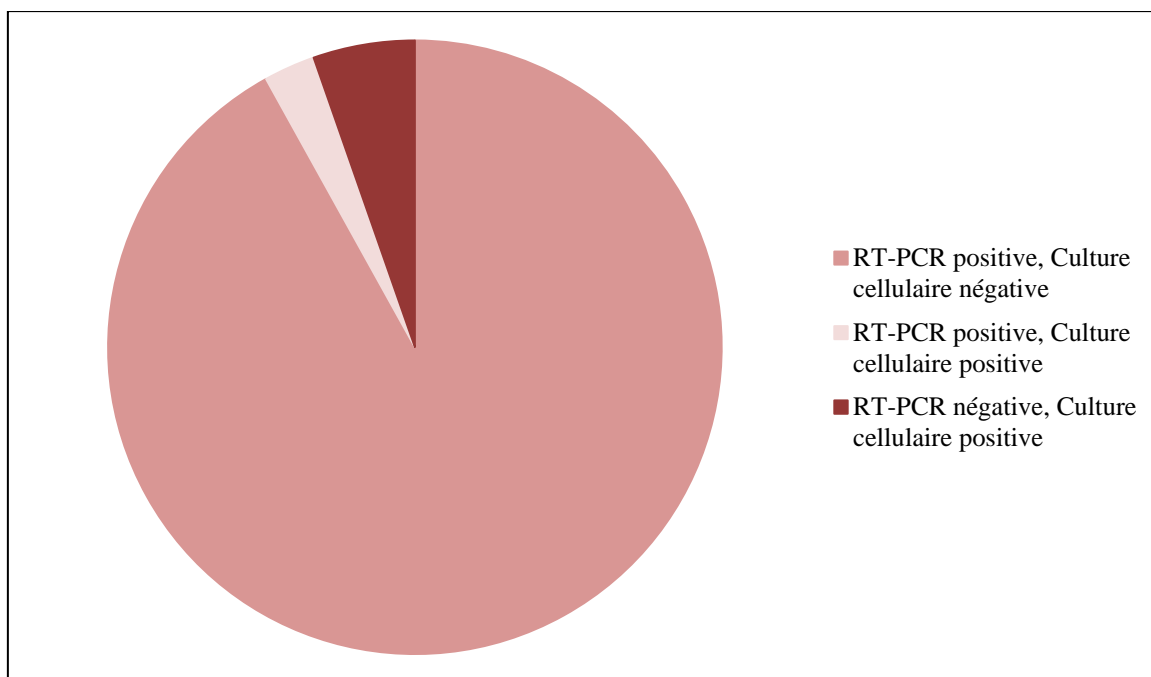
L'utilisation de différentes amorces, qui ciblent des séquences de la même région (5'NC). Selon **Rotbart et al. (1994)** ; **Heim (2005)** ; **Piqueur et al. (2009)**, les différences entre les séquences d'amorces et/ou de sondes et des types d'EV donnent parfois des résultats faussement négatifs.

Le système de détection dans la RT-PCR en temps réel est doté de sondes spécifiques s'hybridant en même temps que les amorces et permettant une détection plus sensible même d'un faible taux d'amplicons. La PCR classique quant à elle, permet une détection visuelle après migration électrophorétique, une faible concentration d'amplicons sera donc peu ou pas visible et une amplification positive peut ne pas être détectée.

Aussi, l'absence d'étape post-PCR en PCR en temps réel accélère considérablement le rendu des résultats tout en limitant le risque de contamination, de décantation et de perte des particules virales (**Kares et al., 2004**).

Dans des études précédentes, La PCR en temps réel s'est avérée hautement sensible pour la détection des EV. A titre d'exemple, **Archimbaud et al., (2004)** ont comparé les deux techniques de RT-PCR pour la détection des EV dans des LCR de patients présentant des signes cliniques de méningite virale. Les résultats ont démontré que la RT-PCR en temps réel était aussi sensible que la RT-PCR classique.

Au total, la RT-PCR a permis la détection des EV dans 35 sur 50 échantillons de LCR (70%) dans un délai de 24 h. Parmi ces 35 échantillons, 34 (68%) ont été négatifs en culture cellulaire (**Figure 32**), des résultats similaires ont été trouvés par **Meri et al., (1998)** dont 80% des échantillons négatifs en culture cellulaire ont été positifs par RT-PCR, ce qui confirme la grande sensibilité de ces techniques vis-à-vis des virus à propagation difficile sur culture cellulaire ou généralement des virus non cultivables.



**Figure 32.** Comparaison des résultats de la détection des EV obtenus par isolement sur culture cellulaire et par RT-PCR.

Comparé à la culture cellulaire, plusieurs études ont confirmé la grande sensibilité/spécificité de l'amplification génique dans la détection des EV de différents spécimens et particulièrement de LCR (**Meri et al., 1998 ; Archimbaud et al., 2004 ; Mulford et al., 2004 ; Hymas et al., 2008 ; Dahee et al., 2015 ; Manukyan et al., 2018**). A titre d'exemples ; l'étude de **Dahee et al., (2015)** qui a le même objectif de notre travail. Leurs résultats confirment la sensibilité de la RT-PCR comparativement à la culture cellulaire dans le cas des méningites à EV, ils démontrent que seulement 32.3% des LCR positifs par RT-PCR ont été ainsi positifs en culture cellulaire, le reste des échantillons positifs sur RT-PCR (67.7%) n'ont montrés aucun ECP significatif en culture cellulaire.

Egalement, dans l'étude de **Verstrepen et al., (2001)** où un total de 70 échantillons de LCR ont été testés en parallèle par RT-PCR en temps réel et par culture cellulaire. Les résultats démontrent que la sensibilité de la RT-PCR en temps réel était de 100,0% par

rapport à la culture virale, ce qui est trouvé ainsi dans le travail de **Meri et al., (1998)**. Une autre étude a été réalisée par **Yerly et al., (1996)**, ils ont objectivé que la technique de PCR était plus sensible que les cultures cellulaires pour le diagnostic des méningites à EV chez les enfants.

Il apparaît clair que la RT-PCR est une technique sensible pour la recherche des EV dans le LCR. D'après **Read et al., (1997)**, la détection des virus par la RT-PCR est probablement plus fiable que la culture virale, car il n'est pas nécessaire de maintenir la compétence de réplication du virus et certains virus qui ne se développent pas en culture cellulaire. En plus, la RT-PCR est une méthode rapide et précise pour diagnostiquer les EV. Elle a amélioré la capacité de détecter les EV dans les 24 heures (**Oberste et al., 2003**). Pour cela, la PCR s'est révélée être une alternative rapide et sensible à la culture cellulaire pour le diagnostic des infections du système nerveux central causées par les EV (**Rotbart et al., 1994**).

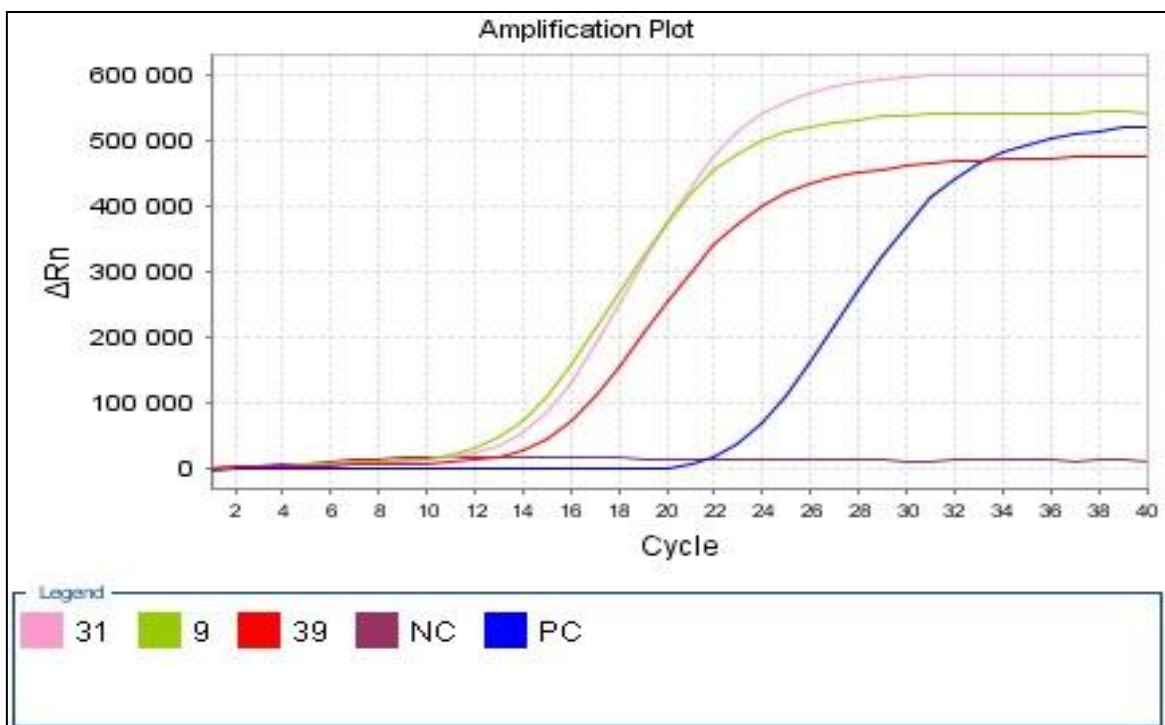
Cependant, il est primordial de signaler que les trois échantillons détectés par culture cellulaire n'ont pas tous donné un résultat positif en utilisant l'amplification génique. Les résultats négatifs de la RT-PCR dans les deux échantillons 31 et 39, d'une culture virale positive, pourraient être dus à de très faibles concentrations de virus dans le LCR. Ces résultats faux négatifs peuvent également être dus à des substances inhibitrices qui interfèrent avec la fonction des enzymes utilisées dans la PCR (**Meri et al., 1998**). Il aurait été utile de refaire le test, cependant la quantité de LCR restant ne le permettait pas. Il est probable ainsi, que la sensibilité de la PCR avec des échantillons cliniques soit inférieure à sa sensibilité moléculaire réelle à cause des problèmes techniques, tels que la dégradation de l'ARN viral, réduiront la sensibilité de la PCR.

## 2. A partir de surnageant de culture

Après une deuxième amplification des échantillons montrant précédemment un résultat négatif par les deux techniques de la RT-PCR mais cette fois-ci à partir de surnageant de cultures positifs. Des résultats fortement positifs sont obtenus par la RT-PCR classique (**Figure 33**). Ainsi que par la RT-PCR en temps réel (**Figure 34**).



**Figure 33.** Résultats obtenus par RT-PCR classique après amplification génique à partir de surnageant de culture.



**Figure 34.** Résultats obtenus par RT-PCR en temps réel après amplification génique à partir de surnageant de culture. Dans la PCR en temps réel, la fluorescence augmente de manière exponentielle à chaque cycle. Les échantillons sont devenus fortement positifs. Ils croisent le seuil de détection dès le début de la réaction (4-6 cycles). Contrôle positif est positif, contrôle négatif est négatif (aucune fluorescence détectée).



De ces résultats obtenus, nous pouvons conclure que l'isolement sur culture cellulaire a permis la multiplication des rares EV initialement présent et l'enrichissement des LCR en matière de charge virale. Ceci a peut-être permis d'augmenter la probabilité de rencontre (amorce-génome) dans les techniques d'amplification génique. Dans ce sens, **Saeedinia et al., (2008)** ont révélé que la RT-PCR convient à la détection des virus isolés en culture cellulaire.

### III. Identification moléculaire des isolats

Dans notre étude, nous avons identifié 3 souches isolées en culture cellulaire par séquençage de la région VP1. L'identification des génotypes a été faite par une comparaison de la séquence obtenue avec les séquences disponibles dans les banques génomiques sur le NCBI. L'analyse des séquences a révélé que nos isolats sont des Echovirus 27 (HEV-B). Cette souches appartiennent aux NPHEV, connus comme la cause majeur de tous les cas des méningites aseptiques dans lesquels l'agent pathogène est identifié (**Michos et al., 2007 ; Huang et Shih, 2015 ; Opanda et al., 2016**).

L'identification des EV est faite après amplification préalable sur culture cellulaire. De même point de vue, **Ibrahim, (2014)**, rapportent qu'en raison de la forte variabilité de la région sélectionnée (VP1) pour le séquençage et par conséquent de l'emploi d'amorces dégénérées (AN232/233 dans la première amplification), la sensibilité de cette technique ne s'est pas montrée suffisante pour permettre la caractérisation des souches directement à partir de prélèvements cliniques et notamment à partir du LCR.

La même technique d'identification moléculaire des EV a été utilisée en **1999** par le groupe de **Steven Oberste** qui a développé cette technique ciblant une région codante pour la partie centrale de la protéine VP1. Cette technique a permis l'identification de 55 isolats cliniques correspondant à des souches non typables par des techniques sérologiques.

La région codant la protéine VP1 est la plus variable du génome des EV et possède les principaux sites antigéniques de neutralisation et les domaines d'attachement aux récepteurs cellulaires (**Caro et al., 2001 ; Ibrahim, 2014**). C'est la raison pour laquelle de nombreux chercheurs ont focalisé leurs études sur différentes régions de VP1 dans le but de mettre en place une technique de typage moléculaire des EV (**Oberste et al., 2000 ; Oberste et al., 2001 ; Bahri et al., 2005 ; Opanda et al., 2016**).

# *Conclusion*

## Conclusion

La mise en évidence d'une infection virale constitue un élément clé pour assurer un traitement plus efficace et un soulagement rapide des symptômes associés. Au fil du temps, plusieurs techniques de diagnostic des infections virales ont été mises au point. Toutefois, chacune se distingue de l'autre par un certain nombre d'inconvénients, liés principalement à la nature du prélèvement, ses conditions du transport et sa charge virale. Dans ce contexte, les Entérovirus (EV) constituent la cause principale des méningites virales. Plusieurs techniques ont été mises au point afin d'obtenir les meilleurs résultats de diagnostic.

Dans ce travail, l'idée de comparer les résultats du diagnostic par les techniques de la RT-PCR (classique et en temps réel) à ceux de la culture cellulaire a montré qu'aucune des techniques ne peut assurer, avec certitude, le diagnostic de tous les cas de méningite à EV. La PCR en temps réel détecte plus de cas positifs que la PCR classique. Toutes deux semblent être, de loin, meilleures, comparativement à la culture cellulaire. Cependant, dans certains cas où la RT-PCR semble être inefficace pour la détection de l'origine virale d'une méningite, la culture cellulaire se montre irremplaçable et, selon les résultats obtenus, elle peut être utilisée comme outil d'enrichissement de l'échantillon en matière de charge virale initiale. Ceci peut permettre, sans doute, d'augmenter les chances de réussite des techniques d'amplification génique. Donc, La culture cellulaire, étant donné qu'elle produit des particules virales entières comme résultat final, elle présente l'avantage d'être un support solide pour les tests sérologiques cependant, elle reste une technique limitée pour le diagnostic des méningites à partir de LCR dans lequel les EV sont difficiles à être isolés.

Cette étude démontre clairement que la RT-PCR est souvent plus sensible, précise et beaucoup plus rapide que la culture virale pour le diagnostic des méningites à EV. La disponibilité rapide des résultats de la RT-PCR augmente leur impact clinique potentiel, en particulier au début de l'évolution de la maladie. Un diagnostic définitif peut protéger le patient contre des investigations inutiles et un traitement antibiotique, permettre une sortie précoce de l'hôpital et indiquer un meilleur pronostic.

*Références  
bibliographiques*

**Références Bibliographiques :**

**Abbasi, S., Makvandi, M., Teimoori, A., Samarbaf-Zadeh, A. (2018).** Complete genome sequence of a multi-recombinant echovirus 6 strain isolated from CSF in Ahvaz, Southwestern Iran. *Journal of the Chinese Medical Association.* 81 : 340-347.

**Afifi, S.S., Zaki, S.A., Mohamed, A.F. et El-Hosseiny, H. (2009).** Isolation and Identification of Non-Polio Enteroviruses from Children in Different Egyptian Governorates. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences.* 3(4): 3230-3238.

**Agut, H., Buffet-Janveresse, C., Le Faou, A., Peigue-Lafeuille, H., Seigneurin, J.M. (2007).** Révir : Référentiel en virologie médicale. 2<sup>ème</sup> édition. 17, rue Jean Daudin 75015, Paris. Chapitre32 : Entérovirus. P 107-109.

**Andreoletti, L., Renois, F., Jacques, J., Leveque, N. (2009).** Entérovirus non poliomyélitiques et pathologies respiratoires. *Medecine sciences.* 25 : 921-923. doi : 10.1051/medsci/20092511921.

**Apostol, L.N., Suzuki, A., Bautista, A., Galang, H., Paladin, F.J., Fuji, N., Lupisan, S., Olveda, R. et Oshitani, H. (2012).** Detection of Non-Polio Enteroviruses From 17 Years of Virological Surveillance of Acute Flaccid Paralysis in the Philippines. *Journal of Medical Virology.* 84 : 624-626. doi : 10.1002/jmv.23242.

**Archimbaud, C., Mirand, A., Chambon, M., Regagnon, C., Bailly, J.L., Lafeuille, H.P. et Henquell, C. (2004).** Improved Diagnosis on a Daily Basis of Enterovirus Meningitis Using a One-Step Real-Time RT-PCR Assay. *Journal of Medical Virology.* 74:604–610. doi : 10.1002/jmv.20217.

**Arita, M., Zhu, S.L., Yoshida, H., Yoneyama, T., Miyamura, T. et Shimizu, H. (2005).** A Sabin 3-Derived Poliovirus Recombinant Contained a Sequence Homologous with Indigenous Human Enterovirus Species C in the Viral Polymerase Coding Region. *Journal Of Virology.* 79 (20) : 12650. doi:10.1128/JVI.79.20.12650–12657.

**Bahri, O., Rezig, D., Ben Nejma-Oueslati, B., Ben Yahia, A., Ben Sassi, J., Hogga, N., Sadraoui, A. et Triki, H. (2005).** Enteroviruses in Tunisia: virological surveillance over 12 years (1992–2003). *J. of Medical Microbiology*. 54 : 63–66. doi: 10.1099/jmm.0.45695-0.

**Bendig, J.W.A., Brien, P.S.O. et Mui, P. (2001).** Serotype-specific detection of Coxsackievirus A16 in clinical specimens by Reverse Transcription-Nested PCR. *Journal Of Clinical Microbiology*. 39 (10) : 3690. doi: 10.1128/JCM.39.10.3690–3692.2001.

**Bessaud, M., Jegouic, S., Joffret, M.L., Barge, C., Balanant, J., Gouandjika-Vasilache, I. et Delpeyroux, F. (2008).** Characterization of the genome of human enteroviruses: design of generic primers for amplification and sequencing of different regions of the viral genome. *Journal of Virological Methods*. 149(2): 277-281. doi: 10.1016/j.jviromet.2008.01.027.

**Blomqvist, S., Paananen, A., Kopra, C.S., Hovi, T. et Roivainen, M. (2008).** Eight Years of Experience with Molecular Identification of Human Enteroviruses. *Journal Of Clinical Microbiology*. 46 (7) : 2410–2412. doi:10.1128/JCM.00313-08.

**Bourlet, T., Gharbi, J., Omar S., Aouni, M., Pozzetto, B. (1998).** Comparison of a rapid culture method combining an immunoperoxidase test and a group specific anti-VP1 monoclonal antibody with conventional virus isolation techniques for routine detection of enteroviruses in stools. *J. Med. Virol.* 54(3): 204-9.

**Bousslama, L., Nasri, D., Chollet, L., Belguith, K., Bourlet, T., Aouni, M., Pozzetto, B. et Pillet, S. (2007).** Natural recombination event within the capsid genomic region leading to a chimeric strain of human enterovirus B. *J. Virol.* 81 : 8944–8952. doi: 10.1128/JVI.00180-07.

**Cameron, C.E., Suk-Oh, H. et Moustafa, I.M. (2010).** Expanding knowledge of P3 proteins in the poliovirus lifecycle. *Future Microbiology*. 5 : 867–868.

**Capaul, S.E. et Gorgievski-Hrisoho, M. (2005).** Detection of Enterovirus RNA in cerebrospinal fluid (CSF) using NucliSens EasyQ Enterovirus assay. *Journal of Clinical Virology*. 32 : 237-238. doi:10.1016/j.jcv.2004.08.006.

**Caro, V., Guillot, S., Delpeyroux, F. et Crainic, R. (2001).** Molecular strategy for 'serotyping' of human enteroviruses. *J. Gen. Virol.* 82 : 88–89. doi: 10.1099/0022-1317-82-1-79.

**Casas, I., Powell, L., Klapper, P.E., Cleator, G.M. (1995).** New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebro spinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. *J. Virol. Methods.* 53: 25–36.

**Collier, L. et Oxford J. (2000).** Virologie Humaine. 2<sup>ème</sup> édition. 4, rue Casimir-Delavigne, 75006 Paris : Flammarion Médecines- Sciences. Chapitre 16, Poliomyélite et autres infections à picornavirus, p. 123-129.

**Committee on the enteroviruses, National Foundation For Infantile Paralysis. (1957).** The Enteroviruses. *American Journal of public health.* 47(12): 1556-58.

**Conrad, C. (2012).** Evaluation des propriétés en culture de nouvelles souches atténuées de Poliovirus candidates à un nouveau vaccin inactivé. Thèse de Doctorat. Université de Lorraine : Sciences pharmaceutiques. P 22-27.

**Dahee, J., Heo, T.H., Byeon, J.H., Kim, J.H., Kim, MK., Eun, S.H. et Eun, B.L. (2015).** Analysis of clinical information and rRT-PCR for early diagnosis of enteroviral meningitis. *Korean J. Pediatr.* 58(11) :446. doi : 10.3345/kjp.2015.58.11.446.

**Dalwai, A., Ahmad, S., Al-Nakib, W. (2010).** Echoviruses are a major cause of aseptic meningitis in infants and young children in Kuwait. *Virology Journal.* 7: 236.

**De Crom, S.C.M., Obihara, C.C., Van Loon, A.M., Argilagos-Alvarez, A.A., Peeters, M.F., Van Furth, A.M. et Rossen, J.W.A. (2011).** Detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid : comparaison of two molecular assays. *Journal of Virological Methods.* 11675 : 1-4. doi:10.1016/j.jviromet.2011.10.007.

**Doedens, J., Maynell, L.A., Klymkowsky, M.W. et Kirkegaard, K. (1994).** Secretory pathway function, but not cytoskeletal integrity, is required in poliovirus infection. In : Ibrahim, W. (ed). *Arch. Virol. Supp.* 19 : 159–172.

**Fernandez-Miragall O., Quinto S.L., Martínez-Salas E. (2009).** Relevance of RNA structure for the activity of Picornavirus IRES elements. *Virus Res.* 139:172-182.

**Filbin, M.E. et Kief, J.S. (2009).** Towards a structural understanding of IRES RNA function. *Struct. Biol.* 19(3): 267–272. doi:10.1016/j.sbi.2009.03.005.

**Fleury, H.J.A. (2002).** Virologie humaine. 4<sup>ème</sup> édition. 120, bd Saint-Germain. 75280 Paris Cedex 06 : Masson. Chapitre 10 : Les Picornaviridae. P 91-94.

**Fleury, H.J.A. (2009).** Virologie humaine. 5<sup>ème</sup> édition. 62, rue Camille Desmoulins. 92442 Issy-les-Moulineaux Cedex. Elsevier Masson. Chapitre 3 : Réplication des virus à ARN. P 19-20.

**Gamarnik, AV et Andino, R. (2000).** Interactions of viral protein 3CD and poly (rC) binding protein with the 5' untranslated region of the poliovirus genome. *J. Virol.* 74 : 2219–2226.

**Graham, A.K. et Murdoch, D.R. (2005).** Association between Cerebrospinal Fluid Pleocytosis and Enteroviral Meningitis. *Journal Of Clinical Microbiology.* 43 (03) : 1491. doi:10.1128/JCM.43.3.1491.2005.

**Grosjean, J., Clavé, D., Archambaud, M., Pasquier, C. (2011).** Bactériologie et virologie pratique. 2<sup>ème</sup> édition, Rue des Minimes 39, B-1000 Bruxelles. P66-68.

**Grosjean, J., Clavé, D., Archambaud, M., Pasquier, C. (2016).** Bactériologie et virologie pratique. 3<sup>ème</sup> édition, Rue du Bosquet 7, B-1348 Louvain-la-Neuve. P 254.

**Hamza, I.A., Jurzik, L., Uberla, K., Wilhelm, M. (2011).** Methods to detect infectious human enteric viruses in environmental water samples. *International Journal of Hygiene and Environmental Health.* 214 : 226. doi:10.1016/j.ijheh.2011.07.014.

**Harvala, H., Kondracka, J., McIntyre, CL., Leitch, ECM., Templeton, KE et al. (2011).** Comparison of human parechovirus and enterovirus detection frequencies in cerebrospinal fluid samples collected over a 5-year period in Edinburgh - HPeV type 3 identified as the most common picornavirus type. *Journal of Medical Virology.* 83 (5) : 20-21.



**Harvala, H., Broberg, E., Benschop, K., Bergin, N., Ladhani, S., Susif, P., Christianseng, C., McKenna, J., Allene, D., Makiellok, P., McAllister, G., Carmen, M. et al. (2018).** Recommendations for enterovirus diagnostics and characterisation within and beyond Europe. *J. of Clinical Virology*. 101: 11–17. doi : 10.1016/j.jcv.2018.01.008.

**Hassel, C. (2015).** Epidémiologie moléculaire et évolution de l'entérovirus A71 et interactions génétiques avec les autres entérovirus de l'espèce A responsables de la maladie pied-main-bouche. Thèse de Doctorat. Université d'Auvergne- Clermont-Ferrand : Médecine humaine et pathologie. P 20-31.

**Heim, A. (2005).** From poliovirus surveillance to enterovirus surveillance : A complete picture ? *J. Med. Microbiol.* 54: 1-2.

**Hober, D., Sané, F., Riedweg, K., Moumna, I., Goffard, A., Choteau, L., Alidjinou, E.K. et Desailoud, R. (2013).** Viruses and Type 1 Diabetes: Focus on the Enteroviruses. *Intech Open Science*. P35. doi : 10.5772/52087.

**Huang, H.I. et Shih, S.R. (2015).** Neurotropic Enterovirus Infections in the Central Nervous System. *J. Viruses*. 7 : 6051–6053. doi : 10.3390/v7112920.

**Hymas, W.C., Aldous, W.K., Taggart, E.W., Stevenson, J.B. et Hillyard, D.R. (2008).** Description and Validation of a Novel Real-Time RT-PCR Enterovirus Assay. *Clinical Chemistry*. 54(2) : 406- 411. doi: 10.1373/clinchem.2007.095414.

**Hyypia, T., Hovi, T., Knowles, N.J. et Stanway, G. (1997).** Classification of enteroviruses based on molecular and biological properties. *Journal of General Virology*. 78 : 1-2.

**Johnston, S.L.G. et Siegel, C.S. (1990).** Presumptive Identification of Enteroviruses with RD, HEp-2, and RMK Cell Lines. *Journal Of Clinical Microbiology*. 28 (05) : 1049-1050. doi : 0095-1137/90/051049-02\$02.00/0.

**Ibrahim, W., Boukhadra, N., Nasri-Zoghalmi, N., Berthelot, P., Omar, S., Bourlet, T., Pozzetto, B., Pillet, S. (2014).** Partial sequencing of the VP2 capsid gene for direct enterovirus genotyping in clinical specimens. *Clinical Microbiology and Infection*. 20 : 558-564. doi : 10.1111/469-0691.12520.

**Ibrahim, W. (2014).** Mise au point et évaluation d'une technique de PCR permettant la détection et le typage des entérovirus directement à partir de produits pathologiques ou d'échantillons environnementaux. Thèse de Doctorat. Université Jean Monnet de Saint-Etienne : Faculté de Médecine Jacques Lisfranc. P76- 104.

**Julien, J., Leparc-Goffart, I., Lina, B., et al. (1999).** Postpolio syndrome: polio-virus persistence is involved in the pathogenesis. *J. Neurol.* 246 : 472-476.

**Kayser, FH., Bottger, EC., Deplazes, P., Roers, HA. (2017).** Manuel De Poche De Microbiologie Médicale. 2eme édition. Lavoisier, Paris. P 496.

**Kempf, B.J. et Barton, D.J. (2008).** Poly (rC) Binding Proteins and the 5' Cloverleaf of Uncapped Poliovirus mRNA Function during De Novo Assembly of Polysomes. In : Volle, R. (ed). *Journal of Virology.* 82(12) : 5835-5846.

**Kondrashova, A., Hyöty, H. (2014).** Role of viruses and other microbes in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Int. Rev. Immunol.* 33(4) : 284-95.

**Kottaridi, C., Bolanaki, E., Mamuris, Z., Stathopoulos, C., Markoulatos, P. (2006).** Molecular phylogeny of VP1, 2A, and 2B genes of echovirus isolates: epidemiological linkage and observations on genetic variation. *Arch. Virol.* 151: 1117–18

**Kristensson, K. (1999).** The discovery of the poliovirus. *Brain Research Bulletin.* 50 : 461.

**Lamoril, J., Ameziane, N., Deybach, J.C., Bouizegarene, P., Bogard, M. (2008).** Les techniques de séquençage de l'ARN : une révolution en marche. Première partie. *J. Immuno-analyse et biologie spécialisée.* 23 : 262-263. doi:10.1016/j.immbio.2008.07.016.

**Lauber, C. et Gorbalenya, A. E. (2012).** Toward genetics-based virus taxonomy : comparative analysis of a genetics-based classification and the taxonomy of picornaviruses. *J. Virol.* 86 : 3907–3913. doi : 10.1128/JVI.07174-11.

**Leveque, N., Renois, F., Talmud, D., Nguyen, Y., Lesaffre, F., Boulagnon, C., Bruneval, P., Fornes, P. et Andreoletti, L. (2012).** Quantitative genomic and antigenomic enterovirus RNA detection in explanted heart tissue samples from patients with end-stage idiopathic dilated cardiomyopathy. *J. Clin. Microbiol.* 50 : 3378–3380. doi : 10.1128/JCM.01612-12.

**Mammette, A. (2002).** Virologie médicale. 80 Boulevard de la Croix-Rousse, BP 4371, 69242 LYON 04, P 265- 280.

**Manukyan, H., Zagorodnyaya, T., Ruttimann, R., Manor, Y., Bandyopadhyay, A., Shulman, L., Chumakov, K. et Laassri, M. (2018).** Quantitative multiplex one-step RT-PCR assay for identification and quantitation of Sabin strains of poliovirus in clinical and environmental specimens. *J. Virol. Methods.* 259 :74-80. doi : 10.1016/j.jviromet.2018.06.009.

**Michos., A.G, Syriopoulou., V.P, Hadjichristodoulou., C, Daikos., G.L, Lagona., E. et al. (2007).** Aseptic Meningitis in Children : Analysis of 506 Cases. *PLoS ONE.* 2(8): 674. doi:10.1371/journal.pone.0000674.

**Melnick, J.L. (1996).** My role in the discovery and classification of the enteroviruses. *Annu. Rev. Microbiol.* 50: 2–18.

**Menegus, M.A. et Hollick, G.E. (1982).** Increased Efficiency of Group B Coxsackievirus Isolation from Clinical Specimens by Use of BGM Cells. *Journal of Clinical Microbiology.* 15 : 946- 948.

**Meri, G.H., Schumacher, J.D., Vilimonovic, N., Germann, D. et Matter, L. (1998).** Detection by PCR of Enteroviruses in Cerebrospinal Fluid during a Summer Outbreak of Aseptic Meningitis in Switzerland. *J. Clin. Microbiol.* 36 (9): 2408–2412.

**Mulford, W.S., Buller, R.S., Arens, M.Q. et Storch, G.A. (2004).** Correlation of cerebrospinal fluid (CSF) cell counts and elevated CSF protein levels with enterovirus reverse transcription-PCR results in pediatric and adult patients. *J. Clin. Microbiol.* 42:4199–4203. doi : 10.1128/JCM.42.9.4199–4203.2004.

**Nix, W.A., Oberste, M.S. et Pallansch, M.A. (2006).** Sensitive seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 44 : 2698–2704. doi:10.1128/JCM.00542-06.

**Nijhuis, M., Van Maarseveen, N., Shuuman, R., Verkuijlen, S., De Vos, M., Hendriksen, K., Van Loon, A.M. (2002).** Rapid and Sensitive Routine Detection of All Members of the Genus *Enterovirus* in different Clinical specimens by Real- Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 40(10) : 3666-3670. doi : 10.1128/JCM.40.10.3666-3670.2002.

**Norder, H., Bjerregaard, L., Magnius, L., Lina, B., Aymard, M. et Chomel, J.J. (2003).** 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. *Gen. Virol.* 84: 827-36. doi : 10.1099/vir.0.18647-0.

**Oberste, M.S., Maher, K., Kilpatrick, D.R., Flemister, M.R., Brown, B.A. et Pallansch, M.A. (1999a).** Typing of Human Enteroviruses by Partial Sequencing of VP1. *Journal Of Clinical Microbiology*. 73 (5) : 1288–1292.

**Oberste, M.S., Maher, K., Kilpatrick, D.R. et Pallansch, M.A. (1999b).** Molecular Evolution of the Human Enteroviruses : Correlation of Serotype with VP1 Sequence and Application to Picornavirus Classification. *Journal Of Virology*. 73 (3): 1941–1948.

**Oberste, M.S., Maher, K., Flemister, M.R., Marchetti, G., Kilpatrick, D.R. et Pallansch, M.A. (2000).** Comparison of classic and molecular approaches for the identification of untypeable enteroviruses. *J. Clin. Microbiol.* 38 : 1170–1174.

**Oberste, M.S., Schnurr, D., Maher, K., al-Busaidy, S. et Pallansch, M.A. (2001).** Molecular identification of new picornaviruses and characterization of a proposed enterovirus 73 serotype. *Journal of General Virology*. 82 : 409–416.

**Oberste, M.S., Nix, W.A., Maher, K., Pallansch, M.A. (2003).** Improved molecular identification of enteroviruses by RT-PCR and amplicon sequencing. *Journal of Clinical Virology*. 26 : 375- 376. doi : 10.1016/S1386-6532(03)00004-0.

**Oberste, M.S., Maher, K. et Pallansch, M.A. (2004).** Evidence for Frequent Recombination within Species Human Enterovirus B Based on Complete Genomic Sequences of All Thirty-Seven Serotypes. *Journal of Virology*. 78 : 855-876. doi : 10.1128/JVI.78.2.855–867.2004.

**Oberste, M.S., Penaranda, S., Rogers, S.L., Henderson, E., Nix, W.A. (2010).** Comparative evaluation of taqman real- time PCR and semi nested VP1 PCR for detection of enteroviruses in clinical specimens. *Journal of Clinical Virology*. 49 : 73-74. doi : 10.1016/j.jcv.2010.06.022

**Opanda, S.M., Wamunyokoli, F., Khamadi, S., Coldren, R. et Bulimo, W.D. (2016).** Genotyping of enteroviruses isolated in Kenya from pediatric patients using partial VP1 region. *Springer Plus*. 5 :158. doi : 10.1186/s40064-016-1834-0.

**Organisation mondiale de la Santé. (2005).** Manuel de la sécurité biologique en laboratoire. 3<sup>ème</sup> édition. OMS, 20 avenue Appia, 1211 Genève 27 (Suisse), P 75-105.

**Organisation mondiale de la Santé. (2006).** Passage au vaccin antipoliomyélitique inactivé suite à l'abandon du vaccin antipoliomyélitique oral-Supplément à la note d'information de l'OMS. *Weekly Epidemiol. Record*. 81 : 137-44.

**Owino, C.W. et Chu, J.J.H. (2019).** Recent advances on the role of host factors during non poliovirus enteroviral infections. *Journal of Biomedical Science*. 26 : 27. doi : 10.1186/s12929-019-0540-y.

**Palacios, G. et Oberste M.S. (2005).** Enteroviruses as agents of emerging infectious diseases. *J. Neurovirol*. 11 : 424.

**Pasquier, C., Bertagnoli, S., Dunia, D., Izopet, J. (2013).** Virologie humaine et zoonoses. 120, Boulevard Saint-Germain, 75280 Paris cedex 06, P 176-179.

**Paul, A. V., van Boom, J. H., Filippov, D. et Wimmer, E. (1998).** Protein-primed RNA synthesis by purified poliovirus RNA polymerase. In : Renois, F. (ed). *Nature* .393 : 280–284.

**Pelletier, J. et Sonenberg, N. (1988).** Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature*. 334 : 320.

**Pillet, S., Billaud, G., Omar, S., Lina, B., Pozzetto, B. et Schuffenecker, I. (2010).** Multicenter evaluation of the Enterovirus R-gene real-time RT-PCR assay for the detection of enteroviruses in clinical specimens. *J. Clin. Virol*. 47 : 54–59.

**Piqueur, M.A.C., Verstrepen, W.A., Bruynseels, P. et Mertens A.H. (2009).** Improvement of a real time RT-PCR assay for the detection of enterovirus RNA. *Virology Journal*. 95 (6) : 1-3. doi : 10.1186/1743-422X-6-95.

**Poitras, E. et Houde, A. (2002).** La PCR en temps réel : principes et applications. *Reviews in Biology and Biotechnology*. 02: 2-4.

**Prescott, L., Harley, J., Klein, D., Wiley, Sherwood, Woolverton, C. (2010).** Microbiologie, 3<sup>ème</sup> édition. Rue des Minimes, 39 B-1000 Bruxelles, P 940-41.

**Racaniello, V. et Howley, P.M. (2007).** Picornaviridae : the viruses and their replication. In Fields VIROLOGY, 5<sup>ème</sup> édition, Philadelphia, pp. 795–838.

**Read, S.V., Jeffery, K.J.M. et Bangham, C.R.M. (1997).** Aseptic Meningitis and Encephalitis : the Role of PCR in the Diagnostic Laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*. 35 (3) : 691-695.

**Renois, F. (2012).** Etude des caractéristiques virologiques, cliniques et de la réponse inflammatoire au cours de l'infection de l'arbre respiratoire par les entérovirus humains. Thèse de Doctorat. Université de Reims Champagne-Ardenne : UFR Médecine. pp37-72.

**Renois, F., Bouin, A., Wehbe, M., Leveque, N., Andreoletti, L. (2014).** Infections persistantes à entérovirus et pathologies humaines. *Virologie*. 18(6) : 306-311. doi: 10.1684/vir.2014.0582

**Rotbart, H.A., Sawyer, M.H., Fast, S., Lewinski, C., Murphy, N., Keyser, E.F., Spadoro, J., Kao, S.Y. et Loeffelholz, M. (1994).** Diagnosis of Enteroviral Meningitis by Using PCR with a Colorimetric Microwell Detection Assay. *Journal Of Clinical Microbiology*. 32 (10) : 2590-2591.

**Rotbart, H.A. et Hayden, FG. (2000).** Picornavirus infections : a primer for the practitioner. *Arch Farm Med*. 9(9) : 913-20.

**Saeedinia, A., Shamsara, M., Zeinoddini, M., Sadeghi, V. et Maghsoudi, N. (2008).** Evaluation of nucleic acid sequence based amplification (NASBA) and Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction for detection of coxsackievirus B3 in cell culture and animal tissue samples. *Iranian Journal Of Biotechnology*. 6 (4) : 228.

**Samuelson, A., Skoog, A., Forsgren, M. (1990).** Aspects on the serodiagnosis of enterovirus infections by ELISA. In : Ibrahim, W. (ed). *Serodiagn. Immunother.Infect.* 4 : 395–406.

**Shabani, A., Makvandi, M., Samarbafzadeh, A., Teimoori, A., Rasti, M., Karami, C., Rastegarvand, N., Nikfar, R., Shamsizadeh, A., Salehi, A. et Angali, K.A. (2018).** Echovirus 30 and coxsackievirus A9 infection among young neonates with sepsis in Iran. *Iranian Journal of Microbiology.* 10 : 259-263.

**Smura, T., Ylipaasto, P., Klemola, P., Kaijalainen, S., Kyllönen, L., Sordi, V., Piemonti, L., Roivainen, M. (2010).** Cellular tropism of human enterovirus D species serotypes EV-94, EV-70, and EV-68 in vitro : implications for pathogenesis. *Journal of Medical Virology.* 82(11) : 1940.

**Steil, B.P. et Barton, D.J. (2009).** Conversion of VPg into VPgpUpUOH before and during Poliovirus Negative-Strand RNA Synthesis. *Journal of Virology.* 83(24) : 12660-12670. doi : 10.1128/JVI.01676-08.

**Thompson, A. et Peersen, O.B. (2004).** Structural basis for proteolysis-dependent activation of the poliovirus RNA-dependent RNA polymerase. *EMBO J.* 23 : 3462-66.

**Tsai, H.P., Huang, S.W., Wu, F.L., Kuo, P.H., Wang, S.M., Liu, C.C., Su, I.J. et Wang, J.R. (2011).** An echovirus 18-associated outbreak of aseptic meningitis in Taiwan: epidemiology and diagnostic and genetic aspect. *J. of Medical Microbiology.* 60: 1362-1364. doi : 10.1099/jmm.0.027698-0.

**Van kuppeveld F.J, Melchers, W.J., Kirkegaard, K. et Doedens, J. R. (1997).** Structure-function analysis of coxsackie B3 virus protein 2B. *Virology.* 227 : 111–118.

**Verstrepen, W.A., Kuhn, S., Kockx, M.M., Van De Vyvere, M.E., Mertens, A.H. (2001).** Rapid detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid specimens with a novel single-tube real-time reverse transcription-PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 39(11): 4093-6. doi : 10.1128/JCM.39.11.4093–4096.2001.

**Volle, R., Bailly, J.L., Mirand, A., Pereira, B., Marque, J.S., Chambon, M., Regagnon, C., Brebion, A., Henquell, C., Peigue, L.H., Archimbaud, C. (2014).** Variations In Cerebrospinal Fluid Viral Loads Among Enterovirus Genotypes In Patients

Hospitalized With Laboratory-Confirmed Meningitis Due To Enterovirus. *J. Infect. Dis.* 210(4) : 576-84. doi : 10.1093/infdis/jiu178.

**Volle, R. (2014).** Pathogénie des entérovirus : étude de la charge virale au cours de méningites et de la perméabilité des cellules endothéliales microvasculaires cérébrales humaines. Thèse de Doctorat. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand : Biologie cellulaire. P 20-27.

**Wang, L., Dong, C., Chen, D.E., Song, Z. (2014).** Coxsackievirus-induced acute neonatal central nervous system disease model, *J. Clin. Exp. Pathol.* 7(3): 858-866.

**Weil, M., Rahav, G., Somech, R., Stauber, T., Alfandari, J., Weiss, L., Silberstein, I., Indenbaum, V., Or, I.B., Mendelson, E., Sofer, D. et Shulman, L.M. (2019).** First report of a persistent oropharyngeal infection of type 2 vaccine-derived poliovirus (iVDPV2) in a primary immune deficient (PID) patient after eradication of wild type 2 poliovirus. *International Journal of Infectious Diseases.* 83 : 40-42. doi : 10.1016/j.ijid.2019.03.037.

**Wells, A.I. et Coyne, C.B. (2019).** Enteroviruses : A Gut-Wrenching Game of Entry, Detection, and Evasion. *Viruses.* 11, 460. doi : 10.3390/v11050460.

**Yerly, S., Gervaix, A., Simonet, V., Cafilisch, M., Perrin, L. et Wunderli, W. (1996).** Rapid and Sensitive Detection of Enteroviruses in Specimens from Patients with Aseptic Meningitis. *Journal Of Clinical Microbiology.* 34 (1) : 199–201.

**Yin-Murphy, M. (1984).** Acute hemorrhagic conjunctivitis. *Prog. Med. Virol.* 29: 23-44.

**Zhou., F, Kong., F, McPhi., K, Ratnamohan., M, Donovan., L, Zeng., F, Gilbert., G.L, Dwyer, D.E. (2009).** Identification of 20 common human enterovirus serotypes by use of a reverse transcription-PCR-based reverse line blot hybridization assay. *J. Clin. Microbiol.* 47(9) : 2737-43. doi:10.1128/JCM.00823-09.

**Zoll, J., Heus, H. A., Van Kuppeveld, F. J., Melchers, W. J. (2009).** The structure-function relationship of the enterovirus 3'-UTR. In : Volle, 2014. *Virus Research.* 139(2) :209–216.



# *Annexes*

**Annexes :**

**Annexe 1 :**

**La composition de milieu de croissance complet (Milieu MEM + Suppléments)  
et le rôle de ces constituants :**

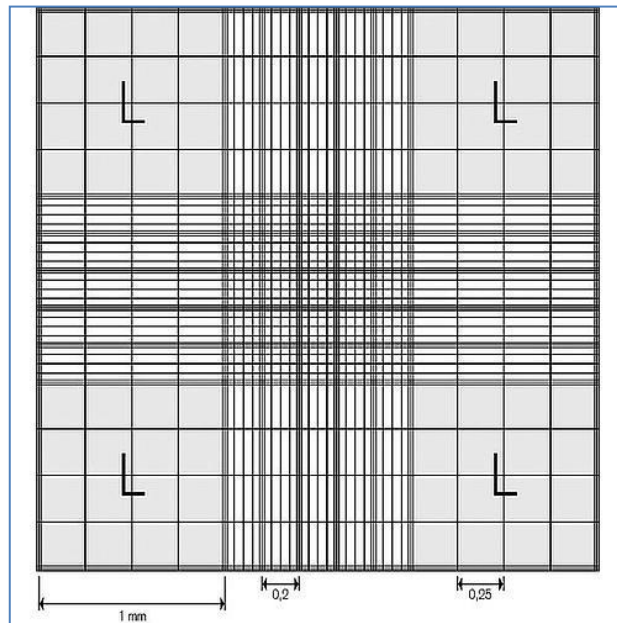
|   | Constituants  | Rôles   |
|---|---|---|
| <b>MEM<br/>(Minimum Essential<br/>Medium)</b> | Sels minéraux   | Maintien de l'isotonicité du milieu   |
|   | Glucose   | Source de carbone et d'énergie  |
|   | Acides aminés essentiels et non essentiels            | Source d'azote et facteurs de croissance  |
|   | Vitamines   | Facteurs de croissance  |
|   | Bicarbonate de sodium                                 | Tampon  |
|   | Rouge de phénol                                       | Indicateur coloré de pH révélant la culture de champignons ou bactéries   |
| <b>Additifs</b>                               | <b>Sérum de veau fœtal (SVF)</b>                      | Apporte :<br>- <b>facteurs de croissance</b><br>- <b>fibrinolectine</b> qui permet l'ancrage des cellules au flacon<br>- des éléments tampon. |
|   | L-glutamine   | Facteur de croissance   |
|   | <b>Antibiotiques</b> (pénicilline G et streptomycine) | Evitent la contamination bactérienne  |
|   | <b>Antifongique</b> (fungizone ou amphotéricine B)    | Evite la contamination fongique   |

## Annexe 2 :

### La numération cellulaire :

La quantité exacte de cellules est calculée par numération cellulaire à l'aide d'un Haemocytomètre (cellule de Neubauer), comme suit :

- ✓ Diluer 0.2 mL de la suspension cellulaire dans 0.2 mL de bleu de Trypan, les cellules mortes seront colorées en bleu.
- ✓ Bien mélanger la suspension cellulaire additionnée de bleu de Trypan et pipeter un volume suffisant pour remplir les deux chambres de la cellule Neubauer.
- ✓ Mettre le volume de la suspension nécessaire entre la lame de Neubauer et lamelle.
- ✓ Compter les cellules viables dans la première chambre de la cellule Neubauer puis dans la deuxième chambre (les 4 grands carreaux de la chambre (voir ci-après le schéma)).



- ✓ Les cellules mortes colorées en bleu par le bleu de Trypan ne sont pas pris en considération.
- ✓ Pour un test valide, les résultats de la numération des deux chambres doivent donner moins de 20% de différence.
- ✓ Calculer la concentration par mL des cellules viables selon la formule suivante :

$$C_I = m \times \frac{1}{4} \times f \times 10^4$$

$C_1$  : concentration cellulaire initiale par mL.

$m$  : moyenne des cellules viables comptées dans les deux chambres de la cellule Neubauer.

$\frac{1}{4}$  : la moyenne des cellules par carreau.

$f$  : 2 facteurs de dilution (dilution au  $\frac{1}{2}$  : un volume de bleu de Trypan + un volume de suspension cellulaire).

$10^4$  : conversion du  $\text{mm}^3$  au mL.

### **Annexe 3 :**

#### **Préparation de tampon d'extraction :**

Pour 300 mL :

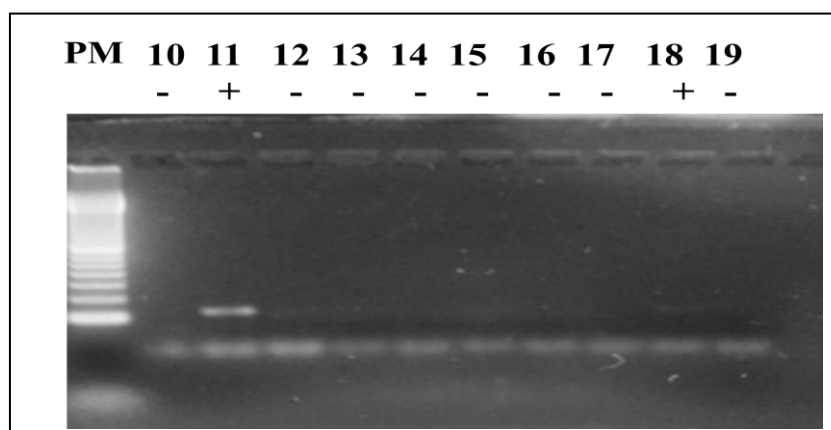
- 4 M GuSCN                      141,80 g
- 0.5 % N-Lauryl Sarcosin    1.50 g
- 1 mM DTT                        0.05 g
- 25 mM Sodium Citrate        2.20 g

### **Annexe 4 :**

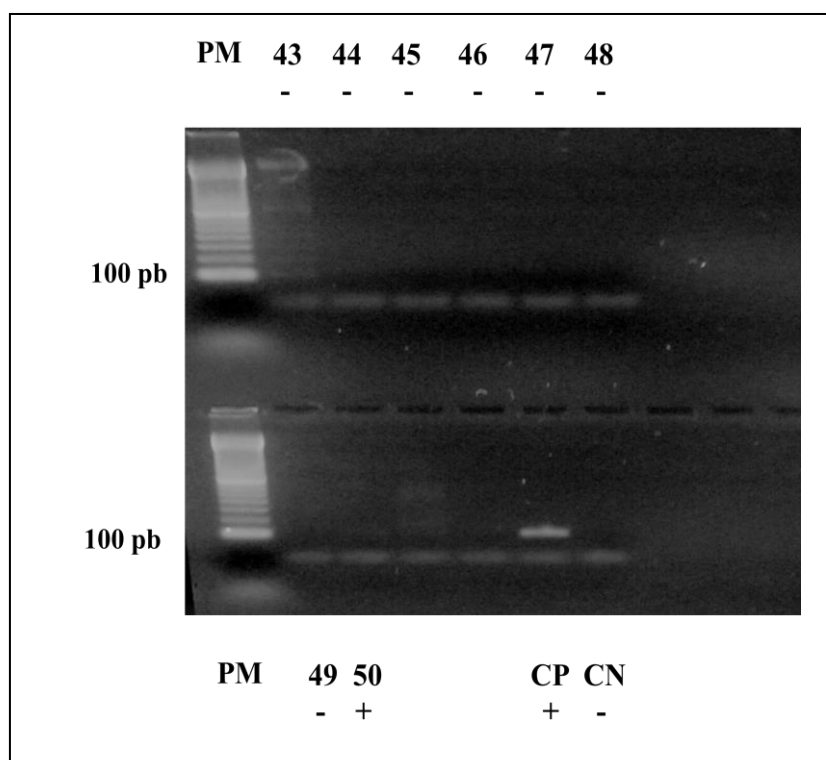
#### **Préparation de l'ARN carrier :**

- ✓ Pipeter 310  $\mu\text{L}$  de buffer AVE et les déposer dans le tube contenant l'ARN carrier lyophilisé pour obtenir une concentration de  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .
- ✓ Distribuer 5.6  $\mu\text{L}$  d'ARN carrier reconstitué dans 50 tubes de 1.5 mL.
- ✓ Les congeler à  $-20^\circ\text{C}$  pour une utilisation directe.

**Annexe 5 :**



**Figure.** Résultats obtenus par RT-PCR classique.



**Figure.** Résultats obtenus par RT-PCR classique.

## Résumé :

Les Entérovirus (EV) constituent la cause principale des méningites virales. Plusieurs techniques ont été mises au point afin d'obtenir les meilleurs résultats de diagnostic. L'objectif de cette étude est la détection des EV par isolement sur culture cellulaire et par amplification génique (RT-PCR) en ciblant la région 5'NC, à partir des LCR prélevés de patients présentant une méningite virale. Sur les 50 LCR, 35 se sont révélés positifs par RT-PCR (70%) et trois par culture cellulaire (6%). Deux LCR positifs en culture et négatifs préalablement par RT-PCR, sont devenu positifs après amplification à partir de surnageant de culture positif, la culture a servi de ce fait à l'amplification des virus. Les isolats obtenus ont été identifiés par séquençage de la région VP1 du génome virale, les résultats ont révélé un Echovirus 27 pour les trois isolats. Cette étude démontre clairement que la RT-PCR est souvent plus sensible, précise et beaucoup plus rapide, fournissant des résultats fiables dans un délai cliniquement acceptable comparativement à la culture cellulaire. L'utilité clinique de la culture cellulaire à partir de LCR est limitée mais reste utile, en particulier pour les tests sérologiques, ainsi que pour l'enrichissement des échantillons en matière de charge virale initiale.

**Mots clés :** Entérovirus, méningite virale, LCR, culture cellulaire, RT-PCR.

## Abstract :

Enteroviruses (EV) constitute the major cause of viral meningitis. Several techniques have been developed to obtain better diagnostic results. Herein, we evaluated the detection of EV by cell culture isolation and gene amplification (RT-PCR), targeting the 5'NC region from 50 Cerebrospinal fluid samples (CSF) collected from patients with viral meningitis. Thirty-five CSF revealed to be positive with RT-PCR (70%) and three by cell culture (6%). Two culture-positive CSFs, previously negative by RT-PCR, became positive after amplification from the cell culture supernatant. Thus, the culture served to amplify the viruses. The obtained isolates were then identified by sequencing the viral genome's VP1 region, giving one Echovirus 27 for the three culture-positive samples. This study clearly demonstrates that RT-PCR is often more sensitive, accurate and much faster, providing reliable results within a clinically acceptable timeframe compared to cell culture. The clinical usefulness of cell culture from CSF is limited but remains useful, particularly for serological tests, as well as for enriching samples for initial viral load.

**Keywords:** Enterovirus, Viral Meningitis, CSF, cell culture, RT-PCR.

## ملخص :

الفيروس المعوي (EV) هو السبب الرئيسي لإلتهاب السحايا الفيروسي. لقد تم تطوير العديد من التقنيات للحصول على أفضل النتائج التشخيصية. الهدف من هذه الدراسة هو الكشف عن الفيروس المعوي في السائل النخاعي مأخوذ من مرضى يعانون من إلتهاب السحايا الفيروسي، وذلك عن طريق عزله على مجموعة من الخلايا، و عن طريق تضخيم الجينات من خلال إستهداف المنطقة 5'NC من أصل 50 سائل نخاعي 35 كانت نتيجتها إيجابية من طرف RT-PCR (70%) و ثلاثة بتقنية العزل الخلوي (6%) حيث اثنان منهما لم يكونا ايجابيين بتقنية RT-PCR إلا بعد تطبيق هذه الاخيرة على المستخلص الفيروسي المتكاثر و المعزول من الخلايا المستهدفة، و بالتالي فإن عزل الفيروس على الخلايا يؤدي الى تكاثره و زيادة عدده. تم التعرف على العزلات عن طريق التسلسل الجيني (Séquençage) للمنطقة VP1، و كشفت النتائج عن Echovirus 27. من خلال هذه الدراسة نستنتج أن تقنية RT-PCR هي أكثر حساسية، دقة، و سرعة، حيث تقدم نتائج موثوقة في إطار زمني مقبول، مقارنة مع تقنية العزل الخلوي. إن تقنية العزل الخلوي للفيروسات الموجودة في السائل النخاعي محدودة و لكنها تظل تقنية مهمة خاصة بالنسبة للإختبارات المصلية، وكذلك لإثراء العينات بالفيروسات الموجودة فيه.

**الكلمات المفتاحية :** الفيروسات المعوية، التهاب السحايا، السائل النخاعي، العزل الخلوي، RT-PCR.