



HAL
open science

Récepteurs et voies d'entrée d'Echovirus 6 :Rôle des quasi-espèces virales

Nicolas Lévêque

► **To cite this version:**

Nicolas Lévêque. Récepteurs et voies d'entrée d'Echovirus 6 :Rôle des quasi-espèces virales. Autre [q-bio.OT]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2007. Français. NNT : . tel-00174060

HAL Id: tel-00174060

<https://theses.hal.science/tel-00174060>

Submitted on 21 Sep 2007

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE

présentée

devant l'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

pour l'obtention

du DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

présentée et soutenue publiquement le

11 Juillet 2007

par

Mr Nicolas LEVEQUE

TITRE :

**Récepteurs et voies d'entrée d'Echovirus 6 :
Rôle des quasi-espèces virales**

Directeur de thèse :

Monsieur le Professeur Bruno LINA

JURY :
Madame le Docteur Helene NORDER
Monsieur le Professeur Pierre BOULANGER
Monsieur le Docteur Laurent ANDREOLETTI
Monsieur le Docteur Francis DELPEYROUX (rapporteur)
Monsieur le Professeur Bruno LINA
Monsieur le Professeur Bruno POZZETTO (rapporteur)

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I

Président de l'Université

Vice-Président du Conseil Scientifique

Vice-Président du Conseil d'Administration

Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Secrétaire Général

M. le Professeur L. COLLET

M. le Professeur J.F. MORNEX

M. le Professeur J. LIETO

M. le Professeur D. SIMON

M. G. GAY

SECTEUR SANTE

Composantes

UFR de Médecine Lyon R.T.H. Laënnec

UFR de Médecine Lyon Grange-Blanche

UFR de Médecine Lyon-Nord

UFR de Médecine Lyon-Sud

UFR d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut Techniques de Réadaptation

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur D. VITAL-DURAND

Directeur : M. le Professeur X. MARTIN

Directeur : M. le Professeur F. MAUGUIERE

Directeur : M. le Professeur F.N. GILLY

Directeur : M. O. ROBIN

Directeur : M. le Professeur F. LOCHER

Directeur : M. le Professeur MATILLON

Directeur : M. le Professeur P. FARGE

SECTEUR SCIENCES

Composantes

UFR de Physique

UFR de Biologie

UFR de Mécanique

UFR de Génie Electrique et des Procédés

UFR Sciences de la Terre

UFR de Mathématiques

UFR d'Informatique

UFR de Chimie Biochimie

UFR STAPS

Observatoire de Lyon

Institut des Sciences et des Techniques de l'Ingénieur de Lyon

IUT A

IUT B

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. le Professeur A. HOAREAU

Directeur : M. le Professeur H. PINON

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur A. BRIGUET

Directeur : M. le Professeur P. HANTZPERGUE

Directeur : M. le Professeur M. CHAMARIE

Directeur : M. le Professeur M. EGEA

Directeur : M. le Professeur H. PARROT

Directeur : M. le Professeur R. MASSARELLI

Directeur : M. le Professeur R. BACON

Directeur : M. le Professeur J. LIETO

Directeur : M. le Professeur M. C. COULET

Directeur : M. le Professeur R. LAMARTINE

Directeur : M. le Professeur J.C. AUGROS

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur le Professeur Bruno Lina de m'avoir accueilli il y a 7 ans déjà dans son laboratoire et de m'avoir encouragé à y rester. J'en repars un entérovirus sous le bras, heureux d'avoir eu la chance, grâce à lui, de découvrir la virologie. Je n'oublierai pas sa gentillesse, sa disponibilité, son éternel optimisme et ses voitures de collection.

Je remercie sincèrement les deux rapporteurs de ce mémoire, Messieurs Francis Delpeyroux et Bruno Pozzetto, d'avoir chaleureusement accepté ce travail ingrat. Ils ont permis par leurs conseils et leurs remarques de passionnés des entérovirus de remodeler et ainsi d'améliorer très nettement ce manuscrit. J'espère que cette dernière version aura davantage répondu à leurs attentes légitimes.

Mes remerciements vont également aux autres membres du jury, Monsieur le Professeur Pierre Boulanger qui a suivi d'un œil bienveillant l'évolution de ce travail, Madame Helene Norder pour m'avoir patiemment aidé à assembler des morceaux de caspide et pour être présente aujourd'hui malgré la distance, et Monsieur Laurent Andréoletti pour ses idées passionnantes sur les entérovirus et les quasi-espèces virales.

Je n'oublierai pas non plus toute l'équipe du laboratoire de virologie du tout nouveau pôle Est. Je compte bien venir vérifier qu'ils n'abiment pas leurs locaux flambant neufs. Leur chaleur me manquera.

Je n'abandonne pas non plus complètement Monique et Delphine. Laurent Andréoletti ayant très judicieusement choisi de s'intéresser aux entérovirus, j'aurai sans doute la chance de pouvoir continuer à les embêter régulièrement.

Je ne peux que remercier humblement Gaëlle, Delphine, Nathalie et Saw-See sans qui ce travail et par la même la suite de ma vie en virologie n'auraient pas été possibles.

Je remercie chaleureusement Marie-Claire et Danielle pour m'avoir patiemment corrigé et recorrecté tout au long de cette année aussi riche en émotions qu'en papiers imprimés.

Je quitte avec regret Emilie, Florence, Geneviève, Martine, Maude, Vanessa et Yahia. Leur amitié me manquera mais je sais que leur goût immodéré pour le champagne les forcera à venir me voir.

J'emporte avec moi le souvenir des cafés pris en compagnie d'Olivier, Alexandra, Audrey, Jean-Jacques et Nicole.

Remerciements

Je ne peux finir sans écrire quelques mots pour Jean-Jacques et Dominique Chomel qui m'auront accompagné tout au long de ces années des rues de Paris à celles de Madrid. J'espère qu'ils profiteront pendant de très nombreuses années de leurs petits-enfants très chanceux d'avoir des grands-parents pareils.

A Ségolène, Constant et François. Ces quelques mots pour qu'ils se souviennent d'avoir été lyonnais.

En souvenir de ma mère.

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE.....	7
DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES.....	10
1. LES ENTÉROVIRUS	11
1.1. DÉFINITION	11
1.2. UNE CLASSIFICATION EN CONSTANTE ÉVOLUTION.....	13
1.3. PLACE D'ECHOVIRUS 6 DANS LE GENRE ENTÉROVIRUS.....	13
2. STRUCTURE D'ECHOVIRUS 6 ET DES ENTÉROVIRUS.....	14
2.1. MORPHOLOGIE, GÉNÉTIQUE ET PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES	14
2.2. STRUCTURE DE LA CAPSIDE.....	15
2.3. STRUCTURE DU GÉNOME	16
3. MULTIPLICATION DES ENTÉROVIRUS	20
3.1. ETAPES PRÉCOCES	21
3.1.1. L'attachement.....	21
3.1.1.1. Les récepteurs cellulaires des picornavirus.....	27
3.1.1.2. Les co-récepteurs.....	27
3.1.1.3. Cas des récepteurs alternatifs	27
3.1.1.4. Mécanismes d'attachement des picornavirus à leurs récepteurs cellulaires.....	28
3.1.2. L'entrée dans la cellule.....	32
3.1.2.1. Les signaux induits par les virus	32
3.1.2.2. Les voies d'endocytose utilisées au cours de l'infection.....	33
3.1.2.3. Libération de la capsid e dans le cytoplasme : formation de pores dans les membranes cellulaires.....	40
3.2. SYNTHÈSES VIRALES.....	43
3.2.1. Traduction du génome viral	43
3.2.2. Réplication du génome viral.....	43
3.3. ETAPES TARDIVES : MORPHOGÉNÈSE ET LIBÉRATION DES VIRIONS	44
4. LES INFECTIONS À ENTÉROVIRUS.....	46
4.1. EPIDÉMIOLOGIE	46
4.2. PHYSIOPATHOLOGIE DE L'INFECTION.....	47
4.3. LES ENTÉROVIRUS EN PATHOLOGIE HUMAINE	48
4.3.1. Les infections neurologiques.....	48
4.3.2. Autres infections.....	51

Table des matières

5. LES ENTÉROVIRUS : DES PATHOGÈNES ÉMERGENTS	52
6. LES INFECTIONS À ECHOVIRUS 6	53
6.1. LES INFECTIONS AIGUËS	53
6.2. L'INFECTION PERSISTANTE : LA SCLÉROSE LATÉRALE AMYOTROPHIQUE.....	53
6.2.1. Modifications moléculaires virales.....	55
6.2.2. Modifications cellulaires	56
7. CONCLUSION ET OBJECTIFS.....	58
<u>TRAVAUX ORIGINAUX</u>	60
LES VOIES D'ENTRÉE CELLULAIRE D'ECHOVIRUS 6.....	61
ARTICLE N°1 :	62
“ECHOVIRUS 6 STRAINS DERIVED FROM A CLINICAL ISOLATE SHOW DIFFERENCES IN HAEMAGGLUTINATION ABILITY AND CELL ENTRY PATHWAY”	62
RÉCEPTEURS CELLULAIRES DE HAE6 ET NHA6.....	67
ARTICLE N°2 :	69
“CAR AND DAF ARE REQUIRED FOR ECHOVIRUS 6 INFECTION”	69
<u>DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES</u>	72
<u>CONCLUSION GENERALE</u>	79
<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	81
<u>ANNEXES</u>	97
Annexe 1 : "New enteroviruses, EV-93 and EV-94, associated with acute flaccid paralysis in the Democratic Republic of the Congo".....	98
Annexe 2 : "Surveillance of enteroviruses in France, 2000-2004".....	99
Annexe 3 : "Two Outbreaks of Acute Hemorrhagic Conjunctivitis in Africa by genotype III Coxsackievirus A24 variant".....	100

Table des illustrations

Tableaux

Tableau 1	
Classification actuelle des Picornaviridae.....	page 12
Tableau 2	
Récepteurs cellulaires des picornavirus.....	page 24

Image

Image 1	
Localisation du génome d'enterovirus par RT-PCR.....	page 54

Figures

Figure 1	
Classification des entérovirus humains en 5 espèces ou génogroupes.....	page 14
Figure 2	
Echovirus 6.....	page 15
Figure 3	
Structure de la capsid des entérovirus.....	page 16
Figure 4	
Organisation génomique des entérovirus.....	page 16
Figure 5	
Organisation du génome et mécanisme de maturation de la polyprotéine des entérovirus.....	page 19
Figure 6	
Cycle de réplication du poliovirus dans la cellule humaine.....	page 20
Figure 7	
Représentation des différents récepteurs des picornavirus.....	page 22
Figure 8	
Structure de 3 récepteurs des entérovirus.....	page 25
Figure 9	
Représentation schématique du Coxsackievirus-Adenovirus Receptor.....	page 28
Figure 10	
Le complexe Poliovirus/Pvr.....	page 29
Figure 11	
Le <i>canyon</i> des entérovirus est une dépression à la surface de la particule virale.....	page 31
Figure 12	
Les virus peuvent être internalisés dans la cellule de mammifère.....	page 34
Figure 13	
Modèle d'organisation des radeaux lipidiques et des <i>caveolae</i>	page 38
Figure 14	
Mécanisme théorique de libération dans le cytoplasme du génome des poliovirus.....	page 42
Figure 15	
Physiopathologie de l'infection.....	page 47
Figure 16	
Etat des lieux des cas de poliomyélite antérieure aiguë.....	page 50

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

Les entérovirus 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). Le genre *Enterovirus* de la famille des *Picornaviridae* est constitué de petits virus non enveloppés à ARN simple brin de polarité positive (Racaniello, 2007). Il comprend actuellement 73 sérotypes pathogènes pour l'Homme répartis en 5 espèces d'une classification en permanente évolution grâce à l'apport des outils moléculaires (Junttila *et al.*, 2007 ; Oberste *et al.*, 2007).

Echovirus 6 est un des nombreux sérotypes de l'espèce B des entérovirus « humains ». Neurotrophe et épidémiogène, il est fréquemment impliqué dans des épidémies estivales de méningites aseptiques survenant principalement chez l'enfant (Chomel *et al.*, 2003 ; Antona *et al.*, 2007). Le laboratoire CNRS FRE 3011 de Virologie et Pathologie Humaine s'intéresse depuis plusieurs années aux infections persistantes à echovirus 6. Les nombreux travaux réalisés sont partis de l'hypothèse que certaines pathologies dégénératives du motoneurone, telles que la sclérose latérale amyotrophique, étaient associées à des infections persistantes ou chroniques à entérovirus (Leparc-Goffart *et al.*, 1996 ; Berger *et al.*, 2000). Différentes études avaient permis de mettre en évidence des séquences d'echovirus 6 dans des coupes de moëlle épinière de patients atteints de SLA (Berger *et al.*, 2000 ; Giraud *et al.*, 2001).

Face au pouvoir pathogène d'echovirus 6 et des entérovirus, les moyens thérapeutiques disponibles sont dérisoires. La découverte de nouveaux antiviraux devient une nécessité de plus en plus impérieuse ce qui nous a conduit à approfondir les connaissances de la biologie des entérovirus notamment celles portant sur les premières étapes du cycle infectieux correspondant à l'attachement et à l'entrée du virus dans la cellule. Elles ont été peu étudiées et sont donc peu connues. Elles représentent pourtant des cibles potentielles pour de nouvelles thérapeutiques. Le modèle historique représenté par les poliovirus faisait état d'une libération de l'ARN viral à la membrane cytoplasmique (Rueckert, 1996). Les données récentes de la littérature, qui constituent la première partie de ce manuscrit, tendent à montrer que les picornavirus exploiteraient en fait les différentes voies d'endocytose et que la décapsidation se produirait au niveau d'une vésicule d'endocytose ou d'un organite cellulaire (Stuart *et al.*, 2002 ; chung *et al.*, 2005).

Ce travail s'est attaché à déterminer les récepteurs et les voies d'entrée cellulaires d'echovirus 6. Dans une première partie, nous avons montré qu'une souche isolée d'un patient est en fait constituée d'un mélange de quasi-espèces virales, définies sur la base de leur pouvoir d'héماغglutination, capables d'entrer dans la cellule par de multiples voies.

Introduction générale

La diversité génétique d'un isolat clinique semble donc constituer pour le virus un avantage adaptatif majeur lui permettant de faire face aux nombreux environnements et pressions de sélection rencontrés au cours de l'infection. Les substitutions nucléotidiques observées dans la région du génome codant les protéines de capsid ont permis de caractériser l'origine de la propriété hémagglutinante des echovirus susceptible de moduler le choix du récepteur à la surface cellulaire et d'orienter les virus hémagglutinants et non hémagglutinants vers des voies d'endocytose distinctes. L'étude des récepteurs des deux quasi-espèces d'echovirus 6 correspond à la seconde partie des résultats expérimentaux obtenus.

Le dernier chapitre discute les différents résultats obtenus en soulignant le rôle potentiel des quasi-espèces virales en pathologie et les possibles implications pour le diagnostic virologique.

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

Données bibliographiques

Le terme echovirus signifie *enteric cytopathogenic human orphan virus*. La désignation de virus orphelin fut utilisée en raison de l'effet cytopathique observé *in vitro* alors qu'aucune symptomatologie clinique n'était constatée. En effet, ces virus ont été pour la première fois isolés en 1951 des selles d'enfants asymptomatiques. Ils ont été plus tard rattachés à des cas de méningite aseptique (Melnick et Agren, 1952 ; Honig *et al.*, 1956). Les echovirus appartiennent à la famille des *Picornaviridae* et au genre *Enterovirus*.

1. Les entérovirus

1.1. Définition

Le terme d'entérovirus a été introduit en 1963 afin de regrouper sous une même entité des virus biologiquement proches, les entérovirus et les rhinovirus (Melnick *et al.*, 1963). Dans cette classification, le genre entérovirus regroupe les trois sérotypes de poliovirus (PV1-3), les coxsackievirus A et B (CV-A et CV-B), les entérovirus (EV) et donc les echovirus (E). La terminologie de *Picornaviridae* est un acronyme synthétique employé pour « *poliovirus, insensitivity to ether, coxsackievirus, orphan virus, rhinovirus, ribo nucleic acid* », mais également pour regrouper sous un même terme de petits (du grec, *pico*, 10^{-12}) virus à ARN (*pico-RNA-virus*). Officialisée en 1974 par le Comité International de Nomenclature des Virus (actuellement Comité International de Taxonomie des Virus -ICTV-), la famille des *Picornaviridae* désigne des virus humains et animaux, non enveloppés dont le génome est un simple brin d'ARN de polarité positive. Elle regroupe alors les genres entérovirus, rhinovirus, cardiovirus, hépatovirus et aphtovirus (Minor *et al.*, 1995). Cette classification établie sur la base de données issues de la culture cellulaire est depuis quelques années remodelée consécutivement à l'acquisition des données de la biologie moléculaire. La connaissance des génomes de ces picornavirus permet de les regrouper désormais en 9 genres (entéro-, rhino-, cardio-, aphto-, hépto-, parécho-, erbo-, kobu- et teschovirus) et 20 espèces (Racaniello, 2007) (**Tableau I**). Le genre *Enterovirus* réunit 97 sérotypes dont 75 sont inféodés à l'Homme. On y retrouve les poliovirus (3 sérotypes), les coxsackievirus A (23 sérotypes) et B (6 sérotypes), les echovirus (29 sérotypes) et les entérovirus (7 sérotypes). Les entérovirus dits « humains » sont répartis en 5 espèces: les poliovirus et les entérovirus des espèces A, B, C et D (Oberste *et al.*, 2001 ; Stanway *et al.*, 2005) (**Figure 1**).

Données bibliographiques

Tableau 1 : Classification actuelle des *Picornaviridae*

Genres	Espèces	Sérotypes	Commentaires
Entérovirus (EV)	EV humains A	16	CV-A2-8, 10, 12, 14, 16, EV 71, 76, 89-91
	EV humains B	42	E1-7, 9, 11-21, 24-27, 29-33, CV-B1-6, CV-A9, EV 69, 73-75, 77-78, 93
	EV humains C	14	CV-A1, 11, 13, 15, 17-22, 24, PV1-3
	EV humains D	3	EV-68, EV-70 et EV-94
	EV bovins	2	
	EV porcins A	1	
	EV porcins B	2	
	EV simiens	20	Encore non classés
Rhinovirus (RV)	RV humains A	58	
	RV humains B	17	
	RV non classés	28	
Cardiovirus	Virus EMC	1	
	Virus EMT	3	
Aphthovirus	Virus de la Rhinite équineA	1	
	Virus de la Fièvre Aphteuse (FMDV)	7	
Hépatovirus	Hépatite A (VHA)	1	
Parechovirus	Parechovirus humains	2	Anciens Echovirus 22 et 23
	Parechovirus « animal »	1	Virus Ljungan
Erbovirus	Virus Rhinite équine B	1	
Kobuvirus	Virus Aichi	1	
Teschovirus	TeV porcins	10	Anciens entérovirus porcins reclassés

D'après Racaniello, 2007.

Données bibliographiques

1.2. Une classification en constante évolution

Les membres d'une même espèce présentent une similitude en acides aminés de plus de 70% dans les régions structurales et non structurales du génome, un nombre restreint et homogène de récepteurs cellulaires et d'hôtes, une composition du génome en G+C ne variant pas de plus de 2.5% et enfin une homologie significative des processus de protéolyse, réplication, encapsidation autorisant les phénomènes de recombinaison génétique (Fauquet *et al.*, 2005). Compte tenu de ces différentes données, les poliovirus ont été repositionnés dans l'espèce C (Brown *et al.*, 2003).

En 1999, Oberste *et al.*, du CDC (Center for Disease Control and prevention) d'Atlanta, ont introduit une méthode de typage moléculaire basée sur l'amplification et le séquençage d'une partie du gène codant la protéine de capsid VP1 englobant la boucle BC (Oberste *et al.*, 1999). Les séquences obtenues permettent de retrouver la classification actuelle en espèces et sérotypes. L'identification d'une souche est rendue possible après comparaison de la séquence à celles des sérotypes d'entérovirus déjà répertoriés. Deux souches sont considérées comme de même sérotype si leurs séquences nucléotidiques présentent plus de 75% d'homologie pour un fragment d'au moins 300 bases.

Le typage moléculaire des souches d'entérovirus a progressivement remplacé la technique conventionnelle de séroneutralisation par les pools croisés de Melnick permettant ainsi l'identification de nouveaux sérotypes lorsque l'homologie avec les sérotypes connus est inférieure à 70% (Melnick *et al.*, 1977 ; Bailly *et al.*, 1996 ; Norder *et al.*, 2003). Depuis 2001, 11 nouveaux sérotypes d'entérovirus ont ainsi été découverts : les entérovirus 73 à 78, 89 à 91, 93 et 94 (Oberste *et al.*, 2001 ; Norder *et al.*, 2003 ; Oberste *et al.*, 2004 ; Oberste *et al.*, 2005 ; Junttila *et al.*, 2007 : article en annexe 1). Les entérovirus 76, 89, 90 et 91 ont été rattachés à l'espèce A tandis que les entérovirus 77, 78 et 94 ont été classés dans l'espèce B. L'entérovirus 93 constitue le troisième membre de l'espèce D avec les entérovirus 68 et 70.

1.3. Place d'echovirus 6 dans le genre entérovirus

Echovirus 6 est l'un des 28 sérotypes d'echovirus (echovirus 1-7, 9, 11-21, 24, 27, 29-33). Il appartient comme tous les echovirus à l'espèce B des entérovirus « humains » qui comprend le plus grand nombre de sérotypes (42 au total).

Certains echovirus sont antigéniquement très proches tels que les echovirus 1 et 8 et ne peuvent être distingués par séroneutralisation.

Données bibliographiques

D'autres, initialement nommés echovirus 21 et 22, ont été reclassés dans un genre distinct, le genre Parechovirus, sur la base de données moléculaires (existence de 3 protéines de capsid au lieu de 4, faible homologie de séquence dans la région 5' non codante) et de culture (meilleure adaptation aux cellules de tumeur rectales humaines HRT18).

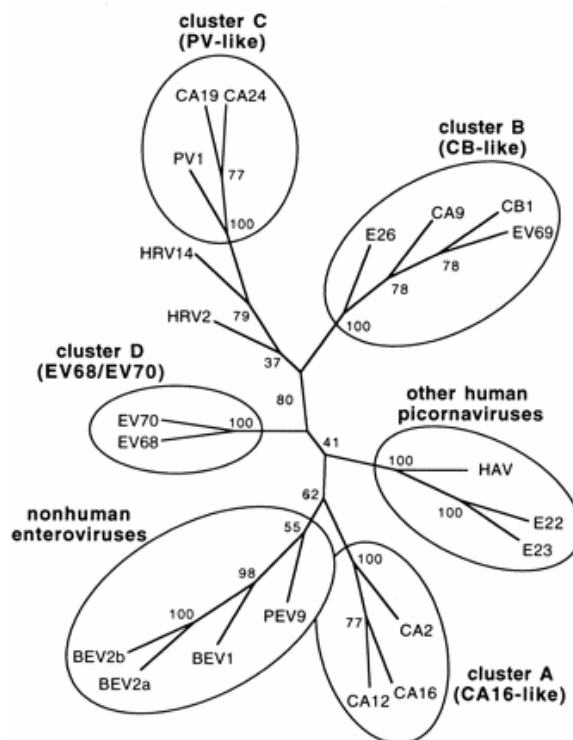


Figure 1. Classification des entérovirus humains en 5 espèces ou génogroupes. La proximité génétique évidente entre les poliovirus et les entérovirus de l'espèce C a abouti à leur rapprochement au sein d'une même espèce. D'après Oberste *et al.*, 2001.

2. Structure d'echovirus 6 et des entérovirus

2.1. Morphologie, génétique et propriétés physico-chimiques

Echovirus 6 (E6), comme les autres entérovirus, est un petit virus à ARN monocaténaire de polarité positive, c'est à dire que le génome viral peut être directement traduit en protéines virales. Les entérovirus ont un diamètre de 24 à 30 nm, un poids de 8×10^6 à 9×10^6 daltons, et possèdent une capsid à symétrie icosaédrique de symétrie cubique, sans enveloppe lipido-protéique (**Figure 2**). Leur densité est d'environ 1.32 à 1.35 g/cm³ et leur coefficient de sédimentation varie de 150 à 160 Svedberg. De nombreux aspects de la pathologie, de la transmission et de l'épidémiologie des entérovirus sont liés à leur grande résistance.

Données bibliographiques

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

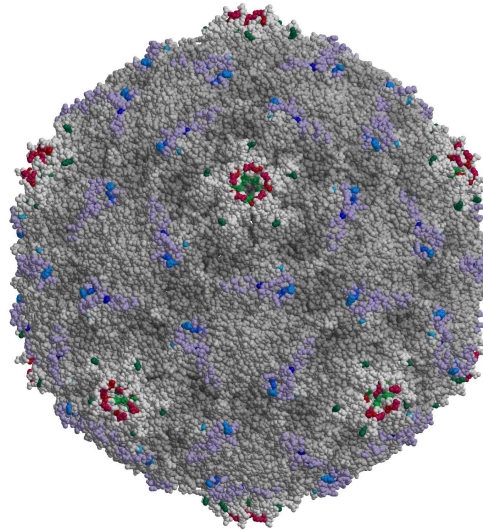


Figure 2. Echovirus 6 comme tous les entérovirus est un virus nu disposant d'une capsidie icosaédrique de symétrie cubique. La dépression ou canyon qui circonscrit l'axe de symétrie 5 est indiqué en rouge. D'après Williams *et al.*, résultats non publiés.

2.2. Structure de la capsidie

La capsidie des entérovirus est composée de 60 protomères identiques, ou capsomères, chacun formé de 4 protéines structurales : VP1 (34 kDa), VP2 (30 kDa), VP3 (26 kDa) et VP4 (7 kDa) (Rueckert, 1996). VP1, VP2 et VP3 présentent une structure tridimensionnelle relativement proche, alors que celle de VP4 diffère et apparaît comme une extension de VP2. VP1, VP2 et VP3 forment entre elles une dépression, appelée *canyon*, décrite comme le site d'attachement au récepteur cellulaire humain du poliovirus (**Figure 3**) (Colston et Racaniello, 1995 ; He *et al.*, 2000). La résolution de la structure tridimensionnelle de la capsidie a permis de comprendre les différents rôles de cette structure : protéger le génome viral des nucléases de l'environnement, reconnaître un récepteur cellulaire spécifique, porter à sa surface les déterminants antigéniques, contenir les informations pour l'encapsidation du génome viral et la maturation des virions, et enfin libérer le génome viral dans les cellules hôtes infectées (Rueckert, 1996).

Données bibliographiques

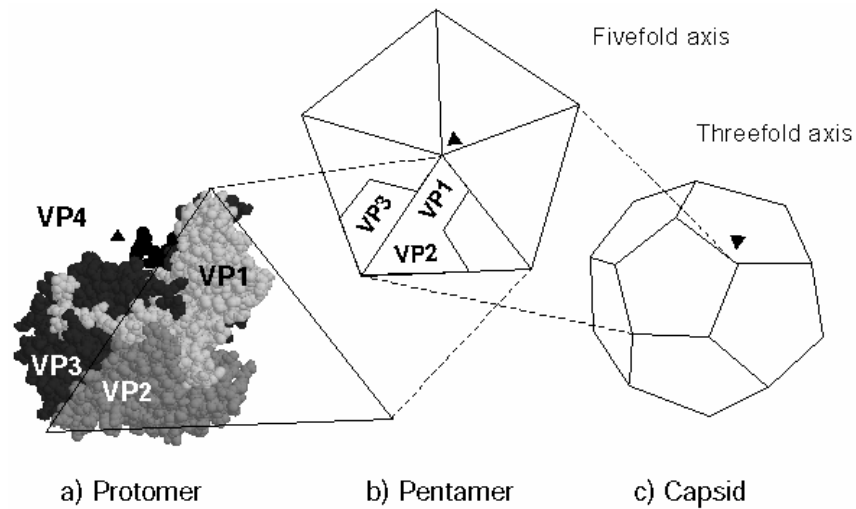


Figure 3. Structure de la capsid des entérovirus. Les protéines VP1, 2 et 3 constituent la surface du virus tandis que VP4 est interne. Le *canyon* sur l'axe de symétrie 5 est bordé au nord par VP1 et au sud par VP3 et VP2. D'après Rueckert, 1996.

2.3. Structure du génome

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

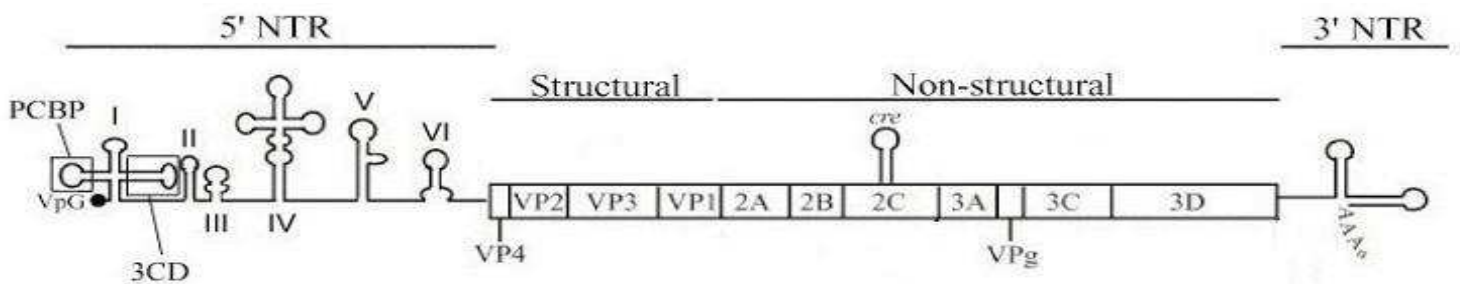


Figure 4. Organisation génomique des entérovirus. La région codante est entourée de 2 régions non codantes en 5' et 3' impliquées dans la régulation de la réplication et de la traduction. Elle code, elle-même, des protéines structurales (les 4 protéines de capsid) et des protéines non structurales (protéases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

D'après Rueckert, 1996.

Données bibliographiques

Le génome des entérovirus est un simple brin d'ARN de polarité positive, non coiffé, d'environ 2.5×10^6 daltons et d'approximativement 7500 nucléotides (nt). L'ARN est dit « infectieux » parce qu'il peut être directement traduit en protéines virales nécessaires à la réplication dès sa libération dans la cellule. Cette molécule comprend une extrémité 5' non codante (5' NC) d'environ 800 nt de long, un large cadre ouvert de lecture (ORF, Open Reading Frame) d'environ 6400 nt de long et une extrémité 3' polyadénylée, également non codante (3'NC), d'environ 300 nt de long. La région 5'NC est caractérisée par une structure secondaire extrêmement complexe. Elle est liée de façon covalente à une petite protéine virale de 22 à 24 acides aminés (VPg) en fonction des picornavirus qui sera clivée au moment de la traduction de l'ARN (Rueckert, 1996) (**Figure 4**).

→ La région 5' non codante (5'NC):

La région 5'NC des entérovirus est particulièrement longue en comparaison aux autres picornavirus (Wimmer *et al.*, 1993). Cette région, extrêmement conservée entre les virus d'une même espèce, est impliquée dans des processus de régulation de la réplication et de traduction en protéines de l'ARN viral (Rohll *et al.*, 1994 ; Skinner *et al.*, 1989). Du fait de l'absence de coiffe en 5' de l'ARN viral, la traduction du génome en une polyprotéine est sous le contrôle d'une structure appelée RLP (« Ribosome Landing Pad ») ou IRES (« Internal Ribosome Entry Site ») (Pelletier et Sonenberg, 1988 ; Rohll *et al.*, 1994). Cet IRES serait également impliqué dans la réplication du génome viral (Borman *et al.*, 1994). Il s'avère donc que cette structure, bien que non traduite, revêt une importance capitale dans la biologie des entérovirus (Skinner *et al.*, 1989), ainsi que dans celle du virus de l'hépatite C possédant lui aussi une telle structure IRES (Tsukiyama-Kohara *et al.*, 1992). Enfin, l'IRES, et particulièrement le domaine V de cette structure, porte les trois mutations impliquées dans l'atténuation des souches vaccinales Sabin de poliovirus. Ces mutations (aux positions 480, 481 et 472 dans le génome Sabin de type 1, 2, et 3, respectivement), initialement suspectées d'atténuer le pouvoir répliquatif des virus vaccinaux (Svitkin *et al.*, 1985), furent confirmées comme ayant un rôle majeur de contrôle de la neurovirulence du poliovirus (Gromeier *et al.*, 1999).

→ La région 3' non codante (3' NC) :

La région 3'NC est de taille variable selon les entérovirus, de 60 nt pour le poliovirus à 100 nt pour les coxsackievirus B. Cette région à structure secondaire complexe (3 domaines en « épingle à cheveux ») est également impliquée dans l'initiation de la réplication de l'ARN viral (Pierangeli *et al.*, 1995 ; Jacobson *et al.*, 1993 ; Pilipenko *et al.*, 1996). En son extrémité 3' terminale, cette région 3'NC porte une séquence polyadénylée d'environ 75 nt.

Données bibliographiques

La fonction exacte de cette séquence homopolymérique est encore incertaine mais elle semble néanmoins impliquée dans le processus de réplication du génome et elle joue un rôle dans l'infectivité de l'ARN génomique (Sarnow, 1989).

→ La phase ouverte de lecture :

La phase de lecture est de taille relativement conservée parmi les entérovirus et code une polyprotéine d'environ 250 kDa. Au fur et à mesure de sa synthèse, cette polyprotéine est clivée (clivage auto-catalytique) et génère alors 11 protéines virales. Elle est divisée en trois régions, P1, P2 et P3, correspondant aux trois précurseurs des protéines virales (**Figure 5**).

La région P1 code la polyprotéine P1, précurseur des protéines structurales VP4, VP2, VP3, et VP1 (dans cet ordre sur le précurseur). Ces protéines entrent dans la composition de la capsid virale. Dès que P1 est libéré du reste de la polyprotéine par la protéase 2A, il est à son tour clivé en VP0, VP3 et VP1 par la protéase 3D, VP0 donnant ultérieurement VP4 et VP2 lors de l'assemblage du virion (Arnold *et al.*, 1987).

Les régions P2 et P3 codent les polyprotéines P2 et P3, respectivement, précurseurs des protéines non structurales impliquées dans le clivage de la polyprotéine, dans la réplication du génome viral, et dans l'inhibition des fonctions cellulaires (Porter, 1993). P2 est le précurseur des protéines 2A, 2B et 2C, et P3 le précurseur des protéines 3A, 3B, 3C et 3D.

- **2A** est une protéase, libérée de manière autocatalytique de la polyprotéine virale (Hellen, *et al.*, 1992). Elle est ensuite impliquée dans le clivage protéolytique du précurseur 3CD, et participe également à la réplication de l'ARN viral (Lee et Wimmer, 1988 ; Molla *et al.*, 1993). Au niveau cellulaire, 2A est responsable du « shut-off » de la synthèse des protéines cellulaires par clivage protéolytique de la protéine p220 constituant le facteur d'initiation de traduction eucaryotique 4G, (eIF4-G, pour eucaryotique initiation factor 4G) (Hellen, *et al.*, 1992).
- **2B** semble jouer un rôle structural dans les complexes de réplication virale (Johnson et Sarnow, 1991), dans le blocage des processus de sécrétion des protéines cellulaires au niveau du réticulum endoplasmique (Doedens et Kirkegaard, 1995), et dans la perturbation de l'intégrité membranaire de l'appareil de Golgi (Sandoval et Carosco, 1997).
- **2C** interviendrait surtout au cours de l'initiation de la synthèse de l'ARN de polarité négative (Barton et Flanagan, 1997). Elle contient le site de résistance à la guanidine, une drogue inhibant la réplication entérovirale (Baltera et Tershak, 1992).

Données bibliographiques

- 3AB participe à la réplication du génome viral (Xiang *et al.*, 1995). 3A pourrait intervenir dans l'inhibition de la communication reticulum-Golgi (Doedens *et al.*, 1997), ainsi que dans l'effet cytopathique viro-induit (Lama *et al.*, 1998). 3B (VPg) est uridylée en VPg-pU(pU) et sous cette forme participe directement à la réplication du génome viral en servant d'amorce à l'ARN polymérase-ARN dépendante (Paul *et al.*, 1998).
- 3CD est impliquée dans les processus protéolytiques permettant la maturation des protéines structurales (Ypma-Wong *et al.*, 1988), ainsi que dans la réplication virale (Andino *et al.*, 1993). 3C est la protéase majeure responsable des clivages protéolytiques au sein des précurseurs P2 et P3 (Hanecak *et al.*, 1982). Elle serait également responsable du clivage d'un certain nombre de protéines cellulaires telles que le facteur de transcription TFIIC, la TATA-binding protein TBP, le facteur de transcription CREB et le facteur oct-1, ceci ayant pour conséquence directe l'inhibition de la transcription cellulaire assurée par les ARN polymérases I, II, et III (Rubinstein *et al.*, 1992). 3D est l'ARN polymérase-ARN dépendante, responsable de la synthèse des ARN positifs et négatifs (Neufeld *et al.*, 1991).

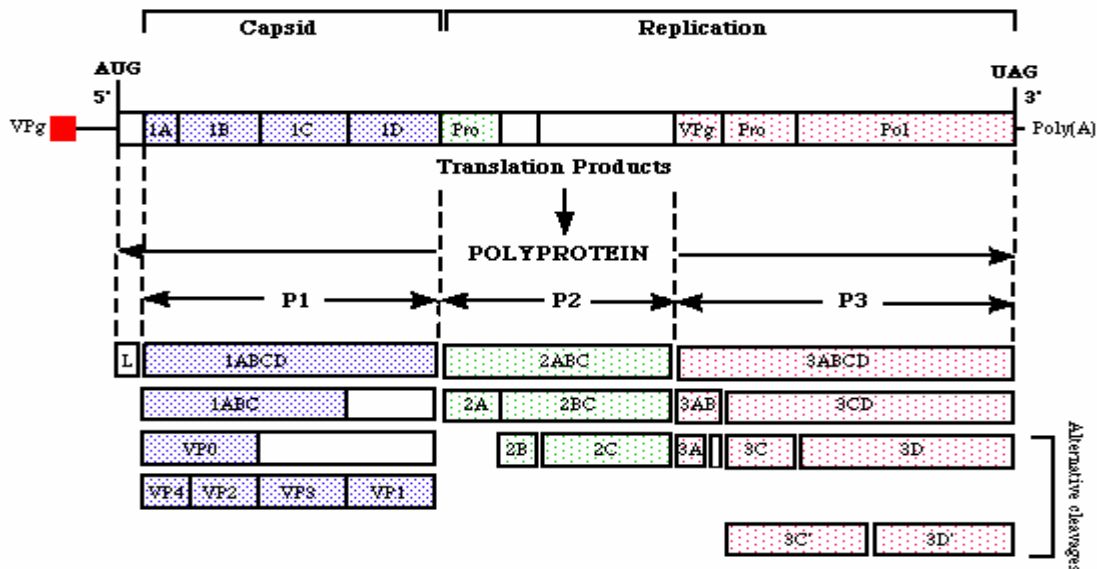


Figure 5. Organisation du génome et mécanisme de maturation de la polyprotéine des entérovirus. La région codante est divisée en trois régions, P1, P2 et P3 qui seront secondairement clivées par les 2 protéases virales, 2A et 3C. Les produits des clivages intermédiaires et finaux sont indiqués.

D'après Racaniello, 2007.

3. Multiplication des entérovirus

La réplication des picornavirus se produit dans le cytoplasme. La première étape correspond à l'attachement du virus à son récepteur cellulaire (**Figure 6**). L'ARN viral est ensuite libéré après modifications de la structure de la capside. Seul le brin d'ARN positif rentre dans le cytoplasme où il est aussitôt traduit en protéines virales nécessaires à la réplication et à la formation de nouvelles particules virales. La durée d'un cycle de réplication est estimée entre 5 et 10 heures en fonction de la virulence de la souche, de la température, du pH, de la cellule hôte et de la multiplicité d'infection. Le cycle de multiplication des entérovirus s'achève par la lyse de la cellule et la libération des nouveaux virions.

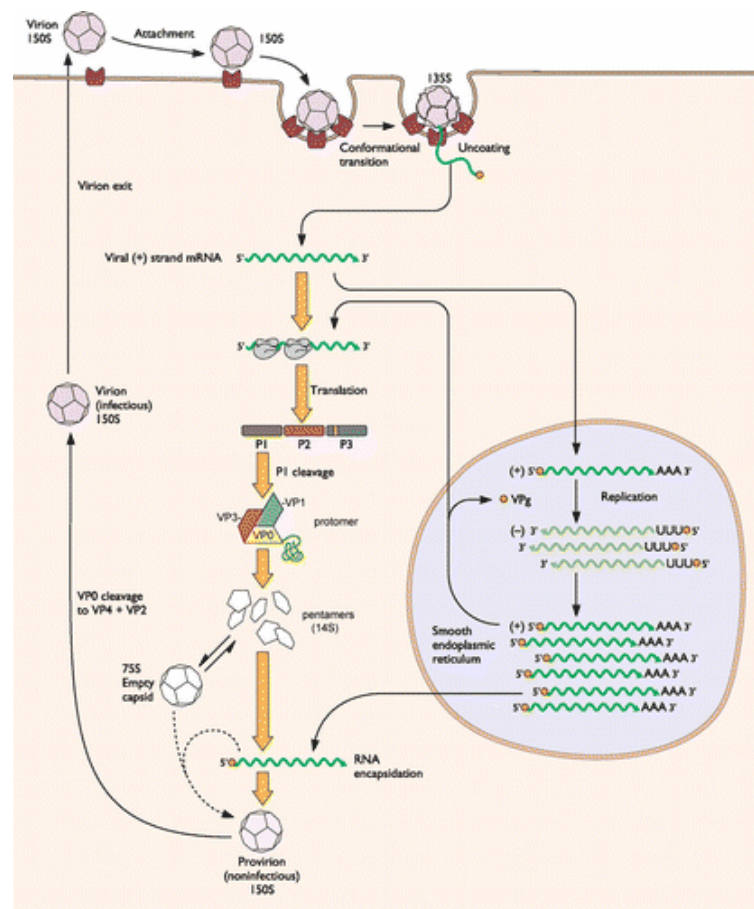


Figure 6. Cycle de réplication du poliovirus dans la cellule humaine. L'infection débute par l'attachement du virus à son récepteur responsable de changements de conformation de la capside permettant la libération de l'ARN viral dans le cytoplasme où il est aussitôt répliqué et traduit. La traduction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

Données bibliographiques

3.1. Etapes précoces

Les étapes précoces du cycle des entérovirus correspondent à l'attachement aux récepteurs cellulaires puis à l'entrée dans la cellule.

3.1.1. L'attachement

Les virus ne sont capables d'infecter que les cellules à la surface desquelles ils peuvent se fixer. L'attachement se produit entre des protéines de la surface du virus et leurs récepteurs à la surface de la cellule. La nature, la distribution et le comportement de ces composants cellulaires déterminent quels types de cellules, quels tissus et quels organismes un virus est susceptible d'infecter. La spécificité du récepteur et son expression tissulaire déterminent le tropisme d'un virus qui caractérise en partie son pouvoir pathogène et la maladie dont il est la cause.

Le récepteur d'un virus se définit comme la molécule à la surface de la cellule capable non seulement de fixer le virus mais aussi de permettre son entrée dans la cellule (a) en induisant des modifications de la structure du virus permettant l'association à d'autres récepteurs et l'entrée par fusion des enveloppes virales et cellulaires (b) en transmettant un signal à travers la membrane cytoplasmique facilitant la capture et l'entrée du virus et préparant la cellule à l'infection, ou (c) en guidant le virus vers une grande variété de voies d'endocytose.

Les récepteurs d'attachement aident à concentrer les virus à la surface cellulaire, facilitant ainsi l'entrée du virus et l'infection. A la différence des véritables récepteurs, ils n'induisent pas de modification de la structure du virus, ne permettent pas l'entrée et ne transmettent pas de signaux vers l'intérieur de la cellule. Généralement, l'interaction avec un récepteur d'attachement n'est pas spécifique.

Les récepteurs et facteurs d'attachement constituent une liste de protéines, de sucres et de lipides avec des fonctions physiologiques très loin du rôle effectivement joué par un récepteur pour un virus. D'abondants et ubiquitaires à rares et spécifiques d'espèce, ils diffèrent d'un virus à l'autre.

La nature exacte des récepteurs cellulaires des picornavirus est restée obscure jusqu'en 1989 quand les récepteurs des poliovirus, CD155 ou poliovirus receptor (Pvr), et du groupe majeur des rhinovirus (ICAM-1) furent découverts (Greve *et al.*, 1989 ; Mendelsohn *et al.*, 1989 ; Staunton *et al.*, 1989) (**Figure 7**). Les récepteurs pour de nombreux picornavirus ont été depuis lors identifiés (**Tableau 2**). Différentes molécules sont utilisées comme récepteurs et certaines sont communes à plusieurs picornavirus et aussi à des virus d'autres familles.

Données bibliographiques

Par exemple, le Decay Accelerating Factor (DAF) ou CD55 est le récepteur pour certains coxsackievirus A et B, echovirus et l'entérovirus 70 (**Figure 7**). Le récepteur des poliovirus, le CD155, est également un des récepteurs des *alpha Herpesviridae* (Spear, 2004).

Pour certains picornavirus, (poliovirus et rhinovirus), un seul type de récepteur est suffisant pour l'entrée du virus dans la cellule. Pour d'autres, une seconde molécule appelée co-récepteur est nécessaire. Néanmoins, le rôle précis des co-récepteurs dans l'entrée des picornavirus n'est pas précisément défini.

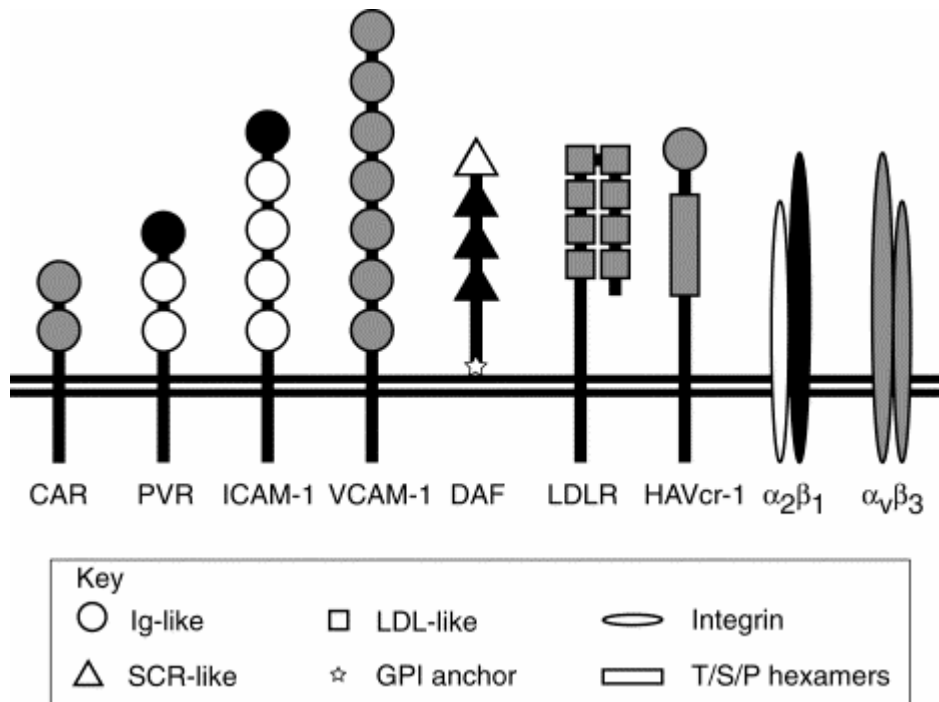


Figure 7. Représentation des différents récepteurs des picornavirus. VCAM : Vascular Cell Adhesion Molecule ; DAF : Decay Accelerating Factor ; LDL-R : Low Density Lipoprotein Receptor ; HAVcr-1 : Hepatitis A Virus receptor ; $\alpha_2\beta_1$: Very Late antigen (super famille des intégrines) ; $\alpha_V\beta_3$: Vitronectin receptor (super famille des intégrines) ; Ig-like : Immunoglobuline-like ; SCR-like : Short Consensus Repeat-like ; LDL-like : Low Density Lipoprotein-like ; GPI: Glycosylphosphatidylinositol ; T/S/P : Thréonine/Sérine/Proline.

D'après Evans et Almond, 1998.

Données bibliographiques

3.1.1.1. Les récepteurs cellulaires des picornavirus

→ Pvr

Le récepteur des poliovirus fut identifié par transformation de cellules murines après transfection d'ADN (Mendelsohn *et al.*, 1989). Les cellules murines étaient connues comme non permissives aux poliovirus parce que dépourvues du récepteur *ad hoc* (McLaren *et al.*, 1959). Les cellules de souris sont, en revanche, sensibles à l'infection par le poliovirus après introduction de l'ARN viral dans la cellule. Des souris sensibles à l'infection par les poliovirus furent ensuite obtenues après introduction d'ADN génomique humain dans la cellule murine (Mendelson *et al.*, 1986). Le clonage du récepteur des poliovirus a révélé que ce récepteur est une protéine intégrale membranaire appartenant à la superfamille des immunoglobulines et comportant 3 domaines extracellulaires de structures semblables aux immunoglobulines : un domaine de type V en position distale suivi de 2 domaines de type C2 (Mendelson *et al.*, 1989) (**Figure 8**). Le premier domaine de structure identique à une immunoglobuline comporte le site de liaison des poliovirus. Ainsi, les cellules exprimant le premier domaine de Pvr sont devenues permissives à l'infection par les poliovirus (Koike *et al.*, 1991 ; Selinka *et al.*, 1991 ; Selinka *et al.*, 1992 ; Morrison *et al.*, 1994). Des mutations dans la première région de Pvr perturbent la liaison du poliovirus à son récepteur (Aoki *et al.*, 1994 ; Bernhardt *et al.*, 1994). Enfin, les modèles d'interaction poliovirus/Pvr produits en microscopie cryoélectronique ont montré que seul le domaine 1 entre en contact avec la surface du virus (Belnap *et al.*, 2000a ; He *et al.*, 2000 ; Xing *et al.*, 2000). Les mutations qui affectent la liaison virus/récepteur ont permis de définir les zones d'interaction.

L'expression de Pvr par la souris suffit à rendre la souris sensible à l'infection par les poliovirus (Ren *et al.*, 1990). Parce que les souris transgéniques ont montré qu'elles étaient capables de développer une poliomyélite après inoculation du virus par différentes voies, elles constituent un bon modèle d'étude de la physiopathologie de la maladie (Racaniello, 2006). Paradoxalement, les souris exprimant Pvr ne sont pas sensibles, pour des raisons non encore élucidées, après inoculation par voie orale, le mode de contamination classique chez l'Homme (Zhang et Racaniello, 1997). Pvr est exprimé dans de nombreux tissus chez la souris transgénique alors que les sites majeurs de réplication des poliovirus sont le cerveau et la moëlle épinière. Ce tropisme restreint est régulé par la réponse en interféron alpha et beta, qui limite la réplication virale dans les tissus extra-neuronaux (Ida-Hosonuma *et al.*, 2005). Cet élément tempère la relation entre tropisme cellulaire et pouvoir pathogène qui n'est, de fait, pas simplement conditionné par l'expression tissulaire du récepteur.

Données bibliographiques

Tableau 2 : Récepteurs cellulaires des picornavirus

Virus	Récepteur	Nature	Co-récepteur	Références
<i>Genre Aphthovirus</i>				
Virus de la fièvre aphteuse (adapté sur cellules en culture)	Sulfates d'héparane	Glycosaminoglycanes		(Jackson <i>et al.</i> , 1996)
Virus de la fièvre aphteuse Encéphalomyocardite	$\alpha_v\beta_3, \alpha_v\beta_8$ Vcam-1 Glycophorine A sialylée (pour l' hémagglutination)	Intégrine Famille des immunoglobulines Glucide		(Neff <i>et al.</i> , 1998) (Huber, 1994)
<i>Genre Enterovirus</i>				
Poliovirus 1-3	Pvr	Famille des immunoglobulines		(Mendelsohn <i>et al.</i> , 1989)
Coxsackievirus A13, A18, A21	Icam-1	Famille des immunoglobulines		(Colonno <i>et al.</i> , 1986)
Coxsackievirus A21	Decay-accelerating factor (CD55)	Domaines SCR (système du complément)	Icam-1	(Shafren <i>et al.</i> , 1997a)
Coxsackievirus A9	$\alpha_v\beta_3, \alpha_v\beta_6$	Intégrine		(Roivainen <i>et al.</i> , 1994; Williams <i>et al.</i> , 2004)
Coxsackievirus B1-B6	CAR (coxsackievirus-adenovirus receptor)	Famille des immunoglobulines		(Bergelson <i>et al.</i> , 1997)
Coxsackievirus B1, B3, B5	CD55	Domaines SCR	$\alpha_v\beta_6$ -Intégrine	(Agrez <i>et al.</i> , 1997; Shafren <i>et al.</i> , 1995)
Echovirus 1, 8	$\alpha_2\beta_1$ -Intégrine (Vla-2)	Intégrine	β_2 -Microglobulin	(Bergelson <i>et al.</i> , 1992; Ward <i>et al.</i> , 1998)
Echovirus 3, 6, 7, 11-13, 20, 21, 24, 29, 33	CD55	Domaines SCR	β_2 -Microglobulin	(Bergelson <i>et al.</i> , 1994 ; Powell <i>et al.</i> , 1997 ; Ward <i>et al.</i> , 1998)
Enterovirus 70	CD55/acide sialique	Domaines SCR /Glucide		(Alexander et Dimock, 2002)
Enterovirus Bovins	Acide sialique	Glucide		(Zajac et Crowell, 1965)
<i>Genre Parechovirus</i>				
Parechovirus 1	$\alpha_v\beta_1, \alpha_v\beta_3$ (Récepteur de la vitronectine)	Intégrine		(Triantafilou <i>et al.</i> , 2000)
<i>Genre Hepatovirus</i>				
Hépatite A	HAVcr-1	Famille des Ig, mucine		(Kaplan <i>et al.</i> , 1996)
<i>Genre Rhinovirus</i>				
Rhinovirus groupe majoritaire (91 sérotypes)	Icam-1	Famille des immunoglobulines		(Greve <i>et al.</i> , 1989 ; Staunton <i>et al.</i> , 1989)
Rhinovirus groupe minoritaire (10 sérotypes)	Récepteur des Low-density lipoprotéines	Molécule de signalisation		(Hofer <i>et al.</i> , 1994)
Rhinovirus 87	Acide sialique	Glucide		(Uncapher <i>et al.</i> , 1991)

Ig, Immunoglobuline; SCR, short consensus repeat.

D'après Racaniello, 2007.

Données bibliographiques

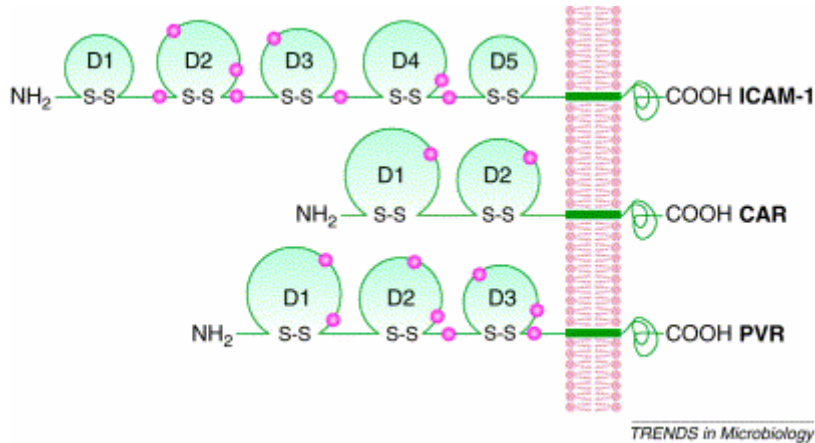


Figure 8. Structure de 3 récepteurs des entérovirus appartenant à la superfamille des immunoglobulines. ICAM (Intercellular Adhesion Molecule) pour le coxsackievirus A21, CAR (Coxsackie Adenovirus Receptor) pour les coxsackievirus du groupe B et Pvr (Poliovirus Receptor) pour les poliovirus. D'après Rossmann *et al.*, 2002.

Ainsi, l'expression de Pvr par de nombreuses lignées cellulaires provenant de différents animaux suffit à les rendre permissives et caractérise donc la sensibilité aux poliovirus. Il semble également évident que Pvr est la seule molécule nécessaire à l'attachement et à l'entrée des poliovirus.

Une première observation avait pourtant montré qu'un anticorps monoclonal anti-CD44, un antigène lymphocytaire, bloquait la fixation et l'entrée du poliovirus dans la cellule suggérant qu'il pouvait constituer un co-récepteur potentiel (Shepley et Racaniello, 1994). Il fut montré par la suite que CD44 n'est pas un récepteur pour les poliovirus et n'est pas indispensable à l'infection des cellules exprimant Pvr (Freistadt et Eberle, 1996). L'explication serait que Pvr et CD44 seraient associés au niveau de la membrane cellulaire et que des anticorps anti-CD44 bloqueraient l'attachement des poliovirus par encombrement stérique des sites de liaisons des virus à Pvr (Freistadt et Eberle, 1997).

Des homologues du gène codant Pvr sont présents dans le génome de nombreux mammifères, certains n'étant pas sensibles à l'infection par les poliovirus (Ida-Hosonuma *et al.*, 2003). La séquence en acides aminés du domaine 1 de Pvr varie énormément parmi les animaux non sensibles, notamment dans les régions qui se lient au poliovirus. L'absence du site de liaison des poliovirus sur ces molécules explique ainsi pourquoi l'infection est restreinte aux primates.

Pvr est une molécule d'adhésion qui concourt à la formation de l'adhérence cellule/cellule à travers l'interaction avec la nectine de type 3, une molécule proche des immunoglobulines (Mueller et Wimmer, 2003).

Données bibliographiques

Pvr est également reconnu à la surface des cellules HeLa par les cellules NK en interagissant avec le CD226 et le CD96 stimulant ainsi leur cytotoxicité (Fuchs *et al.*, 2004). La protéine UL141 du cytomégalo virus réduit l'expression de Pvr, permettant aux cellules infectées d'échapper à la cytotoxicité médiée par les cellules NK (Tomasec *et al.*, 2005).

→ ICAM-1

Le récepteur cellulaire pour le groupe majeur des rhinovirus (90 sérotypes) a été identifié en utilisant des anticorps monoclonaux dirigés contre le site de liaison du virus bloquant ainsi l'infection de cellules permissives. L'analyse de la séquence en acides aminés de la protéine purifiée a révélé qu'il s'agissait d'ICAM-1, une protéine transmembranaire, qui appartient également à la superfamille des immunoglobulines (Greve *et al.*, 1989 ; Staunton *et al.*, 1989) (**Figure 8**). Les fonctions physiologiques d'ICAM-1 sont de se fixer à son ligand, l'antigène associé aux fonctions lymphocytaires (LFA-1) présent à la surface des lymphocytes, et ainsi de déclencher un grand nombre de fonctions physiologiques (Van de Stolpe et Van der Saag, 1996). Les érythrocytes infectés par *Plasmodium falciparum* acquièrent la faculté d'adhérer à ICAM-1 à la surface des cellules endothéliales permettant au parasite d'infecter différents tissus. ICAM-1 est exprimé à la surface de nombreux tissus incluant l'épithélium nasal, le site d'entrée des rhinovirus.

La mutagenèse dirigée d'ICAM-1 révèle que le domaine de liaison des rhinovirus est localisé sur le premier domaine de type immunoglobuline (McClelland *et al.*, 1991). Les sites de liaison de deux autres ligands connus d'ICAM-1, LFA-1 et les érythrocytes infectés par le plasmodium, sont également localisés dans le premier domaine. Un modèle du complexe rhinovirus/ICAM-1 obtenu en cryo-microscopie électronique confirme que seul le domaine 1 du récepteur entre en contact avec le virus (Casasnovas et Springer, 1995 ; Kolatkar *et al.*, 1999). Les résidus d'ICAM-1 impliqués sont localisés dans les boucles BC, CD, DE, et FG de l'extrémité N-terminale du premier domaine.

La comparaison de la structure du complexe virus/récepteur formé par 3 picornavirus différents révèle que, bien que les récepteurs se fixent tous à l'intérieur du canyon, leur orientation est à chaque fois différente. L'empreinte de Pvr sur les poliovirus est significativement plus grande que celle laissée par ICAM-1 à la surface des rhinovirus. La surface de contact entre le coxsackievirus A21 et ICAM-1 est la plus petite des trois. Les parties exposées de la capsid des poliovirus sont le *knob* de la protéine de capsid VP3, région particulièrement exposée connue pour porter les épitopes de séroneutralisation, et l'extrémité C-terminale de la protéine VP1 qui interagissent avec Pvr (Muckelbauer *et al.*, 1995). Ces différences peuvent se traduire par des différences de cinétique et de constante d'affinité entre les différents virus et leurs récepteurs.

Données bibliographiques

3.1.1.2. Les co-récepteurs.

De nombreux entérovirus se lient à DAF ou CD55, Decay Accelerating Factor, qui intervient dans la cascade du complément. Pour beaucoup de ces virus, l'interaction avec DAF n'est pas suffisante pour permettre l'infection. Par exemple, le coxsackievirus A21 se lie à DAF mais l'infection n'a lieu que si ICAM-1 est également présent (Shafren *et al.*, 1997). Certains coxsackievirus B qui utilisent DAF ont besoin de l'intégrine $\alpha\beta6$ en complément de DAF tandis que les echovirus se fixent à l'intégrine $\alpha2\beta1$ (Agrez *et al.*, 1997). La $\beta2$ microglobuline constitue également un co-récepteur potentiel de DAF (Ward *et al.*, 1998).

3.1.1.3. Cas des récepteurs alternatifs

Certains virus peuvent se lier à différents récepteurs cellulaires en fonction de la souche virale et de la lignée cellulaire. La souche A12 du virus de la fièvre aphteuse se fixe à la cellule par le récepteur $\alpha\beta3$ (Neff *et al.*, 1998). La souche O qui a été sélectionnée par passages successifs sur cellules en culture ne peut en revanche se lier à l'intégrine $\alpha\beta3$ mais utilise les sulfates d'héparane comme récepteur cellulaire (Jackson *et al.*, 1996). La souche A12 ne peut infecter les cellules n'exprimant pas $\alpha\beta3$ même si la cellule est couverte de sulfate d'héparane. On assiste ici à un mécanisme d'adaptation au laboratoire du virus de la fièvre aphteuse par cultures sur lignées exprimant l'intégrine $\alpha\beta3$ à un faible niveau entraînant la sélection d'une souche utilisant un récepteur alternatif.

L'explication tiendrait aux charges négatives portées par les chaînes de glycosaminoglycanes (chaînes GAG) attachées à des protéines transmembranaires et chargées négativement. Habituellement, la chaîne GAG sert de récepteur d'attachement permettant la concentration du virus à la surface cellulaire et facilitant le contact avec les récepteurs et co-récepteurs. La liaison au virus implique des zones des protéines de surface chargées positivement. Ainsi, l'adaptation sur cellules en culture se traduit par la sélection de virus porteurs de protéines de surface exprimant d'avantage de groupements basiques. Au contraire, les souches isolées de patients n'ont pas nécessairement recouru aux sulfates d'héparane comme récepteurs d'attachement.

Données bibliographiques

3.1.1.4. Mécanismes d'attachement des picornavirus à leurs récepteurs cellulaires

Chez les virus enveloppés, les glycoprotéines d'enveloppe sont responsables de l'attachement à la cellule hôte.

Chez les virus non enveloppés, les structures interagissant avec le récepteur sont des projections ou des dépressions de la capside. Le site de liaison au récepteur peut impliquer une protéine unique ou être constitué de plusieurs chaînes polypeptidiques. Les adénovirus disposent d'une fibre trimérique, le penton, avec à son extrémité une partie globuleuse appelée *knob* qui se lie au domaine N-terminal de CAR (Bergelson *et al.*, 1997) (**Figure 9**).

Le site de fixation des entérovirus est localisé dans le *canyon*.

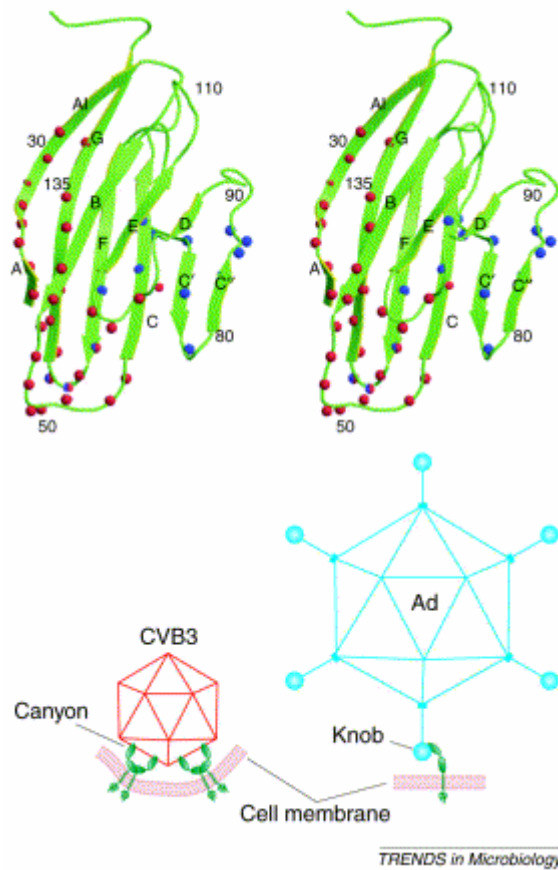


Figure 9. Représentation schématique du Coxsackievirus-Adenovirus Receptor. Les acides aminés intervenant dans la liaison au *canyon* du coxsackievirus B3 sont indiqués en rouge tandis que ceux interagissant avec le *knob* des adénovirus apparaissent en bleu. D'après Rossmann *et al.*, 2002.

La capside des picornavirus est donc composée de 4 protéines constituant une structure de symétrie icosaédrique. Au sein des membres de cette famille, les protéines de capside sont organisées de façon similaire mais l'architecture de la surface de la particule virale varie. Ces variations reflètent les différences de sérotypes et les modes d'interaction virus/récepteur.

Données bibliographiques

Par exemple, la capside des poliovirus, rhinovirus et coxsackievirus dispose d'une dépression appelée *canyon* à sa surface autour de l'axe de symétrie 5 tandis que les cardiovirus et aphotavirus en sont dépourvus (Rossmann, 1989).

Le *canyon* des poliovirus, rhinovirus et coxsackievirus est considéré comme le site d'interaction virus/récepteur. Ainsi, des mutations intéressant les acides aminés constituant le *canyon* des poliovirus et rhinovirus modifient l'affinité du virus pour le récepteur (Colonno *et al.*, 1988 ; Colston et Racaniello, 1994). Des modèles d'interaction des poliovirus, rhinovirus et coxsackievirus avec leur récepteur cellulaire ont été réalisés à partir de résultats obtenus en cryo-microscopie électronique et cristallographie (Casasnovas *et al.*, 1998 ; Kolatkar *et al.*, 1999 ; Belnap *et al.*, 2000b ; He *et al.*, 2000 ; Xing *et al.*, 2000) (**Figure 10**). Ces modèles ont montré que seul le 1^{er} domaine de Pvr ou d'ICAM-1 s'imbriquait dans le *canyon* du virus.

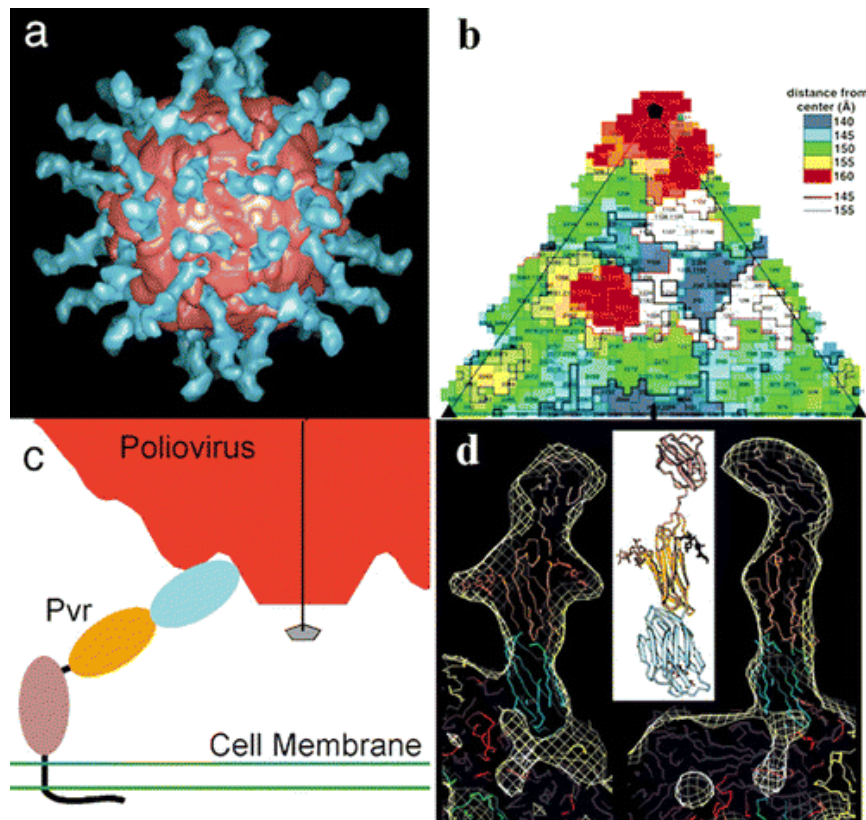


Figure 10. Le complexe Poliovirus/Pvr. (a) Image du complexe formé par le poliovirus et son récepteur, Pvr. Le virus est en rouge tandis que les récepteurs apparaissent en bleu. (b) Cartographie de l'empreinte de Pvr à la surface de la capsid virale. Un seul protomère est ici représenté. La zone de liaison à Pvr est indiquée en blanc. (c) Représentation de la liaison de Pvr à la capsid du poliovirus. La structure de Pvr est telle que'un virus fixé est obligatoirement amené au contact de la membrane cytoplasmique. (d) Reconstruction de Pvr et du virus (à l'échelle atomique). D'après Hogle, 2002.

Données bibliographiques

Pour les rhinovirus, même si la capsidie présente également à sa surface une dépression, elle ne constitue pas, pour le groupe dit mineur, le site d'attachement au récepteur des lipoprotéines de faible densité (RLDL). Pour ces rhinovirus, le récepteur se fixe au voisinage de l'axe de symétrie 5, sur l'excroissance entourée par le *canyon* (Hewaat *et al.*, 2000 ; Verdaguer *et al.*, 2004). L'analyse des séquences codant les protéines de capsidie et la comparaison des structures ont montré pourquoi les groupes majeur et mineur de rhinovirus reconnaissent des récepteurs différents. Une lysine en position 224 de la protéine de capsidie VP1, position conservée au sein du groupe minoritaire, constitue le point clé de l'interaction avec le complexe chargé négativement du RLDL (Verdaguer *et al.*, 2004). La liaison électrostatique RLDL/lysine initie le contact du virus et de son récepteur. Les acides aminés voisins hydrophobes et basiques permettent de renforcer ensuite la liaison du virus à son récepteur. Cette lysine n'est pas retrouvée dans la protéine VP1 du groupe majoritaire expliquant l'absence d'adhésion au RLDL. Une exception est le rhinovirus 85, un sérotype du groupe majoritaire, qui possède une lysine en position 224. L'explication de la non fixation au RLDL est sans doute due au fait que des acides aminés situés de part et d'autre de la position 224 ne seraient pas hydrophobes et basiques.

A l'intérieur de la dépression se trouve une poche hydrophobe qui s'ouvre à la base du *canyon* et se prolonge le long de l'axe de symétrie 5. Cette cavité est occupée chez de nombreux picornavirus par un acide gras ou une substance lipidique. Certaines molécules antivirales sont capables de déplacer ce lipide et de se fixer à l'intérieur de la poche (Smith *et al.*, 1986) (**Figure 11**). Elles provoquent chez le rhinovirus 14 des changements de conformation du *canyon* empêchant l'attachement à la cellule (Pevear *et al.*, 1989). Au contraire, ces molécules ne provoquent que des modifications mineures de la capsidie chez les rhinovirus 1A, 3 et 16 comme chez les poliovirus (Grant *et al.*, 1994 ; Hiremath *et al.*, 1995 ; Hadfield *et al.*, 1999). L'inhibition d'attachement du rhinovirus 16 induite par ces composés n'est probablement pas le résultat d'une altération directe du site d'interaction virus/récepteur mais plutôt le résultat d'un empêchement des modifications de conformation de la capsidie indispensable à la liaison au récepteur. Chez les poliovirus, ces antiviraux n'inhibent pas l'attachement mais plutôt l'étape de décapsidation (McSharry *et al.*, 1979).

Données bibliographiques

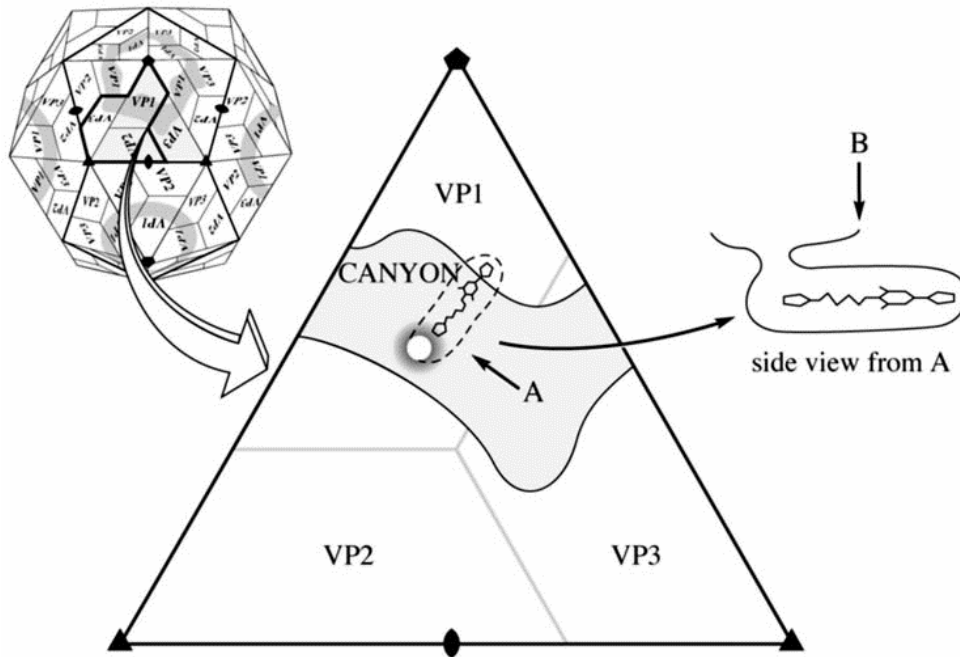


Figure 11. Le *canyon* des entérovirus est une dépression à la surface de la particule virale délimitée au nord par la protéine de capsidè VP1 et au sud par les protéines VP2 et VP3. Au fond du *canyon* se trouve une poche hydrophobe occupée par une substance lipidique. Cette cavité est la cible des antiviraux de type WIN qui viennent s'y fixer empêchant le processus de décapsidation. D'après Grant *et al.*, 1994.

On a cru pendant longtemps que le *canyon* des picornavirus était trop étroit pour permettre la pénétration des anticorps et masquait au système immunitaire les acides aminés impliqués dans l'attachement (Rossmann, 1989). En fait, les anticorps sont capables d'entrer dans le *canyon* des rhinovirus au même titre qu'ICAM-1 (Smith *et al.*, 1996). La forme étroite du *canyon* des picornavirus n'est donc pas faite pour les soustraire au système immunitaire.

La capsidè de certains picornavirus, dont le coxsackievirus A9 et le virus de la fièvre aphteuse, ne dispose pas d'un *canyon* très marqué. Ces virus se fixent à leur récepteur cellulaire grâce aux boucles formées à la surface de la capsidè virale. Pour le virus de la fièvre aphteuse, une séquence Arg-Gly-Asp dans la boucle β G- β H de la protéine de capsidè VP1 reconnaît les récepteurs de type intégrines à la surface cellulaire (Fox *et al.*, 1989). Des peptides contenant cette séquence ou sa modification par mutations empêchent l'attachement du virus (Mason *et al.*, 1994). Chez le coxsackievirus A9, la séquence Arg-Gly-Asp est présente dans un groupe de 17 acides aminés à l'extrémité C-terminale de la protéine VP1 et constitue également le site d'interaction du virus à son récepteur (Hughes *et al.*, 1995).

Le virus de la fièvre aphteuse est connu pour utiliser 2 récepteurs alternatifs à la surface de la cellule en fonction des souches : une intégrine et les sulfates d'héparane.

Données bibliographiques

Le site de liaison aux sulfates d'héparane est une dépression peu profonde à la surface du virus formée par les trois protéines de capsid VP1, VP2 et VP3 (Fry *et al.*, 1999). L'acide aminé en position 56 de la protéine de capsid VP3 joue un rôle majeur dans la reconnaissance du récepteur. Chez les virus « sauvages » se liant à l'intégrine, cet acide aminé est une histidine tandis que l'adaptation sur cellules sélectionne les virus avec une arginine à cette position ayant une forte affinité pour les sulfates d'héparane.

3.1.1. L'entrée dans la cellule

3.1.2.1. Les signaux induits par les virus

De nombreux virus utilisent le système de signalisation cellulaire pour favoriser et optimiser leur entrée dans la cellule. Les signaux sont utilisés pour favoriser l'accès aux co-récepteurs, pour induire l'endocytose dans les conditions propres à chaque virus et préparer sa réplication. Le signal est initié à la membrane cytoplasmique après liaison du virus et regroupement des récepteurs. Il se poursuit ensuite au sein des vésicules d'endocytose (endosomes et cavésomes) (Pelkmans *et al.*, 2001).

Au niveau de la membrane cellulaire, l'interaction virus/récepteur se traduit par l'activation de tyrosine ou d'autres kinases qui, à leur tour, induisent une cascade de signalisations à travers le cytoplasme jusqu'au noyau. Les signaux induits par les virus dépendent du panel classique de seconds messagers tels que le calcium, les phosphatidylinositides, les diacylglycérides, de petites GTPases (Rabs, Arfs, Rho-like) et de nombreux autres régulateurs de la circulation cellulaire et de la réorganisation des filaments d'actine (Nemerow, 2000 ; Greber, 2002 ; Pelkmans *et al.*, 2004 ; Tagawa *et al.*, 2005). La dynamine, la clathrine, la cavéoline et d'autres facteurs de modification membranaire sont recrutés à la membrane cellulaire et sont capables d'induire une réorganisation du cytosquelette cortical permettant le transfert de vésicules néo-formées du cortex cellulaire à travers le cytoplasme.

Un exemple permet de comprendre la complexité des mécanismes de signalisation induits par les virus. Il s'agit des adénovirus 2 et 5 qui utilisent CAR et l'intégrine $\alpha\beta3$ comme récepteurs (Nemerow, 2000 ; Greber, 2002). Le phénomène d'endocytose implique les puits tapissés de clathrine et l'internalisation se produit dans les endosomes. L'interaction avec l'intégrine entraîne l'activation de p85/p110, une kinase PI(3). La synthèse de PI (3, 4) P₂ et de PI (3, 4, 5) P₃ active la protéine kinase C. Les petites GTPases (Rab5 et Rho) sont également activées.

Données bibliographiques

Une des réponses induites est l'activation transitoire de la macropinocytose, un processus dépendant des fonctions de l'actine entraînant une augmentation rapide de l'entrée des fluides (Meier *et al.*, 2002). Cette réponse semble favoriser la pénétration des adénovirus à partir des vésicules d'endocytose par rupture des membranes induite par le virus.

La liste des virus connus pour utiliser les voies de signalisation de la cellule hôte afin de faciliter leur entrée s'est rapidement allongée. Pour beaucoup d'entre eux, l'activation des voies de signalisation est indispensable. Les virus profitent de l'extrême sensibilité des cellules aux stimuli et ligands extracellulaires dont ils vont mimer l'action, entraînant le recrutement et l'activation des protéines impliquées dans la transmission du signal.

3.1.2.2. Les voies d'endocytose utilisées au cours de l'infection

Les virus nus pénètrent dans le cytosol soit directement à travers la membrane cytoplasmique soit à travers la membrane d'organites internes (endosomes, lysosomes, réticulum endoplasmique ou cavéosomes) après endocytose. Ces deux hypothèses ont été longtemps opposées. Il semble maintenant clair que si certains virus sont capables d'infecter la cellule en traversant la membrane cytoplasmique, la plupart ont recours à une ou plusieurs voies d'endocytose.

La raison principale qui fait que les virus ont privilégié les voies d'endocytose est qu'elles offrent un accès direct au cytoplasme à travers la membrane cellulaire, le cytosquelette cortical et les différentes barrières rencontrées au cours de l'infection (Marsh et Bron, 1997). De plus, le recours à des mécanismes physiologiques a pour effet de retarder la détection du virus par le système immunitaire. Le virus peut aussi bénéficier des conditions optimales en matière de pH et d'adressage cellulaire propres à sa réplication. Les vésicules impliquées dans l'endocytose contiennent des enzymes telles que des protéases ou des thioloxydases nécessaires à son entrée et sa décapsidation. Enfin, pour des virus comme les adénovirus qui pénètrent dans la cellule par lyse des membranes ou grâce à la formation de pores, il est plus facile de préserver l'intégrité de la cellule en traversant la membrane d'une vésicule d'endocytose plutôt que la membrane cytoplasmique.

Depuis les descriptions de la phagocytose et des puits tapissés de clathrine, le panorama des voies d'endocytose s'est singulièrement complexifié (**Figure 12**). Les nouvelles voies d'entrée correspondent aux radeaux lipidiques et aux *caveolae* et à plusieurs mécanismes encore peu connus indépendants à la fois de la clathrine et de la cavéoline (Conner et Schmid, 2003 ; Parton et Richards, 2003; Pelkmans et Helenius, 2003).

Données bibliographiques

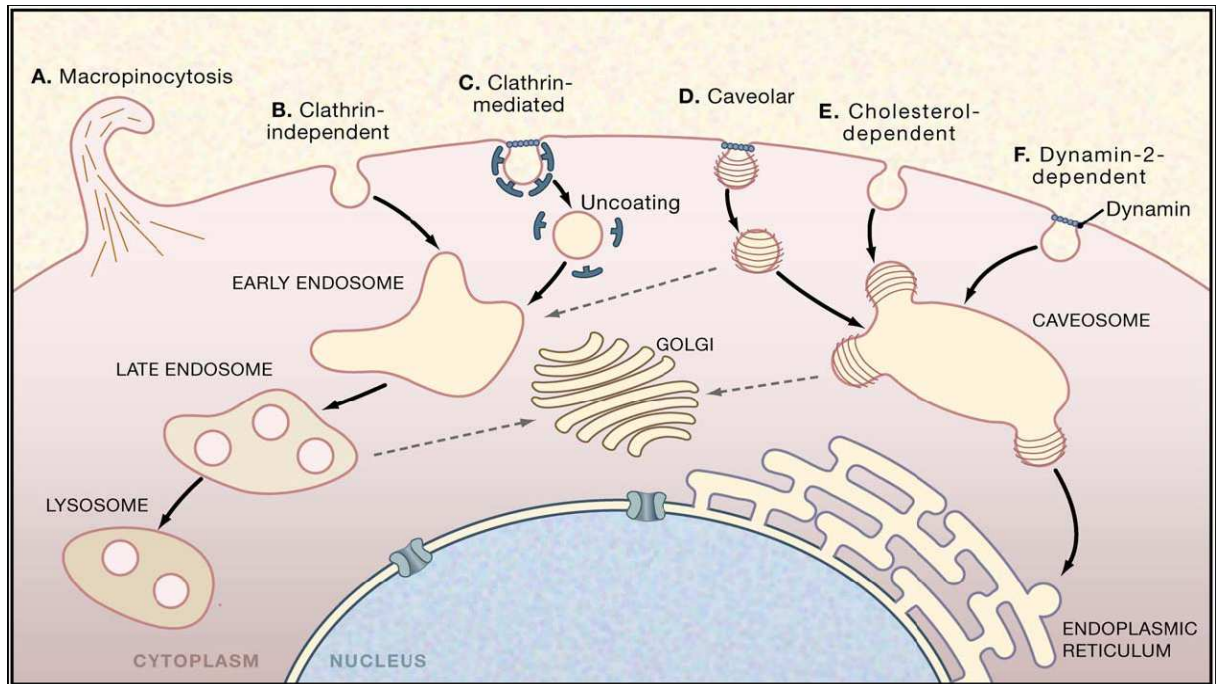


Figure 12. Les virus peuvent être internalisés dans la cellule de mammifère à travers différentes voies d'endocytose. D'après Helenius, 2007.

Six voies différentes ont été décrites dans la littérature.

(A) La macropinocytose est impliquée dans l'entrée des adénovirus.

(B) Une voie indépendante de la clathrine mais qui aboutit aux endosomes précoces. Elle est utilisée par les virus influenza et les arénavirus.

(C) La voie dépendante de la clathrine où les virus sont transportés aux endosomes précoces puis tardifs. Elle est la plus décrite en virologie.

(D) La voie dépendante des radeaux lipidiques et plus précisément des *caveolae*. Décrite à partir des études réalisées sur le virus simien 40 ou SV40, elle est dépendante du cholestérol et correspond au transport du virus dans le cavéosome jusqu'au réticulum endoplasmique lisse.

(E) Une voie dépendante des radeaux lipidiques mais indépendante des *caveolae* et de la dynamine.

(F) Une voie d'endocytose similaire à (E) mais dépendante de la dynamine.

Différentes molécules chimiques furent initialement utilisées pour caractériser les voies d'entrée des virus. Elles avaient pour but de bloquer plus ou moins spécifiquement une voie d'endocytose donnée. La chlorpromazine est connue pour empêcher le bourgeonnement des puits tapissés de clathrine à partir de la membrane cytoplasmique. La nystatine par inhibition de synthèse et la méthyl- β -cyclodextrine par capture diminuent la teneur de la cellule en cholestérol détruisant radeaux lipidiques et *caveolae*. La toxicité et les effets pléiotropiques de ces substances ont poussé à tester la surexpression dans la cellule des formes mutées négatives (mutants dominants négatifs) de protéines impliquées dans les différentes voies d'entrée. Enfin, la technologie des siRNA a récemment fait son apparition et permet « d'éteindre » spécifiquement l'expression d'une protéine de l'endocytose.

Données bibliographiques

→ La voie d'endocytose dépendante de la clathrine

L'endocytose dépendante des puits tapissés de clathrine est la voie d'internalisation la plus anciennement connue et la plus étudiée. Cette voie permet le transport, *via* les endosomes, de ligands de la membrane cytoplasmique à l'appareil de Golgi ou aux lysosomes avant libération dans le cytosol ou le noyau. La cellule l'utilise pour internaliser une grande variété de ligands après interaction avec leurs récepteurs cellulaires spécifiques, différentes protéines et lipides membranaires. La liaison au récepteur cellulaire déclenche les signaux d'internalisation par les puits tapissés de clathrine. Le virus utilise cette propriété et se comporte comme un véritable ligand opportuniste. L'entrée du virus par cette voie est caractérisée par sa rapidité (les virus sont généralement internalisés quelques minutes après l'adhésion) et sa grande efficacité (plus de 3000 particules virales sont internalisées chaque minute par la cellule) (Marsh et Helenius, 1989). D'un diamètre allant jusqu'à 120 nm, ces puits sont suffisamment grands pour permettre l'entrée de la plupart des virus des animaux (Marsh et Helenius, 1989). Parfois, même des particules plus larges telles que le virus de la stomatite vésiculeuse (VSV) peuvent être internalisées (Matlin *et al.*, 1982).

Bien que l'endocytose dépendante de la clathrine soit un phénomène en constante activité, elle est pourtant fortement régulée. Une étude récente utilisant des siRNA a montré que l'endocytose dépendante de la clathrine du VSV dans les cellules HeLa était sous le contrôle de près de 90 kinases cellulaires (Pelkmans *et al.*, 2005). Curieusement, l'entrée des virus influenza et des réovirus se fait dans des puits formés *de novo* au niveau du site de liaison du virus (Ehrlich *et al.*, 2004 ; Rust *et al.*, 2004). Seule une petite fraction de particules virales rentrerait dans des vésicules préexistantes comme si le virus induisait par sa fixation un signal provoquant la formation d'un puits de clathrine. Les mécanismes aboutissant à ce phénomène demeurent encore mystérieux.

La voie médiée par la clathrine amène le virus et le récepteur associé aux endosomes précoces où ils sont exposés à un pH modérément acide. Le chemin continue ensuite vers les endosomes tardifs à pH plus acide et éventuellement vers les lysosomes où les virus (ou ce qu'il en reste après pénétration) sont dégradés (Marsh et Helenius, 1989). La pénétration se produit donc à l'intérieur des endosomes précoces ou tardifs (Marsh et Helenius, 1989 ; Lakadamyali *et al.*, 2003). Les virus circulent dans le cytoplasme grâce aux vésicules de transport endosomal. Les lysosomes sont rarement impliqués dans l'endocytose et correspondent à un cul-de-sac destructeur que le virus va s'attacher à éviter à tout prix.

Données bibliographiques

En théorie, les virus entrant par les puits tapissés de clathrine requièrent un pH acide. Bien que ce soit souvent vrai, certains sont capables d'atteindre un compartiment acide sans passer par les puits tapissés de clathrine (Dourmashkin et Tyrrell, 1974 ; Sieczkarski et Whittaker, 2003 ; Rust *et al.*, 2004). Il est alors important de confirmer l'implication de la clathrine par traitement à la chlorpromazine, l'utilisation des formes dominantes négatives ou l'extinction par les siRNA des protéines Eps15, Rab5 et des chaînes de clathrines (Conner et Schmid, 2003 ; Sieczkarski et Whittaker, 2002). L'inhibition des fonctions de la dynamine-2, longtemps utilisée, n'est pas un bon indicateur de l'implication des puits tapissés de clathrine parce qu'elle est aussi impliquée dans l'endocytose dépendante des radeaux lipidiques (Pelkmans *et al.*, 2002 ; Pietiainen *et al.*, 2004).

Les virus ayant besoin d'un pH encore relativement élevé pénètrent dans la cellule en quelques minutes (5 à 10 minutes) après internalisation dans les endosomes précoces sous contrôle de la petite GTPase Rab5 (Marsh et Helenius, 1989). Ces endosomes sont localisés à la périphérie de la cellule et ont un pH compris entre 6,5 et 6. Les virus avec un seuil de pH plus bas pénètrent plus tard (10 à 50 minutes après infection) lorsqu'ils sont dans les endosomes tardifs de pH compris entre 6 et 5 régulés par la petite GTPase Rab7. Ainsi l'entrée du virus de la forêt de Sindbis à pH 6,2 active Rab5 mais pas Rab7 tandis que le virus de la grippe (pH 5,0 à 5,6) requiert les deux petites GTPases pour rentrer dans la cellule (Sieczkarski et Whittaker, 2003).

→ Radeaux lipidiques et *caveolae*

Des voies alternatives à celle des puits de clathrine, la mieux caractérisée, est celle dépendante des radeaux lipidiques et des *caveolae* décrite initialement pour le virus simien 40 et les polyomavirus (Richterova *et al.*, 2001 ; Gilbert *et al.*, 2003 ; Damm *et al.*, 2005). Les radeaux lipidiques doivent leur nom à leur haute teneur en cholestérol et en glycosphingolipides (Simons et Ikonen, 1997) (**Figure 13**). On peut ainsi les comparer à des mottes de beurre flottant à la surface d'une mer d'huile. Les *caveolae* correspondent à un sous-type de radeaux lipidiques spécifiquement dédié à l'endocytose et doivent leur nom à la protéine de base qui les compose, la cavéoline. Cette voie induite par l'interaction d'un récepteur avec son ligand est dépendante du cholestérol et est régulée par les tyrosines kinases. Les vésicules de transport des virus formées à la membrane cellulaire ont une taille de 70 nm de diamètre environ et n'ont pas de structure reconnaissable en microscopie électronique. Les radeaux lipidiques concentrent en leur sein un grand nombre de molécules dont les protéines ancrées par le glycosylphosphatidylinositol qui sont autant de récepteurs potentiels pour les virus. Enfin, le détachement des *caveolae* à partir de la membrane cytoplasmique est assuré, comme pour les puits de clathrine, par une GTPase de 100kDa, la dynamine.

Données bibliographiques

Il existe trois variantes de l'entrée par les radeaux lipidiques :

- l'endocytose classique par les *caveolae* (SV40 et polyomavirus) (Pelkmans *et al.*, 2001 ; Richterova *et al.*, 2001)
- un mécanisme médié par les radeaux lipidiques, dépendant de la dynamine-2 mais indépendant des *caveolae* (echovirus 1 et rotavirus) (Pietinen *et al.*, 2004 ; Sanchez-San Martin *et al.*, 2004)
- un mécanisme toujours dépendant des radeaux lipidiques mais indépendants des *caveolae* et de la dynamine-2 (SV40 et polyomavirus) (Gilbert *et al.*, 2003 ; Damm *et al.*, 2005).

La plupart des *caveolae* est présente en permanence au niveau de la membrane cellulaire. Une faible proportion suit un cycle de détachement puis de fusion avec la membrane cellulaire (Thomsen *et al.*, 2002 ; Pelkmans *et al.*, 2005). Lorsqu'une tyrosine est activée suite à l'interaction d'un virus avec son récepteur, les *caveolae* deviennent au contraire très actifs (Cao *et al.*, 1998 ; Thomsen *et al.*, 2002 ; Parton et Richards, 2003 ; Pelkmans et Zerial, 2005 ; Tagawa *et al.*, 2005). Emportant une particule virale, ils se détachent et se meuvent rapidement dans le cytoplasme où ils fusionnent avec les cavéosomes. Les cavéosomes sont des organelles à pH neutre contenant de la cavéoline, bourgeonnant à partir des membranes cellulaires et distincts des endosomes et des autres organelles impliqués dans les voies d'entrée et de sécrétion (Pelkmans *et al.*, 2001). Des structures similaires existent pourtant dans les cellules dépourvues de cavéoline. Enfin, une faible fraction de *caveolae* vient fusionner avec les endosomes précoces par une voie dépendante de Rab-5 (Pelkmans *et al.*, 2004).

Données bibliographiques

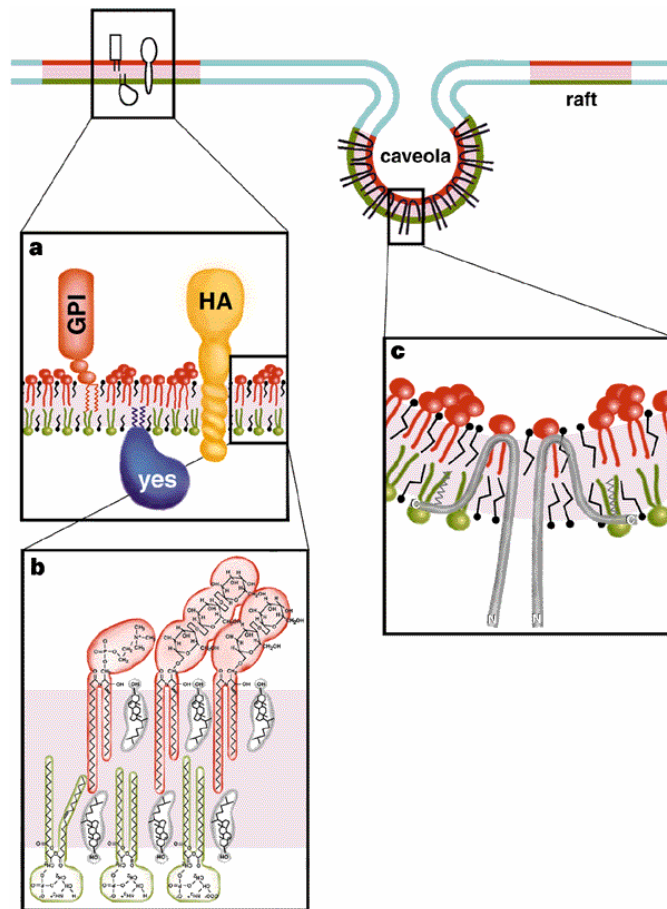


Figure 13. Modèle d'organisation des radeaux lipidiques et des *caveolae* dans la membrane cytoplasmique. Les radeaux lipidiques (en rouge) sont distincts des autres régions du feuillet externe de la bi-couche lipidique (en bleu) où prédominent les phospholipides insaturés tels que la phosphatidylcholine. (a) Les radeaux contiennent des protéines soit ancrées au feuillet externe de la membrane cytoplasmique par le glycosylphosphatidylinositol, soit attachées au feuillet interne par leurs chaînes acyl (kinases de la famille src YES), soit associées grâce à leur domaine transmembranaire comme l'hémagglutinine du virus grippal (HA). (b) La bi-couche lipidique est asymétrique avec une haute teneur du feuillet externe en sphingomyéline (en rouge) et en glycosphingolipides (en rouge) alors que les glycérolipides (phosphatidylsérine et phosphatidyléthanolamine, en vert) se retrouvent dans le feuillet interne. Le cholestérol (en gris) est présent dans les deux feuillets et occupe l'espace situé sous les têtes des sphingolipides. (c) Les *caveolae* se forment suite à l'oligomérisation de molécules de cavéoline constituant une structure en épingle à cheveux dans la membrane (en gris). Les interactions avec les radeaux lipidiques se font par liaison au cholestérol (en rouge) et acylation de résidus cystéine de l'extrémité C-terminale (en vert). D'après Simons et Ikonen, 1997.

Les cavéosomes représentent le site d'entrée d'échovirus 1 mais le mode d'entrée au niveau de cette organelle reste mystérieux (Upla *et al.*, 2004). SV40 et les polyomavirus poursuivent quant à eux leur route jusqu'au réticulum endoplasmique en ayant recours à une seconde catégorie de vésicules dépourvues cette fois de cavéoline (Pelkmans *et al.*, 2001). Dans le réticulum, la pénétration dans le cytosol se produit suite à l'intervention d'une disulfide isomérase et de ERp57 (2 thiol oxydases de la lumière du réticulum) et de Derlin-1, une protéine de la membrane du réticulum associée aux processus de dégradation (Magnuson *et al.*, 2005).

Données bibliographiques

Il est maintenant admis qu'un grand nombre de picornavirus pénètre dans la cellule par endocytose après interaction entre le virus et son récepteur. Le virus de la fièvre aphteuse et les rhinovirus entrent dans la cellule par un mécanisme d'endocytose déclenché par l'interaction avec un récepteur et voient le processus de décapsidation accéléré par l'acidification croissante de l'endosome au fur et à mesure de sa progression dans la cellule. L'infection de la cellule par ces virus est en effet inhibée par les bases faibles et les agents complexants qui bloquent l'acidification des endosomes (Carrillo *et al.*, 1984). Suite à la description de ce mécanisme d'entrée, le virus de la fièvre aphteuse recouvert d'anticorps est capable de se lier et d'infecter les cellules exprimant des récepteurs pour le fragment Fc (Mason *et al.*, 1993). Le récepteur cellulaire du virus de la fièvre aphteuse joue le rôle d'un crochet : il n'induit pas à lui seul les mécanismes de décapsidation de la particule virale mais accroche le virus à la cellule et l'amène vers sa voie d'entrée. Le mécanisme par lequel un pH acide entraîne la décapsidation du virus de la fièvre aphteuse a été éclairci par des études structurales. A un pH d'environ 6.5, la capsid virale se dissocie en pentamères relarguant l'ARN viral (Van Vlijmen *et al.*, 1998). Une étude au niveau atomique révèle une forte densité en histidine au niveau de la jonction entre les pentamères (Acharya *et al.*, 1989). Ces résidus confèrent à la capsid une grande stabilité à pH neutre. Or le pKa de l'histidine est de 6.8, proche donc du pH de décapsidation. L'accroissement du nombre de charges positives à la surface des chaînes de l'histidine provoquerait une répulsion électrostatique aboutissant à la décapsidation (Curry *et al.*, 1995). Pour valider cette hypothèse, une histidine en position 143 de la protéine VP3 a été changée en arginine par mutagenèse. La capsid obtenue s'est révélée plus stable à pH acide que les capsides non modifiées prouvant le rôle des résidus histidine dans le processus de décapsidation catalysé par le pH acide (Ellard *et al.*, 1999).

Le poliovirus est capable de libérer son génome dans la cellule soit directement à travers la membrane cytoplasmique soit à partir d'endosomes. En effet, des molécules telles que la bafilomycine A1, connues pour bloquer l'acidification des endosomes en inhibant les pompes amenant les protons dans la vésicule, n'empêchent pas l'infection par les poliovirus (Perez et Carrasco, 1993). Ces molécules inhibent pourtant l'infection par les virus influenza entrant dans le cytoplasme à partir du compartiment acide constitué par les endosomes. De plus, l'arrêt de la voie d'endocytose dépendante de la clathrine et des *caveolae* par une forme dominante négative de la dynamine 2 n'a pas d'effet sur la réplication des poliovirus alors qu'elle bloque l'entrée du rhinovirus 16 (DeTuello et Kirchausen, 1998).

Données bibliographiques

3.1.2.3. Libération de la capsidie dans le cytoplasme : formation de pores dans les membranes cellulaires

Internalisés dans une vésicule d'endocytose, les virus doivent ensuite transférer leur capsidie et leur génome à travers la partie hydrophobe d'une membrane cellulaire sans l'aide d'un processus de fusion de membrane à membrane caractéristique des virus enveloppés.

Les mécanismes impliqués dans la pénétration des membranes par les virus nus sont encore peu connus. Il semble pourtant qu'ils utilisent trois grandes stratégies distinctes :

- La lyse. La particule virale induit la destruction de la membrane cytoplasmique ou de l'organite avec relargage des virus dans le cytoplasme.
- La perforation de la membrane. La capsidie entière passe la membrane cellulaire sans destruction importante de la membrane.
- La ponction de la membrane. La particule virale génère un pore dans la membrane à travers lequel le génome est relargué dans le cytosol. La capsidie virale ne rentre pas dans le cytoplasme et la perte de matériel cellulaire est indétectable ou limitée à des molécules de faible poids moléculaire.

Si les adénovirus utilisent un mécanisme lytique et les rotavirus la perforation des membranes, les picornavirus se sont spécialisés dans la formation de pores dans les membranes cellulaires (figure 9) (Seth *et al.*, 1984).

L'interaction du poliovirus et de son récepteur entraîne des changements majeurs dans la structure du virus aboutissant à la formation de particules altérées appelées particules A contenant l'ARN viral mais ayant perdu la protéine interne de capsidie VP4. En outre, l'extrémité N-terminale de la protéine VP1 normalement masquée est ici exposée à la surface du virus (Fricks et Hogle, 1990). Cette séquence de la protéine VP1 est hydrophobe et augmente l'affinité de la particule A pour les membranes cellulaires par comparaison à celle de la particule virale intacte.

Dans la première hypothèse relative à l'entrée du poliovirus dans la cellule, l'interaction virus/récepteur à la surface cellulaire aboutit à ces changements de conformation. L'extrémité lipophile N-terminale de la protéine VP1 vient ensuite s'insérer dans la membrane cellulaire entraînant la formation d'un pore à travers lequel l'ARN est injecté dans le cytoplasme. Le fait que les particules A ajoutées à une bi-couche lipidique induisent la formation d'un canal ionique valide cette hypothèse (Tosteson et Chow, 1997). Les modèles de particules A obtenus en cryomicroscopie électronique ont apporté des informations importantes sur la décapsidation du poliovirus et la libération du génome viral (Belnap *et al.*, 2000b). Par rapport à la capsidie du virus intact, la capsidie de la particule A a grossi de 9 Å dans un mouvement qui peut être comparé au mouvement des plaques tectoniques.

Données bibliographiques

Ces mouvements provoquent un décalage entre les sous-unités de la capsid et ce décalage, à l'endroit où les sous-unités constituées par les protéines VP1, VP2 et VP3 se rejoignent, entraîne l'émergence de la protéine VP4 et de l'extrémité N-terminale de la protéine VP1. Dans ce modèle, la protéine VP4 et l'extrémité N-terminale de la protéine VP1 sont exposées à l'extrémité d'une structure en hélice au niveau de l'axe de symétrie 5. A cet endroit, les 5 hélices amphiphiles théoriques de l'extrémité N-terminales de la protéine VP1 sont en position pour s'insérer dans la membrane cytoplasmique. Un pore est ainsi formé et la protéine VP3, qui ferme l'axe de symétrie 5, est clivée permettant à l'ARN viral de sortir de la particule (**Figure 14**).

Le fait que la protéine VP4 participe ou non à la formation du pore n'est pas clairement déterminé mais il est évident qu'elle est indispensable aux étapes précoces de l'entrée dans la cellule. Un virus comportant une mutation du 28^{ème} acide aminé de la protéine VP4 peut se fixer à la cellule, et être converti en particule A mais les étapes suivantes de l'entrée sont empêchées (Moscufo *et al.*, 1993). La substitution d'acide aminé à cette position réduit la conduction du canal ionique et la translocation de l'ARN viral (Danthi *et al.*, 2003). Ces découvertes suggèrent que VP4 joue un rôle plus important que soupçonné dans la perforation de la membrane. VP4 et VP2 sont produites au cours de la maturation des protéines virales à partir du précurseur VP0 qui n'est clivé qu'au moment de l'encapsidation de l'ARN. Le clivage de VP0 peut être perçu comme une façon d'amorcer le mécanisme de décapsidation en séparant VP4 de VP2.

Bien que la particule A ait des propriétés biochimiques et de structure compatibles avec un intermédiaire de décapsidation, son rôle exact dans l'entrée du virus est discuté depuis qu'il a été fait la preuve que les poliovirus sont infectieux à 25°C, température à laquelle la formation de particules A ne peut être détectée (Dove et Racaniello, 1997). Les particules A détectées à des températures plus élevées pourraient n'être que les formes finales stables d'intermédiaires de décapsidation instables et difficiles à détecter.

Données bibliographiques

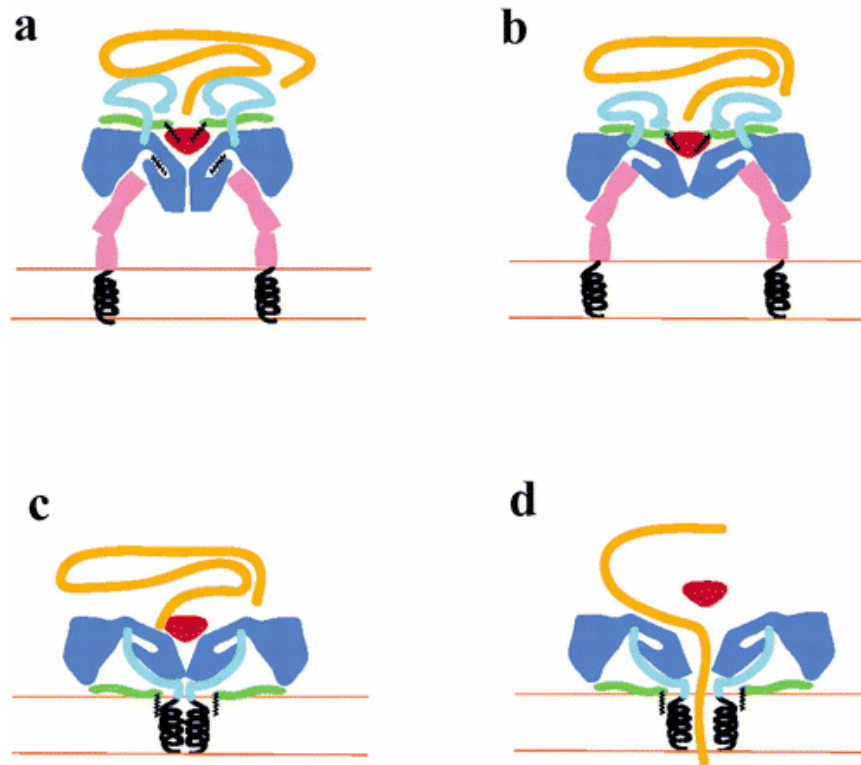


Figure 14. Mécanisme théorique de libération dans le cytoplasme du génome des poliovirus par formation de pores dans la membrane cellulaire. (a) Le virus s'attache à son récepteur. Les trois domaines exposés de Pvr sont indiqués en rose tandis que les hélices transmembranaires d'ancrage à la membrane cytoplasmique apparaissent en noir. La capside du virus est bleue avec la poche hydrophobe en noir, l'extrémité N-terminale de la protéine VP1 en bleu clair, la valve formée par la protéine VP3 en rouge, la protéine VP4 en vert et l'ARN viral en orange. (b) A 37°C, l'interaction virus/récepteur induit une modification de la structure de la capside virale déplaçant le composé lipidique de la poche hydrophobe. (c) Les changements de conformation de la particule virale se traduisent par l'insertion de l'extrémité N-terminale de la protéine VP1 et de l'acide myristique de la protéine VP4 dans la membrane cellulaire entraînant la formation d'un tunnel. (d) Un afflux brutal d'ions calcium aboutit à une dilatation de la capside déplaçant provisoirement le cylindre formé par la protéine VP3 et libérant l'ARN viral dans la cellule. D'après Hogle, 2002.

Dans la seconde hypothèse, les mécanismes de décapsidation du poliovirus se déroulent à l'intérieur d'un endosome. Il est important de noter que l'endocytose à elle seule n'est pas synonyme de décapsidation. Ainsi, un poliovirus opsonisé demeure incapable d'infecter une cellule couverte de récepteurs du fragment Fc malgré une endocytose très efficace (Mason *et al.*, 1993 ; Arita *et al.*, 1999). Ces découvertes suggèrent que les changements de conformation induits par la fixation au Pvr sont indispensables au processus de décapsidation. De même, la liaison d'ICAM-1 à la capside de certains rhinovirus (les sérotypes 3 et 14) suffit à provoquer la décapsidation et la libération du génome (Hoover-Litty et Greve, 1993).

Données bibliographiques

L'étude du complexe rhinovirus 3 / ICAM-1 induit une augmentation de volume de la particule virale de 4% (Xing *et al.*, 2003). L'expansion de la particule virale est due aux mouvements des pentamères constituant la capsid le long de l'axe de symétrie 5 et entraînant la perte de contact entre les différents protomères. Pour le rhinovirus 14, l'accroissement en taille de la particule virale s'accompagne d'un mouvement de la protéine VP1 ouvrant un orifice de 10 Å de diamètre au niveau de l'axe de symétrie 5 permettant la sortie de l'ARN génomique (Hewaat et Blaas, 2004). La liaison à ICAM-1 semble maintenir la capsid virale dans cet état d'extension nécessaire à la libération du génome viral.

3.2. Synthèses virales

3.2.1. Traduction du génome viral

Une fois libéré dans le cytoplasme, l'ARN entéroviral, de polarité positive, est directement traduit en protéines virales, après clivage de VPg par une protéase cellulaire (figure 10). L'ARN viral n'étant pas « coiffé » (absence de la structure m⁷GpppN à l'extrémité 5' de l'ARN viral), l'initiation de la traduction, dite « initiation interne » est médiée par la fixation de la sous unité 40S du ribosome à la structure IRES du virus (Pelletier et Sonenberg, 1988). Afin de stabiliser l'interaction entre l'IRES et la machinerie traductionnelle (en particulier le facteur d'initiation eucaryotique eIF4-G), certaines molécules cellulaires telles que l'auto-antigène La (p52), la polypyrimidine-tract-binding protein (PTB), ou encore eIF-2 α et la poly(rC)-binding protein 2 (PCBP2) agissent comme protéines chaperonnes (Rueckert, 1996 ; Belsham et Sonenberg, 2000).

3.2.2. Réplication du génome viral

Lorsque suffisamment de protéines virales sont produites, une bascule de la traduction vers la réplication du génome viral se produirait, ces deux phénomènes ne pouvant *a priori* pas se produire simultanément. L'initiation de la réplication serait, elle aussi, sous le contrôle de la structure en feuille de trèfle présente en l'extrémité 5' du génome entéroviral. La boucle IV de la feuille de trèfle interagirait spécifiquement avec la PCBP cellulaire, sous régulation de la protéine virale 3CD (Gamarnik et Andino, 1998 ; Gamarnik et Andino, 2000).

Données bibliographiques

De nombreux travaux ont permis le développement d'un modèle représentatif des mécanismes de réplication des entérovirus (Xiang *et al.*, 1997). La synthèse du brin négatif (complémentaire de l'ARN génomique, positif) serait contrôlée par la région 3'NC, en collaboration avec les protéines virales 3Dpol et 3AB. Par ailleurs, il est maintenant admis que l'uridylation de VPg est la première étape de cette réplication, VpgU(pU) fournissant alors une amorce à la polymérase virale 3Dpol (Paul *et al.*, 1998). La synthèse du brin positif est initiée à partir de l'extrémité 3' du brin négatif neosynthétisé (Agol *et al.*, 1999). L'extrémité gauche de la forme répliquative servirait d'origine de réplication dont la structure en hétéroduplex serait reconnue par les protéines du complexe de réplication et stabilisée au niveau de la structure en feuille de trèfle de l'ARN positif par des protéines virales (2A ?, 3AB ?, 3CD ?) et cellulaires non identifiées. Un complexe ribonucléoprotéique se formerait alors à l'extrémité 5' du brin positif (Andino *et al.*, 1993). La libération de l'extrémité 3' du brin négatif surviendrait ensuite, suivie de l'uridylation de VPg par 3Dpol. Enfin, la VPg nouvellement uridylée (VPg pU(pU)) et la 3Dpol seraient transférées vers l'extrémité 3' du brin négatif pour initier la synthèse du brin positif (Andino *et al.*, 1993).

L'enzyme responsable de la réplication est donc 3Dpol, une ARN polymérase ARN dépendante. Cet enzyme commet de nombreuses erreurs à chaque cycle, une tous les 10^3 à 10^4 nucléotides, qu'elle n'est ensuite pas capable de corriger. Ce taux élevé de mauvais appariements au cours de l'étape de réplication a pour conséquence l'accumulation de mutations dans le génome des virus nouvellement synthétisés. Ainsi, chaque virus va différer des autres par au moins une mutation (Crotty *et al.*, 2000). Une souche d'entérovirus n'est donc pas constituée d'un génotype unique mais plutôt d'un mélange de quasi-espèces virales.

3.3. Etapes tardives : Morphogénèse et libération des virions

Bien qu'encore sujette à interrogations, la morphogénèse entérovirale a été appréhendée grâce à l'étude de la capsidie du poliovirus (Basavappa *et al.*, 1994). Tout débute par la libération de P1 par la protéase 2A, puis par la libération de VP0, VP1 et VP3 par la protéase 3CD (Hellen et Wimmer, 1995). Ces protéines s'associent ensuite pour former un protomère, puis un pentamère (5 protomères), puis la procapsidie. L'ARN viral neosynthétisé s'associe ensuite avec cette capsidie immature pour former le provirion. Une étape de maturation au cours de laquelle VP0 est clivé en VP4 et VP2 intervient ensuite, ce qui, couplé à l'encapsidation de l'ARN viral, a pour effet de stabiliser la capsidie (Basavappa *et al.*, 1994).

Données bibliographiques

L'encapsidation de l'ARN génomique est un processus exclusif, de telle sorte que ni l'ARN négatif, ni les ARNs cellulaires ne peuvent être encapsidés (Barclay *et al.*, 1998). L'assemblage effectué, les particules virales s'accumulent dans le cytoplasme, sous forme de vésicules cristallines, puis sont ensuite libérées par éclatement des vacuoles à la surface des cellules. La libération des nouveaux virions est concomitante de la lyse cellulaire, au cours de laquelle la protéine virale 2B serait impliquée (Van Kuppeveld *et al.*, 1997).

Les entérovirus sont le plus souvent responsables d'infections aiguës au cours desquelles l'aspect cellulaire est profondément modifié, traduisant l'effet cytopathogène du virus (condensation du noyau, accumulation de vésicules membranaires, ainsi que des réarrangements du cytosquelette) (Schlegel et Kirkegaard, 1995). Ces modifications, donnant à la cellule un aspect arrondi, traduisent les modifications métaboliques du fait du détournement de la machinerie cellulaire au profit du cycle viral (Rueckert, 1996). D'autres mécanismes tels que le « shut-off » de la synthèse des protéines cellulaires induit par la protéase 2A, participent aux perturbations subies par la cellule infectée (Hellen *et al.*, 1992).

4. Les infections à Entérovirus

4.1. Epidémiologie

Les entérovirus sont des pathogènes largement ubiquitaires, présents dans toutes les régions du monde. L'Homme est le seul hôte et réservoir naturel des entérovirus impliqués en pathologie. Leur mode de transmission principal est fécal-oral (*via* des objets, aliments 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 de certains sérotypes ayant une prédilection pour le système respiratoire. La transmission par les gouttelettes rhinopharyngées fut soupçonnée d'être à l'origine de la dernière épidémie de poliomyélite due au sérotype 3 en Finlande en 1984 (Hovi *et al.*, 1986). Les infections à entérovirus peuvent être sporadiques mais évoluent volontiers sur un mode épidémique, voire pandémique, durant les périodes estivo-automnales (Morens et Pallansch, 1995). La transmission nosocomiale a également été rapportée, notamment pour les coxsackievirus B et echovirus 11, particulièrement redoutables chez les nouveau-nés (Mertens *et al.*, 1982).

La transmission des entérovirus est d'autant facilitée que ces virus sont extrêmement résistants aux conditions extérieures telles que les pH acides, les températures extrêmes, l'humidité ou la teneur en matières organiques. Ces propriétés assurent aux entérovirus une très bonne dissémination dans les sols, les eaux de surface ou encore les eaux usées de stations d'épuration (Morens et Pallansch, 1995). Notons que les eaux de mers n'altèrent pas la dissémination des entérovirus qui se retrouvent fréquemment captés par les mollusques filtreurs tels que les huîtres (Shieh *et al.*, 1999).

En France, un réseau sentinelle a été créé en janvier 2000 afin de surveiller et de documenter la circulation des entérovirus chez l'Homme et dans l'environnement dans le contexte mondial d'éradication des poliovirus. Au cours des années 2000 à 2004, le Réseau de Surveillance des Entérovirus (RSE) a attentivement étudié l'épidémiologie des infections à entérovirus en France (Antona *et al.*, 2007 : article en annexe 2). En résumé, aucun poliovirus sauvage n'a été identifié durant ces 5 années de surveillance tandis que deux souches vaccinales importées ont été détectées chez l'Homme. Cinq poliovirus apparentés aux souches vaccinales ont été isolés à partir de boues de stations d'épuration. Concernant les entérovirus non polio, les données ont été obtenues de l'analyse de 192 598 prélèvements incluant 39 276 liquides céphalorachidiens (14,7% de positifs pour la présence d'un entérovirus), 45 889 selles

Données bibliographiques

(4,3% de positifs), 70 330 prélèvements respiratoires (2,2% de positifs) et 14 243 sérums (1,4% de positifs). Les 10 sérotypes d'entérovirus non polio les plus fréquemment identifiés ont été par ordre décroissant : echovirus 30, echovirus 13, echovirus 6, coxsackievirus B5, echovirus 11, coxsackievirus B4, echovirus 9, echovirus 7, coxsackievirus B1 et coxsackievirus B2.

4.2. Physiopathologie de l'infection

Dans la plupart des cas (exception faite des conjonctivites associées à des entéroviroses), les entérovirus infectent l'organisme par la voie orale. Après multiplication dans les muqueuses pharyngiennes et intestinales (sites primaires de réplication), ils 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, muscle, cœur, peau...) (Crainic *et al.*, 1995 ; Melnick, 1996) (**Figure 15**). La période d'incubation couvrant cette évolution dure entre 7 et 14 jours, parfois jusqu'à 35 jours.

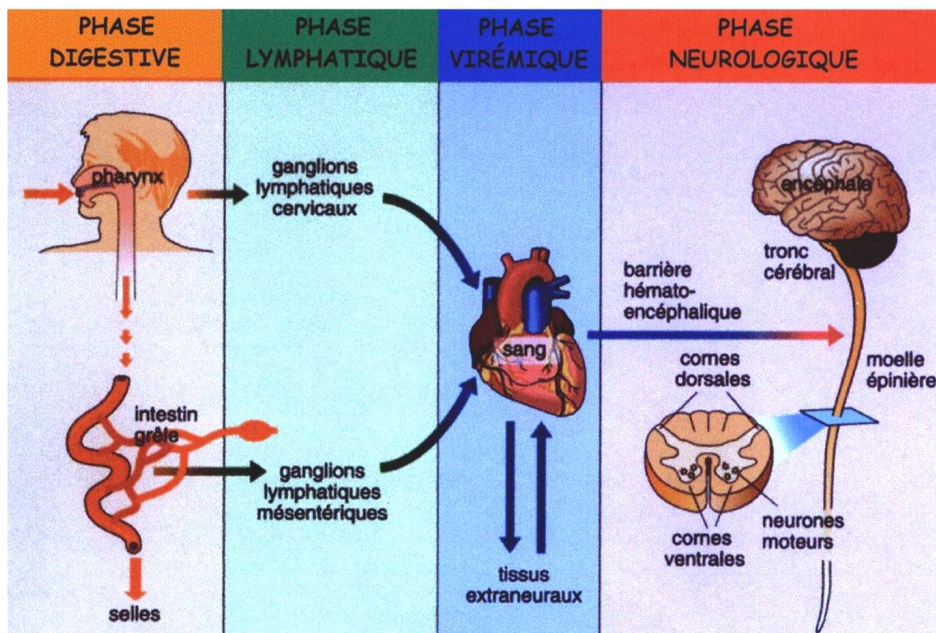


Figure 15. Physiopathologie de l'infection par les entérovirus à travers la représentation schématique de la pathogénèse de la poliomyélite aiguë. L'infection se déroule en quatre phases principales : digestive, lymphatique, virémique et neurologique. La voie sanguine suivie du franchissement de la barrière hémato-encéphalique reste l'hypothèse privilégiée pour expliquer la migration du poliovirus vers le système nerveux central. D'après Crainic *et al.*, 1995.

Données bibliographiques

4.3. Les entérovirus en pathologie humaine

Les entérovirus sont les virus les plus communément rencontrés chez l'Homme. On estime à 50 millions les infections à entérovirus chaque année aux Etats-Unis et potentiellement à 1 milliard à travers le monde (Morens et Pallansch, 1995 ; Palacios et Oberste, 2005). La plupart de ces infections sont asymptomatiques. Néanmoins, les entérovirus peuvent être responsables d'un large éventail de pathologies incluant : des infections respiratoires, des éruptions cutanées, des méningites aseptiques, des encéphalites, des paralysies flasques, la pleurodynie et des atteintes multiviscérales du nouveau-né. A côté de ces atteintes aiguës, ils ont été également impliqués dans certaines pathologies chroniques sévères telles que les myocardites et les cardiomyopathies dilatées, le diabète de type 1 et les atteintes neuromusculaires.

4.3.1. Les infections neurologiques

- La *Poliomyélite Paralytique Aiguë* (PPA): Elle est la plus ancienne des entéroviroses humaines connues. En 1988, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en collaboration avec le Rotary Club, le CDC américain et l'UNICEF a initié un programme global d'éradication des poliovirus. En 17 ans, le nombre de cas a été réduit de 99%, passant de 350 000 en 1988 répartis dans 125 pays à 1951 cas en 2005. En 2006, seuls 4 pays étaient encore considérés comme zone d'endémie. L'Europe est devenue en 2002 la troisième région du globe, après l'Amérique et l'Océanie, déclarée comme étant débarrassée des poliovirus (**Figure 16**).

Classiquement associée aux trois sérotypes de poliovirus, seulement 1 à 2 % des personnes infectées par voie digestive développent cette forme nerveuse au cours de laquelle le poliovirus gagne le neurone moteur périphérique. Une paralysie musculaire flasque aiguë des membres concernés, ainsi qu'une atrophie musculaire survient dès la mort du neurone moteur. Une paralysie des muscles respiratoires entraîne, dans bien des cas, la mort du patient (Crainic *et al.*, 1995).

- La *méningite lymphocytaire à liquide clair*: Cette infection à entérovirus est, en terme de fréquence relative, la plus importante des entéroviroses (Gaudin, 1991). Les entérovirus constituent la principale étiologie des méningites aseptiques. Elle touche généralement les enfants et adolescents, et se traduit par un syndrome méningé, parfois accompagné de fièvre, de céphalées ou de raideur de la nuque.

Données bibliographiques

D'évolution rapidement favorable, cette infection se présente volontiers sous la forme d'épidémies estivales (Rotbard, 1995).

- Les *encéphalites*: Elles correspondent à des cas sporadiques. Leur nombre serait vraisemblablement sous-évalué. Ces infections seraient bien souvent associées à des méningo-encéphalites. Contrairement aux méningites, elles peuvent être fatales ou laisser de graves séquelles neurologiques (Gaudin, 1991).

D'autres infections du système nerveux central telles que des *ataxies cérébelleuses*, des *syndromes de Guillain-Barré* et des *myélites transverses* ont également été associées à des infections à entérovirus (Chopra *et al.*, 1986).

Données bibliographiques

Wild Poliovirus*, 13 Jun 2006 to 12 Jun 2007

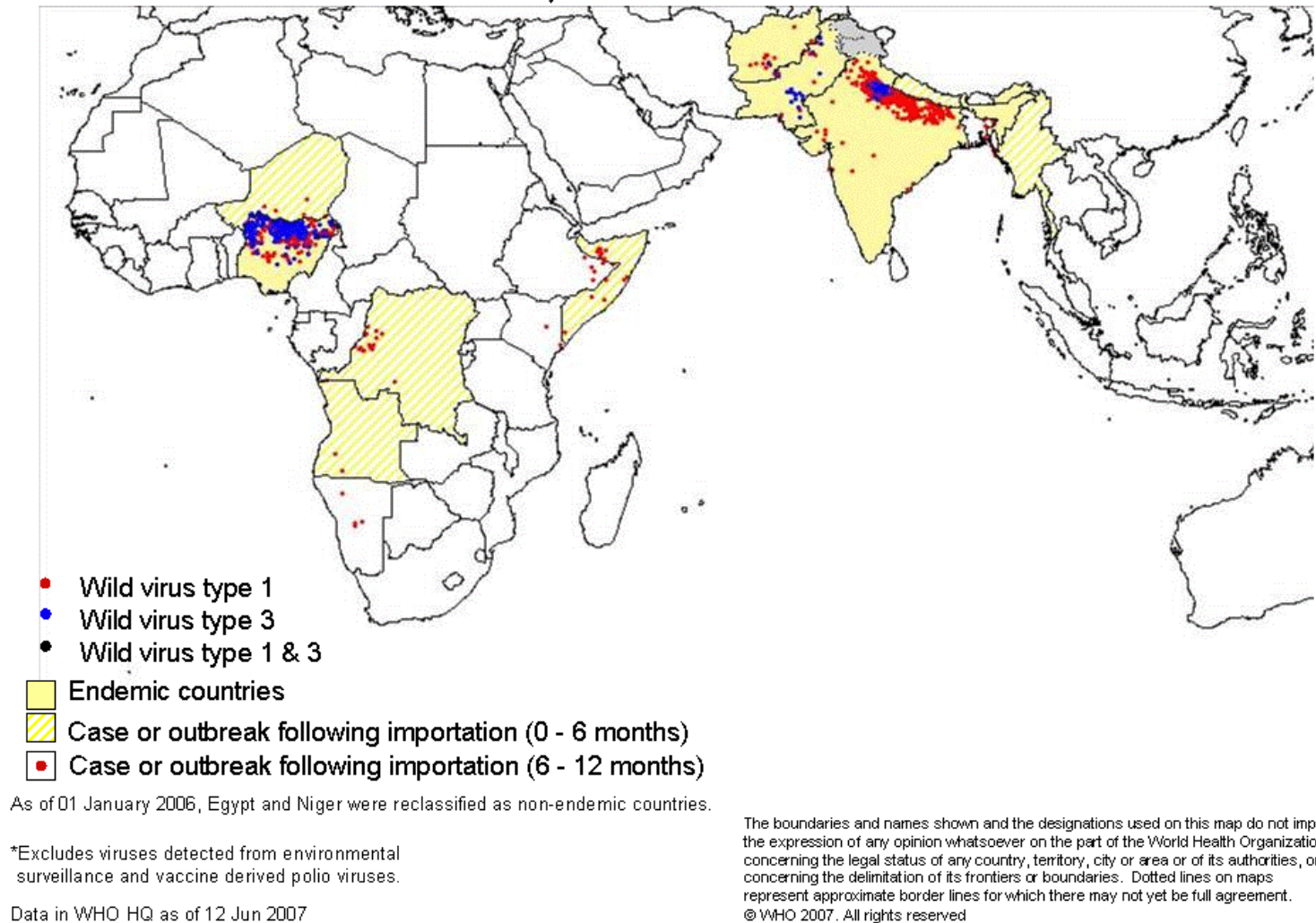


Figure 16. Etat des lieux des cas de poliomyélite antérieure aiguë déclarés dans le monde entre juin 2006 et juin 2007.

Données obtenues sur le site internet de l’OMS (<http://www.polioeradication.org/casecount.asp>).

Données bibliographiques

4.3.2. Autres infections

- Les *infections généralisées du nouveau-né*: Ces infections sont souvent sévères, voire fatales du fait de complications méningo-encéphalitiques, myocardiques, ou hépatiques (el-Sageyer *et al.*, 1998).
- La *maladie de Bornholm*: Encore appelée pleurodynie, myalgie épidémique, cette infection généralement associée aux coxsackievirus A et B, voire aux echovirus, entraîne des douleurs abdominales et/ou thoraciques intenses, de la fièvre, et sont souvent accompagnées de céphalées (Gaudin, 1991).
- Des *atteintes respiratoires hautes* (rhinite, laryngite, pharyngite) *et basses* (bronchite, pneumonie, bronchiolite) ont été décrites impliquant divers sérotypes de coxsackie et d'echovirus (Mc Carthy *et al.*, 2000). Plusieurs études de cohorte effectuées chez des nourrissons ou des jeunes enfants hospitalisés pour bronchiolite, ont permis de détecter par RT-PCR la présence du génome des entérovirus dans 8 à 25 % des échantillons de sécrétions respiratoires plaçant les entérovirus au 3^{ème} rang des étiologies virales derrière le virus respiratoire syncytial et les rhinovirus (Andréoletti *et al.*, 2000 ; Jartti *et al.*, 2004 ; Jacques *et al.*, 2006).
- Les *infections cutané-muqueuses* à entérovirus sont dues au coxsackievirus A16 et à l'entérovirus 71, responsables respectivement du *syndrome « pied-main-bouche »* ou de l'*herpangine* (Gaudin, 1991).
- Les *atteintes cardiaques* sont le reflet du cardiotropisme des entérovirus, en particulier des coxsackievirus B. Ces derniers sont reconnus comme responsables des myocardites aiguës nécrosantes (Andréoletti et Wattré, 1999).
- Les *syndromes gastro-intestinaux* sont fréquemment rapportés lors d'infections à entérovirus (Melnick, 1996).

5. Les entérovirus : des pathogènes émergents

La plupart des virus émergents proviennent de l'animal et notamment des autres primates qui constituent un réservoir de nouveaux virus. Le facteur prédisposant à l'émergence d'un nouvel agent pathogène pour l'Homme est l'augmentation des contacts avec le réservoir animal que ce soit grâce à des rongeurs ou des insectes hématophages ou que ce soit à l'occasion de modifications des pratiques agricoles ou d'une extension des zones urbaines.

Bien que les entérovirus soient des virus tout à fait communs et non considérés habituellement comme des pathogènes émergents, de nombreux sérotypes circulent avec une incidence différente chaque année et la prévalence d'un sérotype donné peut être complètement modifiée d'une année sur l'autre. Différents sérotypes d'entérovirus ont ainsi été associés à l'émergence de maladies spécifiques ayant un impact majeur sur la santé publique.

- L'entérovirus 71 a été responsable d'épidémies de syndrome pied-main-bouche associées à des complications neurologiques. L'épidémie la plus tristement célèbre s'est produite à Taiwan en 1998 (Lin *et al.*, 2003).
- La conjonctivite aiguë hémorragique a été décrite pour la première fois au début des années 1970 avec l'émergence de l'entérovirus 70 et d'un variant antigénique du coxsackievirus A24 (CVA-24v) (Mirkovic *et al.*, 1974). L'article en annexe 3 décrit deux épidémies de CAH survenue en République Démocratique du Congo et au Maroc au cours des étés 2003 et 2004 (Lévêque *et al.*, 2003).
- L'éradication des poliovirus laisse une place vacante dans l'étiologie des paralysies flasques aiguës (PFA) que d'autres entérovirus (entérovirus 71, coxsackievirus A24, echovirus 11) ou de nouveaux entérovirus (entérovirus 93 et 94) se sont chargés bien vite de combler (Junttila *et al.*, 2007 : article en annexe 1).

6. Les infections à echovirus 6

Les infections dues à l'echovirus de type 6 se déclinent à la fois sous la forme de pathologies aiguës mais aussi d'infections persistantes ou chroniques.

6.1. Les infections aiguës

L'épidémiologie et le pouvoir pathogène d'echovirus 6 ne se distinguent pas des autres entérovirus. Les infections aiguës à echovirus 6 correspondent essentiellement à des épidémies de méningite aseptique telles que décrites en Australie en 1996 et en France en 2000 survenant sur un fond endémique (Ashwell *et al.*, 1996 ; Chomel *et al.*, 2003). Les travaux de surveillance de la circulation des entérovirus ont en effet montré qu'echovirus 6 faisait partie chaque année des sérotypes les plus fréquemment isolés même en l'absence d'épidémie notable (Dos Santos *et al.*, 2006 ; Richter *et al.*, 2006 ; Antona *et al.*, 2007 : article en annexe 1).

Echovirus 6 peut être responsable d'éruptions vésiculeuses de type pied-main-bouche ou présentant une topographie identique à un zona (Boell *et al.*, 1977 ; Meade *et al.*, 1979). Le virus a été également isolé des selles d'enfants au cours d'une épidémie de gastroentérites (Abe *et al.*, 2000).

Les infections à echovirus 6 sont en règle générale bénignes à l'exception des infections survenant chez le sujet immunodéprimé ou en période néonatale. L'infection peut alors s'étendre, devenir multiviscérale et souvent fatale. Des cas parfois combinés d'encéphalites, d'hépatites, de pancréatites, de glomérulonéphrites et de pneumonies néonatales fatales ont été rapportés (Boyd *et al.*, 1987 ; Blokziji *et al.*, 1989 ; Ventura *et al.*, 2001 ; Yen *et al.*, 2003).

6.2. L'infection persistante : la sclérose latérale amyotrophique

Echovirus 6 est également suspecté d'être impliqué dans le déclenchement d'une pathologie neurodégénérative, la Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA). La SLA est la plus fréquente des maladies du motoneurone de l'adulte (Bouche, 1986).

Données bibliographiques

Il existe plusieurs hypothèses physiopathologiques dont la mise en jeu de facteurs environnementaux, génétiques ou biochimiques. Ces facteurs sont à l'origine d'un processus pouvant aboutir à la mort des motoneurones. Dans ce processus, les phénomènes excitotoxiques dépendant du système glutamatergique ont un rôle favorisant (Shaw et Ince, 1997).

L'hypothèse virale de la SLA est née du fait du neurotropisme avéré des entérovirus et de la détection d'anticorps spécifiques ou de séquences génomiques de ces virus chez les patients atteints.

Compte tenu de la proximité physiopathologique existant entre la poliomyélite et la SLA, les entérovirus ont fait l'objet des études les plus anciennes et les plus abouties. Woodall *et al.* ont mis en évidence des séquences nucléotidiques apparentées à celles des virus coxsackie B dans 75 % des moelles épinières de patients SLA (Woodall *et al.*, 1994). Une persistance d'EV dans la moëlle épinière est suspectée bien qu'aucune corrélation n'ait pu être réalisée entre la présence de ces séquences, la topographie des signes cliniques et les anomalies neuropathologiques observées. Ce travail a été confirmé par Berger *et al.* qui ont détecté le génome viral d'un EV apparenté à echovirus 6 dans 88 % des moëllles de patients atteints de SLA (cf image 1) (Berger *et al.*, 2000). Récemment, Giraud *et al.* ont rapporté la présence de séquences d'echovirus 6 chez 60 % des moelles de patients SLA d'une série japonaise (Giraud *et al.*, 2001). Ceci renforce donc l'hypothèse d'une persistance des EV dans la moëlle épinière de patients atteints de SLA mais ne peut démontrer leur mécanisme d'action. La dernière étude en date infirme l'hypothèse entérovirale dans la SLA (Nix *et al.*, 2004).



Image 1 : Localisation du génome d'entérovirus par RT-PCR *in situ* chez les patients SLA.
D'après Berger *et al.*, 2000.

Données bibliographiques

In vivo, les infections persistantes correspondent à la détection par PCR de parties de séquences génomiques virales dans la moelle épinière à distance du début du tableau de SLA sans toutefois pouvoir démontrer la présence de particules virales entières et infectieuses dans les tissus. Toutefois, un modèle cellulaire *in vitro* a été développé au sein du laboratoire CNRS FRE 3011 de Virologie et Pathologie Humaine pour étudier les modifications moléculaires virales et cellulaires induites par l'infection virale persistante (Berger *et al.*, 2000 ; Giraud *et al.*, 2001). Il utilise des précurseurs d'astrocytes humains infectés par echovirus 6. Si durant l'infection aiguë du système nerveux central, le virus perturbe le métabolisme cellulaire et provoque la mort de la cellule, il peut initier *in vitro* une infection chronique sans modification de la morphologie cellulaire mais avec une nette réduction de la multiplication virale et de la production des antigènes viraux de l'ordre d'un facteur 100.

6.2.1. Modifications moléculaires virales

Un des mécanismes pouvant modifier la virulence est la présence de mutations à l'intérieur du génome viral et plus particulièrement au niveau de l'extrémité 5' et du gène codant pour la protéase 2A.

L'extrémité 5' du génome d'echovirus 6 est dite non codante car elle n'est pas traduite en protéines. Pourtant, l'étude de cette région a montré son rôle majeur dans le contrôle de la virulence. Elle est reconnue pour porter les déterminants génétiques de la neurovirulence des poliovirus et de la cardiovirulence du coxsackievirus B3. Cette région conservée au sein des entérovirus est constituée d'environ 750 nucléotides. Elle dispose d'une conformation secondaire complexe avec une structure en feuille de trèfle et un site interne d'entrée du ribosome (IRES) qui régulent respectivement la réplication et la traduction de l'ARN viral. La protéase virale 2A intervient dans la multiplication du virus par le clivage de la polyprotéine virale et participe à l'arrêt des synthèses protéiques cellulaires par protéolyse de facteurs de transcription tel qu'eIF4G. Cinq mutations cumulatives ont été identifiées. Trois mutations sont situées dans la région 5' non codante (deux dans la feuille de trèfle et une troisième en amont de l'IRES) et deux dans le gène codant pour la protéase 2A au voisinage du site enzymatique. Les mutations observées dans la feuille de trèfle sont susceptibles d'interférer avec la réplication et la traduction de l'ARN viral réduisant ainsi la virulence tandis que les mutations présentes dans le gène de la protéase 2A se traduisent par une diminution de l'activité protéolytique et de ce fait par la capacité du virus à se répliquer mais sans entraîner

Données bibliographiques

d'inhibition de la synthèse protéique cellulaire. Ces modifications confèrent au virus un phénotype persistant.

6.2.2. Modifications cellulaires

Le modèle de l'infection chronique à EV de cellules gliales humaines a permis de reproduire les altérations du transport du glutamate observées chez les patients atteints de SLA. Le glutamate est le neurotransmetteur le plus abondant du système nerveux central humain. Il est rapidement retiré de la fente synaptique par les transporteurs astrocytaires dont EAAT1 et EAAT2 (Excitatory Amino Acid Transporters de type 1 et de type 2). Cette activité permet de mettre fin au signal excitateur mais elle est également un moyen de défense contre la neurotoxicité induite par le glutamate.

En effet, le motoneurone soumis à une excitation permanente du glutamate à forte concentration est constamment sollicité, affaibli et finalement détruit. La diminution du transport tissulaire et du catabolisme du glutamate associée à sa toxicité pour les motoneurons est un mécanisme relié à la SLA. Dans 60 à 70% des cas de SLA, le défaut de transport du glutamate a été attribué à une diminution de l'expression de la protéine EAAT2 de 70 à 90% liée à un mécanisme d'épissage aberrant de l'ARN pré-messager (Legay *et al.*, 2003 ; Lin *et al.*, 1998). Ce phénomène correspond à des sauts d'exons (« exon-skipping phenomenon ») ou à des rétentions d'introns (« intron-retention phenomenon ») lors de l'épissage de l'ARN pré-messager d'EAAT2. Les isoformes de l'ARN d'EAAT2 ainsi produites sont traduites mais les protéines obtenues ne sont pas fonctionnelles. Cependant, ce phénomène ne semble pas spécifique de la SLA puisque également décrit chez certains patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Flowers *et al.*, 2001).

Enfin, la relation entre le stress oxydatif et la mort de cellules neuronales est connue depuis plusieurs années. L'accumulation de radicaux libres dans le motoneurone est une des hypothèses avancées pour expliquer leur dégénérescence. Or, si l'activité de la superoxyde dismutase mitochondriale dépendante du Cu/Zn, qui participe à la protection de la cellule contre le stress oxydatif, est significativement augmentée en cas d'infection virale aiguë par un echovirus de cellules gliales humaines, elle est fortement diminuée dans le cas d'une infection persistante. Les cellules chroniquement infectées se retrouvent ainsi plus vulnérables au stress oxydatif pouvant à terme déclencher la mort cellulaire (Berger *et al.*, 2004).

Données bibliographiques

Malgré le développement d'un modèle *in vitro* probant et l'apport de différentes données épidémiologiques, il n'existe pas, à l'heure actuelle, de preuves définitives de l'implication des entérovirus et plus particulièrement d'échovirus 6 dans la SLA. La question reste ouverte à ce jour.

7. Conclusion et objectifs

La physiopathogénie des infections dues aux entérovirus *in vivo* et le cycle répliatif *in vitro* ont été étudiés de façon approfondie à partir du modèle du poliovirus. Malgré les progrès récents obtenus grâce aux dernières technologies (imagerie en microscopie confocale, siRNA et mutants dominants négatifs), les premières étapes du cycle infectieux correspondant à l'interaction du virus et de son récepteur et à l'entrée du virus dans la cellule restent obscures et parfois confuses. Le modèle historique est celui du poliovirus qui, après liaison à son récepteur, entraîne un changement irréversible de conformation de la capsid virale permettant la libération du génome dans le cytoplasme (Rueckert, 1996). L'absence de source d'énergie dans la particule virale permettant d'expliquer le phénomène de décapsidation au niveau de la membrane cellulaire et la survie aléatoire d'un ARN étranger nu dans le cytoplasme ont rendu cette hypothèse caduque.

Il est maintenant admis que les entérovirus pénètrent dans la cellule par endocytose après interaction entre le virus et son récepteur. Ils empruntent les voies dépendantes de la clathrine et de la cavéoline. Parmi les picornavirus, le paréchovirus 1, le rhinovirus 2 et le coxsackievirus B3 pénètrent dans la cellule par une voie dépendante de la clathrine tandis que les échovirus 1 et 11, et les coxsackievirus A9 et B4 entrent grâce aux *caveolae* (Bayer *et al.*, 2001 ; Joki-Korpela *et al.*, 2001 ; Marjomäki *et al.*, 2002 ; Stuart *et al.*, 2002 ; Triantafilou *et al.*, 2003 ; Triantafilou *et al.*, 2004 ; chung *et al.*, 2005).

→ **Or les étapes précoces de l'infection par échovirus 6 n'ont jusqu'à présent jamais été étudiées.**

Une population d'entérovirus ne consiste pas en un seul génotype mais plutôt en un ensemble de séquences proches appelées quasi-espèces (Gromeier et wimmer, 1998 ; Vignuzzi *et al.*, 2006). La diversité génétique obtenue semble avoir une implication directe sur la virulence de la souche d'entérovirus. Ainsi, un poliovirus disposant d'une ARN polymérase ARN dépendante de haute fidélité se réplique à un niveau équivalent de celui d'un poliovirus sauvage mais présente une diversité génétique moindre et il est de ce fait incapable de s'adapter. Chez l'animal, cela se traduira par une atténuation de la neurovirulence et de la pathogénicité (Pfeiffer et Kirkegaard, 2006).

Si un taux de mutations trop élevé est synonyme d'un grand nombre de virus défectifs et d'une extinction de la souche, les nombreuses erreurs de l'ARN polymérase virale contribuent à créer un assemblage de quasi-espèces susceptibles de s'adapter aux multiples

Données bibliographiques

environnements et pressions de sélection rencontrés au cours de l'infection. Les défenses immunitaires de l'hôte, les différents tissus et les différentes lignées cellulaires rencontrés au cours de l'infection, la barrière hémato-encéphalique constituent autant d'obstacles que seule la flexibilité génétique du virus lui permet de franchir. Les quasi-espèces virales ne sont pas un assemblage de mutants successifs mais interagissent les uns avec les autres afin de permettre à la population d'atteindre le système nerveux central. Ainsi, certains mutants à l'intérieur de la population facilitent, par exemple, la colonisation de la gorge tandis qu'un autre permet l'échappement au système immunitaire ou traverse aisément la barrière hémato-encéphalique. Au niveau cellulaire, la membrane cytoplasmique peut être assimilée à une barrière que la diversité de la souche en quasi-espèces pourrait permettre de traverser plus facilement en exploitant au mieux les différentes voies d'endocytose offertes.

→ **Quel est le rôle des quasi-espèces virales dans les étapes précoces du cycle infectieux d'echovirus 6 ?**

Ce projet développé au sein du laboratoire de virologie et pathologie humaine en étroite collaboration avec le centre national de référence des entérovirus poursuit l'étude de la virulence des entérovirus à travers la détermination de leurs voies d'entrée cellulaire. Le choix du sérotype retenu est en parfaite adéquation avec les thématiques de recherche conduites jusqu'alors au sein du laboratoire puisqu'il s'agit d'echovirus 6. Le rôle d'echovirus 6 en pathologie humaine a en effet été largement démontré que ce soit à travers des épidémies de méningite aseptique ou son implication plus controversée dans le développement d'une pathologie neurodégénérative, la SLA (Berger *et al.*, 2000 ; Chomel *et al.*, 2003). Or il n'existe à ce jour aucun outil thérapeutique permettant de prévenir ou de traiter les infections à echovirus 6. La caractérisation des mécanismes d'attachement et des voies d'entrée d'echovirus 6 devrait permettre de définir de nouvelles cibles thérapeutiques potentiellement applicables aux infections par d'autres sérotypes d'entérovirus.

TRAVAUX ORIGINAUX

Les voies d'entrée cellulaire d'echovirus 6

Une souche clinique d'echovirus 6 est constituée de quasi-espèces capables d'infecter une cellule par de multiples voies d'entrée.

Deux populations d'echovirus 6 ont été sélectionnées à partir d'une souche isolée d'un patient souffrant d'une méningite aseptique par passages successifs sur deux lignées cellulaires différentes, des cellules humaines d'hépatocarcinome (cellules PLC) et des cellules de carcinome utérin (cellules HeLa). La souche cultivée sur cellules PLC (HAE6) a accru sa capacité à agglutiner les hématies humaines de groupe O+ tandis que la souche sélectionnée sur cellules HeLa (NHAE6) a définitivement perdu cette propriété sans perte du pouvoir infectieux. Des expériences d'adhésion cellulaire ont permis de montrer une fixation 4 fois plus importante de HAE6 par rapport à NHAE6 à la surface de cellules d'ovaire de hamster exprimant DAF confirmant le rôle de DAF dans les mécanismes d'hémagglutination. En outre, l'absence de compétition entre les 2 virus lors de l'infection de cellules A549 de carcinome pulmonaire suggère le recours à des récepteurs et à des voies d'entrée distincts. Nous montrons grâce à des traitements chimiques et à la technologie des mutants dominants négatifs que HAE6 utilise préférentiellement une voie d'endocytose dépendante des radeaux lipidiques et des *caveolae* tandis que NHAE6 entre dans la cellule par les puits tapissés de clathrine. La comparaison des séquences codant les 4 protéines de capsid des virus HAE6 et NHAE6 a révélé la présence de 5 substitutions d'acides aminés démontrant la présence de 2 quasi-espèces virales. Ces substitutions localisées dans des régions très exposées de VP1, VP2 et VP3, outre l'explication de la différence de phénotype, sont susceptibles de moduler le choix du récepteur à la surface cellulaire et ainsi d'orienter les virus vers 2 voies d'entrée distinctes.

Travaux originaux

Article N°1 :

“Echovirus 6 strains derived from a clinical isolate show differences in haemagglutination ability and cell entry pathway”

Nicolas Lévêque, Youssef Zreik, Gaëlle Cartet, Helene Norder,
Delphine Falcon, Nathalie Rivat, Jean-Jacques Chomel, Saw-See Hong
et Bruno Lina.

Virus Research, Juin 2007

Travaux originaux

Dans ce premier article, nous avons étudié les voies d'endocytose de 2 quasi-espèces obtenues d'une souche d'echovirus 6 différenciées par leur aptitude ou non à agglutiner les hématies humaines de groupe O⁺. Les echovirus sont, avec certains types de coxsackievirus, cardiovirus, rhinovirus et l'entérovirus 70, les seuls picornavirus possédant une activité hémagglutinante. La nature exacte de ce pouvoir hémagglutinant est encore inconnue. Contrairement à d'autres familles de virus, il n'est pas supporté par une protéine clairement différenciée et individualisée mais correspondrait davantage à une conformation particulière de la capsid virale.

La découverte du pouvoir hémagglutinant des echovirus date de 1957 (Goldfield *et al.*, 1957). Ces auteurs ont montré que les hématies humaines de groupe O⁺ sont agglutinées par certains sérotypes d'echovirus : echovirus 3, 7, 11 et 12. Dardanoni et Zaffiro ont décrit les modalités techniques de la réaction d'hémagglutination et d'inhibition d'hémagglutination (Dardanoni et Zaffiro, 1959).

Les premiers travaux portant sur la nature du pouvoir hémagglutinant des echovirus datent des années 1960-1965. Ils portaient surtout sur l'action de différentes substances chimiques et de certains enzymes sur l'hémagglutinine du virus. Le rôle des groupements sulfhydryl des echovirus (types 7, 9, 11, 12, 19) dans leur interaction avec les érythrocytes a été démontré par Philipson (Philipson *et al.*, 1960) : inactivation du pouvoir hémagglutinant par le p-chloromercuribenzoate et d'autres agents formant des mercaptides. Le blocage de ces groupements réduit l'infectivité du virus (Purnell *et al.*, 1961). L'impact de différents traitements enzymatiques a été réalisé par Lerner en 1966 (Lerner *et al.*, 1966). Ces chercheurs ont démontré que l'activité hémagglutinante des echovirus 3, 7, 11 et 19 n'était pas affectée par l'incubation du virus avec la trypsine. En revanche, un certain nombre de glycosidases (β glucosidase, β glucuronidase, hyaluronidase, lactase, maltase) inhibe cette propriété. Il semblerait pourtant que cet effet soit non spécifique et résulterait plutôt de l'encombrement stérique par ces enzymes de sites viraux impliqués dans l'interaction avec les érythrocytes. L'oxydation par le periodate et l'incubation des echovirus avec un certain nombre d'aldoses provoquent également une inhibition de l'activité hémagglutinante qui serait due à l'interaction entre les sucres et les récepteurs des érythrocytes (Tillotson et Lerner, 1966 ; Lerner *et al.*, 1966). Il est à noter que, dans toutes ces études, la disparition de l'activité hémagglutinante est associée à la perte du pouvoir infectieux. Lerner et Miranda avaient alors conclu à partir de l'ensemble de leurs travaux à la nature glycoprotéique de l'hémagglutinine des echovirus (Lerner et Miranda, 1968).

Travaux originaux

Or des études postérieures à partir de préparations virales hautement purifiées ont montré que la capsid des picornavirus ne contenait pas de sucres (Burness *et al.*, 1973 ; Drzeniek et Bilello, 1974).

La nature des récepteurs à la surface des érythrocytes liant les echovirus est mieux connue. Dès 1964, ils ont été montrés comme étant de nature protéique et contenant des lipides et des glucides (Philipson *et al.*, 1964). La protéine responsable a depuis été identifiée. Il s'agit de DAF (Decay Accelerating Factor) ou CD55, une protéine de 70 kDa impliquée dans la régulation du système du complément. DAF agit en dissociant la convertase responsable du clivage de la fraction C3. DAF est constitué de 4 séquences consensus répétées (SCR de 1 à 4) de 60 acides aminés chacune, d'une région fortement o-glycosylée et d'un ancrage à la surface cellulaire par le glycosylphosphatidylinositol (**Figure 17**).

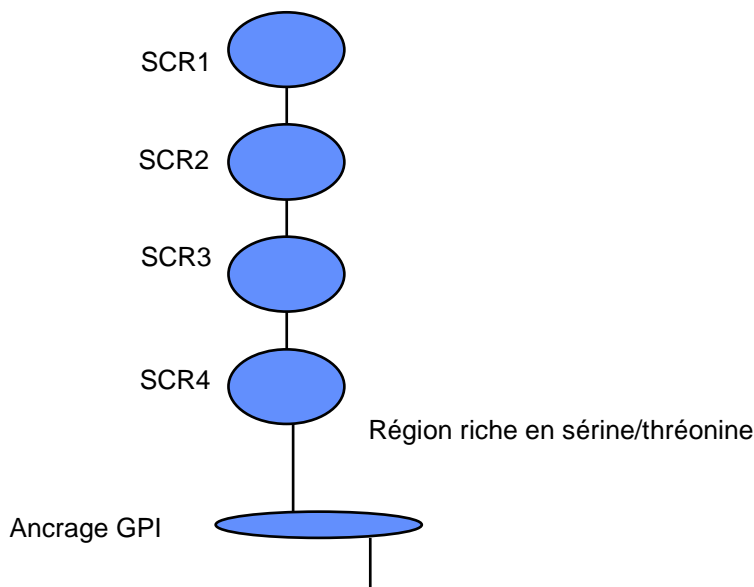


Figure 17. Structure de DAF ou CD55. DAF est constitué de 4 séquences consensus répétées (SCR de 1 à 4) de 60 acides aminés chacune, d'une région fortement o-glycosylée et d'un ancrage à la surface cellulaire par le glycosylphosphatidylinositol. D'après Powell *et al.*, 1999.

A l'exception du coxsackievirus A21 et de l'entérovirus 70 qui se lient à la SCR1, les entérovirus interagissent avec la SCR3 seule ou en association avec les SCR2 et 4 (Shafren *et al.*, 1998 ; Powell *et al.*, 1999). Tous les sérotypes d'echovirus hémagglutinants (echovirus 3, 6, 6', 7, 11-13, 19, 21, 24, 25, 29, 30 et 33) utilisent DAF comme récepteur cellulaire. D'autres membres du genre *Enterovirus*, également hémagglutinants, ont recours à DAF.

Travaux originaux

L'entérovirus 70, le Coxsackievirus A 21 ainsi que les Coxsackievirus B 1, 3 et 5 ont la capacité de se fixer à DAF (Shafren *et al.*, 1995).

Néanmoins, l'existence de sérotypes capables d'hémagglutiner en l'absence de liaison à DAF suggère l'implication d'autres récepteurs tels que les acides sialiques ou les sulfates d'héparane intervenant dans l'infection par de nombreux entérovirus et présents à la surface des hématies (Goodfellow *et al.*, 2001 ; Alexander et Dimock, 2002).

Un phénomène de perte de l'activité hémagglutinante par les echovirus avait déjà été décrit après le passage d'une culture sur cellules primaires simiennes à un isolement sur cellules humaines en lignée continue (Maizel *et al.*, 1961 ; Podoplekin, 1964). Cova et Aymard ont, à leur tour, constaté la perte irréversible de l'activité hémagglutinante d'echovirus 11 après passages successifs sur cellules HeLa sans que ceci soit lié à une production insuffisante de particules virales ni à une modification de leurs propriétés antigéniques ou physico-chimiques (Cova et Aymard, 1980).

Trois hypothèses avaient alors été envisagées :

- L'hémagglutinine est masquée par des inhibiteurs non spécifiques présents dans les cellules HeLa. Ces inhibiteurs ont été trouvés à un taux beaucoup plus faible dans les cultures primaires de cellules de rein de singe. La sensibilité des inhibiteurs à l'action de la chymotrypsine et de la papaïne, ainsi qu'à certains solvants organiques, suggère une nature lipoprotéique (Schmidt *et al.*, 1964a ; Schmidt *et al.*, 1964b). Le rôle inhibiteur des mycoplasmes, contaminant potentiel des cellules en lignée continue, a même été évoqué. La présence de ces inhibiteurs à un titre très faible et identique dans toutes les cultures cellulaires permettant aussi bien le gain ou la perte du titre hémagglutinant a permis d'infirmer cette hypothèse (Cova et Aymard, 1980).
- L'apparition de mutations ponctuelles dans la région codant les protéines de la capsid virale susceptibles d'être le support de l'activité hémagglutinante.
- La sélection, au cours des passages sur cellules HeLa, de particules non hémagglutinantes à partir d'une population virale mixte.

Nous sommes partis dans ce travail de l'hypothèse d'une sélection par la culture cellulaire de 2 quasi-espèces préexistantes dans l'isolat clinique. Or, la question de mutations induites au cours des différents passages ou de l'adaptation d'une souche virale à la culture cellulaire avec modification de ses propriétés doit être également discutée.

La souche de départ présentait un titre hémagglutinant égal à 16. Pour prouver l'existence des 2 quasi-espèces dans l'isolat de départ, nous avons réalisé à partir du surnageant de culture de la souche initiale, obtenue sur fibroblastes embryonnaires humains (des cellules MRC5), une

Travaux originaux

réaction d'hémagglutination au cours de laquelle la population hémagglutinante s'est adsorbée à la surface des hématies et a sédimenté au fond du tube. La réduction du titre infectieux avant et après hémagglutination n'ayant été que d'approximativement 1%, nous en avons conclu que, si les 2 quasi-espèces sont bien présentes dans la souche de départ, le virus NHA6, malgré les incertitudes et le caractère grossier de la mesure, est largement majoritaire avec un ratio de 100 contre 1. Le même processus de cultures cellulaires successives entrepris pour d'autres sérotypes d'échovirus connus pour utiliser DAF (les échovirus 11, 13 et 30) a permis de sélectionner à nouveau une population hémagglutinante et une population non hémagglutinante à partir de souches isolées de patients dans les mêmes conditions (Bergelson *et al.*, 1994). Cet élément est lui aussi en défaveur de l'induction de mutations aléatoires induites par la culture cellulaire. Enfin, un virus adapté à la multiplication sur une lignée cellulaire perd logiquement la capacité à se lier à un récepteur qui n'est pas exprimé par la cellule (Bergelson *et al.*, 1995). Ici, le virus NHA6 obtenu sur cellules HeLa semble avoir perdu la propriété de se fixer à DAF. Or DAF est largement exprimé par cette lignée (Pasch *et al.*, 1999). Ce processus d'adaptation ne semble donc pas intervenir ici.

L'utilisation des cellules humaines d'hépatocarcinome (cellules PLC) comme lignée permettant d'accroître le pouvoir hémagglutinant d'échovirus 6 fut le résultat d'une découverte fortuite. Parmi les nombreuses lignées testées (BGM, Hep-2, MRC5, A549, LLC, Vero), seules les cellules PLC ont permis d'augmenter significativement le titre hémagglutinant du virus passant de 16 unités pour la souche initiale isolée sur cellules MRC5 à un titre de 256 après 6 passages successifs.

En conclusion, l'étude des voies d'entrée d'échovirus 6 dans la cellule a permis non pas de caractériser de façon certaine la route empruntée par ce virus mais de mettre en relief la complexité de ce mécanisme. De nombreuses publications ont en effet longtemps associées un virus à une unique voie d'entrée (Bayer *et al.*, 2001 ; Daecke *et al.*, 2005). Nous montrons ici qu'un virus ne saurait se limiter à un processus aussi restrictif qui conduirait rapidement l'infection à l'échec. Il doit être capable de s'adapter aux nombreux environnements rencontrés au cours de l'infection. Ainsi, certaines lignées cellulaires peuvent être dépourvues d'une voie d'endocytose donnée tels que les lymphocytes qui ne disposent pas de *caveolae* (Fra *et al.*, 1994). Cette capacité d'adaptation est rendue possible chez les virus à ARN positif par la diversité génétique provoquée et entretenue par les erreurs de l'ARN polymérase virale.

Nous montrons par cette étude qu'une souche isolée d'un patient semble effectivement constituée d'un mélange de quasi-espèces virales susceptibles d'entrer dans la cellule par de multiples voies.

Récepteurs cellulaires de HAE6 et NHA6

CAR et DAF sont nécessaires à l'infection par echovirus 6.

La comparaison des séquences codant les 4 protéines de capsid a révélé 5 substitutions d'acides aminés entre les virus HAE6 et NHA6. Aucune variation n'a été trouvée dans la séquence de la protéine VP4 tandis qu'une substitution apparaît dans la protéine VP2, une dans la protéine VP3 et trois dans la séquence de la protéine VP1 dont deux seulement localisées à l'intérieur de domaines exposés. A partir d'un modèle tridimensionnel de la capsid du coxsackievirus B3, ces mutations semblent se situer dans et autour du *canyon* connu pour être la zone d'ancrage du virus à son récepteur cellulaire (Muckelbauer *et al.*, 1995). Il est, dès lors, légitime d'imaginer le recours par HAE6 et NHA6 à des récepteurs différents à la surface de la cellule susceptibles d'orienter les 2 virus vers 2 voies d'entrée distinctes. Dans le premier article, nous avons ainsi rattaché les propriétés hémagglutinantes de HAE6 à sa fixation à DAF ancré à la surface cellulaire par le glycosylphosphatidylinositol et de ce fait présent dans les radeaux lipidiques. La liaison à DAF pourrait entraîner la localisation des virus hémagglutinants au sein des radeaux lipidiques qui deviendraient leur voie d'entrée toute désignée dans la cellule (Shafren *et al.*, 1997b ; Stuart *et al.*, 2002).

De nombreux autres récepteurs ont été décrits pour les echovirus dont certains pourraient être utilisés préférentiellement par la souche NHA6. Ainsi, des anticorps polyclonaux dirigés contre CD59 ou la β 2-microglobuline sont capables de bloquer l'infection de cellules de rhabdomyosarcome par différents echovirus (Goodfellow *et al.*, 2000 ; Ward *et al.*, 1998). L'infection par les echovirus 1 et 8 dépend de la sous-unité α 2 de l'intégrine VLA-2 tandis que les sulfates d'héparane permettent l'attachement de nombreux echovirus à la surface cellulaire (Bergelson *et al.*, 1992 ; Goodfellow *et al.*, 2001). Pourtant, ces molécules largement distribuées à travers l'organisme n'expliquent pas le tropisme des entérovirus pour les méninges, le myocarde, l'épithélium du tube digestif, le foie, le pancréas et les poumons. En outre, différents auteurs ont avancé l'idée de l'utilisation simultanée de plusieurs récepteurs dont certains encore inconnus (Powell *et al.*, 1998).

Le deuxième article a donc eu pour but de tenter de clarifier le rôle de différents récepteurs potentiels pour les echovirus tout en essayant d'observer une différence dans le choix du récepteur entre souches hémagglutinantes et non hémagglutinantes.

Travaux originaux

Pour ce faire, nous avons eu recours à l'inhibition de l'infection de cellules A549 par différents traitements enzymatiques ainsi qu'à un large éventail de cellules d'ovaire de hamster (CHO) transfectées de manière à exprimer DAF, le Coxsackie Adenovirus Receptor (CAR), ou VLA-2. Nous avons ainsi pu montrer pour la première fois l'association nécessaire de CAR et DAF pour permettre l'infection par un echovirus de cellules CHO naturellement non permissives.

Article N°2 :

“CAR and DAF are required for echovirus 6 infection”

Nicolas Lévêque, Youssef Zreik, Gaëlle Cartet, Helene Norder,
Delphine Falcon, Nathalie Rivat, Jean-Jacques Chomel, Saw-See Hong
et Bruno Lina.

Soumis à *Journal of General Virology*

Travaux originaux

Les 2 quasi-espèces d'echovirus 6 sont caractérisées par leur différence de phénotype, hémagglutinant ou non, potentiellement expliquée par des substitutions en acides aminés dans des régions exposées de la capsid virale. Ces substitutions sont en outre susceptibles de moduler le choix du récepteur à la surface de la cellule et d'orienter les deux populations virales vers 2 voies d'entrée distinctes. La suite logique de ce travail a donc été de déterminer le récepteur des 2 virus en partant de l'hypothèse de l'existence de 2 récepteurs différents. L'évaluation du rôle de différents récepteurs connus des picornavirus (acide sialique, sulfates d'héparane, molécules à ancrage GPI et DAF, intégrine VLA-2 et enfin CAR) a apporté 2 informations importantes :

- L'affinité 4 fois plus importante de HAE6 pour DAF explique l'entrée du virus hémagglutinant par les radeaux lipidiques.
- L'utilisation de l'association DAF/CAR lors de l'infection des cellules CHO. Ceci constitue la première description du rôle de CAR comme récepteur pour un echovirus.

Si le recours à DAF et CAR est une nouveauté pour les echovirus, il s'agit d'une stratégie déjà éprouvée par les coxsackievirus B (CV-B). Les auteurs Coyne et Bergelson ont récemment décrit dans le journal *Cell* la méthode mise au point par ces virus pour traverser l'épithélium digestif (Coyne et Bergelson, 2006). Ils ont en effet découvert le moyen d'accéder à la jonction cellule/cellule où est exprimé CAR, leur récepteur, et de là, après internalisation, à leur site de réplication. Ce sésame est constitué par DAF présent à la face apicale de la cellule épithéliale polarisée. DAF y est concentré dans les radeaux lipidiques par son ancrage à la cellule par le glycosylphosphatidylinositol et de ce fait très mobile. Son rôle ne se limite pas à être un simple récepteur d'adhésion. L'ancrage GPI l'amène à interagir avec de nombreuses tyrosine-kinases des familles Abl et Src. L'activation d'Abl déclenchée par l'arrivée du virus et le regroupement de plusieurs molécules aboutit au remodelage du réseau d'actine à travers la stimulation de la petite GTPase Rac. Les mouvements des filaments d'actine permettent au complexe virus/DAF de se mouvoir à la surface de la cellule jusqu'à la face baso-latérale où est situé CAR. L'arrivée du virus en modifiant les fonctions de CAR « ouvre » la jonction cellule/cellule. En outre, l'interaction CV-B/CAR déclenche la décapsidation, étape indispensable à la libération de l'ARN viral à partir de l'endosome. DAF est incapable à lui seul d'induire ce mécanisme ce qui le range dans la catégorie des co-récepteurs des coxsackievirus au même titre que CD46. L'internalisation du virus se produit ensuite par une voie d'endocytose dépendante de la cavéoline-1.

Travaux originaux

L'activation de cette voie d'entrée semble être là encore le résultat du regroupement de plusieurs DAF à la suite de la fixation à la capsid virale. La kinase Fyn de la famille Src est phosphorylée dans les 10 minutes suivant l'interaction DAF/CVB. Elle-même ajoute un groupement phosphate à la tyrosine en position 14 de la cavéoline-1 aboutissant à la formation de *caveolae* et à l'entrée du virus dans la cellule.

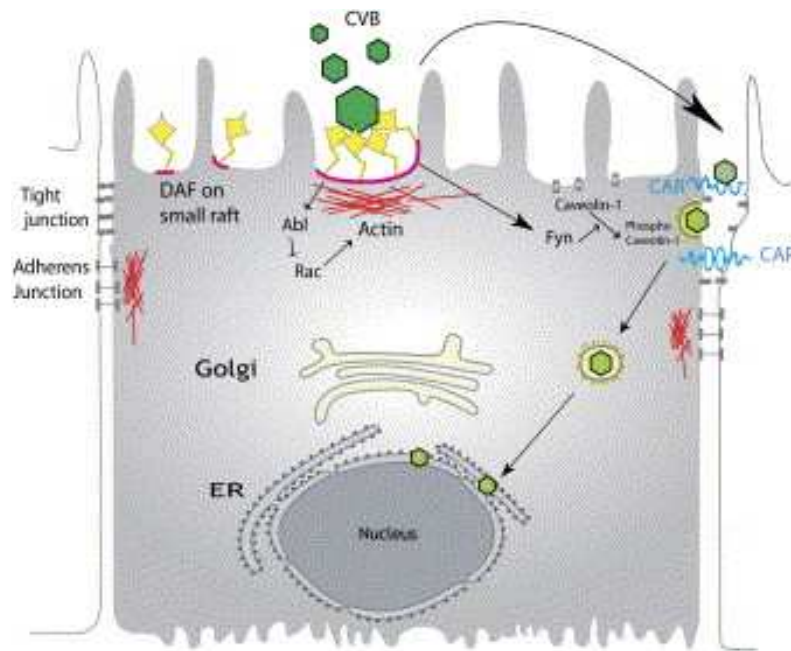


Figure 18. Les coxsackievirus B se fixent à DAF au niveau de la surface apicale de la cellule épithéliale intestinale entraînant le regroupement de nombreuses molécules et de nombreux petits radeaux lipidiques en un seul grand. Ce phénomène aboutit au remodelage du réseau d'actine, *via* l'activation de la tyrosine kinase Abl et de la petite GTPase Rac, nécessaire au transport du complexe CVB/DAF jusqu'à la face baso-latérale où le virus rencontre son véritable récepteur, CAR. Le virus induit alors la dissociation des liaisons CAR/CAR aboutissant à la désorganisation de l'adhésion cellule/cellule et ouvrant une brèche dans l'épithélium digestif. La liaison à CAR désorganise aussi la capsid virale déclenchant la décapsidation. Enfin, la concentration de DAF permet l'internalisation du virus dans les *caveolae* suite à l'activation d'une kinase Src, la kinase Fyn, qui phosphoryle la cavéoline-1. Le virus est internalisé seul sans CAR ni DAF. Une heure et demie après le début de l'infection, les particules virales se retrouvent au niveau du réticulum endoplasmique dans la zone périnucléaire. D'après Diaz et Rodriguez-Boulan, 2006.

**DISCUSSION GENERALE
ET PERSPECTIVES**

Travaux originaux

Les entérovirus sont responsables d'infections très fréquentes chez l'Homme dont la plupart sont heureusement asymptomatiques (Palacios et Oberste, 2005). Néanmoins, ces pathogènes humains bénins peuvent se révéler de redoutables adversaires. En France, la surveillance épidémiologie des entérovirus montre que leur circulation et leur impact en santé humaine sont une réalité non négligeable (Antona *et al.*, 2007). Leur résistance et leur propagation rapide sur un mode dépassant la simple contamination fécale-orale, notamment par aérosols de gouttelettes rhinopharyngées, en font un problème de santé publique majeur même dans les pays dits développés (Hovi *et al.*, 1986). S'ils sont fréquemment responsables d'épidémies estivales de méningites aseptiques chez l'enfant, des épidémies massives de conjonctivites aiguës hémorragiques ou d'éruptions vésiculeuses de type « *pied-main-bouche* » ont été rapportées (Lévêque *et al.*, 2003 ; Lin *et al.*, 2003). Enfin, l'éradication définitive des poliovirus n'est pas encore acquise et il n'est pas exclu de les voir réapparaître, eux-mêmes ou des virus proches ayant évolué par dérive génétique, dans les années futures lorsque la couverture vaccinale patiemment édifiée viendra à s'étioler (Rousset *et al.*, 2004 ; Combiescu *et al.*, 2007). Dans le cas idéal d'une éradication complète, il faut malheureusement s'attendre à ce que la niche écologique laissée vacante ne soit aussitôt occupée par des sérotypes d'entérovirus non poliovirus particulièrement neurovirulents tel que l'entérovirus 71 ou les nouveaux entérovirus 93 et 94 (Junttila *et al.*, 2007).

Les entérovirus restent donc des agents infectieux de premier plan dont certains sérotypes se comportent comme de véritables pathogènes émergents ou réémergents. Toutes ces raisons doivent nous pousser à améliorer encore les connaissances que nous avons de leur biologie. Longtemps, les poliovirus, les plus célèbres d'entre eux, ont monopolisé l'attention des virologues. Les connaissances accumulées tant théoriques que techniques ont servi de modèle pour la virologie dans son ensemble. Si la physiopathogénie des infections *in vivo* et le cycle répliatif *in vitro* ont été étudiés de façon soutenue et sont désormais bien connues, les mécanismes qui interviennent au cours des étapes précoces du cycle infectieux correspondant à l'interaction virus/récepteur suivie de l'entrée du virus dans la cellule sont longtemps restés obscures.

Les mécanismes et les stratégies utilisés par les virus pour entrer dans la cellule sont extrêmement variés mais tous sont intimement dépendants des fonctions cellulaires. Ainsi, à cause d'une structure rudimentaire et d'une information génétique limitée, ils exploitent au mieux des processus cellulaires très complexes. L'induction de signaux, l'activation des voies d'endocytose, l'exploitation des systèmes d'adressage et de circulation sont autant d'exemples d'utilisation des fonctions de la cellule au profit du virus.

Travaux originaux

A la suite immédiate de l'entrée dans la cellule, les virus doivent être acheminés jusqu'à leur site de réplication qu'il soit cytoplasmique ou nucléaire. Ces événements sont très finement coordonnés dans l'espace et dans le temps et reliés à des modifications successives de la capsid virale. Il est remarquable de voir combien peu de place est laissée au hasard. Le déroulement des mécanismes d'infection au niveau tissulaire, cellulaire et à l'échelle de l'organisme complet demeure largement méconnu. L'apport de nouvelles technologies moléculaires telles que les siRNA, capables d'éteindre de façon transitoire et spécifique l'expression d'une protéine cible, ou les mutants dominants négatifs, formes mutées ou clivées non fonctionnelles de protéines impliquées dans l'endocytose, constituent une avancée importante pour l'étude des voies d'entrée. Elles ont permis de sortir de l'utilisation de molécules chimiques toxiques et peu spécifiques. Couplées à une évaluation de la réplication virale, elles offrent un reflet indiscutable de l'importance d'une voie d'endocytose dans l'infection cellulaire. L'imagerie à base de microscopie électronique ou de microscopie confocale constitue une autre stratégie. Elle se heurte à l'obligation d'utiliser un grand nombre de particules virales pour pouvoir visualiser les processus d'entrée entraînant un manque de spécificité (Stuart *et al.*, 2002). Le virus utilisé à des titres élevés aura tendance à rentrer dans la cellule coûte que coûte, par de multiples voies, sans en privilégier aucune. Ces techniques ne sont malheureusement pas applicables à l'échelle d'un organisme entier et il est effectivement discutable d'espérer caractériser des mécanismes aussi complexes et d'en tirer des informations exploitables *in vivo* à partir de phénomènes observés dans des cellules en lignée continue. Un modèle plus fidèle pourrait être constitué de cellules primaires au premier rang desquelles des cellules épithéliales polarisées, première barrière que le virus doit franchir à son arrivée dans l'organisme.

Malgré les progrès récents réalisés, la situation actuelle concernant l'entrée des virus dans la cellule reste un peu confuse car certains virus, entrant à pH acide, ont parfois recours à des voies indépendantes de la clathrine tandis que d'autres peuvent utiliser plusieurs voies d'endocytose distinctes simultanément ou de manière alternative en fonction de la lignée cellulaire, de la dose infectieuse, et des conditions de culture. (Sieczkarski et whittaker, 2003 ; Rust *et al.*, 2004 ; Damm *et al.*, 2005). Le virus Herpès simplex a, par exemple, recours à trois voies d'entrée différentes dont deux sont des voies d'endocytose (Milne *et al.*, 2005). En plus des *caveolae*, SV40 peut utiliser une voie alternative (Gilbert *et al.*, 2003 ; Damm *et al.*, 2005).

Travaux originaux

Les virus influenza A utilisent des voies dépendantes et indépendantes des puits tapissés de clathrine et enfin le VIH-1 qui pénètre par fusion de son enveloppe avec la membrane cellulaire peut également utiliser une voie d'endocytose (Sieczkarski et whittaker, 2002 ; Rust *et al.*, 2004 ; Daecke *et al.*, 2005).

Les nouveaux outils récemment développés doivent aussi amener à réévaluer les connaissances acquises pour de nombreux virus. Ainsi, Bayer *et al.* et Snyers *et al.* ont successivement montré que l'endocytose du rhinovirus de sérotype 2 était dépendante des puits tapissés de clathrine du fait de son inhibition par le mutant K44A de la dynamine et par la méthyl- β -cyclodextrine (Bayer *et al.*, 2001 ; Snyers *et al.*, 2003). Ces outils permettront également de conclure entre différents résultats contradictoires à propos, par exemple, de l'entrée du poliovirus dépendante de la clathrine mais aussi inhibée par la déplétion en cholestérol caractéristique des radeaux lipidiques (DeTulleo et Kirchhausen, 1998 ; Danthi *et al.*, 2004).

Caractériser le mode d'endocytose d'un virus est complexe car seule une petite fraction des virus attachés à la surface cellulaire entrera effectivement dans la cellule et engendrera une infection productive. Les études morphologiques ne peuvent distinguer les virus qui entrent activement et sont véritablement infectieux de ceux entrant passivement dans le cadre d'un cycle abortif. Il est important de pouvoir faire la preuve d'une infection « réussie » et donc d'évaluer la réplication du virus comme preuve de son entrée. Seule la combinaison de ces différentes méthodes permettrait de caractériser fidèlement l'entrée d'un virus.

L'étude des voies d'entrée d'echovirus 6 dans la cellule a ainsi permis non pas de caractériser de façon certaine la route empruntée par ce virus mais de mettre en relief la complexité de ce mécanisme. De nombreuses publications ont en effet longtemps associé un virus à une unique voie d'entrée (Marjomaki *et al.*, 2002 ; Triantafilou et Triantafilou, 2003 ; Triantafilou et Triantafilou, 2003). Nous montrons ici qu'un virus ne saurait se limiter à un processus aussi restrictif qui conduirait rapidement l'infection à l'échec. Il doit être capable de s'adapter aux nombreux environnements rencontrés au cours de l'infection. Ainsi, certaines lignées cellulaires peuvent être dépourvues d'un récepteur ou d'une voie d'endocytose donnée tels que les lymphocytes qui ne disposent pas de *caveolae* (Fra *et al.*, 1994). Cette capacité d'adaptation est rendue possible chez les virus à ARN positif par la diversité génétique provoquée et entretenue par les erreurs de l'ARN polymérase virale. Les mutations s'accumulent dans le génome des virus nouvellement synthétisés aboutissant à la formation d'un mélange de quasi-espèces virales. Vignuzzi *et al.* ont montré que cette diversité génétique était indispensable à la neurovirulence des poliovirus (Vignuzzi *et al.*, 2006).

Travaux originaux

Le trajet du virus de son entrée dans l'organisme jusqu'au système nerveux central est rempli d'obstacles que seul un taux de mutations suffisant de la souche lui permet de franchir (Pfeiffer et Kirkegaard, 2006). Au niveau cellulaire, la présence d'un récepteur et l'étape d'endocytose peuvent être assimilées à l'une de ces nombreuses barrières.

Ainsi, une souche isolée d'un patient semble effectivement constituée d'un mélange de quasi-espèces virales susceptibles d'entrer dans la cellule par de multiples voies. De futurs travaux devront permettre de relier ou non la composition en quasi-espèces au tropisme tissulaire et à la virulence de la souche. En effet, les conséquences pour le diagnostics et cliniques de ce phénomène n'ont jamais été étudiées. On peut en effet estimer que plus une souche va présenter de quasi-espèces différentes plus grande sera sa virulence. Il est dès lors possible d'imaginer que la gravité des infections à entérovirus chez l'immunodéprimé est liée non seulement à la carence en défenses immunitaires mais aussi à une clairance virale retardée qui laisse au virus davantage de cycles de réplication et donc la possibilité d'accroître sa diversité génétique. Les futurs moyens diagnostiques devront inclure la mesure de la diversité génétique comme marqueur pronostic de l'infection et, pourquoi pas, du tropisme tissulaire. La composition en quasi-espèces pourrait en effet également expliquer la variabilité des pathologies associées aux entérovirus, certaines souches étant plus volontiers neurotropes, cardiotropes ou pneumotropes. Dans un contexte de méningite, la comparaison moléculaire de la souche à son entrée dans l'organisme à partir d'un prélèvement de gorge avec le virus isolé du liquide céphalorachidien permettrait de caractériser les quasi-espèces ayant été capables d'atteindre le système nerveux central. Il semble toutefois qu'une fois la barrière franchie, le virus reconstitue rapidement un mélange de quasi-espèces (Vignuzzi *et al.*, 2006).

Les quasi-espèces d'échovirus 6 sélectionnées par passages successifs sur cellules d'hépatocarcinome (cellules PLC) et de carcinome utérin (cellules HeLa) se distinguent par 5 substitutions en acides aminés intéressant les protéines de capsid dont 4 sont exposées à la surface du virus. Il est à noter qu'aucune différence de virulence n'a été constatée entre les virus hémagglutinant (HAE6) et non hémagglutinant (NHAE6). Toutefois, les régions non codantes et non structurales du génome n'ont pas été séquencées alors qu'elles sont impliquées dans la régulation du *fitness* de la souche. Une ou plusieurs de ces mutations expliquent le pouvoir hémagglutinant d'échovirus 6 décrit comme étant la conséquence de la liaison à DAF, protéine ancrée dans les radeaux lipidiques cellulaires (Powell *et al.*, 1998). Notre hypothèse était que l'interaction HAE6/DAF orientait le virus vers une voie d'endocytose dépendante des radeaux lipidiques et des *caveolae* (Stuart *et al.*, 2002).

Travaux originaux

Or, l'étude des récepteurs de HAE6 et NHA6 montre que ces deux quasi-espèces virales ont recours à l'association CAR/DAF pour infecter les cellules CHO transfectées naturellement non permissives aux echovirus. L'hémagglutination induite par HAE6 pourrait n'être que la conséquence d'une affinité supérieure pour DAF. Les mutations portées par le *knob* de la protéine de capsid VP3 et l'extrémité C-terminale de la protéine VP1 participant à la formation du *canyon* sont connues chez le poliovirus pour interagir avec Pvr, le Poliovirus receptor, et peuvent se traduire par des différences de cinétique et de constante d'affinité entre les différents virus et leurs récepteurs (Colonno *et al.*, 1988 ; Colston et Racaniello, 1994 ; Muckelbauer *et al.*, 1995).

La coopération DAF/CAR offre une description du rôle des co-récepteurs des entérovirus jusqu'ici peu connu. Comme décrit par Coyne et Bergelson, DAF, le co-récepteur, permettrait au virus de franchir une barrière topologique en accédant à la jonction cellule/cellule où se situe CAR, le récepteur (Coyne et Bergelson, 2006). CAR est décrit ici pour la première fois comme un récepteur potentiel pour un echovirus par la méthode ayant permis la découverte de Pvr et de l'intégrine VLA-2 comme récepteur des echovirus 1 et 8 (Mendelsohn *et al.*, 1989 ; Bergelson *et al.*, 1992). L'évaluation de son rôle dans l'infection par d'autres sérotypes d'echovirus permettrait d'envisager à terme de le rebaptiser ECAR pour Echo-Coxsackie-Adenovirus Receptor. La seconde partie des travaux conclut à l'implication des sulfates d'héparanes comme récepteurs d'attachement, au rôle de DAF comme co-récepteur et de CAR comme récepteur. Or, les cellules embryonnaires fibroblastiques humaines MRC5 couramment employées pour l'isolement des echovirus sont dépourvues de CAR imposant la recherche d'un second récepteur (Tonew *et al.*, 1996).

Nous avons vu le rôle supposé chez l'Homme des infections persistantes dues à echovirus 6. L'établissement d'une infection cellulaire chronique est en partie le résultat de mutations s'accumulant dans les régions non codantes et non structurales du génome du virus (Beaulieux *et al.*, 2001). Il semble pourtant qu'un des facteurs majeurs soit constitué par le choix du récepteur cellulaire et donc par la présence de mutations adaptatives spécifiques au niveau des gènes codant les protéines de capsid (Colbère-Garapin *et al.*, 2001 ; Frisk *et al.*, 2001). La diversité génétique offerte par l'existence des quasi-espèces d'echovirus 6 pourrait être *in vitro* à l'origine de l'infection persistante de cellules gliales humaines. L'utilisation d'un récepteur alternatif à la surface cellulaire par une des quasi-espèces pourrait entraîner un échappement aux mécanismes d'apoptose permettant le passage d'une infection lytique à une infection chronique.

Travaux originaux

Enfin, les informations collectées grâce à l'étude des mécanismes d'entrée des entérovirus pourraient avoir un impact important en thérapeutique. Les phases d'attachement et d'entrée sont en effet des cibles potentielles pour un grand nombre de futures molécules antivirales. Les seuls antiviraux ayant fait la preuve de leur efficacité *in vitro* sur les infections à picornavirus sont, à ce jour, les composés WIN qui agissent soit comme inhibiteurs d'attachement (rhinovirus) soit comme inhibiteurs de décapsidation (entérovirus). Ils viennent se loger dans la poche hydrophobe située à la base du canyon, site d'interaction virus/récepteur, en déplaçant le composé lipidique normalement présent bloquant les mécanismes de « respiration » de la capsid préalable à la libération du génome. La vaccination exploite depuis toujours cette stratégie consistant à bloquer le virus avant qu'il ne pénètre dans la cellule limitant les effets secondaires. Ainsi, les anticorps produits en réponse à la vaccination anti-poliomyélitique sont capables de recouvrir la particule virale masquant les sites d'interaction virus/récepteur. Neutralisant *in vitro*, ils sont dits protecteurs *in vivo*. Agir sur la cellule en bloquant les voies d'endocytose semble en revanche peu envisageable du fait de sa toxicité. Une piste à explorer pourrait être la possibilité de moduler les fonctions de défense cellulaire impliquées dans la lutte contre l'infection virale. Enfin, il a été récemment montré que l'information génétique correspondant à près de 1% du génome humain était nécessaire à l'entrée et aux premières étapes de l'infection de la cellule par un virus (Pelkmans *et al.*, 2005). Ces gènes incluent un nombre important de kinases qui interviennent dans la régulation des voies d'endocytose. Il semble donc également important de s'intéresser de près à ces co-facteurs cellulaires en tant que nouvelles cibles des thérapeutiques antivirales.

CONCLUSION GENERALE

Travaux originaux

L'étude des voies d'endocytose d'échovirus 6 a permis d'envisager une souche d'entérovirus non pas comme un bloc monolithique mais comme une multitude de populations ayant leurs caractéristiques propres. Cette diversité génétique semble représenter pour le virus un potentiel d'adaptation majeur. Les quasi-espèces virales sont ainsi capables d'infecter la cellule après interaction avec différents récepteurs par différentes voies d'entrée. Les conséquences quant à la physiopathologie de l'infection sont nombreuses. Elles concernent essentiellement la relation entre virulence et diversité génétique que ce soit à l'occasion d'infections aiguës ou chroniques chez l'immunocompétent ou l'immunodéprimé.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

1. Abe O, Kimura H, Minakami H, Akami M, Inoue M, Saito A, and Otsuki K. Outbreak of gastroenteritis caused by echovirus type 6 in an orphanage in Japan. *J Infect.* 2000 ; 41:285 - 6.
2. Acharya R, Fry E, Stuart D, Fox G, Rowlands D, Brown F. The three-dimensional structure of foot-and-mouth disease virus at 2.9 Å resolution. *Nature.* 1989 ; 337:709-16.
3. Agol VI, Paul AV, Wimmer E. Paradoxes of the replication of picornaviral genomes. *Virus Res.* 1999 ; 62(2):129-47. Review.
4. Agrez MV, Shafren DR, Gu X, Cox K, Sheppard D, Barry RD. Integrin alpha v beta 6 enhances coxsackievirus B1 lytic infection of human colon cancer cells. *Virology.* 1997 ; 239(1):71-7.
5. Alexander DA, Dimock K. Sialic acid functions in enterovirus 70 binding and infection. *J Virol.* 2002 ; 76(22):11265-72.
6. Andino R, Rieckhof GE, Achacoso PL, Baltimore D. Poliovirus RNA synthesis utilizes an RNP complex formed around the 5'-end of viral RNA. *EMBO J.* 1993 ; 12(9):3587-98.
7. Andréoletti L, Wattré P. Le rôle des coxsackievirus B dans les pathologies cardiaques humaines. *Virologie.* 1999 ; 3:309-21.
8. Andréoletti L, Lesay M, Deschildre A, Lambert V, Dewilde A, Wattré P. Differential detection of rhinoviruses and enteroviruses RNA sequences associated with classical immunofluorescence assay detection of respiratory virus antigens in nasopharyngeal swabs from infants with bronchiolitis. *J Med Virol.* 2000 ; 61(3):341-6.
9. Antona D, Lévêque N, Chomel JJ, Dubrou S, Levy-Bruhl D, Lina B. Surveillance of enteroviruses in France, 2000-2004. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2007 ; 26(6):403-12.
10. Aoki J, Koike S, Ise I, Sato-Yoshida Y, Nomoto A. Amino acid residues on human poliovirus receptor involved in interaction with poliovirus. *J Biol Chem.* 1994 ; 269(11):8431-8.
11. Arita M, Horie H, Arita M, Nomoto A. Interaction of poliovirus with its receptor affords a high level of infectivity to the virion in poliovirus infections mediated by the Fc receptor. *J Virol.* 1999 ; 73(2):1066-74.
12. Arnold E, Luo M, Vriend G, Rossmann MG, Palmenberg AC, Parks GD, Nicklin MJ, Wimmer E. Implications of the picornavirus capsid structure for polyprotein processing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 ; 84(1):21-5.
13. Ashwell MJ, Smith DW, Phillips PA, Rouse IL. Viral meningitis due to echovirus types 6 and 9: epidemiological data from Western Australia. *Epidemiol Infect.* 1996 ; 117(3):507-12.
14. Bailly JL, Borman AM, Peigue-Lafeuille H, Kean KM. Natural isolates of ECHO virus type 25 with extensive variations in IRES sequences and different translational efficiencies. *Virology.* 1996 ; 215(1):83-96.
15. Baltera RF Jr, Tershak DR. Role of amino acid residue 187 of poliovirus polypeptide 2C in determining the guanidine trait. *Intervirology.* 1992 ; 33(3):165-72.
16. Barclay W, Li Q, Hutchinson G, Moon D, Richardson A, Percy N, Almond JW, Evans DJ. Encapsidation studies of poliovirus subgenomic replicons. *J Gen Virol.* 1998 ; 79 (Pt 7):1725-34.
17. Barton DJ, Flanagan JB. Synchronous replication of poliovirus RNA: initiation of negative-strand RNA synthesis requires the guanidine-inhibited activity of protein 2C. *J Virol.* 1997 ; 71(11):8482-9.
18. Basavappa R, Syed R, Flore O, Icenogle JP, Filman DJ, Hogle JM. Role and mechanism of the maturation cleavage of VP0 in poliovirus assembly: structure of the empty capsid assembly intermediate at 2.9 Å resolution. *Protein Sci.* 1994 ; 3(10):1651-69.

Références bibliographiques

19. Bayer N, Schober D, Huttinger M, Blaas D, Fuchs R. Inhibition of clathrin-dependent endocytosis has multiple effects on human rhinovirus serotype 2 cell entry. *J Biol Chem.* 2001 ; 276 (6), 3952-62.
20. Beaulieux F, Zreik Y, Deleage C, Sauvinet V, Legay V, Giraudon P, Kean KM, Lina B. Cumulative mutations in the genome of Echovirus 6 during establishment of a chronic infection in precursors of glial cells. *Virus Genes.* 2005 ; 30(1):103-12.
21. Belnap DM, McDermott BM Jr, Filman DJ, Cheng N, Trus BL, Zuccola HJ, Racaniello VR, Hogle JM, Steven AC. Three-dimensional structure of poliovirus receptor bound to poliovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000a ; 97(1):73-8.
22. Belnap DM, Filman DJ, Trus BL, Cheng N, Booy FP, Conway JF, Curry S, Hiremath CN, Tsang SK, Steven AC, Hogle JM. Molecular tectonic model of virus structural transitions: the putative cell entry states of poliovirus. *J Virol.* 2000b ; 74(3):1342-54.
23. Belsham G.J. & Sonenberg N. Picornavirus RNA translation; roles of cellular proteins. *Trends. Microbiol.* 2000 ; 8, 330-5.
24. Bergelson JM, Shepley MP, Chan BM, Hemler ME, Finberg RW. Identification of the integrin VLA-2 as a receptor for echovirus 1. *Science.* 1992 ; 255:1718-20.
25. Bergelson JM, Chan M, Solomon KR, St John NF, Lin H, Finberg RW. Decay-accelerating factor (CD55), a glycosylphosphatidylinositol-anchored complement regulatory protein, is a receptor for several echoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 ; 91(13):6245-8.
26. Bergelson JM, Mohanty JG, Crowell RL, St. John NF, Lublin DM, and Finberg RW. Coxsackievirus B3 adapted to growth in RD cells binds to decay-accelerating factor (CD55). *J Virol.* 1995 ; 69:1903-6.
27. Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, Kurt-Jones EA, Krithivas A, Hong JS, Horwitz MS, Crowell RL, Finberg RW. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science.* 1997 ; 275(5304):1320-3.
28. Berger MM, Kopp N, Vital C, Redl B, Aymard M, Lina B. Detection and cellular localization of enterovirus RNA sequences in spinal cord of patients with ALS. *Neurology.* 2000 ; 54(1):20-5.
29. Berger MM, Jia XY, Legay V, Aymard M, Tilles JG, Lina B. Nutrition- and virus-induced stress represses the expression of manganese superoxide dismutase in vitro. *Exp Biol Med.* 2004 ; 229(8):843-9.
30. Bernhardt G, Harber J, Zibert A, deCrombrugge M, Wimmer E. The poliovirus receptor: identification of domains and amino acid residues critical for virus binding. *Virology.* 1994 ; 203(2):344-56.
31. Blokziji ML, Koskiniemi M. Echovirus 6 encephalitis in a preterm baby. *Lancet.* 1989 ; 2(8655):164-5.
32. Boell F, Meier-Ewert H. [Echo-6-virus as the pathogen of hand, foot and mouth exanthema] *Hautarzt.* 1977 ; 28(2):96-7.
33. Borman AM, Deliat FG, Kean KM. Sequences within the poliovirus internal ribosome entry site segment control viral RNA synthesis. *EMBO J.* 1994 ; 13, 3149-3157.
34. Bouche P. La sclérose latérale amyotrophique (maladie du motoneurone). *Encycl. Med. Chir. (Parus, France), Neurologie.* 1986 ; 5 :20.
35. Boyd MT, Jordan SW, Davis LE. Fatal pneumonitis from congenital echovirus type 6 infection. *Pediatr Infect Dis J.* 1987 ; 6(12):1138-9.
36. Brown B, Oberste MS, Maher K, Pallansch MA. Complete genomic sequencing shows that polioviruses and members of human enterovirus species C are closely related in the noncapsid coding region. *J Virol.* 2003 ; 77(16):8973-84.

Références bibliographiques

37. Burness AT, Pardoe IU, Fox SM. Evidence for the lack of glycoprotein in the encephalomyocarditis virus particle. *J Gen Virol.* 1973 ; 18(1):33-49.
38. Cao W, Henry MD, Borrow P, Yamada H, Elder JH, Ravkov EV, Nichol ST, Compans RW, Campbell KP, Oldstone MB. Identification of alpha-dystroglycan as a receptor for lymphocytic choriomeningitis virus and Lassa fever virus. *Science.* 1998 ; 282(5396):2079-81.
39. Carrillo EC, Giachetti C, Campos RH. Effect of lysosomotropic agents on the foot-and-mouth disease virus replication. *Virology.* 1984 ; 135(2):542-5.
40. Casasnovas JM, Springer TA. Kinetics and thermodynamics of virus binding to receptor. Studies with rhinovirus, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), and surface plasmon resonance. *J Biol Chem.* 1995 ; 270(22):13216-24.
41. Casasnovas JM, Stehle T, Liu JH, Wang JH, Springer TA. A dimeric crystal structure for the N-terminal two domains of intercellular adhesion molecule-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 ; 95(8):4134-9.
42. Chomel JJ, Antona D, Thouvenot D, Lina B. Three echovirus serotypes responsible for outbreak of aseptic meningitis in Rhone-Alpes region, France. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2003 ; 22:191-3.
43. Chopra A, Rana PV, Narayanaswamy AS, et al. Neurological complications following acute viral conjunctivitis : a new profile. *Trop Geogr Med.* 1986 ; 38:197-202.
44. Chung SK, Kim JY, Kim IB, Park SI, Paek KH, Nam JH. Internalization and trafficking mechanisms of coxsackievirus B3 in HeLa cells. *Virology.* 2005 ; 333 (1): 31-40.
45. Colbere-Garapin F, Jacques S, Drillet AS, Pavio N, Couderc T, Blondel B, Pelletier I. Poliovirus persistence in human cells in vitro. *Dev Biol (Basel).* 2001 ; 105:99-104.
46. Colonno RJ, Callahan PL, Long WJ. Isolation of a monoclonal antibody that blocks attachment of the major group of human rhinoviruses. *J Virol.* 1986 ; 57(1):7-12.
47. Colonno RJ, Condra JH, Mizutani S, Callahan PL, Davies ME, Murcko MA. Evidence for the direct involvement of the rhinovirus canyon in receptor binding. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 ; 85(15):5449-53.
48. Colston E, Racaniello VR. Soluble receptor-resistant poliovirus mutants identify surface and internal capsid residues that control interaction with the cell receptor. *EMBO J.* 1994 ; 13(24):5855-62.
49. Colston E, Racaniello VR. Poliovirus variants selected on receptor-expressing cells identify capsid residues that expand receptor recognition. *J Virol.* 1995 ; 69:4823-9.
50. Combiescu M, Guillot S, Persu A, Baicus A, Pitigoi D, Balanant J, Oprisan G, Crainic R, Delpeyroux F, Aubert-Combiescu A. Circulation of a type 1 recombinant vaccine-derived poliovirus strain in a limited area in Romania. *Arch Virol.* 2007 ; 152(4):727-38.
51. Conner SD, Schmid SL. Regulated portals of entry into the cell. *Nature.* 2003 ; 422:37-44. Review.
52. Cova L, Aymard M. Isolation and characterization of non-haemagglutinating echovirus 11. *J Gen Virol.* 1980 ; 51(Pt 1):219-22.
53. Coyne CB, Bergelson JM. Virus-induced Abl and Fyn kinase signals permit coxsackievirus entry through epithelial tight junctions. *Cell.* 2006 ; 124:119-31.
54. Crainic R, Delpeyroux F, Georgescu M, et al. La poliomyélite : une maladie neurologique provoquée par un virus entérotrope. *Ann. Institut. Pasteur,* 1995 ; 6:75-85.
55. Crotty S, Maag D, Arnold JJ, Zhong W, Lau JY, Hong Z, Andino R, Cameron CE. The broad-spectrum antiviral ribonucleoside ribavirin is an RNA virus mutagen. *Nat Med.* 2000 ; 6(12):1375-9.

Références bibliographiques

56. Curry S, Abrams CC, Fry E, Crowther JC, Belsham GJ, Stuart DI, King AM. Viral RNA modulates the acid sensitivity of foot-and-mouth disease virus capsids. *J Virol.* 1995 ; 69(1):430-8.
57. Daecke J, Fackler OT, Dittmar MT, Krausslich HG. Involvement of clathrin-mediated endocytosis in human immunodeficiency virus type 1 entry. *J Virol.* 2005 ; 79(3):1581-94.
58. Damm EM, Pelkmans L, Kartenbeck J, Mezzacasa A, Kurzchalia T, Helenius A. Clathrin- and caveolin-1-independent endocytosis: entry of simian virus 40 into cells devoid of *caveolae*. *J Cell Biol.* 2005 ; 168(3):477-88.
59. Danthi P, Tosteson M, Li QH, Chow M. Genome delivery and ion channel properties are altered in VP4 mutants of poliovirus. *J Virol.* 2003 ; 77(9):5266-74.
60. Danthi P, Chow M. Cholesterol removal by methyl-beta-cyclodextrin inhibits poliovirus entry. *J Virol.* 2004 ; 78(1):33-41.
61. Dardanoni L, Zaffiro P. [Identification of ECHO viruses by means of hemagglutinin-inhibition reaction.] *Boll Ist Sieroter Milan.* 1959 ; 38:441-5
62. DeTulleo L, Kirchhausen T. The clathrin endocytic pathway in viral infection. *EMBO J.* 1998 ; 17(16):4585-93.
63. Diaz F, Rodriguez-Boulan E. Open sesame! Coxsackieviruses conspire to trespass the tight junctional gate. *Dev Cell.* 2006 ; 10(2):151-2.
64. Doedens JR & Kirkegaard K. Inhibition of cellular protein secretion by poliovirus proteins B and 3A. *E.M.B.O. J.* 1995 ; 14:894-907.
65. Doedens JR, Giddings TH Jr, Kirkegaard K. Inhibition of endoplasmic reticulum-to-Golgi traffic by poliovirus protein 3A: genetic and ultrastructural analysis. *J Virol.* 1997 ; 71(12):9054-64.
66. Dos Santos GP, Skraba I, Oliveira D, Lima AA, de Melo MM, Kmetzsch CI, da Costa EV, da Silva EE. Enterovirus meningitis in Brazil, 1998-2003. *J Med Virol.* 2006 ; 78(1):98-104.
67. Dourmashkin RR, Tyrrell DA. Electron microscopic observations on the entry of influenza virus into susceptible cells. *J Gen Virol.* 1974 ; 24(1):129-41.
68. Dove AW, Racaniello VR. Cold-adapted poliovirus mutants bypass a postentry replication block. *J Virol.* 1997 ; 71(6):4728-35.
69. Drzeniek R, Bilello P. Absence of glycoproteins in poliovirus particles. *J Gen Virol.* 1974 ; 25(1):125-32.
70. Ellard FM, Drew J, Blakemore WE, Stuart DI, King AM. Evidence for the role of His-142 of protein 1C in the acid-induced disassembly of foot-and-mouth disease virus capsids. *J Gen Virol.* 1999 ; 80 (Pt 8):1911-8.
71. El-Sageyer MM, Szendroi A, Hutter E, et al. Characterization of an echovirus type 11' (prime) epidemic strain causing haemorrhagic syndrome in newborn babies in Hungary. *Acta Virol.* 1998 ; 2:157-66.
72. Ehrlich M, Boll W, Van Oijen A, Hariharan R, Chandran K, Nibert ML, Kirchhausen T. Endocytosis by random initiation and stabilization of clathrin-coated pits. *Cell.* 2004 ; 118(5):591-605.
73. Evans DJ, Almond JW. Cell receptors for picornaviruses as determinants of cell tropism and pathogenesis. *Trends Microbiol.* 1998 ; 6(5):198-202. Review.
74. Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, et al., eds. *Virus Taxonomy : Classification and Nomenclature of Viruses. Eight Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses.* San Diego, CA: Elsevier Academic Press. 2005.

Références bibliographiques

75. Flowers JM, Powell JF, Leigh PN, Andersen P, Shaw CE. Intron 7 retention and exon 9 skipping EAAT2 mRNA variants are not associated with amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 2001 ; 49(5):643-9.
76. Fox G, Parry NR, Barnett PV, McGinn B, Rowlands DJ, Brown F. The cell attachment site on foot-and-mouth disease virus includes the amino acid sequence RGD (arginine-glycine-aspartic acid). *J Gen Virol.* 1989 ; 70 (Pt 3):625-37.
77. Fra AM, Williamson E, Simons K, Parton RG. Detergent-insoluble glycolipid microdomains in lymphocytes in the absence of *caveolae*. *J Biol Chem.* 1994 ; 269(49):30745-8.
78. Freistadt MS, Eberle KE. CD44 is not required for poliovirus replication in cultured cells and does not limit replication in monocytes. *Virology.* 1996 ; 224(2):542-7.
79. Freistadt MS, Eberle KE. Physical association between CD155 and CD44 in human monocytes. *Mol Immunol.* 1997 ; 34(18):1247-57.
80. Fricks CE, Hogle JM. Cell-induced conformational change in poliovirus: externalization of the amino terminus of VP1 is responsible for liposome binding. *J Virol.* 1990 ; 64(5):1934-45.
81. Frisk G. Mechanisms of chronic enteroviral persistence in tissue. *Curr Opin Infect Dis.* 2001 ; 14(3):251-6. Review.
82. Fry EE, Lea SM, Jackson T, Newman JW, Ellard FM, Blakemore WE, Abu-Ghazaleh R, Samuel A, King AM, Stuart DI. The structure and function of a foot-and-mouth disease virus-oligosaccharide receptor complex. *EMBO J.* 1999 ; 18(3):543-54.
83. Fuchs A, Cella M, Giurisato E, Shaw AS, Colonna M. Cutting edge: CD96 (tactile) promotes NK cell-target cell adhesion by interacting with the poliovirus receptor (CD155). *J Immunol.* 2004 ; 172(7):3994-8.
84. Gamarnick AV, Andino R. Switch from translation to RNA replication in a positive-stranded RNA virus. *Genes Dev.* 1998 ; 12, 2293-2304.
85. Gamarnick AV, Andino R. Interactions of viral protein 3C_d and poly(rC)-binding protein with the 5' untranslated region of the poliovirus genome. *J. Virol.* 2000 ; 74, 2219-26.
86. Gaudin OG. Enterovirus. In *Encyclopédie de Médecine et Chirurgie*. Editions techniques eds, Paris. 1991 ; pp1-8.
87. Gilbert JM, Goldberg IG, Benjamin TL. Cell penetration and trafficking of polyomavirus. *J Virol.* 2003 ; 77(4):2615-22.
88. Giraud P, Beaulieux F, Ono S, Shimizu N, Chazot G, Lina B. Detection of enteroviral sequences from frozen spinal cord samples of Japanese ALS patients. *Neurology.* 2001 ; 56(12):1777-8.
89. Goldfield M, Srihongse S, Fox JP. Hemagglutinins associated with certain human enteric viruses. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1957 ; 96(3):788-91.
90. Goodfellow IG, Powell RM, Ward T, Spiller OB, Almond JW, Evans DJ. Echovirus infection of rhabdomyosarcoma cells is inhibited by antiserum to the complement control protein CD59. *J Gen Virol.* 2000 ; 81:1393-401.
91. Goodfellow IG, Sioofy AB, Powell RM, Evans DJ. Echoviruses bind heparan sulfates at the cell surface. *J Virol.* 2001 ; 75:4918-21.
92. Grant RA, Hiremath CN, Filman DJ, Syed R, Andries K, Hogle JM. Structures of poliovirus complexes with anti-viral drugs: implications for viral stability and drug design. *Curr Biol.* 1994 ; 4(9):784-97.
93. Greber UF. Signalling in viral entry. *Cell Mol Life Sci.* 2002 ; 59(4):608-26. Review.

Références bibliographiques

94. Greve JM, Davis G, Meyer AM, Forte CP, Yost SC, Marlor CW, Kamarck ME, McClelland A. The major human rhinovirus receptor is ICAM-1. *Cell*. 1989 ; 56(5):839-47.
95. Gromeier M, Wimmer E. Mechanism of injury-provoked poliomyelitis. *J Virol*. 1998 ; 72(6):5056-60.
96. Gromeier M, Bossert B, Arita M, et al. Dual stem loops within the poliovirus internal ribosome entry site control neurovirulence. *J Virol*. 1999 ; 73:958-64.
97. Hadfield AT, Diana GD, Rossmann MG. Analysis of three structurally related antiviral compounds in complex with human rhinovirus 16. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 ; 96(26):14730-5.
98. Hanecak R, Semler BL, Anderson CW, et al. Proteolytic processing of poliovirus polypeptides: antibodies to polypeptide P3-7c inhibit cleavage at glutamine-glycine pairs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982 ; 79:3973-7.
99. He Y, Bowman VD, Mueller S, et al. Interaction of the poliovirus receptor with poliovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 ; 97:79-84.
100. Helenius A. Virus entry and uncoating. In D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), *Fields Virology*, 5th ed, vol. 1. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, Pa. 2007 ; 99-118.
101. Hellen CU, Lee CK, Wimmer E. Determinants of substrate recognition by poliovirus 2A proteinase. *J Virol*. 1992 ; 66:3330-8.
102. Hellen CU, Wimmer E. Translation of encephalomyocarditis virus RNA by internal ribosomal entry. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1995 ; 203:31-63. Review.
103. Hewat EA, Neumann E, Conway JF, Moser R, Ronacher B, Marlovits TC, Blaas D. The cellular receptor to human rhinovirus 2 binds around the 5-fold axis and not in the canyon: a structural view. *EMBO J*. 2000 ; 19(23):6317-25.
104. Hewat EA, Blaas D. Cryoelectron microscopy analysis of the structural changes associated with human rhinovirus type 14 uncoating. *J Virol*. 2004 ; 78(6):2935-42.
105. Hiremath CN, Grant RA, Filman DJ, Hogle JM. Binding of the antiviral drug WIN51711 to the sabin strain of type 3 poliovirus: structural comparison with drug binding in rhinovirus 14. *Acta Crystallogr B Biol Crystallogr*. 1995 ; 51(Pt 4):473-89.
106. Hofer F, Gruenberger M, Kowalski H, Machat H, Huettinger M, Kuechler E, Blaas D. Members of the low density lipoprotein receptor family mediate cell entry of a minor-group common cold virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 ; 91(5):1839-42.
107. Hogle JM. Poliovirus cell entry: common structural themes in viral cell entry pathways. *Annu Rev Microbiol*. 2002 ; 56:677-702. Epub 2002 Jan 30. Review.
108. Honig EI, Melnick JL, Isacson P, Parr R, Myers IL, Walton M. An epidemiological study of enteric virus infections: poliomyelitis, coxsackie, and orphan (ECHO) viruses isolated from normal children in two socioeconomic groups. *J Exp Med*. 1956 ; 103(2):247-62.
109. Hoover-Litty H, Greve JM. Formation of rhinovirus-soluble ICAM-1 complexes and conformational changes in the virion. *J Virol*. 1993 ; 67(1):390-7.
110. Hovi T, Cantell K, Huovilainen A, Kinnunen E, Kuronen T, Lapinleimu K, Poyry T, Roivainen M, Salama N, Stenvik M, et al. Outbreak of paralytic poliomyelitis in Finland: widespread circulation of antigenically altered poliovirus type 3 in a vaccinated population. *Lancet*. 1986 ; 1(8495):1427-32.
111. Huber SA. VCAM-1 is a receptor for encephalomyocarditis virus on murine vascular endothelial cells. *J Virol*. 1994 ; 68(6):3453-8.

Références bibliographiques

112. Hughes PJ, Horsnell C, Hyypia T, Stanway G. The coxsackievirus A9 RGD motif is not essential for virus viability. *J Virol.* 1995 ; 69(12):8035-40.
113. Ida-Hosonuma M, Sasaki Y, Toyoda H, Nomoto A, Gotoh O, Yonekawa H, Koike S. Host range of poliovirus is restricted to simians because of a rapid sequence change of the poliovirus receptor gene during evolution. *Arch Virol.* 2003 ; 148(1):29-44
114. Ida-Hosonuma M, Iwasaki T, Yoshikawa T, Nagata N, Sato Y, Sata T, Yoneyama M, Fujita T, Taya C, Yonekawa H, Koike S. The alpha/beta interferon response controls tissue tropism and pathogenicity of poliovirus. *J Virol.* 2005 ; 79(7):4460-9.
115. Jackson T, Ellard FM, Ghazaleh RA, Brookes SM, Blakemore WE, Corteyn AH, Stuart DI, Newman JW, King AM. Efficient infection of cells in culture by type O foot-and-mouth disease virus requires binding to cell surface heparan sulfate. *J Virol.* 1996 ; 70(8):5282-7.
116. Jacobson SJ, Konings DA & Sarnow P. Biochemical and genetic evidence for a pseudoknot structure at the 3' terminus of the poliovirus RNA genome and its role in viral RNA amplification. *J Virol.* 1993 ; 67:2961-71.
117. Jacques J, Bouscambert-Duchamp M, Moret H, Carquin J, Brodard V, Lina B, Motte J, Andréoletti L. Association of respiratory picornaviruses with acute bronchiolitis in French infants. *J Clin Virol.* 2006 ; 35(4):463-6.
118. Jartti T, Lehtinen P, Vuorinen T, Osterback R, van den Hoogen B, Osterhaus AD, Ruuskanen O. Respiratory picornaviruses and respiratory syncytial virus as causative agents of acute expiratory wheezing in children. *Emerg Infect Dis.* 2004 ; 10(6):1095-101.
119. Johnson KL, Sarnow P. Three poliovirus 2B mutants exhibit noncomplementable defects in viral RNA amplification and display dosage-dependent dominance over wild-type poliovirus. *J Virol.* 1991 ; 65(8):4341-9.
120. Joki-Korpela P, Marjomaki V, Krogerus C, Heino J, Hyypia T. Entry of human parechovirus 1. *J Virol.* 2001 ; 75:1958-67.
121. Junttila N, Leveque N, Kabue JP, Cartet G, Mushiya F, Muyembe-Tamfum JJ, Trompette A, Lina B, Magnus LO, Chomel JJ, Norder H. New enteroviruses, EV-93 and EV-94, associated with acute flaccid paralysis in the Democratic Republic of the Congo. *J Med Virol.* 2007 ; 79(4):393-400.
122. Kaplan G, Totsuka A, Thompson P, Akatsuka T, Moritsugu Y, Feinstone SM. Identification of a surface glycoprotein on African green monkey kidney cells as a receptor for hepatitis A virus. *EMBO J.* 1996 ; 15(16):4282-96.
123. Kitamura N, Semler BL, Rothberg PG, Larsen GR, Adler CJ, Dorner AJ, Emini EA, Hanecak R, Lee JJ, van der Werf S, Anderson CW, Wimmer E. Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. *Nature.* 1981 ; 291:547-53.
124. Koike S, Taya C, Kurata T, Abe S, Ise I, Yonekawa H, Nomoto A. Transgenic mice susceptible to poliovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 ; 88(3):951-5.
125. Kolatkar PR, Bella J, Olson NH, Bator CM, Baker TS, Rossmann MG. Structural studies of two rhinovirus serotypes complexed with fragments of their cellular receptor. *EMBO J.* 1999 ; 18(22):6249-59.
126. Lakadamyali M, Rust MJ, Babcock HP, Zhuang X. Visualizing infection of individual influenza viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 ; 100(16):9280-5.
127. Lama J, Sanz MA, Carroasco L. Genetic analysis of poliovirus protein 3AB abrogate its permeabilizing activity. *FEBS Lett.* 1998 ; 367:5-11.

Références bibliographiques

128. Lee CK, Wimmer E. Proteolytic processing of poliovirus polyprotein: elimination of 2A pro-mediated, alternative cleavage of polypeptide 3CD by in vitro mutagenesis. *Virology*. 1988 ; 166:405-14.
129. Legay V, Deleage C, Beaulieux F, Giraudon P, Aymard M, Lina B. Impaired glutamate uptake and EAAT2 downregulation in an enterovirus chronically infected human glial cell line. *Eur J Neurosci*. 2003 ; 17(9):1820-8.
130. Leparc-Goffart I, Julien J, Fuchs F, Janatova I, Aymard M, Kopecka H. Evidence of presence of poliovirus genomic sequences in cerebrospinal fluid from patients with postpolio syndrome. *J Clin Microbiol*. 1996 ; 34(8):2023-6.
131. Lerner AM, Gelb LD, Tillotson JR, Carruthers MM, Bailey EJ. Enterovirus hemagglutination: inhibition by aldoses and a possible mechanism. *J Immunol*. 1966 ; 96(4):629-36.
132. Lerner AM, Miranda QR. Cellular interactions of several enteroviruses and a reovirus after treatment with sodium borohydride or carbohydrases. *Virology*. 1968 ; 36(2):277-85.
133. Leveque N, Amine IL, Cartet G, Hammani AB, Khazraji YC, Lina B, Muyembe JJ, Norder H, Chomel JJ. Two outbreaks of acute hemorrhagic conjunctivitis in Africa due to genotype III coxsackievirus A24 variant. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2007 ; 26(3):199-202.
134. Lin CL, Bristol LA, Jin L, Dykes-Hoberg M, Crawford T, Clawson L, Rothstein JD. Aberrant RNA processing in a neurodegenerative disease: the cause for absent EAAT2, a glutamate transporter, in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuron*. 1998 ; 20(3):589-602.
135. Lin TY, Twu SJ, Ho MS, Chang LY, Lee CY. Enterovirus 71 outbreaks, Taiwan: occurrence and recognition. *Emerg Infect Dis*. 2003 ; 9(3):291-3.
136. Magnuson B, Rainey EK, Benjamin T, Baryshev M, Mkrtchian S, Tsai B. ERp29 triggers a conformational change in polyomavirus to stimulate membrane binding. *Mol Cell*. 2005 ; 20(2):289-300.
137. Maizel J, Moscovici C, La Placa M. 1961. Susceptibility of human tumor cells to ECHOvirus and loss of hemagglutinating capacity of some of the adapted viruses. *Arch Ges Virusforsch*. 1961 ; 11:209-14.
138. Marjomaki V, Pietiainen V, Matilainen H, Upla P, Ivaska J, Nissinen L, Reunanen H, Huttunen P, Hyypia T, Heino J. Internalization of echovirus 1 in *caveolae*. *J Virol*. 2002 ; 76 (4), 1856-65.
139. Marsh M, Helenius A. Virus entry into animal cells. *Adv Virus Res*. 1989 ; 36:107-51. Review.
140. Marsh M, Bron R. SFV infection in CHO cells: cell-type specific restrictions to productive virus entry at the cell surface. *J Cell Sci*. 1997 ; 110(Pt 1):95-103.
141. Mason PW, Baxt B, Brown F, Harber J, Murdin A, Wimmer E. Antibody-complexed foot-and-mouth disease virus, but not poliovirus, can infect normally insusceptible cells via the Fc receptor. *Virology*. 1993 ; 192(2):568-77.
142. Mason PW, Rieder E, Baxt B. RGD sequence of foot-and-mouth disease virus is essential for infecting cells via the natural receptor but can be bypassed by an antibody-dependent enhancement pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 ; 91(5):1932-6.
143. Matlin KS, Reggio H, Helenius A, Simons K. Pathway of vesicular stomatitis virus entry leading to infection. *J Mol Biol*. 1982 ; 156(3):609-31.
144. McCarthy PL, Klig JE, Kennedy WP, Kahn JS. Fever without apparent source on clinical examination, lower respiratory infections in children, and enterovirus infections. *Curr Opin Pediatr*. 2000 ; 12(1):77-95. Review.
145. McClelland A, de Bear J, Yost SC, Meyer AM, Marlor CW, Greve JM. Identification of monoclonal antibody epitopes and critical residues for rhinovirus binding in domain 1 of intercellular adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 ; 88(18):7993-7.

Références bibliographiques

146. McLaren LC, Holland JJ, Syverton JT. The mammalian cell-virus relationship. I. Attachment of poliovirus to cultivated cells of primate and non-primate origin. *J Exp Med.* 1959 ; 109(5):475-85.
147. McSharry JJ, Caligiuri LA, Eggers HJ. Inhibition of uncoating of poliovirus by arildone, a new antiviral drug. *Virology.* 1979 ; 97(2):307-15.
148. Meade RH, Chang TW. Zoster-like eruption due to echovirus 6. *Am J Dis Child.* 1979 ; 133(3):283-4.
149. Meier O, Boucke K, Hammer SV, Keller S, Stidwill RP, Hemmi S, Greber UF. Adenovirus triggers macropinocytosis and endosomal leakage together with its clathrin-mediated uptake. *J Cell Biol.* 2002 ; 158(6):1119-31.
150. Melnick JL, Agren K. Poliomyelitis and Coxsackie viruses isolated from normal infants in Egypt. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1952 ; 81(3):621-4.
151. Melnick JL, Cockburn WC, Dalldorf G, et al. Picornavirus group. *Virology.* 1963 ; 19, 114-6.
152. Melnick JL, Schmidt NJ, Hampil B, Ho HH. Lyophilized combination pools of enterovirus equine antisera: preparation and test procedures for the identification of field strains of 19 group A coxsackievirus serotypes. *Intervirology* 1977 ; 4:172-81.
153. Melnick JL. Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses and newer enteroviruses. In Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M., et al. Eds. *Virology*, Raven Press, second edition, 1996 ; 549-605.
154. Mendelsohn C, Johnson B, Lionetti KA, Nobis P, Wimmer E, Racaniello VR. Transformation of a human poliovirus receptor gene into mouse cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986 ; 83(20):7845-9.
155. Mendelsohn CL, Wimmer E, Racaniello VR. Cellular receptor for poliovirus: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. *Cell.* 1989 ; 56(5):855-65.
156. Mertens T, Hager H, Hegger HJ. Epidemiology of an outbreak in a maternity unit of infections with an antigenic variant of echovirus 11. *J Med Virol.* 1982 ; 9:81-91.
157. Milne RS, Nicola AV, Whitbeck JC, Eisenberg RJ, Cohen GH. Glycoprotein D receptor-dependent, low-pH-independent endocytic entry of herpes simplex virus type 1. *J Virol.* 2005 ; 79(11):6655-63.
158. Minor P, Brown F, Domingo E, et al. Picornaviridae. *In* Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. Sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Murphy, F.A., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., et al. eds. Summers. Wien, New-York: Springer-Verlag. 1995 ; 329-36.
159. Mirkovic RR, Schmidt NJ, Yin-Murphy M, Melnick JL. A Enterovirus etiology of the 1970 Singapore epidemic of acute conjunctivitis. *Intervirology.* 1974 ; 4(2):119-27.
160. Molla A, Paul AV, Schmid M, et al. Studies on dicistronic polioviruses implicate viral proteinase 2A pro in RNA replication. *Virology.* 1993 ; 196:739-47.
161. Morens DM, Pallansch MA. Epidemiology. *In* Human enterovirus infection. Rotbard, H.A. eds. American Society for Microbiology, Washington, 1995 ; pp 3-23.
162. Morrison ME, He YJ, Wien MW, Hogle JM, Racaniello VR. Homolog-scanning mutagenesis reveals poliovirus receptor residues important for virus binding and replication. *J Virol.* 1994 ; 68(4):2578-88.
163. Moscufo N, Yafal AG, Rogove A, Hogle J, Chow M. A mutation in VP4 defines a new step in the late stages of cell entry by poliovirus. *J Virol.* 1993 ; 67(8):5075-8.

Références bibliographiques

164. Muckelbauer JK, Kremer M, Minor I, Tong L, Zlotnick A, Johnson JE, Rossmann MG. Structure determination of coxsackievirus B3 to 3.5 Å resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 1995 ; 51(Pt 6):871-87.
165. Mueller S, Wimmer E. Recruitment of nectin-3 to cell-cell junctions through trans-heterophilic interaction with CD155, a vitronectin and poliovirus receptor that localizes to alpha(v)beta3 integrin-containing membrane microdomains. *J Biol Chem*. 2003 ; 278(33):31251-60. Epub 2003 May 19.
166. Neff S, Sa-Carvalho D, Rieder E, Mason PW, Blystone SD, Brown EJ, Baxt B. Foot-and-mouth disease virus virulent for cattle utilizes the integrin alpha(v)beta3 as its receptor. *J Virol*. 1998 ; 72(5):3587-94.
167. Nemerow GR. Cell receptors involved in adenovirus entry. *Virology*. 2000 ; 274(1):1-4. Review.
168. Neufeld KL, Richards OC, Ehrenfeld E. Purification, characterization, and comparison of poliovirus RNA polymerase from native and recombinant sources. *J Biol Chem*. 1991 ; 266(35):24212-9.
169. Nix WA, Berger MM, Oberste MS, Brooks BR, McKenna-Yasek DM, Brown RH Jr, Roos RP, Pallansch MA. Failure to detect enterovirus in the spinal cord of ALS patients using a sensitive RT-PCR method. *Neurology*. 2004 ; 62(8):1372-7.
170. Norder H, Bjerregaard L, Magnus L, Lina B, Aymard M, Chomel JJ. Sequencing of 'untypable' enteroviruses reveals two new types, EV-77 and EV-78, within human enterovirus type B and substitutions in the BC loop of the VP1 protein for known types. *J Gen Virol*. 2003 ; 84(Pt 4):827-36.
171. Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Flemister MR, Brown BA, Pallansch MA. Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. *J Clin Microbiol*. 1999 ; 37(5):1288-93.
172. Oberste M, Schnurr D, Maher K, al-Busaidy S, Pallansch M. Molecular identification of new picornaviruses and characterization of a proposed enterovirus 73 serotype. *J. Gen. Virol*. 2001 ; 82(2):409-416.
173. Oberste MS, Michele SM, Maher K, Schnurr D, Cisterna D, Junttila N, Uddin M, Chomel JJ, Lau CS, Ridha W, al-Busaidy S, Norder H, Magnus LO, Pallansch MA. Molecular identification and characterization of two proposed new enterovirus serotypes, EV74 and EV75. *J Gen Virol*. 2004 ; 85(Pt 11):3205-12.
174. Oberste MS, Maher K, Michele SM, Belliot G, Uddin M, Pallansch MA. Enteroviruses 76, 89, 90 and 91 represent a novel group within the species Human enterovirus A. *J Gen Virol*. 2005 ; 86(Pt 2):445-51.
175. Oberste MS, Maher K, Nix WA, Michele SM, Uddin M, Schnurr D, Al-Busaidy S, Akoua-Koffi C, Pallansch MA. Molecular identification of 13 new enterovirus types, EV79-88, EV97, and EV100-101, members of the species Human Enterovirus B. *Virus Res*. 2007
176. Palacios G, Oberste MS. Enteroviruses as agents of emerging infectious diseases. *J Neurovirol*. 2005 ; 11(5):424-33. Review.
177. Parton RG, Richards AA. Lipid rafts and *caveolae* as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms. *Traffic*. 2003 ; 4(11):724-38. Review.
178. Pasch A, Kupper JH, Wolde A, Kandolf R, Selinka HC. Comparative analysis of virus-host cell interactions of haemagglutinating and non-haemagglutinating strains of coxsackievirus B3. *J Gen Virol*. 1999 ; 80:3153-8.
179. Paul AV, van Boom JH, Filippov D, Wimmer E. Protein-primed RNA synthesis by purified poliovirus RNA polymerase. *Nature*. 1998 ; 393:280-284.
180. Pelkmans L, Kartenbeck J, Helenius A. Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat Cell Biol*. 2001 ; 3(5):473-83.

Références bibliographiques

181. Pelkmans L, Puntener D, Helenius A. Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of *caveolae*. *Science*. 2002 ; 296(5567):535-9.
182. Pelkmans L, Helenius A. Insider information: what viruses tell us about endocytosis. *Curr Opin Cell Biol*. 2003 ; 15(4):414-22. Review.
183. Pelkmans L, Burli T, Zerial M, Helenius A. Caveolin-stabilized membrane domains as multifunctional transport and sorting devices in endocytic membrane traffic. *Cell*. 2004 ; 118(6):767-80.
184. Pelkmans L, Fava E, Grabner H, Hannus M, Habermann B, Krausz E, Zerial M. Genome-wide analysis of human kinases in clathrin- and *caveolae*/raft-mediated endocytosis. *Nature*. 2005 ; 436(7047):78-86.
185. Pelkmans L, Zerial M. Kinase-regulated quantal assemblies and kiss-and-run recycling of *caveolae*. *Nature*. 2005 ; 436(7047):128-33.
186. Pelletier J, Sonenberg N. Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from the poliovirus RNA. *Nature*. 1988 ; 334:320-5.
187. Perez L, Carrasco L. Entry of poliovirus into cells does not require a low-pH step. *J Virol*. 1993 ; 67(8):4543-8.
188. Pevear DC, Fancher MJ, Felock PJ, Rossmann MG, Miller MS, Diana G, Treasurywala AM, McKinlay MA, Dutko FJ. Conformational change in the floor of the human rhinovirus canyon blocks adsorption to HeLa cell receptors. *J Virol*. 1989 ; 63(5):2002-7.
189. Pfeiffer JK, Kirkegaard K. Bottleneck-mediated quasispecies restriction during spread of an RNA virus from inoculation site to brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 ; 103(14):5520-5.
190. Philipson L, Purnell W, Choppin MD. On the role of virus sulfhydryl groups in the attachment of enteroviruses to erythrocyte. *J Exp Med*. 1960 ; 112:455-78.
191. Philipson L, Bengtsson S, Brishammar S, Svennerholm L, Zetterqvist O. Purification and chemical analysis of the erythrocyte receptor for hemagglutinating enteroviruses. *Virology*. 1964 ; 22:580-90.
192. Pierangeli A, Bucci M, Pagnotti P, et al. Mutational analysis of the 3'-terminal extra-cistronic region of poliovirus RNA: secondary structure is not only requirement for minus strand RNA replication. *FEBS Lett*. 1995 ; 374:327-32.
193. Pietiainen V, Marjomaki V, Upla P, Pelkmans L, Helenius A, Hyypia T. Echovirus 1 endocytosis into caveosomes requires lipid rafts, dynamin II, and signaling events. *Mol Biol Cell*. 2004 ; 15(11):4911-25.
194. Pilipenko EV, Poperechny KV, Maslova SV, et al. Cis-element, oriR, involved in the initiation of (-) strand poliovirus RNA : a quasi-globular multi-domain RNA structure maintained by tertiary "kissing" interactions. *EMBO J*. 1996 ; 15:5428-36.
195. Podoplekin VD. Effect of tissue cultures on the haemagglutinating properties of Echo viruses and mechanism of the interaction of these viruses with erythrocytes. *Acta Virol*. 1964 ; 8:254-62.
196. Porter AG. Picornavirus non structural proteins: emerging roles in virus replication and inhibition of host cell functions. *J Virol*. 1993 ; 69:7169-79.
197. Powell RM, Ward T, Evans DJ, Almond JW. Interaction between echovirus 7 and its receptor, decay-accelerating factor (CD55): evidence for a secondary cellular factor in A-particle formation. *J Virol*. 1997 ; 71(12):9306-12.
198. Powell RM, Schmitt V, Ward T, Goodfellow I, Evans DJ, Almond JW. Characterization of echoviruses that bind decay accelerating factor (CD55): evidence that some haemagglutinating strains use more than one cellular receptor. *J Gen Virol*. 1998 ; 79:1707-13.

Références bibliographiques

199. Powell RM, Ward T, Goodfellow I, Almond JW, Evans DJ. Mapping the binding domains on decay accelerating factor (DAF) for haemagglutinating enteroviruses: implications for the evolution of a DAF-binding phenotype. *J Gen Virol.* 1999 ; 80(Pt 12):3145-52.
200. Purnell W, Choppin MD, Philipson L. The inactivation of enterovirus infectivity by the sulfhydryl reagent p-chloromercuribenzoate. *J Exp Med.* 1961 ; 113:713-4.
201. Racaniello VR. One hundred years of poliovirus pathogenesis. *Virology.* 2006 ; 344(1):9-16. Review.
202. Racaniello VR. Picornaviridae: the viruses and their replication. In D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), *Fields Virology*, 5th ed, vol. 1. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, Pa. 2007 ; 795-838.
203. Ren RB, Costantini F, Gorgacz EJ, Lee JJ, Racaniello VR. Transgenic mice expressing a human poliovirus receptor: a new model for poliomyelitis. *Cell.* 1990 ; 63(2):353-62.
204. Richter J, Koptides D, Tryfonos C, Christodoulou C. Molecular typing of enteroviruses associated with viral meningitis in Cyprus, 2000-2002. *J Med Microbiol.* 2006 ; 55(Pt 8):1035-41.
205. Richterova Z, Liebl D, Horak M, Palkova Z, Stokrova J, Hozak P, Korb J, Forstova J. *Caveolae* are involved in the trafficking of mouse polyomavirus virions and artificial VP1 pseudocapsids toward cell nuclei. *J Virol.* 2001 ; 75(22):10880-91.
206. Rohll JB, Percy N, Ley R, et al. The 5'-untranslated regions of picornavirus RNAs contain independent functional domains essential for RNA replication and translation. *J Virol.* 1994 ; 65:4735-40.
207. Roivainen M, Piirainen L, Hovi T, Virtanen I, Riikonen T, Heino J, Hyypia T. Entry of coxsackievirus A9 into host cells: specific interactions with alpha v beta 3 integrin, the vitronectin receptor. *Virology.* 1994 ; 203(2):357-65.
208. Rossmann MG. The canyon hypothesis. Hiding the host cell receptor attachment site on a viral surface from immune surveillance. *J Biol Chem.* 1989 ; 264(25):14587-90. Review.
209. Rossmann MG, He Y, Kuhn RJ. Picornavirus-receptor interactions. *Trends Microbiol.* 2002 ; 10(7):324-31. Review.
210. Rotbart, H.A. Meningitis and encephalitis. In *Enterovirus infections*. Rotbart, H.A. eds. American Society for Microbiology, Washington. 1995 ; 271-289.
211. Rousset D, Rakoto-Andrianarivelo M, Razafindratsimandresy R, Balanant J, Delpeyroux F. [Poliovirus vaccination and emergence of recombinant vaccine derived from vaccinal strains in Madagascar.] *Med Mal Infect.* 2004 ; 34(Suppl 1):S65-S66.
212. Rubinstein SJ, Hammerle T, Wimmer E, et al. Infection of HeLa cells with poliovirus results in modification of a complex that binds the rRNA promoter. *J Virol.*, 1992 ; 66:3062-68.
213. Rueckert RR. Picornaviridae: the viruses and their replication. In *Fundamental virology*, third edition. Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, R.M., et al. eds. Philadelphia, Lipincott-Raven publishers. 1996 ; 609-654.
214. Rust MJ, Lakadamyali M, Zhang F, Zhuang X. Assembly of endocytic machinery around individual influenza viruses during viral entry. *Nat Struct Mol Biol.* 2004 ; 11(6):567-73.
215. Sanchez-San Martin C, Lopez T, Arias CF, Lopez S. Characterization of rotavirus cell entry. *J Virol.* 2004 ; 78(5):2310-8.
216. Sandoval IV & Carosco L. Poliovirus infection and expression of the poliovirus protein 2B provoke the disassembly of the Golgi complex, the organelle target for the antipoliovirus drug Ro-090179. *J Virol.* 1997 ; 71:4679-93.

Références bibliographiques

217. Sarnow P. Role of the 3'-end sequences in infectivity of poliovirus transcripts made in vitro. *J Virol.* 1989 ; 63:467-70.
218. Schlegel A & Kirkegaard K. Cell biology of enterovirus infections. In *Human enterovirus infections*. Rotbard, H.A. eds. American Society for Microbiology, Washington. 1995 ; 135-54.
219. Schmidt NJ, Dennis J, Hoffman MN, Lennette EH. Inhibitors of Echovirus and reovirus hemagglutination. II. Serum and phospholipids inhibitors. *J Immunol.* 1964a ; 93:377-86.
220. Schmidt NJ, Dennis J, Hoffman MN, Lennette EH. Inhibitors of Echovirus and reovirus hemagglutination. I. Inhibitors in tissue culture fluids. *J Immunol.* 1964b ; 93:367-76.
221. Selinka HC, Zibert A, Wimmer E. Poliovirus can enter and infect mammalian cells by way of an intercellular adhesion molecule 1 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 ; 88(9):3598-602.
222. Selinka HC, Zibert A, Wimmer E. A chimeric poliovirus/CD4 receptor confers susceptibility to poliovirus on mouse cells. *J Virol.* 1992 ; 66(4):2523-6.
223. Seth P, Fitzgerald DJ, Willingham MC, Pastan I. Role of a low-pH environment in adenovirus enhancement of the toxicity of a *Pseudomonas* exotoxin-epidermal growth factor conjugate. *J Virol.* 1984 ; 51(3):650-5.
224. Shafren DR, Bates RC, Agrez MV, Herd RL, Burns GF, Barry RD. Coxsackieviruses B1, B3, and B5 use decay accelerating factor as a receptor for cell attachment. *J Virol.* 1995 ; 69(6):3873-7.
225. Shafren DR, Dorahy DJ, Ingham RA, Burns GF, Barry RD. Coxsackievirus A21 binds to decay-accelerating factor but requires intercellular adhesion molecule 1 for cell entry. *J Virol.* 1997a ; 71(6):4736-43.
226. Shafren, D.R., Williams, D.T., Barry R.D. A decay-accelerating factor-binding strain of coxsackievirus B3 requires the coxsackievirus-adenovirus receptor protein to mediate lytic infection of rhabdomyosarcoma cells. *J Virol.* 1997b ; 71:9844-8.
227. Shafren DR, Dorahy DJ, Thorne RF, Kinoshita T, Barry RD, Burns GF. Antibody binding to individual short consensus repeats of decay-accelerating factor enhances enterovirus cell attachment and infectivity. *J Immunol.* 1998 ; 160(5):2318-23.
228. Shaw PJ, Ince PG. Glutamate, excitotoxicity and amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol.* 1997 ; 244 Suppl 2:S3-14. Review.
229. Shepley MP, Racaniello VR. A monoclonal antibody that blocks poliovirus attachment recognizes the lymphocyte homing receptor CD44. *J Virol.* 1994 ; 68(3):1301-8.
230. Shieh, Y.C., Calci, K.R. & Baric, R.S. A method to detect low levels of enteric viruses in contaminated oysters. *Appl Environ Microbiol.* 1999 ; 65:4709-14.
231. Sieczkarski SB, Whittaker GR. Dissecting virus entry via endocytosis. *J Gen Virol.* 2002 ; 83(Pt 7):1535-45. Review.
232. Sieczkarski SB, Whittaker GR. Differential requirements of Rab5 and Rab7 for endocytosis of influenza and other enveloped viruses. *Traffic.* 2003 ; 4(5):333-43.
233. Simons, K., Ikonen, E. Functional rafts in cell membranes. *Nature.* 1997 ; 387 (6633):569-72.
234. Skinner, M.A., Racaniello, V.R., Dunn, G., et al. New model for the secondary structure of the 5' non-coding RNA of poliovirus is supported by biochemical and genetic data that also show that RNA secondary structure is important in neurovirulence. *J Mol Biol.* 1989 ; 207:379-92.

Références bibliographiques

235. Smith TJ, Kremer MJ, Luo M, Vriend G, Arnold E, Kamer G, Rossmann MG, McKinlay MA, Diana GD, Otto MJ. The site of attachment in human rhinovirus 14 for antiviral agents that inhibit uncoating. *Science*. 1986 ; 233(4770):1286-93.
236. Smith TJ, Chase ES, Schmidt TJ, Olson NH, Baker TS. Neutralizing antibody to human rhinovirus 14 penetrates the receptor-binding canyon. *Nature*. 1996 ; 383(6598):350-4.
237. Snyers L, Zwickl H, Blaas D. Human rhinovirus type 2 is internalized by clathrin-mediated endocytosis. *J Virol*. 2003 ; 77(9):5360-9.
238. Spear PG. Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry. *Cell Microbiol*. 2004 ; 6(5):401-10. Review.
239. Stanway G., Brown F., Christian P., Hovi T., Hyypiä T., King A.M.Q., Knowles N.J., Lemon S.M., Minor P.D., Pallansch M.A., Palmenberg A.C., Skern T. 2005. Picornaviridae. *In* : Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A. (Eds.), *Virus Taxonomy*. Eighth report of the international committee on the taxonomy of viruses. Elsevier Academic Press, Amsterdam, pp. 757-778.
240. Staunton DE, Merluzzi VJ, Rothlein R, Barton R, Marlin SD, Springer TA. A cell adhesion molecule, ICAM-1, is the major surface receptor for rhinoviruses. *Cell*. 1989 ; 56(5):849-53.
241. Stuart AD, Eustace HE, McKee TA, Brown TDK. A novel cell entry pathway for a DAF-using human enterovirus is dependent on lipid rafts. *J Virol*. 2002 ; 76 (18):9307-22.
242. Svitkin YV, Maslova SV & Agol VLI. The genomes of attenuated and virulent poliovirus strains differ in their in vitro translation efficiency. *Virology*. 1985 ; 147:243-52.
243. Tagawa A, Mezzacasa A, Hayer A, Longatti A, Pelkmans L, Helenius A. Assembly and trafficking of caveolar domains in the cell: *caveolae* as stable, cargo-triggered, vesicular transporters. *J Cell Biol*. 2005 ; 170(5):769-79.
244. Thomsen P, Roepstorff K, Stahlhut M, van Deurs B. *Caveolae* are highly immobile plasma membrane microdomains, which are not involved in constitutive endocytic trafficking. *Mol Biol Cell*. 2002 ; 13(1):238-50.
245. Tillotson JR, Lerner AM. Effect of periodate oxidation on hemagglutinating and antibody-producing capacities of certain enteroviruses and reoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1966 ; 56(4):1143-50.
246. Tomasec P, Wang EC, Davison AJ, Vojtesek B, Armstrong M, Griffin C, McSharry BP, Morris RJ, Llewellyn-Lacey S, Rickards C, Nomoto A, Sinzger C, Wilkinson GW. Downregulation of natural killer cell-activating ligand CD155 by human cytomegalovirus UL141. *Nat Immunol*. 2005 ; 6(2):181-8. Epub 2005 Jan 9.
247. Tosteson MT, Chow M. Characterization of the ion channels formed by poliovirus in planar lipid membranes. *J Virol*. 1997 ; 71(1):507-11.
248. Triantafilou K, Triantafilou M, Takada Y, Fernandez N. Human parechovirus 1 utilizes integrins alphavbeta3 and alphavbeta1 as receptors. *J Virol*. 2000 ; 74(13):5856-62.
249. Triantafilou K, Triantafilou M. Lipid raft microdomains: key sites for Coxsackievirus A9 infectious cycle. *Virology*. 2003 ; 317(1):128-35.
250. Triantafilou K, Triantafilou M. Lipid raft-dependent Coxsackievirus B4 internalization and rapid targeting to the Golgi. *Virology*. 2004 ; 326(1):6-19.
251. Tsukiyama-Kohara, K., Iizuka, N., Kohara, M., et al.. Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J Virol*. 1992 ; 66:1476-83.
252. Uncapher CR, DeWitt CM, Colonno RJ. The major and minor group receptor families contain all but one human rhinovirus serotype. *Virology*. 1991 ; 180(2):814-7.

Références bibliographiques

253. Upla P, Marjomaki V, Kankaanpaa P, Ivaska J, Hyypia T, Van Der Goot FG, Heino J. Clustering induces a lateral redistribution of alpha 2 beta 1 integrin from membrane rafts to *caveolae* and subsequent protein kinase C-dependent internalization. *Mol Biol Cell*. 2004 ; 15(2):625-36. Epub 2003 Dec 2.
254. Van Kuppeveld FJ, Hoenderop JGJ, Smeets RLL, et al. Coxsackievirus protein 2B modifies endoplasmic reticulum membrane and plasma membrane permeability and facilitates virus release. *EMBO J*. 1997 ; 16:3519-32.
255. Van de Stolpe A, Van der Saag PT. Intercellular adhesion molecule-1. *J Mol Med*. 1996 ; 74(1):13-33. Review.
256. Van Vlijmen HW, Curry S, Schaefer M, Karplus M. Titration calculations of foot-and-mouth disease virus capsids and their stabilities as a function of pH. *J Mol Biol*. 1998 ; 275(2):295-308.
257. Ventura KC, Hawkins H, Smith MB, and Walker DH. Fatal neonatal echovirus 6 infection: autopsy case report and review of the literature. *Mod Pathol*. 2001 ; 14:85-90.
258. Verdaguer N, Fita I, Reithmayer M, Moser R, Blaas D. X-ray structure of a minor group human rhinovirus bound to a fragment of its cellular receptor protein. *Nat Struct Mol Biol*. 2004 ; 11(5):429-34.
259. Vignuzzi M, Stone JK, Arnold JJ, Cameron CE, Andino R. Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population. *Nature*. 2006 ; 439(7074):344-8.
260. Ward T, Powell RM, Pipkin PA, Evans DJ, Minor PD, and Almond JW. Role for beta2-microglobulin in echovirus infection of rhabdomyosarcoma cells. *J Virol*. 1998 ; 72:5360-65.
261. Williams CH, Kajander T, Hyypia T, Jackson T, Sheppard D, Stanway G. Integrin alpha v beta 6 is an RGD-dependent receptor for coxsackievirus A9. *J Virol*. 2004 ; 78(13):6967-73.
262. Wimmer E., Hellen C.U., Cao X. Genetics of poliovirus. *Ann Rev Gen*. 1993 ; 27:353-436.
263. Woodall CJ, Riding MH, Graham DI, Clements GB. Sequences specific for enterovirus detected in spinal cord from patients with motor neurone disease. *BMJ*. 1994 ; 308(6943):1541-3.
264. Xiang W, Harris KS, Alexander L, Wimmer E. Interaction between the 5'-terminal cloverleaf and 3AB/3CDpro of poliovirus is essential for RNA replication. *J Virol*. 1995 ; 69(6):3658-67.
265. Xiang W, Paul AV, Wimmer E. RNA signals in Entero- and Rhinovirus genome replication. *Sem Virol*. 1997 ; 8:256-73.
266. Xing L, Tjarnlund K, Lindqvist B, Kaplan GG, Feigelstock D, Cheng RH, Casasnovas JM. Distinct cellular receptor interactions in poliovirus and rhinoviruses. *EMBO J*. 2000 ; 19(6):1207-16.
267. Xing L, Casasnovas JM, Cheng RH. Structural analysis of human rhinovirus complexed with ICAM-1 reveals the dynamics of receptor-mediated virus uncoating. *J Virol*. 2003 ; 77(11):6101-7.
268. Yen HR, Lien R, Fu RH, Chang LY. Hepatic failure in a newborn with maternal peripartum exposure to echovirus 6 and enterovirus 71. *Eur J Pediatr*. 2003 ; 162(9):648-9.
269. Ypma-Wong MF, Dewalt PG, Johnson VH, et al. Protein 3CD is the major poliovirus proteinase responsible for cleavage of the P1 capsid precursor. *Virology*. 1998 ; 66:265-70.
270. Zajac I, Crowell RL. Location and regeneration of enterovirus receptors of HeLa cells. *J Bacteriol*. 1965 ; 89:1097-100.
271. Zhang S, Racaniello VR. Expression of the poliovirus receptor in intestinal epithelial cells is not sufficient to permit poliovirus replication in the mouse gut. *J Virol*. 1997 ; 71(7):4915-20.

ANNEXES

Annexes

Article en Annexe 1 :

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

Nina Junttila, Nicolas Lévêque, Jean-Pierre Kabue, Gaëlle Cartet, Mushia Fidèle, Jean-Jacques Muyembe, Aurélien Trompette, Larsh Magnus, Bruno Lina, Jean-Jacques Chomel et Helene Norder.

Journal of Medical Virology

2007, 79: 393-400

Article en Annexe 2 :

“Surveillance of enteroviruses in France, 2000-2004”

Denise Antona, Nicolas Lévêque, Sylvie Dubrou, Jean-Jacques Chomel,
Daniel Lévy-Bruhl et Bruno Lina.

European journal of microbiology and infectious diseases
2007, 26(6):403-412

Article en Annexe 3 :

“Two Outbreaks of Acute Hemorrhagic Conjunctivitis in Africa
by genotype III Coxsackievirus A24 variant”

Nicolas Lévêque, Idriss Lalou Amine, Gaëlle Cartet, Amine Hammani,
Youssef Khazraji, Bruno Lina, Jean-Jacques Muyembe, Helene Norder
et Jean-Jacques Chomel.

European journal of microbiology and infectious diseases
2006, 26: 199-202



Echovirus 6 strains derived from a clinical isolate show differences in haemagglutination ability and cell entry pathway

Nicolas Lévêque^{a,b,*}, Helene Norder^{a,c}, Youssef Zreik^{a,b}, Gaëlle Cartet^{a,b}, Delphine Falcon^{a,b}, Nathalie Rivat^{a,b}, Jean-Jacques Chomel^{a,b}, Saw-See Hong^b, Bruno Lina^{a,b}

^a Centre National de Référence des Entérovirus, Laboratoire de Virologie, Centre de Biologie et de Pathologie Est, Institut de Microbiologie, Hospices Civils de Lyon, 69677 Bron, France

^b Laboratoire de Virologie et Pathologie Humaine, CNRS FRE 3011, Université Claude Bernard Lyon 1, Faculté de Médecine RTH Laënnec, 69372 Lyon Cedex 08, France

^c VHE, Swedish Institute for Infectious Disease Control, Sweden

Received 4 November 2006; received in revised form 2 May 2007; accepted 4 May 2007

Abstract

Two echovirus 6 (EV6) strains were isolated from a clinical sample after successive sub-cultures in PLC (human hepatocellular carcinoma) and HeLa (human cervical adenocarcinoma) cells. The first strain retained its haemagglutinating capacity (HAEV6) while the second became non-haemagglutinating (NHAEV6). Virus binding assay showed that HAEV6 was capable of binding to DAF-expressing cells but not NHAEV6 confirming the role of DAF in EV6 haemagglutination. The lack of competition between the two viral strains during coinfections suggested that each strain used a different cell entry pathway. We provide evidence showing that HAEV6 used preferentially the lipid raft-dependent caveolae pathway, whereas NHAEV6 followed the clathrin-mediated pathway. Comparison of the sequences of HAEV6 and NHAEV6 revealed five amino acid changes in the VP1, VP2 and VP3 capsid proteins distributed in domains which are known to be highly immunogenic or suggested to be involved in receptor binding, virion stability and pathogenicity.

© 2007 Published by Elsevier B.V.

Keywords: Echovirus 6; Quasispecies; Haemagglutination; DAF; Endocytosis; Caveolin; Clathrin

1. Introduction

Echovirus 6 (EV6) is a human pathogen of the *Picornaviridae* family and the genus *Enterovirus*, responsible for outbreaks of aseptic meningitis and various infections in neonates and young children (Abe et al., 2000; Chomel et al., 2003; Joo et al., 2005; Ventura et al., 2001). EV6 chronic infections have also been described and thought to be implicated in the development of motor neuron diseases (Berger et al., 2000). The virus has an icosahedral capsid made up of 4 structural proteins (VP1, VP2, VP3 and VP4) with 60 copies each enclosing a single-stranded sense-messenger polyadenylated RNA genome of approximately 7400 nucleotides. Similar to other RNA

viruses, enteroviruses have the capacity to evolve rapidly, as the low fidelity viral RNA-dependent RNA polymerase induces mutations during virus replication in both the structural and non-structural proteins (Bailly et al., 2000). An enterovirus population is therefore a collection of similar but genetically different viruses called quasispecies (Pirainen et al., 1998). This viral genomic heterogeneity could be an advantage to the viral population, as it allows for rapid adaptation to environmental changes that present varying types and degrees of selective pressure (Vignuzzi et al., 2005).

In recent years, the early events involved in picornaviruses infections have been intensively studied. Two different mechanisms have been proposed for the viral genome entry into the cytoplasm of host cells. In the first mechanism, similar to polioviruses, the genome delivery into the cytoplasm occurs by direct penetration across the plasma membrane. This process is initiated by the binding of the virus capsid to its cognate cell surface receptor, the poliovirus receptor (CD155) (Racaniello, 2001). In the second mechanism, the virus is invaginated into

* Corresponding author at: Centre National de Référence des Entérovirus, Laboratoire de Virologie, Centre de Biologie et de Pathologie Est, Institut de Microbiologie, Hospices Civils de Lyon, 69677 Bron, France.

Tel.: +33 4 72 12 96 53; fax: +33 4 72 12 95 00.

E-mail address: nicolas.leveque@chu-lyon.fr (N. Lévêque).

the cell by endocytosis via cellular compartments, such as clathrin-coated vesicles or caveolae (Joki-Korpela et al., 2001; Marjomaki et al., 2002).

Many animal viruses are known to use the receptor-mediated endocytosis pathway for host cell entry. The endocytosis pathway could be either mediated by clathrin lattices or caveolae, which involve specialised cholesterol and sphingolipid domains called lipid rafts (Meier and Greber, 2004). The use of pharmacological inhibitors or specific antibodies against endocytotic components, dominant-negative mutants or small interfering RNAs have been used to characterise the cell entry pathways of some picornaviruses. These studies have identified the clathrin-dependent pathway for human parechovirus 1, human rhinovirus serotype 2 and coxsackievirus B3 and the involvement of lipid rafts for echovirus 1, echovirus 11, coxsackievirus A9 and coxsackievirus B4 (Stuart et al., 2002; Triantafilou and Triantafilou, 2003, 2004). The cell entry pathway of EV6 has thus far, not yet being characterised.

Some EV6 strains have the ability to haemagglutinate human erythrocytes and, this feature is related to the attachment of the virus to the decay accelerating factor (DAF), a 70 kDa glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored glycoprotein on the cell membrane and which play a role in the regulation of complement activation (Powell et al., 1999). DAF also mediates the cell surface attachment and infection of several echovirus such as the serotypes 6, 7, 13, 21, 29 and 33, which are all haemagglutinating viruses (Powell et al., 1998). Like other glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins, DAF are found in lipid rafts cholesterol-rich ordered domains within the plasma membrane at the apical surface of the epithelial cells (Coyne and Bergelson, 2006; Simons and Ikonen, 1997).

In this report, we describe the isolation of two cell culture-derived strains from an EV6 clinical isolate, which differed in their haemagglutinating capacity. The cell entry pathways of the haemagglutinating strain (HAEV6) and the non-haemagglutinating strain (NHAEV6) were characterised in Dev cells, a human glial precursor cell line, and in A549 cells, a human lung carcinoma cell line. Sequence determination of the capsid proteins of HAEV6 and NHAEV6 showed five amino acid differences localised in the VP2, VP3 and VP1 proteins. We demonstrate that the strains used different cell entry pathways, involving lipid rafts for HAEV6 and a clathrin-dependent pathway for NHAEV6. The difference in haemagglutination phenotype and the cell entry pathways may be related to the amino acid differences in the capsid proteins of these two viruses. Our results also confirmed that a clinical isolate can be composed of a mixture of quasispecies capable of using different routes to achieve their entry into cells.

2. Materials and methods

2.1. Virus and cells

A clinical EV6 strain was isolated in human lung fibroblasts (MRC5 cell line) from a throat sample obtained from a patient who suffered from a meningitis. PLC cells (human hepatoma cell line, ATCC) and HeLa cells (Human epithelial carcinoma cell

line, ATCC) used for viral sub-strains selection were cultured in Medium 199 (Cambrex) and Dulbecco's modified Eagle's medium (Cambrex), respectively, supplemented with 10% of fetal calf serum and 2% penicillin and streptomycin (Invitrogen) in a humidified atmosphere (5% CO₂) at 37 °C. Dev cells (precursors of human glial cells) and A549 cells (human lung carcinoma, ATCC) used for viral sub-strains endocytic pathway study were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen) containing 10% fetal calf serum (Cambrex) (Jennings et al., 1992).

2.2. Haemagglutination test

The haemagglutination test was carried out by a microtiter method (Cova and Aymard, 1980). Serial twofold dilutions of the virus were made in 50 µl of 150 mM phosphate buffer solution, pH 8.0, to which 50 µl of 0.75% human erythrocyte O positive suspension was added. The plates were then incubated at 4 °C for 1 h. The HA titres were expressed as the reciprocal of the highest dilution showing haemagglutination.

2.3. Virus binding assay

CHO and CHO-DAF cells in 6-well plates were inoculated with 0.01 MOI of the HA or NHA viruses for 30 min at 4 °C. The cell monolayers were then washed three times with phosphate-buffered saline (PBS) before trypsinization. Virus attachment was then evaluated from 1 × 10⁶ cells using "real-time" RT-PCR analysis described below.

2.4. Competition assay

A549 cells seeded into 6-well culture plate were co-infected by both the haemagglutinating and non-haemagglutinating EV6 strains. A constant multiplicity of infection (MOI) of 1 and 10 was used in HAEV6 infections while NHAEV6 infections were performed at increasing MOI of 0.5, 1, 5, 10, 50 and 100. After 24 h of incubation at 37 °C, a haemagglutination test was performed on each cell supernatant.

2.5. Endocytic entry pathway inhibitors

2.5.1. Drugs

Nystatin (Sigma) was used as a lipid raft-dependent endocytosis disruptor whereas chlorpromazine (Sigma) was utilized to inhibit clathrin-mediated endocytosis (Stuart et al., 2002; Sanchez-San Martin et al., 2004). Nystatin and chlorpromazine were dissolved in dimethyl sulfoxide and water, respectively.

2.5.2. Dominant-negative mutants

The plasmids pCINeo/IRES-GFP/caveolin-1 DN, GFP-EΔ 95/295 Eps15 and GFP-Dyn^{K44A} were kindly provided by Jan Eggermont (Laboratorium voor fysiologie, Leuven, Belgium), Alice Dautry-Varsat (Unité des interactions cellulaires, Institut Pasteur, Paris, France) and Mark A. McNiven (Department of Biochemistry and Molecular Biology, Mayo Cancer Center, Rochester, USA), respectively. The caveolin-1

dominant-negative mutant corresponds to the deletion of amino acids 1–81 which disturbed the formation of caveolin-1 containing lipid rafts resulting in caveolar endocytosis freezing (Trouet et al., 2001). The pGFP-EΔ 95/295 Eps15 expressed a dominant negative form of the Eps15 protein which inhibited endocytosis through clathrin-coated pits (Benmerah et al., 1998). The pGFP-Dyn^{K44A} expressed a dominant-negative mutant of the dynamin reported to inhibit the formation of endocytic vesicles at the plasma membrane (Van der Blik et al., 1993).

2.6. Dev cells treatment by endocytosis disrupting drugs

A total of 10⁶ Dev cells were seeded into tissue culture tubes 5 (TPP) and 2 days later, they were pre-treated with drugs (at various concentrations as shown in the legend of Fig. 2) for 30 min. The cells were then infected with either HAEV6 or NHAEV6 at a multiplicity of infection (MOI) of 0.01 and 1 in medium containing the appropriate concentration of each drug for a further 30 min. Supernatant containing virus was removed, and the cells were washed three times with PBS. Fresh medium containing the drugs was added, and the cells were incubated for a further 8 h. After freeze-thawing, the supernatant of each tube was collected.

2.7. Cell transfections with dominant-negative mutants

A total of 5 × 10⁵ Dev cells or A549 cells were seeded onto a 24-well culture plate at 60–80% confluency and in the absence of antibiotics approximately 24 h before transfection. Cells were transfected with 3 μg/well of plasmid using lipofectamineTM 2000 (Invitrogen) and after 24 h, infected with either HAEV6 or NHAEV6 at an MOI of 0.01 for 30 min. Supernatant containing virus was removed, and the cells were washed three times with PBS. Fresh medium was added, and the cells incubated for a further 8 h. The supernatant of each well were then removed and the cells were collected and tested using the “real-time” RT-PCR assay.

2.8. Evaluation of different endocytosis inhibitors on HAEV6 and NHAEV6 infections

To evaluate the effects of drugs and dominant-negative mutants on HAEV6 and NHAEV6 entry, virus replication in Dev and A549 cells was assayed by “real-time” RT-PCR using cells or supernatant collected at 8 h post-infection. Briefly, RNA was extracted from 140 μl of the sample with the QIAamp Viral RNA minikit (QIAGEN) and eluted in 40 μl of a RNase-free water. An aliquot of 10 μl was then added to a reaction mixture containing RT buffer 2×, 1 μM random hexamers, 1 mM deoxynucleoside triphosphates mix (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ), 10 units of RNase inhibitor (Promega, Madison, WI, USA) and five units of Avian Myeloblastosis Virus (AMV, Promega). The RT reaction mixture was incubated at 42 °C for 45 min and heat inactivated at 95 °C for 4 min. The cDNA was subjected to “real-time” PCR with primers previously described which recognized the 5′ non-translated region of all known enteroviruses (Lina et al., 1996). A 5 μl aliquot of each cDNA

was used in a 25 μl reaction mixture containing 12.5 μl of 2X SYBR[®] Green Master Mix (Applied Biosystems), a 1 μM concentration of the forward and reverse primers. Amplification was performed by denaturation at 95 °C for 10 min followed by 40 cycles: denaturation at 95 °C for 15 s, annealing at 60 °C for 1 min. At the end of the annealing-extension step, the real-time PCR amplification was monitored by quantitative analysis of fluorescence emissions using the ABI Prism 7500 SDS (Applied Biosystems).

2.9. Sequencing of the HAEV6 and NHAEV6 capsid coding regions

The viral RNA from the EV6 strains were extracted as previously described for RT-PCR. The cDNA was then subjected to PCR with four sets of primers in order to amplify the different fragments. The VP4 forward and reverse primers were 5′-CTCCGGCCCCCTGAATGCG-3′ and 5′-GACTTGGTGCCCGTGAATGT-3′, respectively. The VP2 forward and reverse primers were 5′-ACATTCACGGGCACCAAGTC-3′ and 5′-TTGACATGGCGTGTGGGA-3′. The VP3 forward and reverse primers used were 5′-TCGGCCTGCAACGATTTCT-3′ and 5′-AGTCGTGCACTGGCATCTTG-3′. The VP1 forward and reverse primers used were 5′-GGCAACCGGTACAGCAACTT-3′ and 5′-TCNACNAHNCCNGGNCCTCRAA-3′. Ten microliters aliquots of each cDNA was used in 50 μl of PCR reaction mixture containing 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 0.4 μM each of the forward and reverse primers, and 2.5 U of Taq polymerase (Applera) in the appropriate amplification buffer. Amplification was performed by denaturation at 94 °C for 5 min followed by 40 cycles: denaturation at 94 °C for 15 s, annealing at 56 °C for 30 s and extension at 72 °C for 2 min, with a final extension cycle at 72 °C for 10 min. The amplified products were purified using DNA Clean & ConcentratorTM-5 (Zymo Research, CA, USA) according to the manufacturer’s instructions and cycle sequencing was performed using 20 ng of template for 100 nucleotides sequenced and 10 μM of each primer by MWG Biotech (Edersberg, Germany).

3. Results

3.1. Isolation and selection of two cell culture-derived EV6 strains, HAEV6 and NHAEV6

An EV6 strain with a haemagglutination titer of 16 was first isolated from the throat sample of an aseptic meningitis case after culture on human lung fibroblasts (MRC5 cells) routinely used in our laboratory for respiratory viruses isolation. The presence of non-haemagglutinating and haemagglutinating strains in the same clinical isolate was determined by comparing the infectious titers before and after haemagglutination. We postulated that the haemagglutinating strain would be adsorbed on the red blood cells while the non-haemagglutinating strain would remain in the supernatant. After haemagglutination, the infectious titer was found to decrease by 1% (data not shown), implying that the non-haemagglutinating virus was the predominant strain in the clinical sample (Fig. 1). The isolate was then

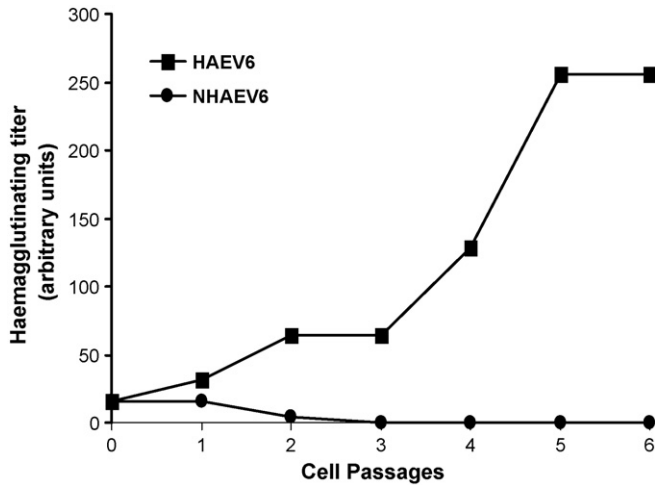


Fig. 1. Evolution of haemagglutination and infectious titers of HAEV6 (solid squares) and NHAEV6 (solid circles) strains selected on PLC and HeLa cells, respectively. The initial EV6 isolate had a haemagglutinating titer of 16 units. The haemagglutinating titers are expressed in arbitrary units.

inoculated either on human hepatocellular carcinoma (PLC) or on human cervical adenocarcinoma (HeLa) cell lines for six successive sub-cultures. The evolution of the haemagglutination titers was analysed before and after each cell passage. (Fig. 1).

The cell culture-derived strain from PLC cells had a final haemagglutinating titer of 256 units for an infectious titre of 2.0×10^6 tissue culture infecting doses (TCID50) in 50 μ l and was named HAEV6. On the contrary, the EV6 strain obtained from HeLa cells lost its haemagglutinating capacity without any loss of infectivity (infectious titre of 4.5×10^5 TCID50) and was named NHAEV6.

3.2. HAEV6 and NHAEV6 show differences in DAF attachment and cell entry pathway

The ability of some EV6 strains to haemagglutinate human erythrocytes has been described to be related to the attachment of the viruses to the DAF receptor (Powell et al., 1998). We therefore tested the attachment of HAEV6 and NHAEV6 to CHO and CHO-DAF cells, at a MOI of 0.01. The binding of the viruses to both cell lines were evaluated by “real-time” RT-PCR on cell samples collected 30 min after addition of the viruses to the cells at 4 °C. HAEV6 attachment on CHO-DAF was observed to be fourfold over the NHAEV6 binding (Fig. 2A). These results indicated that the haemagglutinating property of HAEV6 is directly related to its capacity to bind DAF.

We next investigated the possibility that HAEV6 and NHAEV6 could use different cell entry pathways for infection. To address this question, we looked at the competition between HAEV6 and NHAEV6 in co-infection experiments. A549 cells were simultaneously infected by HAEV6 and NHAEV6, such that a constant MOI of 1 and 10 were used for HAEV6 while NHAEV6 was added at increasing MOI of 0.5, 1, 5, 10, 50 and 100. There was no change in haemagglutinating titer for HAEV6 in the presence of low MOI of the NHAEV6 virus (Fig. 2B). Competition occurred at higher MOI of NHAEV6 as reflected by

the decrease in haemagglutinating titer of HAEV6. These data suggested that at low levels of infection, the two viruses used different receptors and followed different pathways for cell entry.

3.3. Lipid rafts and caveolae are involved in HAEV6 entry

Nystatin is a drug known to disrupt lipid rafts and thus inhibit lipid-raft dependent endocytosis (Stuart et al., 2002; Sanchez-San Martin et al., 2004). To investigate the role of lipid rafts in

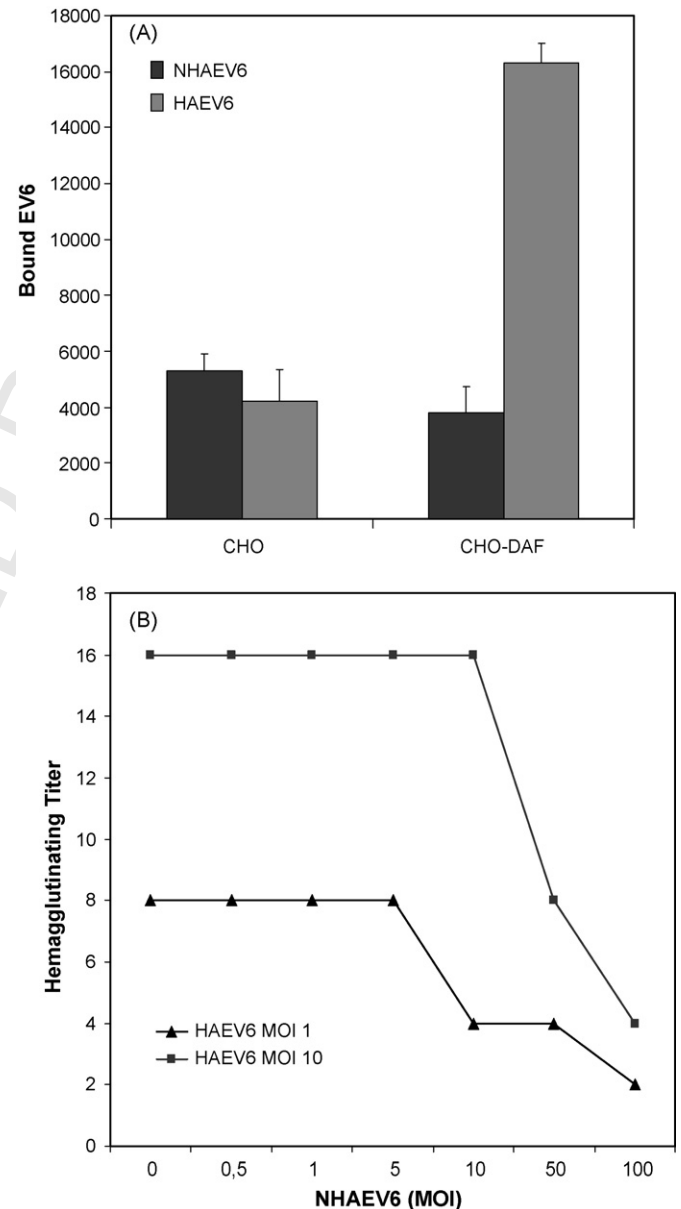


Fig. 2. (A) Binding assay of EV6 strains to DAF. CHO and CHO-DAF cells were incubated with HAEV6 (grey columns) and NHAEV6 (black columns) at MOI of 0.01 for 30 min at 4 °C. Virus attachment on the cells was evaluated using real-time RT-PCR analysis. The data presented are the average of three independent experiments. (B) Assay of competition between HAEV6 and NHAEV6. A549 cells were simultaneously infected with HAEV6 at two fixed MOIs of 1 or 10, while NHAEV6 was added at increasing MOI from 0.5 to 100. The resulting haemagglutinating titer was assessed from each well 24 h post-infection to evaluate the production of progeny HAEV6 in the presence of the competitor NHAEV6. The data presented are from two independent experiments.

HAEV6 and NHAEV6 internalization, Dev cells were infected with the viruses at MOI of 0.01 and 1, in the presence of nystatin and the effects of the drug were assayed 8 h post-infection using the technique of “real-time” RT-PCR to quantify virus replication.

A range of nystatin concentrations was used and it was clearly observed that the effect of the drug on HAEV6 and NHAEV6 infections was comparatively different. At the concentration of 5 μ M, there was 62% and 40% inhibition for HAEV6 infection at MOI of 0.01 and 1, respectively, while there was no significant effect observed for NHAEV6 (Fig. 3A and B). These results showed HAEV6 inhibition was more significant compared to NHAEV6 and the difference was more evident at low MOI, suggesting that infections at MOIs of less than one reflected the use of a more specific entry route.

We next investigated the role of caveolin-1 in HAEV6 and NHAEV6 infection in Dev and A549 cells using a dominant negative form of the protein, caveolin-1 delta1-81. Expression of caveolin-1 delta1-81 reduced HAEV6 infection in Dev cells by 88% whereas NHAEV6 infection was only decreased by 11% (Fig. 3C). In A549 cells, HAEV6 was inhibited by 86%, in comparison to NHAEV6 whose infection was only reduced by 19% (Fig. 3D). These results implied that caveolae played an important role in HAEV6 cell entry and less for NHAEV6.

3.4. NHAEV6 uses clathrin-mediated endocytosis

The role of clathrin-dependent endocytosis in HAEV6 and NHAEV6 infections was studied by treatment of Dev cells with chlorpromazine, a chemical known to prevent assembly of clathrin lattices at the cell surface. Chlorpromazine was used at concentrations reported to inhibit transferrin uptake without any cytotoxicity (Joki-Korpela et al., 2001; Stuart et al., 2002; Sun et al., 2005). At the concentration of 3 μ M, HAEV6 infection was reduced by 11% and 9% at MOI of 0.01 and 1, respectively, while 50% inhibition was observed for NHAEV6 for both MOI of 0.01 and 1 (Fig. 3E and F). At concentrations higher than 6 μ M, NHAEV6 was inhibited more than 50% and two times higher than for HAEV6 (Fig. 3E and F).

We used a second approach of blocking clathrin-coated pit formation by the expression of an Eps15 dominant-negative mutant. Eps15 (EGF receptor pathway substrate 15) is a cytosolic partner of the adaptor complex AP-2 involved in clathrin-coated pit formation at the plasma membrane (Benmerah et al., 1999). In Dev cells, NHAEV6 inhibition was 74% at MOI of 0.01, in comparison to HAEV6 whose inhibition was 28% (Fig. 3C). In A549 cells, NHAEV6 replication was decreased by 83% compared to 26% for HAEV6 (Fig. 3E).

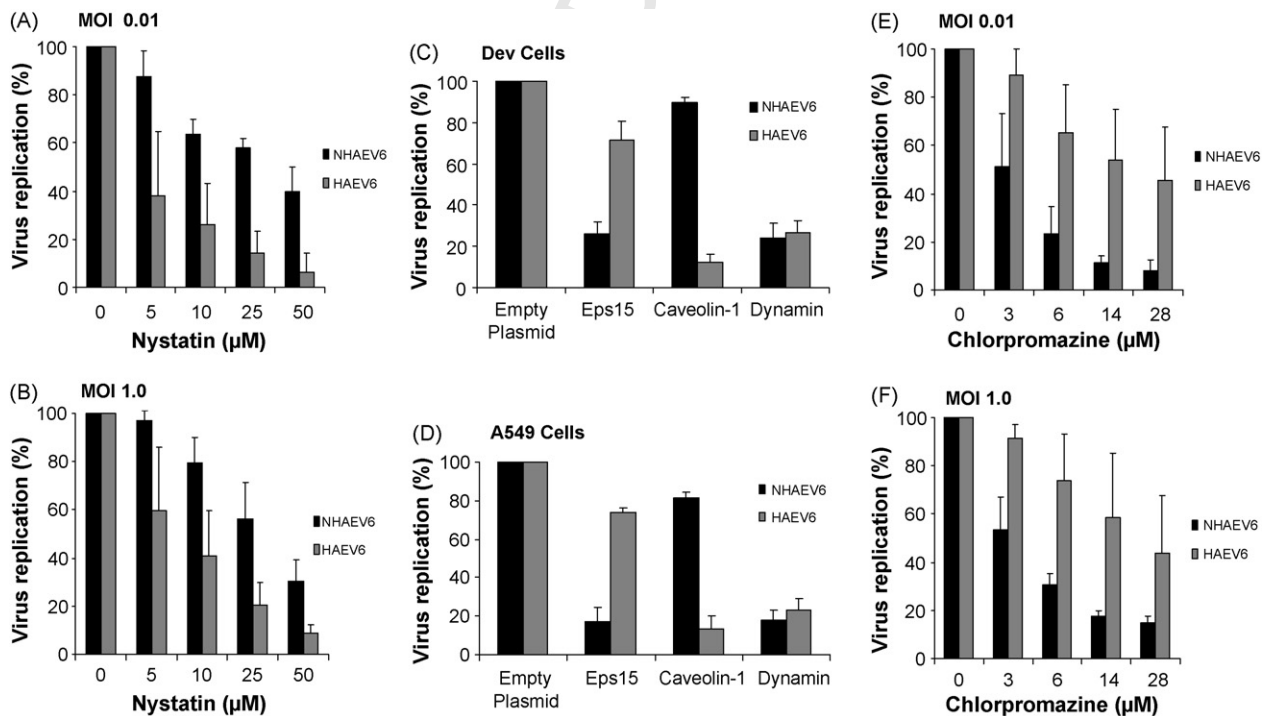


Fig. 3. Effects of drugs and dominant-negative mutants of clathrin, caveolin-1 and dynamin on EV6 infections on HAEV6 (grey columns) and NHAEV6 (black columns) of Dev and A549 cells. Dev cells were pre-treated with nystatin (0–50 μ M) and chlorpromazine (0–28 μ M), before infection with the EV6 viruses at MOI of 0.01 (A and E) and MOI of 1 (B and F). The infected cell culture supernatants were analysed by real-time RT-PCR at 8 h post-infection, and the percentage of inhibition of infection was determined by comparison of the viral genome copy numbers obtained in non-treated and drug-treated cells. The results are the average of five different experiments. (C) Dev and (D) A549 cells were transfected with plasmids expressing either the GFP (control plasmid), GFP-E Δ 95/295 Eps15 (clathrin), GFP-caveolin-1 or GFP-dynamin K44A dominant negative-mutants, respectively. At 24 h post-transfections, cells were infected with HAEV6 or NHAEV6 at MOI of 0.01. At 8 h post-infection, the cells were collected and the viral replication of HAEV6 and NHAEV6 were determined by “real-time” RT-PCR. The effect on HAEV6 and NHAEV6 infections was expressed as a percentage of virus replication corresponding to the number of genome copies obtained from transfected cells divided by that obtained from control transfected cells. The data presented are the average of three independent experiments.

In a more specific manner, the Eps15 data confirmed the results obtained with chlorpromazine and suggested an important role for clathrin during NHAEV6 entry into Dev and A549 cells.

3.5. *Dynamin function is necessary for endocytosis of both HAEV6 and NHAEV6*

Dynamin is a large GTPase which is required both in clathrin- and in caveolae-mediated endocytosis (Dautry-Varsat,

2001; Henley et al., 1998). A dominant-negative mutant of dynamin 2 (mutant K44A) was used in this study to block clathrin-caveolin-dependant endocytosis (Schmid et al., 1998; Van der Bliëk et al., 1993).

Dev and A549 cells transfected with the plasmid coding for dynamin K44A were then infected with each virus at MOI of 0.01. Blocking of dynamin function in these cells resulted in the inhibition of both HAEV6 and NHAEV6 infections by about 80% (Fig. 3C and D), strongly suggesting a dynamin-dependant entry pathway by both viruses.

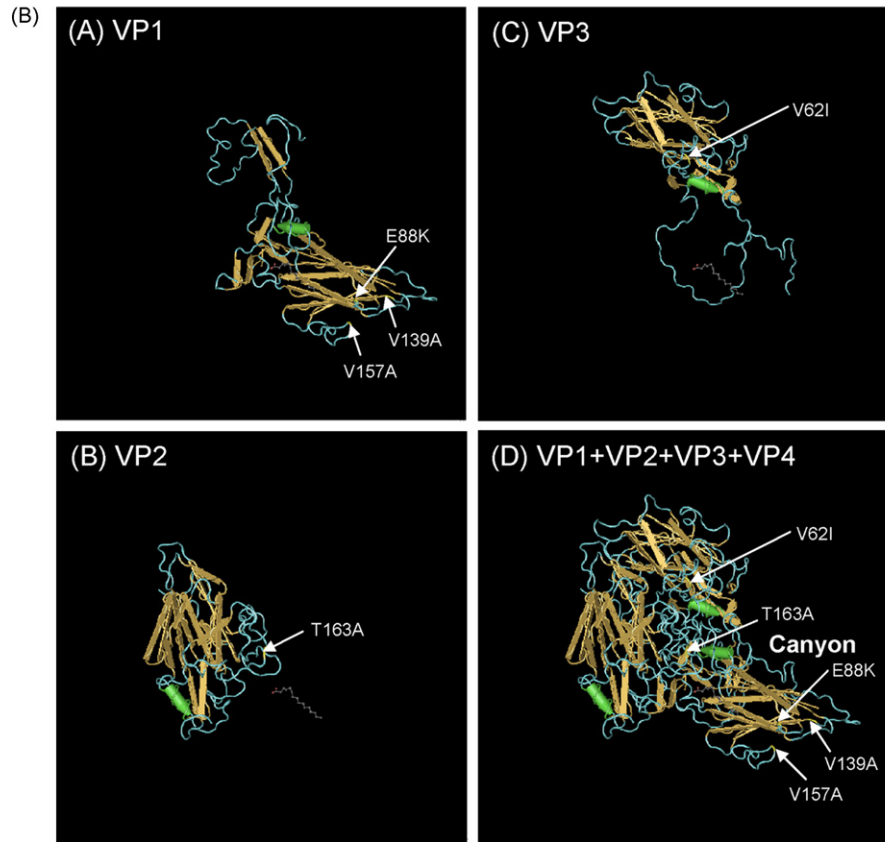
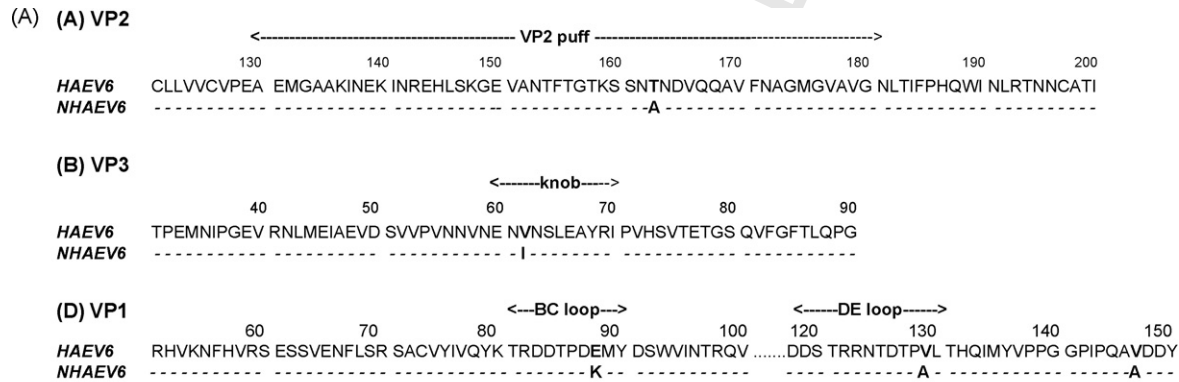


Fig. 4. (A) Sequence comparison of the capsid proteins (A) VP2, (B) VP3 and (C) VP1 of HAEV6 and NHAEV6 strains. The start of each capsid protein is referred to as amino acid residue 1. The five amino acid residues which differ between the two strains are indicated in bold. The sequences of HAEV6 and NHAEV6 have been deposited in the GenBank and given the accession numbers DQ345772 and DQ345771, respectively. (B) Location of the amino acid residues of EV6 on the structure of capsid of coxsackievirus B3 (CVB3) virus. The capsid proteins (A) VP1, (B) VP2 and (C) VP3 of CVB3 virus (Muckelbauer et al., 1995) are presented with white arrows pointing to the positions corresponding to the amino acid residue(s) of echovirus 6 (EV6). The combined structure of the four capsid domains (D) is also presented. The amino acid residues are designated by the residue found on HAEV6, its number on the protein domain and the residue found on NHAEV6.

3.6. Sequence determination of capsid proteins of HAEV6 and NHAEV6

The haemagglutinating phenotype of EV6 could be carried by any of the structural proteins of the virus, namely the VP1, VP2, VP3 and VP4 proteins which make up the viral capsid. The genes coding for the four capsid proteins of HAEV6 and NHAEV6 were therefore sequenced. At the nucleotide level, the sequences between the two strains had 99.71% identity for a total of 2762 residues. At the protein level, the sequence comparison revealed five residues which differed between the two strains (shown in bold, Fig. 4A).

In the VP2 protein on position 163, there was a threonine for HAEV6 and an alanine for NHAEV6. Using the structure of CVB3 as our reference model, this amino acid residue is located in a region called the VP2 puff or EF loop, which is the largest and most variable surface loop of VP2 (Fig. 4B). The VP2 puff is thought to be directly or indirectly involved in receptor binding or recognition. On the VP3 protein at position 62, a valine observed for HAEV6 was an isoleucine for NHAEV6, located within a structural domain called the knob which forms a major surface protrusion (Fig. 4A) (Muckelbauer et al., 1995). Within the VP1 protein, the three amino acid differences between HAEV6 and NHAEV6 were glutamic acid (E88), valine (V139) and valine (V157) for HAEV6, and lysine (K88), alanine (A139) and alanine (A157) for NHAEV6. On the capsid structure of coxsackie B3, these amino acid residues on VP1 were clustered within the same region (Fig. 4B).

4. Discussion

In this study, two cell culture-derived strains, HAEV6 and NHAEV6, were isolated from a single clinical isolate of EV6. The viral sub-strains showed clearly different phenotypic characteristics, as the HAEV6 isolated on PLC cells showed an improved capacity to haemagglutinate red blood cells, while the NHAEV6 selected on HeLa cells lost its haemagglutinating ability. Despite the difference in haemagglutinating ability, there was no difference in infectivity between the two viruses. The existence of each sub-strain in the original clinical isolate was assessed by comparing the infectious titres in the cell culture supernatant before and after a haemagglutination. A decrease of the infectious titre by 1% after haemagglutination indicated that both sub-strains were existing into the clinical sample and the non-haemagglutinating virus was the predominant strain.

Viral sub-strains obtained by successive sub-cultures on a cell line often lose or gain the function to bind to a specific receptor. If the cell expressed a certain receptor, the selected viral strain often showed the capacity to bind to it whereas, in the absence of a receptor, the virus often lose the ability to use it (Bergelson et al., 1995; Johansson et al., 2004; Klimstra et al., 1998). The HeLa cell line used for the NHAEV6 selection was positive for DAF expression and moreover, the level of expression of DAF on HeLa cells was relatively high compared to PLC cells (data not shown). This could not account for the loss of the haemagglutinating ability suggesting that the selection of a non-haemagglutinating virus could not be due to

a low DAF expression. Nevertheless, the relevance of DAF in EV6 haemagglutination was supported by our virus binding data which showed that only the haemagglutinating virus, HAEV6 was capable of binding to DAF-expressing cells.

The difference in DAF-recognition between the two EV6 strains implied that they used different cell receptors for infection. This was confirmed by the lack in competition between the two strains observed at low MOI during coinfections experiments. This observation is in agreement with an earlier study showing that infections at MOIs of less than one reflected the use of a more specific entry route (DeTulleo and Kirchhausen, 1998). We examined the endocytic pathways used by HAEV6 and NHAEV6 to enter precursors of glial (Dev cells) and lung (A549 cells). Caveolin- or clathrin-dependent endocytosis had been proposed as entry routes for several enteroviruses and reports have shown that each serotype has a specific cell entry route (Chung et al., 2005; Marjomaki et al., 2002; Stuart et al., 2002; Triantafilou and Triantafilou, 2003, 2004). In our investigation, infections with HAEV6 and NHAEV6 were estimated by quantification of genomes copies after 8 h which corresponded to one cycle of viral replication. We considered that the genome copies would provide the overall viral replication value which would be a reflection of the efficiency of virus entry. The sensitivity of the technique of “real-time” PCR allowed us to work at low MOIs between 0.01 and 1. Viral internalization and trafficking mechanisms were previously studied by immunofluorescence or electron microscopy and the MOI required to visualize the virus by these methods were usually high, from 10 to 100, which could result in a loss of detection of endocytic pathway specificity (Chung et al., 2005; Snyers et al., 2003; Stuart et al., 2002).

At least two different methods were used to inhibit specific endocytic pathways using chemical inhibitors and expression of dominant-negative mutants. Drugs have multiple effects on normal cell functions and their use to inhibit virus infection should be treated with some caution. The use of dominant-negative mutants of proteins involved in endocytosis is therefore considered to be a more specific way to inhibit endocytosis (Sun et al., 2005). Our results showed that at low MOI, HAEV6 cell entry was preferentially through the caveolae pathway which was lipid raft-dependent, whereas for NHAEV6, it followed the clathrin-mediated entry pathway. Both viruses depended on dynamin 2, a cellular component which is involved in both clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. The lipid raft-dependent pathway used by HAEV6 is corroborated by the DAF-binding capacity of this virus, as DAF is known to be localised in lipid raft domains.

In the present study, eight nucleotide changes defined HAEV6 and NHAEV6 as two quasispecies which used different endocytic pathways for host cell entry. Genomic diversity could either optimize the way a virus enters its host cell or render the virus capable of infecting cells lacking in one receptor, thus leading to changes in viral virulence. The existence of quasispecies in a same clinical isolate has been previously described for enterovirus as a result of high frequency of mutations of the viral RNA populations (Bailly et al., 2000; De La Fuente et al., 1999). The high mutation rate create a “cloud” of potentially beneficial mutations at the population level, which afford the

viral quasispecies a greater probability to evolve and adapt to new environments and challenges during infection (Pfeiffer and Kirkegaard, 2006; Vignuzzi et al., 2006).

In this study, the amino acid changes observed in the viral capsid proteins could be related to differences in haemagglutinating ability. The amino acid changes found on VP2 (position 163) and VP3 (position 62) appeared to be localised to regions which had been reported to be involved in DAF binding for EV12 and EV7, respectively (He et al., 2002; Pettigrew et al., 2006). It is therefore likely that the non-DAF binding nature of NHAEV6 is the consequence of these amino acid changes and the differences in haemagglutination ability observed for HAEV6 and NHAEV6 are likely to be related to their DAF binding capacity. On the three-dimensional capsid structure of the coxsackievirus B3, four of the five amino acid changes were located on regions which corresponded to structural domains described as the puff or EF loop (VP2), the knob domain (VP3) and the BC and DE loops (VP1). Interestingly, these regions have been described to be highly immunogenic or suggested to be involved in receptor binding, virion stability and pathogenicity (Minor et al., 1986; Muckelbauer et al., 1995; Page et al., 1988; Sherry and Rueckert, 1985; Sherry et al., 1986).

The *in vitro* selection of the two EV6 sub-strains could mean that a clinical isolate is made up a mixture of viral quasispecies which are potentially able to cooperate with each other during infection, in particular during host cell attachment and entry. They have genetically to use different receptors and endocytic pathways. The two EV6 sub-strains studied, which exhibit different phenotypic characteristics, represent valuable biological tools for further study. The role of the quasispecies evolution in viral tropism and virulence of an enterovirus strain remains to be determined in particular in immunocompromised host where a longer duration of the virus infection could be related to an improvement of the genetic diversity. Diagnosis could include, in the near future, the determination of viral quasispecies and their proportions in clinical isolates to help evaluate the prognosis of an infection. Presently, the drugs available for treatment of enterovirus infections are restricted to inhibitors of virus uncoating. Improving our knowledge on early steps of enterovirus infection would help in the development of more efficient drugs which target the steps of virus cell attachment and entry.

Uncited reference

Bergelson et al. (1994).

Acknowledgments

This work was supported by the Hospices Civils de Lyon. We thank the Centre Commun de Quantimétrie (UCBL, Lyon) for help with the confocal microscope, Drs. Pascale Giraudon and Jean-Claude Cortay for technical advice during this study, Paula Coelho and Gemma Moncunill Pinas for their participation to this work. We are also grateful to Dr. Serge Manié for critical reading of the manuscript, and to Prof. Pierre Boulanger and Dr. David Williams for fruitful discussions.

References

- Abe, O., Kimura, H., Minakami, H., Akami, M., Inoue, M., Saito, A., Otsuki, K., 2000. Outbreak of gastroenteritis caused by echovirus type 6 in an orphanage in Japan. *J. Infect.* 41 (3), 285–286.
- Bailly, J.L., Chambon, M., Henquell, C., Icart, J., Peigue-Lafeuille, H., 2000. Genomic variations in echovirus 30 persistent isolates recovered from a chronically infected immunodeficient child and comparison with the reference strain. *J. Clin. Microbiol.* 38 (2), 552–557.
- Benmerah, A., Lamaze, C., Bègue, B., Schmid, S.L., Dautry-Varsat, A., Cerf-Bensussan, N., 1998. AP-2/Eps15 interaction is required for receptor-mediated endocytosis. *J. Cell Biol.* 140 (5), 1055–1062.
- Benmerah, A., Bayrou, M., Cerf-Bensussan, N., Dautry-Varsat, A., 1999. Inhibition of clathrin coated pit assembly by an Eps15 mutant. *J. Cell Sci.* 112 (9), 1303–1311.
- Bergelson, J.M., Chan, M., Solomon, K.R., St. John, N.F., Lin, H., Finberg, R.W., 1994. Decay-accelerating factor (CD55), a glycosylphosphatidylinositol-anchored complement regulatory protein, is a receptor for several echoviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91 (13), 6245–6249.
- Bergelson, J.M., Mohanty, J.G., Crowell, R.L., St. John, N.F., Lublin, D.M., Finberg, R.W., 1995. Coxsackievirus B3 adapted to growth in RD cells binds to decay-accelerating factor (CD55). *J. Virol.* 69 (3), 1903–1906.
- Berger, M.M., Kopp, N., Vital, C., Redl, B., Aymard, M., Lina, B., 2000. Detection and cellular localization of enterovirus RNA sequences in spinal cord of patients with ALS. *Neurology* 54 (1), 20–25.
- Chomel, J.J., Antona, D., Thouvenot, D., Lina, B., 2003. Three echovirus serotypes responsible for outbreak of aseptic meningitis in Rhone-Alpes region. *France Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 22 (3), 191–193.
- Chung, S.K., Kim, J.Y., Kim, I.B., Park, S.I., Paek, K.H., Nam, J.H., 2005. Internalization and trafficking mechanisms of coxsackievirus B3 in HeLa cells. *Virology* 333 (1), 31–40.
- Cova, L., Aymard, M., 1980. Isolation and characterization of non-haemagglutinating echovirus 11. *J. Gen. Virol.* 51 (1), 219–222.
- Coyne, C.B., Bergelson, J.M., 2006. Virus-induced Abl and Fyn kinase signals permit coxsackievirus entry through epithelial tight junctions. *Cell* 124 (1), 119–131.
- Dautry-Varsat, A., 2001. Clathrin-independent endocytosis. In: Marsh, M. (Ed.), *Endocytosis*. Oxford University Press, Oxford, pp. 26–57.
- De La Fuente, J., Hidalgo, Y., Ochagavia, M.E., Muzio, V., Rodriguez, M.P., 1999. Analysis of enterovirus sequences recovered from the cerebrospinal fluid of patients with epidemic neuropathy. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 93 (2), 153–161.
- DeTulleo, L., Kirchhausen, T., 1998. The clathrin endocytic pathway in viral infection. *EMBO J.* 17 (16), 4585–4593.
- He, Y., Lin, F., Chipman, P.R., Bator, C.M., Baker, T.S., Shoham, M., Kuhn, R.J., Medof, M.E., Rossmann, M.G., 2002. Structure of decay-accelerating factor bound to echovirus 7: a virus-receptor complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99 (16), 10325–10329.
- Henley, J.R., Krueger, E.W., Oswald, B.J., McNiven, M.A., 1998. Dynamin-mediated internalization of caveolae. *J. Cell Biol.* 141 (1), 85–99.
- Jennings, M.T., Jennings, D.L., Ebrahim, S.A., Johnson, M.D., Turc-Carel, C., Philip, T., Philip, I., Lapras, C., Shapiro, J.R., 1992. *In vitro* karyotypic and immunophenotypic characterisation of primitive neuroectodermal tumours: similarities to malignant gliomas. *Eur. J. Cancer* 28A (4–5), 762–766.
- Johansson, E.S., Xing, L., Cheng, R.H., Shafren, D.R., 2004. Enhanced cellular receptor usage by a bioselected variant of coxsackievirus A21. *J. Virol.* 78 (22), 12603–12612.
- Joki-Korpela, P., Marjomaki, V., Krogerus, C., Heino, J., Hyypia, T., 2001. Entry of human parechovirus 1. *J. Virol.* 75 (4), 1958–1967.
- Joo, C.H., Ahn, J., Seo, I., Kim, Y.K., Kim, D., Hong, H., Lee, H., 2005. Characterisation of non-polio enteroviruses recovered from patients with aseptic meningitis in Korea. *Intervirology* 48 (2–3), 97–103.
- Klimstra, W.B., Ryman, K.D., Johnston, R.E., 1998. Adaptation of Sindbis virus to BHK cells selects for use of heparan sulfate as an attachment receptor. *J. Virol.* 72 (9), 7357–7366.
- Lina, B., Pozzetto, B., Andreoletti, L., Beguier, E., Bourlet, T., Dussaix, E., Grangeot-Keros, L., Gratacap-Cavallier, B., Henquell, C., Legrand-Quillien, M.C., Novillo, A., Palmer, P., Petitjean, J., Sandres, K., Dubreuil, P., Fleury,

- H., Freymuth, F., Leparco-Goffart, I., Hober, D., Izopet, J., Kopecka, H., Lazizi, Y., Lafeuille, H., Lebon, P., Aymard, M., 1996. Multicenter evaluation of a commercially available PCR assay for diagnosing enterovirus infection in a panel of cerebrospinal fluid specimens. *J. Clin. Microbiol.* 34 (12), 3002-3006.
- Marjomaki, V., Pietiainen, V., Matilainen, H., Upla, P., Ivaska, J., Nissinen, L., Reunanen, H., Huttunen, P., Hyypia, T., Heino, J., 2002. Internalization of echovirus 1 in caveolae. *J. Virol.* 76 (4), 1856-1865.
- Meier, O., Greber, U.F., 2004. Adenovirus endocytosis. *J. Gene Med.* 6 (1), S152-S163.
- Minor, P., Ferguson, M., Evans, D.M., Almond, J.W., Icenogle, J.P., 1986. Antigenic structure of polioviruses of serotypes 1, 2 and 3. *J. Gen. Virol.* 67 (7), 1283-1291.
- Muckelbauer, J.K., Kremer, M., Minor, I., Diana, G., Dutko, F.J., Groarke, J., Pevear, D.C., Rossmann, M.G., 1995. The structure of coxsackievirus B3 at 3.5Å resolution. *Structure* 3 (7), 653-667.
- Page, G.S., Mosser, A.G., Hogle, J.M., Filman, D.J., Rueckert, R.R., Chow, M., 1988. Three-dimensional structure of poliovirus serotype 1 neutralizing determinants. *J. Virol.* 63 (5), 1781-1794.
- Pettigrew, D.M., Williams, D.T., Kerrigan, D., Evans, D.J., Lea, S.M., Bhella, D., 2006. Structural and functional insights into the interaction of echoviruses and decay-accelerating factor. *J. Biol. Chem.* 281 (8), 5169-5177.
- Pfeiffer, J.K., Kirkegaard, K., 2006. Bottleneck-mediated quasispecies restriction during spread of an RNA virus from inoculation site to brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 (14), 5520-5525.
- Piirainen, L., Hovi, T., Roivainen, M., 1998. Variability in the integrity of human enteroviruses exposed to various simulated in vivo environments. *Microb. Pathog.* 25 (3), 131-137.
- Powell, R.M., Schmitt, V., Ward, T., Goodfellow, I., Evans, D.J., Almond, J.W., 1998. Characterization of echoviruses that bind decay accelerating factor (CD55): evidence that some haemagglutinating strains use more than one cellular receptor. *J. Gen. Virol.* 79 (7), 1707-1713.
- Powell, R.M., Ward, T., Goodfellow, I., Almond, J.W., Evans, D.J., 1999. Mapping the binding domains on decay accelerating factor (DAF) for haemagglutinating enteroviruses: implications for the evolution of a DAF-binding phenotype. *J. Gen. Virol.* 80 (12), 3145-3152.
- Racaniello, V.R., 2001. *Picornaviridae: the viruses and their replication*. In: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), *Fields Virology*, vol. 1, 4th ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA, pp. 685-722.
- Sanchez-San Martin, C., Lopez, T., Arias, C.F., Lopez, S., 2004. Characterization of rotavirus cell entry. *J. Virol.* 78 (5), 2310-2318.
- Schmid, S.L., McNiven, M.A., De Camilli, P., 1998. Dynamin and its partners: a progress report. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10 (4), 504-512.
- Sherry, B., Rueckert, R.R., 1985. Evidence for at least two dominant neutralization antigens on human rhinovirus 14. *J. Virol.* 53 (1), 137-143.
- Sherry, B., Mosser, A.G., Colonna, R.J., Rueckert, R.R., 1986. Use of monoclonal antibodies to identify four neutralization immunogens on a common cold picornavirus, human rhinovirus 14. *J. Virol.* 57 (1), 246-257.
- Simons, K., Ikonen, E., 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387 (6633), 569-572.
- Snyers, L., Zwickl, H., Blaas, D., 2003. Human rhinovirus type 2 is internalized by clathrin-mediated endocytosis. *J. Virol.* 77 (9), 5360-5369.
- Stuart, A.D., Eustace, H.E., McKee, T.A., Brown, T.D.K., 2002. A novel cell entry pathway for a DAF-using human enterovirus is dependent on lipid rafts. *J. Virol.* 76 (18), 9307-9322.
- Sun, X., Yau, V.K., Briggs, B.J., Whittaker, G.R., 2005. Role of clathrin-mediated endocytosis during vesicular stomatitis virus entry into host cells. *Virology* 338 (1), 53-60.
- Triantafilou, K., Triantafilou, M., 2003. Lipid raft microdomains: key sites for Coxsackievirus A9 infectious cycle. *Virology* 317 (1), 128-135.
- Triantafilou, K., Triantafilou, M., 2004. Lipid raft-dependent Coxsackievirus B4 internalization and rapid targeting to the Golgi. *Virology* 326 (1), 6-19.
- Trouet, D., Hermans, D., Droogmans, G., Nilius, B., Eggermont, J., 2001. Inhibition of volume-regulated anion channels by dominant-negative caveolin-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284 (2), 461-465.
- Van der Blik, A.M., Redelmeier, T.E., Damke, H., Tisdale, E.J., Meyerowitz, E.M., Schmid, S.L., 1993. Mutations in human dynamin block an intermediate stage in coated vesicle formation. *J. Cell Biol.* 122 (3), 553-563.
- Ventura, K.C., Hawkins, H., Smith, M.B., Walker, D.H., 2001. Fatal neonatal echovirus 6 infection: autopsy case report and review of the literature. *Mod. Pathol.* 14 (2), 85-90.
- Vignuzzi, M., Stone, J.K., Andino, R., 2005. Ribavirin and lethal mutagenesis of poliovirus: molecular mechanisms, resistance and biological implications. *Virus Res.* 107 (2), 173-181.
- Vignuzzi, M., Stone, J.K., Arnold, J.J., Cameron, C.E., Andino, R., 2006. Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population. *Nature* 439 (7074), 344-348.

CAR and DAF are required for echovirus 6 infection

Nicolas Lévêque^{1,2*}, Youssef Zreik^{1,2}, Gaëlle Cartet^{1,2}, Helene Norder³, Delphine Falcon^{1,2},
Nathalie Rivat^{1,2}, Jean-Jacques Chomel^{1,2}, Saw-See Hong² and Bruno Lina^{1,2}

¹*Centre National de Référence des Entérovirus, Hospices Civils de Lyon, Domaine Rockefeller, 69373
Lyon Cedex 08, France.*

²*Laboratoire de Virologie et Pathologie Humaine, CNRS FRE 3011, Faculté de Médecine RTH
Laënnec, 69372 Lyon Cedex 08, France.*

³*VHE, Swedish Institute for Infectious Disease Control, Sweden.*

Keywords : Echovirus, infection, DAF, CAR, CHO cells

Running title : Echovirus 6 infection depends on CAR and DAF

Word count for abstract: words

Word count for text: words

Corresponding author :

Dr. Nicolas Lévêque
Centre National de Référence des entérovirus
Hospices Civils de Lyon, Domaine Rockefeller
Lyon 69373, France
Tel: (33) 4 78 77 70 19
Fax: (33) 4 78 01 48 87
E-mail : nicolas.leveque@chu-lyon.fr

Abstract

Several receptors have been described for echovirus cell attachment and infection such as CD59, β -2-microglobulin, heparan sulfates, sialic acid, the human integrin VLA-2 and decay-accelerating factor (DAF or CD55). Among these, the DAF has been the most intensively studied and specifically identified as the receptor for the haemagglutinating strains. However, it has been suggested that echoviruses are able to use yet-unknown receptors, or more than one molecule at the cell surface. Using specific enzyme treatments of A549 cells and receptor expression in non-permissive CHO cells, this report attempts to clarify the role of DAF, CAR, VLA-2, sialic acid, and heparan sulfates in the cell entry of haemagglutinating and non-haemagglutinating echovirus 6 strains. We thus provide evidence that echovirus replication in A549 cells was unaffected by neuraminidase and phospholipase C treatments suggesting that sialic acid and glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins were not essential for infection. Significant reduction of the viral load in the presence of heparin confirmed the role of heparan sulfates as an attachment molecule for echovirus 6. Single expression of CAR, DAF or VLA-2 could not mediate echovirus 6 infection whereas co-expression of DAF and CAR rendered CHO cells susceptible to infection. Finally, no difference in receptor usage for infection was observed between haemagglutinating and non-haemagglutinating strains. Our results therefore show evidence of the role of CAR as an echovirus receptor.

Introduction

Echovirus 6 (E6) is a human pathogen of the *Picornaviridae* family and the genus *Enterovirus*, responsible for outbreaks of aseptic meningitis and various infections in neonates and young children (1, 8, 14, 30). E6 chronic infections have also been described and thought to be implicated in the development of motor neuron diseases (7). The virus has an icosahedral capsid made up of 4 structural proteins (VP1, VP2, VP3 and VP4) with 60 copies of each capsid enclosing a single-stranded sense-messenger polyadenylated RNA genome of approximately 7,400 nucleotides. At the virus surface, a canyon-like structure is involved in virus attachment by interaction with cell surface receptors (25).

Several receptors for echovirus have been described in the literature. For example, antisera to CD59 and β 2-microglobulin have been shown to specifically block the infection of rhabdomyosarcoma cells by a range of echovirus serotypes (13, 17, 33). Similarly, infection by echoviruses 1 and 8 depended on the expression of the α 2 subunit of human integrin VLA-2 in CHO cells while the glucosaminoglycan heparan sulfates mediate echovirus binding at the cell membrane (5, 6, 12). The decay accelerating factor (DAF), a 70 kDa glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchored glycoprotein involved in the regulation of complement activation on the cell membrane, was also reported as a receptor for several echoviruses (4). Moreover, the ability of some echovirus strains to haemagglutinate human erythrocytes was related to their attachment to DAF as echovirus serotypes 6, 7, 11, 13 and 21, which are all haemagglutinating viruses, have been shown to bind to DAF (4, 23). Like other GPI-anchored proteins, DAF is found in lipid rafts cholesterol-rich ordered domains within the plasma membrane and DAF binding is related to lipid raft dependent endocytosis (27, 28).

All these receptors are widely expressed throughout the human tissues and do not correspond to the echovirus tropism which is restricted to specific tissues such as meninges,

myocardium, digestive tract and lungs. To account for these contradictions, it has been suggested that echoviruses are able to use a yet-unknown receptor and most probably more than one receptor for cell attachment and entry (23, 24). In this report, we studied the function of the different receptors known for enteroviruses, in the infection of haemagglutinating and non-haemagglutinating strains of E6. Heparin inhibition and enzyme treatments of A549 cells were performed to determine the role of heparan sulfate, sialic acid or glycosylphosphatidylinositol anchored proteins in E6 infection. In addition, a series of different CHO cell lines expressing DAF, VLA-2 and CAR (coxsackie adenovirus receptor) were used. Finally, co-expression at the CHO cells surface of CAR+VLA-2 or CAR+DAF was evaluated for E6 infection since CAR, a member of the immunoglobulin superfamily, was recently shown to form with DAF a receptor complex involved in coxsackievirus entry and release of viral RNA (9).

Materials and Methods

Cells and viruses. A549 cells (human lung carcinoma, ATCC), CHO cells and CHO cells expressing DAF were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (Cambrex) supplemented with 10% of fetal calf serum and 2% penicillin and streptomycin (Invitrogen) in a humidified atmosphere (5% CO₂) at 37°C (10). Positive cells for DAF were selected by their resistance to the neomycin analogue G418 at the concentration of 25µg/ml of medium. CHO-CAR and CHO-VLA-2 cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen) containing 10% of dialysed fetal calf serum (Cambrex) (3). CHO-2241 defective in heparan sulfates were maintained in F-12 nutrient mixture (Ham) containing L-glutamine (32).

An E6 strain was isolated in MRC5 cells from a throat sample obtained from a patient who suffered from meningitis. The isolate was then inoculated on human hepatocellular carcinoma (PLC) and human cervical adenocarcinoma (HeLa) cell lines, subsequently from which two echovirus strains were derived after 6 successive sub-cultures. The cell culture-derived strain from PLC cells after six passages was haemagglutinating and was named HAE6 while the E6 strain obtained from HeLa cells after six passages lost its haemagglutinating capacity and was named NHA6 (11, 15).

Treatments of A549 cells.

Sialidase treatment. *Streptococcus pneumoniae* sialidase was purchased from Sigma. A total of 1.5×10^6 A549 cells were seeded onto a 24-well culture plate. The cells were washed three times with medium without fetal calf serum, and then incubated at 37°C for 30 min in the presence or absence of sialidase (10 and 100 mU/ml). After sialidase treatment, the cells were washed twice, and used for infection as described above in CHO cells. At last, 2×10^5 collected cells were tested using an enterovirus specific real time RT-PCR assay.

PiPL-C treatment. Cells were washed three times with PBS, and incubated at 37°C for 90 min in 200µl of phosphatidylinositol-specific phospholipase C buffer (RPMI 1640, 0.2% bovine serum albumin, 50 µM 2-mercaptoethanol, 10 mM HEPES, 0.1% sodium azide) in the presence or absence of *Bacillus cereus* PiPL-C (6 U/ml; Sigma) (19). The cells were washed, and virus infection was performed as previously.

Antibody blockade of E6 entry. A549 cells were treated with monoclonal anti-DAF antibody 854 and kindly provided by David T. Williams (University of Glasgow) and previously reported to block infection by a number of echoviruses through SCR3 binding (dilution 1:100) or DMEM alone for 1h at 4°C (23). E6 at MOI of 1 was adsorbed at 4°C for additional 30 min. Unbound virus was then removed, the cells washed and incubated at 37°C for 24h prior to quantification by real-time RT-PCR assay.

Inhibition by heparin. Heparin sodium salt (porcine mucosal intestinal; Sigma) was prediluted in serum-free DMEM at concentrations of 0, 0.5, 1, 2 and 4 mg/ml, and mixed with 5×10^5 50% tissue culture infective doses (TCID₅₀) of virus at 37°C for 1h. Infection was monitored by adding the virus-heparin mixture to a confluent monolayer of A549 cells in a 24-well plate at a MOI of 1 and incubating the plate for 24h at 37°C in 5% CO₂ prior to virus quantification.

Time course of echovirus 6 replication in wild type and transfected CHO cells. A total of 2.4×10^6 CHO cells were seeded onto a 6-well culture plate. At 100% confluency, cells were infected with either haemagglutinating or non haemagglutinating strains at a MOI of 1 for 30 minutes at 4°C. Supernatant containing virus was removed, and the cells were washed three times with PBS. The cell monolayer was then either collected or, after addition of fresh medium, incubated for a further 24 h at 37°C. At last, 1×10^6 collected cells were tested using an enterovirus specific real time RT-PCR assay. The experiment was repeated three times for each cell line.

CHO cells transfection with plasmid vector encoding human CAR. A total of 2.4×10^6 CHO cells were seeded onto a 6-well culture plate in the absence of antibiotics approximately 24h before transfection. At 60-80% confluency, cells were transfected with $3\mu\text{g}/\text{well}$ of plasmid using lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) and after 24h, infected with either haemagglutinating or non haemagglutinating strains as reported above. The plasmid coding for CAR was kindly provided by Dr Kerstin Sollerbrant (Karolinska Institute, Sweden).

Evaluation of EV replication by real-time RT-PCR. To evaluate the effects of the expression of the different potential receptors at the CHO cell membrane and of the different treatments of A549 cells on HAEV6 and NHAEV6 entry, virus replication was evaluated by “real-time” RT-PCR using cells collected 24h post-infection. Briefly, RNA was extracted from 1×10^6 of CHO cells or 2×10^5 of A549 cells with the QIAamp Viral RNA minikit (QIAGEN) and eluted in $40\mu\text{l}$ of a RNase-free water. An aliquot of $10\mu\text{l}$ was then added to a reaction mixture containing RT buffer 2 X, $1\mu\text{M}$ random hexamers, 1mM deoxynucleoside triphosphates mix (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ), 10 units of RNase inhibitor (Promega, Madison, WI., USA) and five units of Avian Myeloblastosis Virus (AMV - Promega). The RT reaction mixture was incubated at 42°C for 45 min and heat inactivated at 95°C for 4 min. The cDNA was subjected to “real-time” PCR with primers previously described which recognized the 5' non-translated region of all known enteroviruses (26, 31). A $5\mu\text{l}$ aliquot of each cDNA was used in a $25\mu\text{l}$ reaction mixture containing $12.5\mu\text{l}$ of 2X SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems), a $1\mu\text{M}$ concentration of the forward and reverse primers. Amplification was performed by denaturation at 95°C for 10 minutes followed by 40 cycles: denaturation at 95°C for 15 seconds, annealing at 60°C for 1 minute. At the end of the annealing-extension step, the ABI Prism 7500 SDS (Applied Biosystems) monitored real-time PCR amplification by quantitative analysis of fluorescence emissions. Viral load was

estimated as genome copies/ml using serial dilutions of a quantified plasmid containing a part of the 5' untranslated region of echovirus 6 genome amplified with primers EV2 (5'-CAAGCACTTCTGTTTCCCCGG-3') and EV3 (5'-ATTGTCACCATAAGCAGCCA-3') as an external standard (16).

Results

Role of sialic acid and heparan sulfates in echovirus 6 (E6) infection

The involvement of sialic acids and heparan sulfates in E6 infection was studied in A549 cells, in particular for the E6 haemagglutinating strain. Sialic acids were reported to be involved in EV70 attachment to nucleated susceptible cell lines and furthermore implicated as an essential component of the EV70 erythrocyte receptor as evaluated by viral haemagglutination (2). Treatment of A549 cells using neuraminidase from *Streptococcus pneumoniae* significantly enhanced both HAE6 and NHAE6 infections (Figure 1A). The removal of cell surface sialic acids could possibly render other viral binding sites more accessible to the virus.

The role of heparan sulfates was investigated through a neutralization assay using heparin at concentrations ranging from 0.5 to 4 mg of heparin/ml. A549 cells infection by HAE6 and NHAE6 was reduced by 92 and 91%, respectively, at the lowest concentration of 0.5 mg/ml (Figure 1B). Concentrations of 1 mg/ml and above completely blocked the infections by both EV6 strains. These results implied the involvement of heparan sulfates in both HAE6 and NHAE6 infections.

Blocking of DAF is not sufficient to inhibit E6 infection in A549 cells

The role of DAF in E6 infection was studied by treatment of A549 cells with *Bacillus cereus* phospholipase C followed by HAEV6 and NHAEV6 infections. The Phospholipase C Phosphatidylinositol-specific (PiPL-C) was used for the release of GPI anchored proteins from the plasma membrane. No significant change was observed between infections performed using treated or non-treated cells for both HAE6 and NHAE6 (Figure 1C). Furthermore, a monoclonal antibody (mAb854) which is known to target the short consensus repeat domain 3 of DAF, which has been shown to bind E6, was tested for its effect on E6 infection (23). No inhibition of E6 infection was observed in the presence of mAb 854 (Figure

1C). These negative results obtained with PiPL-C and mAb 854 suggested that in A549 cells, blocking DAF or other phosphatidylinositol-anchored proteins was not sufficient to inhibit E6 infection.

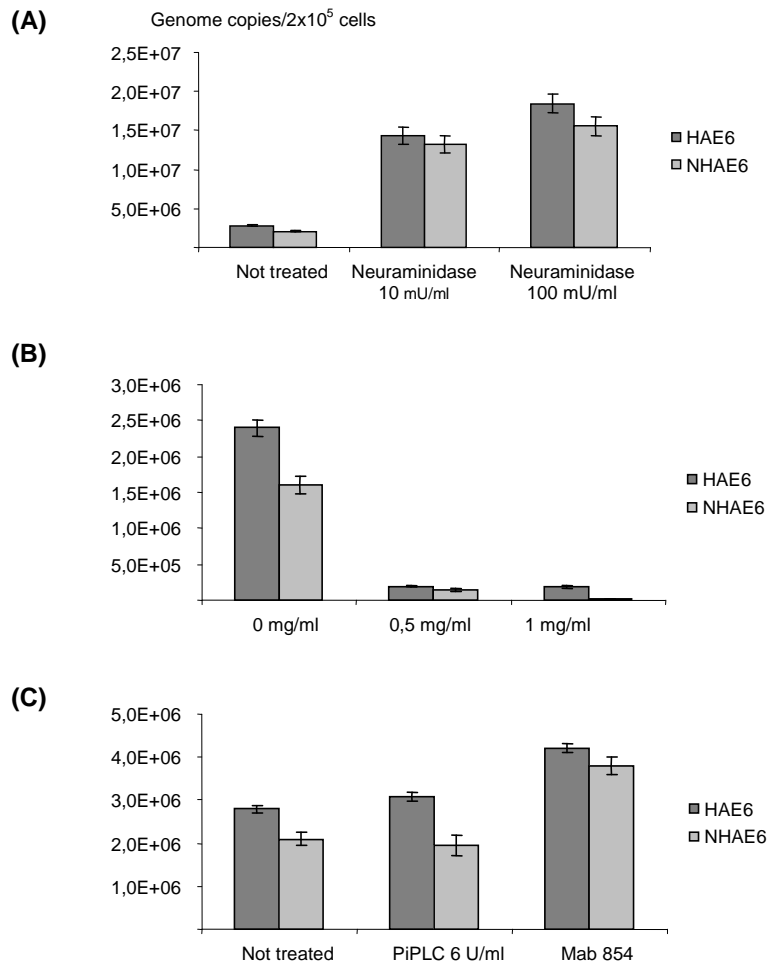


Figure 1 Role of sialic acid, glycosylphosphatidylinositol molecules and heparan sulfates in A549 echovirus 6 infection. (A) E6 infection of A549 cells does not require sialic acid and glycosylphosphatidylinositol anchored receptors. A total of 1.5×10^6 A549 cells were seeded onto a 24-well culture plate. The cells were washed with medium without fetal calf serum, and incubated at 37°C in the presence or absence of *Streptococcus pneumoniae* sialidase (10 and 100 mU/ml) or of *Bacillus cereus* PiPL-C (6 U/ml) for 30 min and 90 min, respectively. The cells were washed, and virus infection was performed with either haemagglutinating (dark grey columns) or non haemagglutinating (light grey columns) strains at a MOI of 1 for 30 minutes at 37°C . Unbound virus was then removed, the cells washed and incubated at 37°C for 24h prior to quantification by real-time RT-PCR assay. Antibody blockade of E6 entry was performed to assess the role of DAF in E6 infection. A549 cells were treated 1h at 4°C with monoclonal anti-DAF antibody 854 known to block E6 infection through SCR3 binding.

E6 at MOI of 1 was adsorbed at 4°C for additional 30 min, before removing of unbound viruses, incubation for 24 h at 37°C and quantification of using real-time RT-PCR assay. (B) Heparin inhibits the infection of A549 cells by E6. Heparin sodium salt was used at concentrations of 0, 0.5, 1, 2 and 4 mg/ml, and mixed with 5×10^5 TCID₅₀ of virus at 37°C for 1h. Infection was monitored by adding the virus-heparin mixture to a confluent monolayer of A549 cells in a 24-well plate at a MOI of 1 and incubating the plate for 24h at 37°C in 5% CO₂ prior to virus quantification by real-time RT-PCR assay. The results are presented as the means (\pm standard deviations) of genome copies per 2×10^5 cells obtained from untreated or treated cells for at least three independent experiments.

E6 infection in CHO cells expressing DAF, CAR and VLA-2

The susceptibility of Chinese Hamster Ovarian (CHO) cells to HAE6 and NHA66 infection was studied at a MOI of 1. As shown in Figure 2A, E6 infection after 24h did not result in any increase in virus titer, indicating the lack of productive infection by both HAE6 and NHA66. Different receptors such as DAF, CAR and VLA-2 which had been reported for other enterovirus were then tested for their ability to act as functional receptors for E6. CHO cells stably expressing DAF (CHO-DAF), CAR (CHO-CAR) and VLA-2 (CHO-VLA2) were therefore studied for their permissivity to E6 infection.

CHO, CHO-DAF, CHO-CAR and CHO-VLA-2 cells were thus incubated with HAE6 or NHA66 at MOI of 1. E6 binding to the cells was evaluated after 30 minutes of incubation at 4°C by “real-time” RT-PCR while cell entry was evaluated after 24 h at 37°C. The HAE6 and NHA66 viruses showed a basal level of attachment for all the cell lines except for CHO-DAF for which a 4-times increase in HAE6 binding was observed (compare Fig. 2A, C & D to Fig. 2B). A CHO cell line deficient in heparan sulfates (CHO HS⁻) was also screened for E6 infection and both viruses showed a background level of attachment which was similar to other CHO cells (Fig. 2E).

The above results show firstly, that CAR and VLA2 do not act as attachment or cell entry receptors for HAE6 or NHA66 in CHO cells. Secondly, background E6 binding to CHO

HS- cells indicated that molecules other than heparan sulfates were involved in the virus attachment. Thirdly, the observed enhanced binding of HAE6 to CHO-DAF cells compared to NHAE6 suggested that DAF-binding is related to the haemagglutination property of HAE6.

Co-expression of DAF and CAR is required for E6 infection

To explore the hypothesis that enterovirus could use more than one receptor at the cell surface, CHO cells that stably expressed DAF and VLA-2 were transiently transfected with a plasmid coding for CAR. The transfected cells were then infected by E6 and virus binding and replication was quantified at 30 min and 24 h post-infection respectively. No increase in virus binding and replication was detected in cells that co-expressed VLA-2+CAR for both HAE6 and NHAE6 (Fig. 3A). The co-expression of DAF+CAR however increased tremendously the susceptibility of the cells to both HAE6 and NHAE6 infection (Fig. 3B). The level of viral load after 30 min at 4°C confirmed the larger attachment of HAE6 to cells expressing DAF while a similar 2-log increase in infection was detected for both HAE6 and NHAE6.

These data demonstrated that the expression of VLA-2 and CAR had no effect on E6 infection. However, the presence of both DAF and CAR resulted in the cell entry and infection of CHO cells by both HAE6 and NHAE6.

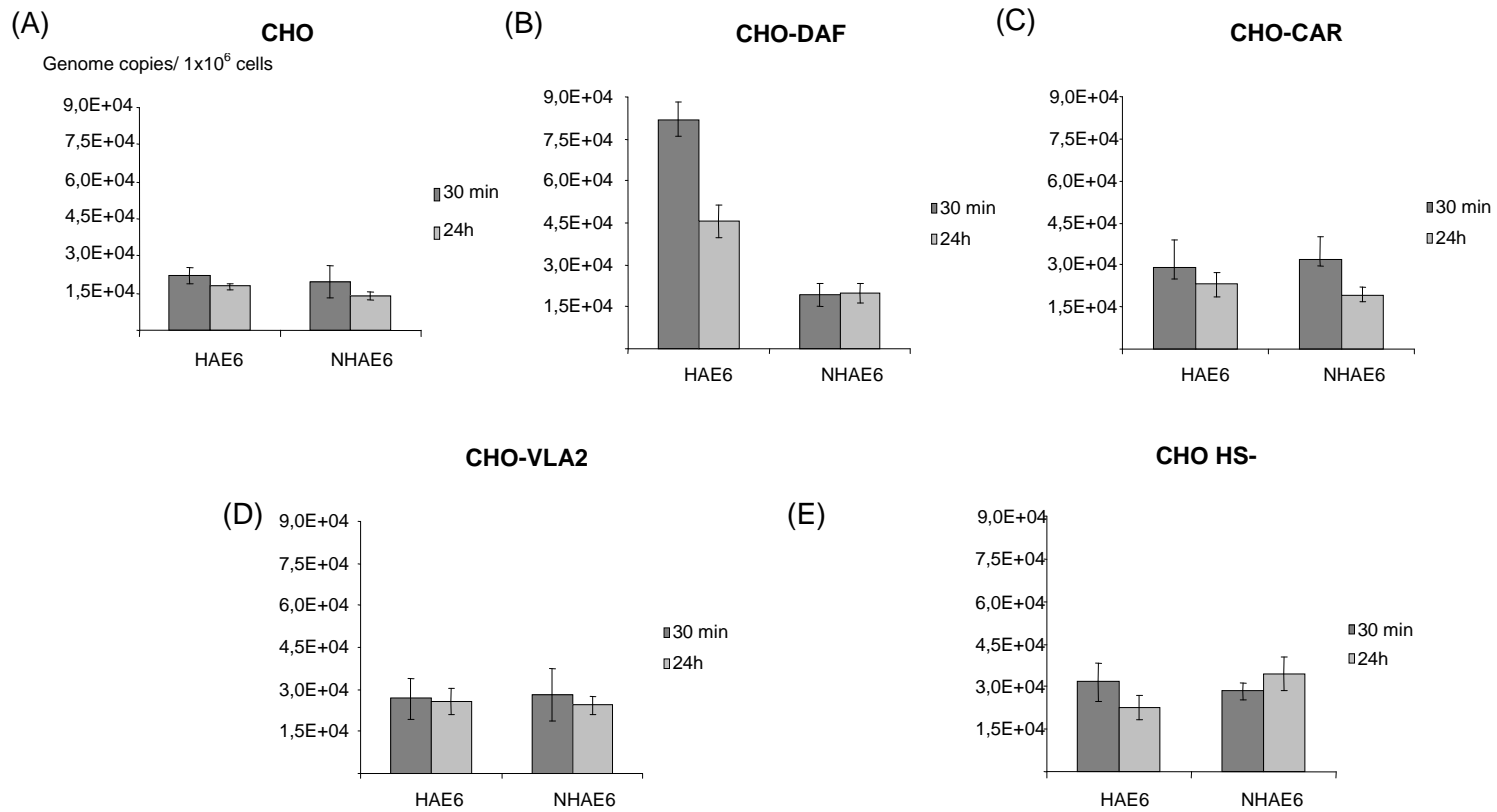


Figure 2 HAE6 and NHA66 binding and replication by CHO cells wild type, transfected with DAF, CAR and the $\alpha 2$ subunit of human VLA-2 or heparan sulfates negative. The different CHO cells were infected with either haemagglutinating or non haemagglutinating strains at a MOI of 1 for 30 minutes at 4°C . Supernatant containing virus was removed, and the cells were washed and incubated for a further 24 h at 37°C . At last, the collected cells after 30 min (dark grey columns) and 24 h (light grey columns) of incubation were tested using an enterovirus specific real time RT-PCR assay. The results are expressed in genome copies per 1×10^6 cells and presented as the means (\pm standard deviations) of three independent experiments for each cell line.

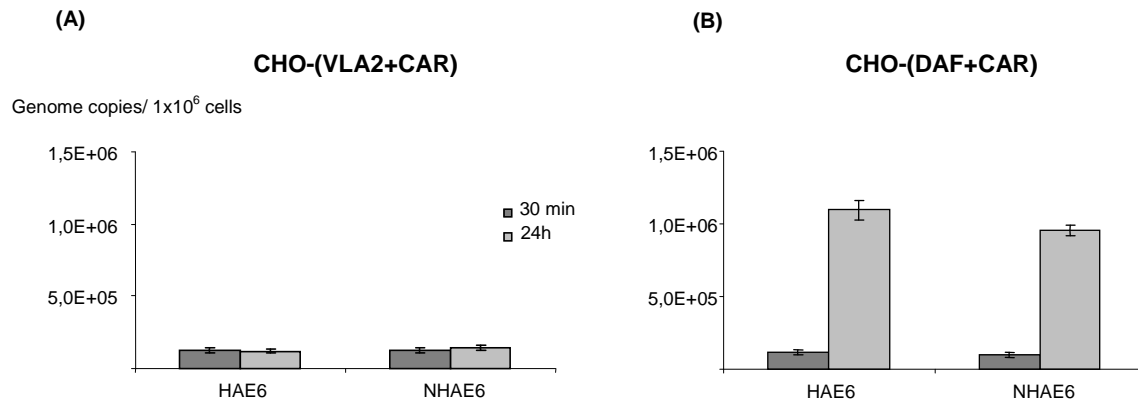


Figure 3 HAE6 and NHA66 replication by CHO cells co-expressing VLA-2+CAR (A) and DAF+CAR (B). A total of 2.4×10^6 CHO cells that stably expressed VLA-2 or DAF were seeded onto a 6-well culture plate and transfected with a plasmid encoding CAR. The cells were then infected by HAE6 and NHA66 at MOI of 1. Virus binding and replication was quantified at 30 min (dark grey columns) and 24 h (light grey columns) post-infection.

Role of DAF in E6 infection

To investigate further the role of DAF in E6 infection when in association with CAR, CHO-(DAF+CAR) cells were pre-treated with PiPL-C before infection with HAE6 and NHA66. Interestingly, PiPL-C treatment of CHO-(DAF+CAR) cells significantly inhibited both virus binding and infection (Fig. 4). This result suggests the important role of DAF as an attachment receptor in E6 infection, in particular for the haemagglutinating strain HAE6.

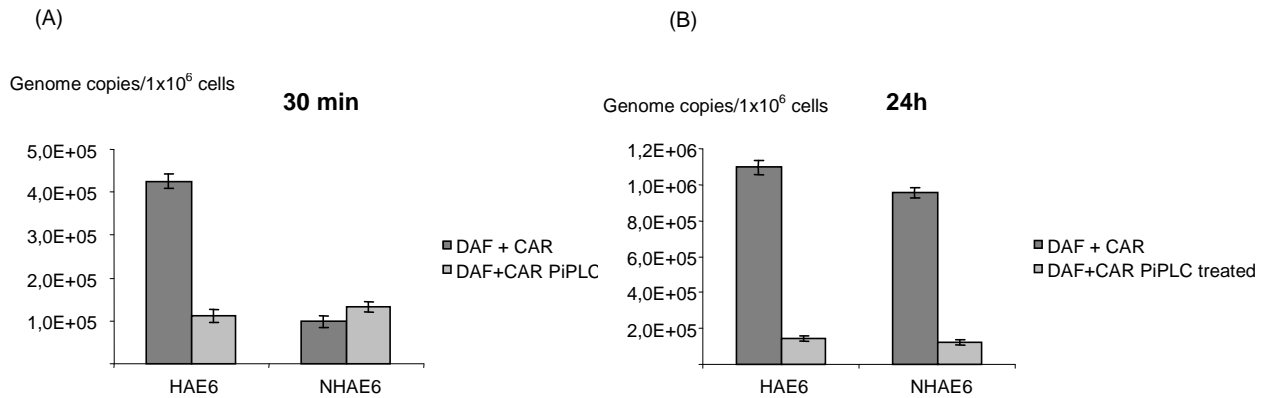


Figure 4 Evaluation of PiPL-C treatment on HAE6 and NHAE6 binding and infection by CHO-(DAF+CAR). CHO cells were treated as described for A549 cells. The results are expressed in genome copies per 1×10^6 cells and presented as the means (\pm standard deviations) of three independent experiments.

Discussion

In this study, two cell culture-derived strains, HAE6 and NHAE6, were isolated from a single clinical isolate of E6. The HAE6 clone isolated on PLC cells showed an improved capacity to haemagglutinate red blood cells, while the NHAE6 clone selected on HeLa cells lost its haemagglutinating ability (15). This different phenotypic characteristic was previously related to DAF usage as receptor at the cell surface (21, 22, 23). DAF is a glycosylphosphatidylinositol(GPI)-anchored surface protein that protects cells from lysis by autologous complement. It was reported to mediate cell surface attachment and infection by several echovirus serotypes (4). Since DAF is expressed on erythrocytes, echoviruses that use this receptor cause haemagglutination. However, infection of RD cells from which DAF has been removed suggests that echoviruses have the capacity to interact with more than one cellular receptor (12, 13). Moreover, DAF binding of echovirus 7 did not lead to the formation of 135S A-particles and then uncoating of the virus contrary to susceptible cells confirming the existence of a secondary cellular receptor (24). At last, several proteins distinct from CAR and DAF have been identified as used for coxsackieviruses (CVB) binding to

cardiac tissue indicating that enteroviruses may use a different set of receptors for infection (20). It is thus clear that echovirus attachment and infection are not limited to DAF usage for haemagglutinating as for non-haemagglutinating strains.

Thus, this report tries to clarify the role of DAF and different enterovirus receptors in echovirus 6 infection and to determine if haemagglutination phenotype is related to differences in the cellular receptor choice. Transfected CHO cells expressing CAR, DAF and VLA-2 and enzymatic treatments of A549 cells were used. CHO cells are not permissive towards infection with echovirus 6. Indeed, no replication was observed after 24h of infection with virus at MOI of 1. Moreover, no isolate adapted to growth in CHO cells was selected after 5 successive passages (data not shown) (5). However, the data presented here demonstrate that CHO cells are able to bind substantial amounts of the viruses. Unexpected binding to CHO cells could be explained by heparan sulfates involvement since they are clearly involved in A549 cells infection by both EV6 strains (12). However, the cell surface heparan sulfates cannot alone explain virus binding since it is not inhibited in heparan sulfates (HS)-negative CHO cells infection proving the existence of others attachment molecules for echovirus 6. Sialic acid functions were thus tested because described in enterovirus 70 binding and infection (2). Their role in echovirus 6 infection was excluded since sialic acid removing from A549 cell surface enhanced virus replication.

Different authors demonstrated that transfection with cDNA encoding for a potential receptor rendered CHO cells permissive to infection by the virus. Bergelson and colleagues have shown by this way that infection by echoviruses 1 and 8 depends on the $\alpha 2$ subunit of human VLA-2 while CHO cells transfected with CAR cDNA become susceptible towards infection with CVB (3, 5). To investigate the role of DAF in HAE6 and NHA6 cell entry mechanisms and to confirm that haemagglutination is related to DAF usage for cell infection, CHO cell transfectants expressing human DAF were infected with both viruses. A significant binding at

the cell membrane was observed after 30 minutes of infection for the two strains. Furthermore, a 4-fold higher number of genome copies confirmed the affinity of the HAE6 to DAF. However, no productive cell infection was observed indicating that DAF is unable to mediate HAE6 entry and uncoating. The role of CAR and VLA-2 was then evaluated. Isolated expression of these molecules was also not able to mediate CHO cells infection by echovirus 6 whereas co-expression of CAR+DAF, but not CAR+VLA-2, made the cells susceptible to the infection. Interestingly, the co-expression at the cell surface of the heparan sulfates and CAR or DAF does not mediate CHO cells infection suggesting a role for E6 as attachment receptor only contrary to CV-B3 (34).

A similar strategy infection as described by Coyne and Bergelson for coxsackieviruses could thus be considered for echovirus 6. In their model, penetration through the intestinal epithelium involves virus attachment to DAF on the apical cell surface. DAF interaction activates actin rearrangements that permit virus movement to the tight junction and access to the coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) promoting conformational changes in the virus capsid and release of viral RNA in the cell cytoplasm (9).

Finally, no difference in receptor usage was observed between haemagglutinating and non haemagglutinating strains. The role of DAF as a sequestration site for haemagglutinating echoviruses within cholesterol-rich ordered domains known as lipid rafts could not be verified (28). The two echovirus 6 strains require close association between CAR and DAF to infect CHO cells despite clear phenotypic differences as observed for haemagglutinating and non haemagglutinating strains of coxsackievirus B3 (21). These findings support the model of a relationship between haemagglutinating ability and affinity differences for DAF binding which could be a consequence of five amino acid changes (data not shown) located on regions of the capsid known to be highly immunogenic or suggested to be involved in receptor binding, virion stability and pathogenicity (18). These amino acid residues could be

associated with conformational changes in the virus capsid which could be related to differences in receptor choice as described for coxsackievirus B3 variant replication in decay accelerating factor (DAF)-negative and coxsackievirus-adenovirus receptor (CAR)-negative cells (34).

Although this report clearly shown for the first time the usage by echovirus 6 of a DAF/CAR complex, evidence of a yet unknown cellular receptor remains. Indeed, human lung cells (MRC5 cells) commonly used for echovirus isolation express DAF but not CAR suggesting the existence of a third receptor able to cooperate with DAF during echovirus infection (29). It will be then interesting to study the role of CAR in other echovirus serotypes infection in order to definitely renowned CAR as ECAR. Moreover, the structural and functional insights into the interaction of echoviruses and CAR, a member of the immunoglobulin superfamily, remain to be determined.

References

1. **Abe, O., H. Kimura, H. Minakami, M. Akami, M. Inoue, A. Saito, and K. Otsuki.** 2000. Outbreak of gastroenteritis caused by echovirus type 6 in an orphanage in Japan. *J. Infect.* **41**:285 - 286.
2. **Alexander, D. A., K. Dimock.** 2002. Sialic acid functions in enterovirus 70 binding and infection. *J. Virol.* **76**:11265-11272.
3. **Bergelson, J. M., J. A. Cunningham, G. Droguett, E. A. Kurt-Jones, A. Krithivas, J. S. Hong, M. S. Horwitz, R. L. Crowell, and R. W. Finberg.** 1997. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* **275**:1320-1323.
4. **Bergelson, J.M., M. Chan, K. R. Solomon, N. F. St. John, H. Lin, and R. W. Finberg.** 1994. Decay-accelerating factor (CD55), a glycosylphosphatidylinositol-anchored complement regulatory protein, is a receptor for several echoviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**:6245 - 6249.
5. **Bergelson, J. M., N. F. St John, S. Kawaguchi, M. Chan, H. Stubdal, J. Modlin, and R. W. Finberg.** 1993. Infection by echoviruses 1 and 8 depends on the alpha 2 subunit of human VLA-2. *J. Virol.* **67**:6847-6852.
6. **Bergelson, J. M., Shepley, M. P., Chan, B. M., Hemler, M. E., Finberg, R. W.** 1992. Identification of the integrin VLA-2 as a receptor for echovirus 1. *Science* **255**:1718-1720.
7. **Berger, M.M., N. Kopp, C. Vital, B. Redl, M. Aymard, and B. Lina.** 2000. Detection and cellular localization of enterovirus RNA sequences in spinal cord of patients with ALS. *Neurology* **54**:20-25.

8. **Chomel, J.J., D. Antona, D. Thouvenot, and B. Lina.** 2003. Three echovirus serotypes responsible for outbreak of aseptic meningitis in Rhone-Alpes region, France. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **22**:191-193.
9. **Coyne, C.B., and J. M. Bergelson.** 2006. Virus-induced Abl and Fyn kinase signals permit coxsackievirus entry through epithelial tight junctions. *Cell* **124**:119-131.
10. **Coyne, K.E., S. E. Hall, S. Thompson, M. A. Arce, T. Kinoshita, T. Fujita, D. J. Anstee, W. Rosse, and D. M. Lublin.** 1992. Mapping of epitopes, glycosylation sites, and complement regulatory domains in human decay accelerating factor. *J. Immunol.* **149**:2906-2913.
11. **Cova, L., and M. Aymard.** 1980. Isolation and characterization of non-haemagglutinating echovirus 11. *J Gen Virol.* **51**:219-222.
12. **Goodfellow, I. G., A. B. Sioofy, R. M. Powell, and D. J. Evans.** 2001. Echoviruses bind heparan sulfates at the cell surface. *J. Virol.* **75**:4918-4921.
13. **Goodfellow, I. G., R M. Powell, T. Ward, O. B. Spiller, J. W. Almond, and D. J. Evans.** 2000. Echovirus infection of rhabdomyosarcoma cells is inhibited by antiserum to the complement control protein CD59. *J. Gen. Virol.* **81**:1393-401.
14. **Joo, C. H., J. Ahn, I. Seo, Y. K. Kim, D. Kim, H. Hong, and H. Lee.** 2005. Characterization of nonpolio enteroviruses recovered from patients with aseptic meningitis in Korea. *Intervirology* **48**:97-103.
15. **Leveque, N., Norder, H., Zreik, Y., Cartet, G., Falcon, D., Rivat, N., Chomel, J. J., Hong, S. S., Lina, B.** Echovirus 6 strains derived from a clinical isolate show differences in haemagglutination ability and cell entry pathway. *Virus Res.* 2007 Jun 11; [Epub ahead of print]
16. **Lina, B., B. Pozzetto, L. Andreoletti, E. Beguier, T. Bourlet, E. Dussaix, L. Grangeot-Keros, B. Gratacap-Cavallier, C. Henquell, M. C. Legrand-Quillien, A.**

- Novillo, P. Palmer, J. Petitjean, K. Sandres, P. Dubreuil, H. Fleury, F. Freymuth, I. Leparc-Goffart, D. Hober, J. Izopet, H. Kopecka, Y. Lazizi, H. Lafeuille, P. Lebon, and M. Aymard.** 1996. Multicenter evaluation of a commercially available PCR assay for diagnosing enterovirus infection in a panel of cerebrospinal fluid specimens. *J. Clin. Microbiol.* **34**:3002-3006.
17. **Mbida, A. D., Pozzetto, B., Gaudin, O. G., Grattard, F., Le Bihan, J. C., Akono, Y., Ros, A.** 1992. A 44,000 glycoprotein is involved in the attachment of echovirus-11 onto susceptible cells. *Virology.* **189**:350-353.
18. **Muckelbauer, J. K., M. Kremer, I. Minor, G. Diana, F. J. Dutko, J. Groarke, D. C. Pevear, M. G. Rossmann.** 1995. The structure of coxsackievirus B3 at 3.5A resolution. *Structure* **3**:653-667.
19. **Nokhbeh, M. R., S. Hazra, D. A. Alexander, A. Khan, M. McAllister, E. J. Suuronen, M. Griffith, and K. Dimock.** 2005. Enterovirus 70 binds to different glycoconjugates containing alpha2,3-linked sialic acid on different cell lines. *J. Virol.* **79**:7087-7094.
20. **Orthopoulos, G., K. Triantafilou, and M. Triantafilou.** 2004. Coxsackie B viruses use multiple receptors to infect human cardiac cells. *J Med Virol.* **74**:291-299.
21. **Pasch, A., J. H. Kupper, A. Wolde, R. Kandolf, and H. C. Selinka.** 1999. Comparative analysis of virus-host cell interactions of haemagglutinating and non-haemagglutinating strains of coxsackievirus B3. *J. Gen. Virol.* **80**:3153-3158.
22. **Powell, R. M., T. Ward, I. Goodfellow, J. W. Almond, and D. J. Evans.** 1999. Mapping the binding domains on decay accelerating factor (DAF) for haemagglutinating enteroviruses: implications for the evolution of a DAF-binding phenotype. *J. Gen. Virol.* **80**:3145-3152.

23. **Powell, R. M., V. Schmitt, T. Ward, I. Goodfellow, D. J. Evans, and J. W. Almond.** 1998. Characterization of echoviruses that bind decay accelerating factor (CD55): evidence that some haemagglutinating strains use more than one cellular receptor. *J. Gen. Virol.* **79**:1707-1713.
24. **Powell RM, Ward T, Evans DJ, and Almond JW.** 1997. Interaction between echovirus 7 and its receptor, decay-accelerating factor (CD55): evidence for a secondary cellular factor in A-particle formation. *J. Virol.* **71**:9306-9312.
25. **Rossmann, M. G.** 1989. The canyon hypothesis. Hiding the host cell receptor attachment site on a viral surface from immune surveillance. *J. Biol. Chem.* **264**:14587-14590.
26. **Rotbart H. A.** 1990. Enzymatic RNA amplification of the enteroviruses. *J. Clin. Microbiol.* **28**:438-442.
27. **Simons, K., and E. Ikonen.** 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**:569-572.
28. **Stuart, A. D., H. E. Eustace, T. A. McKee, and T. D. Brown.** 2002. A novel cell entry pathway for a DAF-using human enterovirus is dependent on lipid rafts. *J. Virol.* **76**:9307-9322.
29. **Tonew, M., B. Wagner, M. Wagner, M. Schmidtke, and A. Stelzner.** 1996. Permissiveness of human embryonal fibroblasts for coxsackieviruses B3. Investigations on virus genetic markers in vitro and localization of virus receptor distribution by immunogold replica technique. *Zentralbl. Bakteriolog.* **284**:443-456.
30. **Ventura, K.C., H. Hawkins, M. B. Smith, and D. H. Walker.** 2001. Fatal neonatal echovirus 6 infection: autopsy case report and review of the literature. *Mod. Pathol.* **14**:85-90.

31. **Verstrepen, W. A., S. Kuhn, M. M. Kockx, M. E. Van De Vyvere, and A. H. Mertens.** 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**:4093-4096.
32. **Vivès, R. R., H. Lortat-Jacob, J. Chroboczek, and P. Fender.** 2004. Heparan sulfates proteoglycan mediates the selective attachment and internalization of serotype 3 human adenovirus dodecahedron. *Virology* **321**:332-340.
33. **Ward, T., R. M. Powell, P. A. Pipkin, D. J. Evans, P. D. Minor, and J W. Almond.** 1998. Role for beta2-microglobulin in echovirus infection of rhabdomyosarcoma cells. *J. Virol.* **72**:5360-5365.
34. **Zautner, A. E., U. Korner, A. Henke, C. Badorff, and M. Schmidtke.** 2003. Heparan sulfates and coxsackievirus-adenovirus receptor: each one mediates coxsackievirus B3 PD infection. *J. Virol.* **77**:10071-10077.

New Enteroviruses, EV-93 and EV-94, Associated With Acute Flaccid Paralysis in the Democratic Republic of the Congo

Nina Junttila,¹ Nicolas Lévêque,² Jean Pierre Kabue,³ Gaëlle Cartet,² Fidèle Mushiya,³ Jean-Jacques Muyembe-Tamfum,³ Aurélien Trompette,² Bruno Lina,² Lars O. Magnus,¹ Jean-Jacques Chomel,² and Helene Norder^{1,2*}

¹Swedish Institute for Infectious Disease Control, Solna, Sweden

²Centre National de Référence des Entérovirus, Laboratoire de Virologie des HCL, Université Claude Bernard Lyon, Lyon Cedex, France

³Institut National de Recherche Bio-Médicale, Kinshasa, Democratic Republic of the Congo

Surveillance of acute flaccid paralysis often identifies enteroviruses not typeable by virus neutralization in cell culture. During 2000 and 2001, 186 isolates from 138 children with acute flaccid paralysis in the Democratic Republic of the Congo were sent for typing to the National Reference Centre for Enteroviruses in Lyon, France. The 5' UTR of the viral genome could be amplified by PCR for 158 isolates from 114 patients. Isolates from 89 patients were neutralizable, and contained non-polio enterovirus types. Seventeen children were infected with more than one enterovirus; another three were co-infected with both these viruses. Serological typing failed with 19 isolates from 13 (9%) patients. The VP1 region of these strains could be amplified by PCR and sequenced, which revealed that five children were infected with CV-A17, EV-70, EV-76, EV-77, or CV-A13. Two patients were doubly infected, one with CV-A24 and E-9, and another with E-27 and EV-81. Isolates from six children contained strains with divergent VP1 region. The amino acid sequences of these complete VP1 regions diverged $\geq 28\%$ from published types indicating that they represented two new enterovirus types, tentatively designated EV-93 belonging to HEV-B and EV-94 within HEV-D. The latter enterovirus has in parallel been isolated from sewage in Egypt. In conclusion, there was a high frequency of "untypable" enterovirus isolates from cases with acute flaccid paralysis in the Democratic Republic of the Congo. Six of these were shown to represent two enteroviruses not previously described. **J. Med. Virol.** 79:393–400, 2007. © 2007 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: human enterovirus; poliovirus; VP1 sequence; phylogenetic analysis; adenovirus

INTRODUCTION

The genus *Enterovirus* (family *Picornaviridae*) comprises at least 95 serotypes, 73 of which are known human pathogens. The correlation between the VP1 sequence and serotype of different enterovirus types has been shown in several studies [Oberste et al., 1999a,b, Norder et al., 2001]. Furthermore, genetic typing of enteroviruses by complete or partial sequencing of the VP1 region may now be applied, which considerably simplifies the typing [Oberste et al., 1999a,b, Norder et al., 2001]. Based on molecular and biological characteristics, the human enterovirus (HEV) types are classified into five species, HEV-A through HEV-D and poliovirus (PV). HEV-A comprises coxsackievirus A2 (CV-A2) to CV-A8, CV-A10, CV-A12, CV-A14, CV-A16, and EV-71 as well as four new types, enterovirus 76 (EV-76), EV-89, EV-90, and EV-91 [Oberste et al., 2005]. HEV-B includes CV-A9, coxsackie B virus 1 (CVB-1) to CV-B6, echovirus 1 (E-1) to E-7, E-9, E-11 to E-21, E-24 to E-27, E-29 to E-33, and also EV-69. Another five newly described enteroviruses; EV-73 [Oberste et al., 2001; Norder et al., 2002], EV-74 and EV-75 [Oberste et al., 2004], and EV-77 and EV-78 [Norder et al., 2003] also belong to this species. The members in the HEV-C species are CV-A1, CV-A11, CV-A13, CV-A15, CV-A17 to CV-A22, and CV-A24. Recent studies show that poliovirus type 1 (PV-1), PV-2, and PV-3, should be considered as members of HEV-C rather than being classified separately [Brown et al., 2003]. There are so far only two published types belonging to HEV-D,

Grant sponsor: European Union.

*Correspondence to: Helene Norder, Swedish Institute for Infectious Disease Control, SE-17182 Solna, Sweden.

E-mail: helene.norder@smi.ki.se

Accepted 28 November 2006

DOI 10.1002/jmv.20825

Published online in Wiley InterScience
(www.interscience.wiley.com)

EV-68, and EV-70. An additional unknown number of "untypeable" isolates remain to be classified [Oberste et al., 2004b, 2005].

HEVs are second to rhinoviruses as the most common viral agents in humans. Most infections are asymptomatic or mild with upper respiratory tract symptoms and/or exanthemas. Rarely, some patients develop aseptic meningitis, encephalitis, paralysis, or myocarditis [Muir et al., 1998]. Knowledge is still incomplete on the relation between viral type and clinical manifestation for non-polio enteroviruses. The same type can cause several different syndromes and different types may cause similar symptoms [Lukashev, 2004]. All three PV types may cause inflammation and destruction of anterior horn cells in the spinal cord resulting in acute flaccid paralysis. After WHO launched the global program of eradication of polio in 1988, poliomyelitis due to wild PV is almost eradicated but acute flaccid paralysis associated with non-polio HEVs remains a problem [Chen et al., 2001; Grimwood et al., 2003; Hussain et al., 2004].

In this study, isolates from patients with acute flaccid paralysis during 2000–2001 in the Democratic Republic of the Congo were typed by neutralization on cell culture. Strains untypeable by this technique were further investigated by PCR amplification and sequencing of the VP1 region.

MATERIALS AND METHODS

A total of 694 fecal samples were collected during 2000–2001 in the Democratic Republic of the Congo for surveillance of acute flaccid paralysis as part of the WHO PV eradication program [Kabue et al., 2004]. The Northern and Western regions of the country were not under governmental control due to rebellions. These regions could, therefore, not be included in the surveillance of acute flaccid paralysis. The Uganda Virus Research Institute and the Institut Pasteur in Bangui in the Central African Republic processed some stool samples from these areas. All samples obtained were inoculated and cultured on RD (rhabdomyosarcoma cells) and L20B, a derivative of murine L cells harboring the human gene for PV receptor [Mendelsohn et al., 1989; Wood and Hull, 1999]. The cell lines were grown in EMEM culture medium supplemented with 2% fetal calf serum and incubated at 36°C at Institut National de Recherche Bio-Medicale in Kinshasa, the Democratic Republic of the Congo. The cells were harvested when complete cytopathic effect (CPE) was obtained. The isolates with CPE on L20B cells were sent for further characterization and typing to the National Institute for Communicable Diseases in Johannesburg, South Africa. One hundred eighty-six isolates selected at random from the samples giving CPE on RD cells only were sent for typing to the National Polio Virus Reference Laboratory (NPL) of France in Lyon. Ninety-eight of the isolates derived from 73 children with acute flaccid paralysis in 2000, and 88 isolates from 65 children with acute flaccid paralysis in 2001.

Neutralization attempts for enteroviruses and human parechoviruses (HPeV) were performed with the Lim-Beneyesh-Melnick (LBM) eight intersecting enterovirus pools of anti-sera, A to H. Enteroviruses, that were possible to re-isolate, were confirmed with pan-enterovirus PCR towards the 5'-UTR sequence as described [Lina et al., 1996, Dussart et al., 2005]. The PV isolates were differentiated further into wild or vaccine type using the neutralization index method [WHO, 1990]. Sabin specific and wild-type specific monoclonal antibodies were supplied by Dr. Radu Crainic, Institut Pasteur, Paris. Confirmatory identification and typing was done at the European Centre for Polio Virus at the Robert Koch-Institute in Berlin, Germany. Adenoviruses were typed by hemagglutination-inhibition according to Rosen (1960).

Non-neutralizable isolates were typed by partial sequencing within the VP1 region [Norder et al., 2003]. RNA was extracted from cell-cultures showing CPE. cDNA was synthesized using 100 U SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA), 20 U Rnasin Plus Ribonuclease Inhibitor (Promega, Madison, WI), 1 nmol random hexamer primers (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN), and 5 µl of extracted RNA. Reverse transcription followed by amplification by PCR was performed with primers 292 and 222, that recognize the N-terminal part of VP1 as described by Oberste et al. [2000]. Amplification of the complete VP1 region was performed for divergent HEV-B and HEV-D strains and carried out with VP1 specific primer pairs. The HEV-B strains were amplified with primers Bs1 (5'-GTNYTRT-GYRTNCCNTGGATHAG-3') and Brt (5'-TCNAC-NAHNCCNggNCCYTCRAA-3') position 2,225–3,548, (positions according to EV-68 accession number AY426531). The HEV-D strains were amplified with primers Ds1 (5'-ACMTGTTTYATGCARACCAA-CCT-3') and Drt (5'-ACYTRCATCKYGCWATTTGAT-GT-3') position 2,260–3,456. Thermocycling for both PCRs was performed for 40 cycles with denaturation for 20 sec at 94°C, annealing for 20 sec at 55°C, and elongation for 90 sec at 72°C.

All PCR amplicons were purified using GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) according to the manufacturer's recommendations. Sequencing was performed in both directions using fluorescent-labeled dideoxy-chain terminators and reagents in the BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit, Version 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA). An ABI PRISM 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems, San Francisco, CA) was used to analyze the fragments. The deduced sequences of the VP1 protein were aligned with previously published sequences [Norder et al., 2001] and sequences obtained from GenBank. The number of identical amino acids were calculated with the MEGA program package, Version 1.02 [Kumar et al., 1993]. Genetic distances were calculated using Dayhoff's PAM 001 matrix [Dayhoff et al., 1978], in the Protdist program in the PHYLIP 3.53 program package [Felsenstein, 1993]. Dendrograms were constructed

using the UPGMA and neighbor-joining algorithms in the Neighbor program [Felsenstein, 1993].

Sequence analysis was undertaken with the sequences of the VP1 region of the strains in the isolates that could not be typed by neutralization on cell culture. The obtained type was, thereafter, confirmed by neutralization on cell culture with high-titre type-specific monovalent antisera. Strains were tentatively proposed as new types if the nucleotide sequence of the VP1 region was less than 70% identical to the corresponding region of all established enterovirus types [Oberste et al., 2004b]. The whole VP1 sequence of these tentatively new enteroviruses was submitted to Dr. Glyn Stanway (stanwg@essex.ac.uk) at the Picornavirus Study Group of the International Committee for the Taxonomy of Viruses.

RESULTS

Enterovirus and/or adenoviruses could be identified in 186 isolates from 133 children with paralytic disease (Table I). Non-polio enteroviruses were serologically typed using LBM-pools in 121 isolates from 89 patients. All isolates had given characteristic CPE on enterovirus susceptible cell lines. Twelve children were infected with PV and 1 of these was co-infected with adenovirus 5 (Ad5) and another with Ad27. HPeV type 1 was serologically identified in the isolate from one patient. Re-isolation failed for five isolates from five patients. Nineteen isolates from 13 children (9%) contained enterovirus strains that could not be neutralized.

Overall, 158 isolates from 114 patients were positive with the pan-enterovirus PCR. A total of 43 different enterovirus types were identified by neutralization or sequencing (Table II). E-11 was the most prevalent type found in 15 patients (11%), followed by CV-A24 and PV-1, each found in the isolates from 13 (9%) and 12 (9%) patients, respectively. All PV strains were isolated during 2000, and were all wild type. Twenty (14%) enterovirus types occurred sporadically and were found in 2–6 patients, and another 20 (14%) types were isolated only once during the 2-year study period. Adenoviruses belonging to species B, C, and D were detected in 18 patients (22 isolates) (Table III). Ad2 (four isolates) and Ad6 (six isolates) were the most common

adenovirus types found in isolates from four patients each followed by Ad8 identified in four isolates from three patients. Five isolates were obtained from 3 patients simultaneously infected with enterovirus and adenoviruses. Seventeen (12%) children were infected with more than one enterovirus and/or adenovirus type. (Table II)

The 19 isolates from the 13 patients infected with strains non-typeable by neutralization could be characterized by sequencing and by phylogenetic analysis within the N-terminal part of the VP1 region. The phylogenetic trees obtained with both UPGMA and NJ algorithms showed that the untypeable strains belonged to all four HEV species. One isolate, Ve41/03 was identified as EV-76, a recently published member of HEV-A [Oberste et al., 2005].

Based on phylogenetic analysis of the complete VP1 region, three isolates, Ve38/03, Ve39/03 (same patient as Ve38/03), and Ve40/04, formed a distinct clade within HEV-B in the dendrogram (Fig. 1). Ve40/03 and Ve38/03 were 99% identical at the amino acid level and 93% at the nucleotide level (Table IV). The complete VP1 sequences of these strains were less than 70% identical to the VP1 sequences of described prototypes and suggested recently new types. The most similar prototype strains were EV-80 and E-15 with 65–72% amino acid and 65–69% nucleotide identities, respectively. Sequence data on these isolates were sent to the Picornavirus Study Group, which confirmed that they represented a tentative new type, registered as EV-93. After partial typing of the VP1 region also Ve14/04 revealed a highly similar sequence to the newly found EV-93 type (not shown in the dendrogram).

Four untypeable members of HEV-B were found in three isolates, Ve16/04, Ve18/04 and Ve23/04. Both Ve16/04 and Ve18/04 contained two enterovirus types. Isolate Ve16/04 contained a strain with sequence similarities to E-9 (Ve16/04#1) and CV-A24 in HEV-C, with a high sequence similarity to the prototype (Ve16/04#2). Sequencing of the whole VP1 region of Ve16/04#1, showed 85% amino acid and 73% nucleotide identity to the E-9 prototype. One of the two strains in the other isolate, Ve18/04#1, formed a unique branch within HEV-B while the other strain, Ve18/04#2, showed 73% nucleotide and 87% amino acid similarity to the E-27 prototype. Sequence data on both these strains were sent to the Picornavirus Study Group. Ve18/04#1 was found to be similar to EV-81 identified recently (not yet published), while the systematic status of Ve18/04#2 was still pending. Isolate Ve23/04 showed 95% amino acid and 86% nucleotide identity to EV-77 [Norder et al., 2003].

Three patients were infected with untypeable HEV-C strains. In the dendrogram, the VP1 sequence from isolate Ve10/04 split off from the CV-A13/CV-A18 branch and showed 84% amino acid and 72% nucleotide identity compared to the CV-A18 prototype. The corresponding region of the strain in isolate Ve12/04 showed highest similarity to the CV-A17 prototype with which it shared 93% amino acid and 77% nucleotide

TABLE I. Virological Findings in 138 Children With Acute Flaccid Paralysis

	2000	2001	Total
Poliovirus	12 ^a	0	12 ^a
Non-poliovirus enteroviruses typeable by neutralization	43	46 ^b	89
Enteroviruses untypeable by neutralization	3	10	13
Adenoviruses	11	7	18
Human parechovirus 1	1	0	1
Negative CPE	3	2	5
Total	73	65	138

^aTwo patients infected with Ad5 and Ad27, respectively.

^bOne patient infected with Ad6.

TABLE II. Enterovirus Types Isolated From Stools From 114 Patients

Type(s)	Number of patients infected with indicated type(s)						
	2000	2001	Total	Type(s)	2000	2001	Total
E-11	6	5	11	CV-B1	1	1	2
E-11 + E-15	1	0	1	E-15	1	1	2
				E-24	1	1	2
PV-1 + E-11	3	0	3	E-30	2	0	2
PV-1	2	0	2				
PV-1 + PV-2	1	0	1	CV-A13 ^a	1	0	1
PV-1 + CV-A20	1	0	1	CV-A13	0	1	1
PV-1 + E-19	1	0	1	CV-A15	1	0	1
PV-1 + PV-2 + E-19	1	0	1	CV-A15 + CV-A11	1	0	1
PV-1 + Ad27	1	0	1	CV-A17 ^a	1	0	1
PV-1 + Ad5	1	0	1	EV-70 ^a	0	1	1
PV1 + E9	1	0	1	E-27 ^a + EV-81 ^a	0	1	1
				EV-76 ^a	0	1	1
CV-A24	3	7	10	EV-77 ^a	0	1	1
CV-A24 + CV-B5	1	0	1	CV-A12	0	1	1
CV-A24 ^a + E-9 ^a	0	1	1	CV-A7	1	0	1
CV-A24 + Ad6	0	1	1	CV-A9	0	1	1
				CV-B2	1	0	1
E-13	1	5	6	CV-B4	1	0	1
				E-14	0	1	1
E-33	3	2	5	E-2	1	0	1
E-33 + E-15	1	0	1	E-20	0	1	1
				E-26	0	1	1
CV-A20	4	0	4	E-3	0	1	1
CV-B5	4	0	4	E-31	0	1	1
E-19	3	1	4	E-6	0	1	1
E-7	0	4	4	E-9	1	0	1
				EV-71	1	0	1
EV-93 ^a	1	2	3				
EV-94 ^a	0	3	3				
CV-A10	0	3	3				
E-12	2	1	3				
E-21	0	3	3				
E-29	1	2	3				
				Total	58	56	114

^aThe types were identified only by sequence analysis of the VP1 region.

identity. The third isolate Ve16/04 contained as mentioned E-9 and CV-A24 strains.

Four isolates, Ve17/04, Ve19/04, Ve22/04, and Ve4/05 contained untypeable members of HEV-D. The VP1 region of two of them, Ve19/04 and Ve22/04, formed a separate clade in the phylogenetic tree and split off from the same branch as EV70 (Fig. 1). The divergences of the VP1 regions were supported by pairwise comparison showing 66 and 67% amino acid identity with the heterotypic EV-70 prototype, corresponding to 72 and

71% nucleotide identity, respectively (Table V). The VP1 nucleotide sequences of the homotypic isolates Ve19/04 and Ve22/04 were 97% identical to one another and the deduced protein sequences were 98% identical. The VP1 sequences of these isolates were submitted to the Picornavirus Study Group, which registered these new HEV-D members as EV-94 also identified in parallel in Egypt [Smura et al., 2007]. Later, partial sequencing of VP1 of a third strain in isolate Ve4/05 also showed high similarity to the two EV-94 strains. The VP1 region of the strain in isolate Ve17/04 was shown to be similar to EV-70 within HEV-D (Fig. 1).

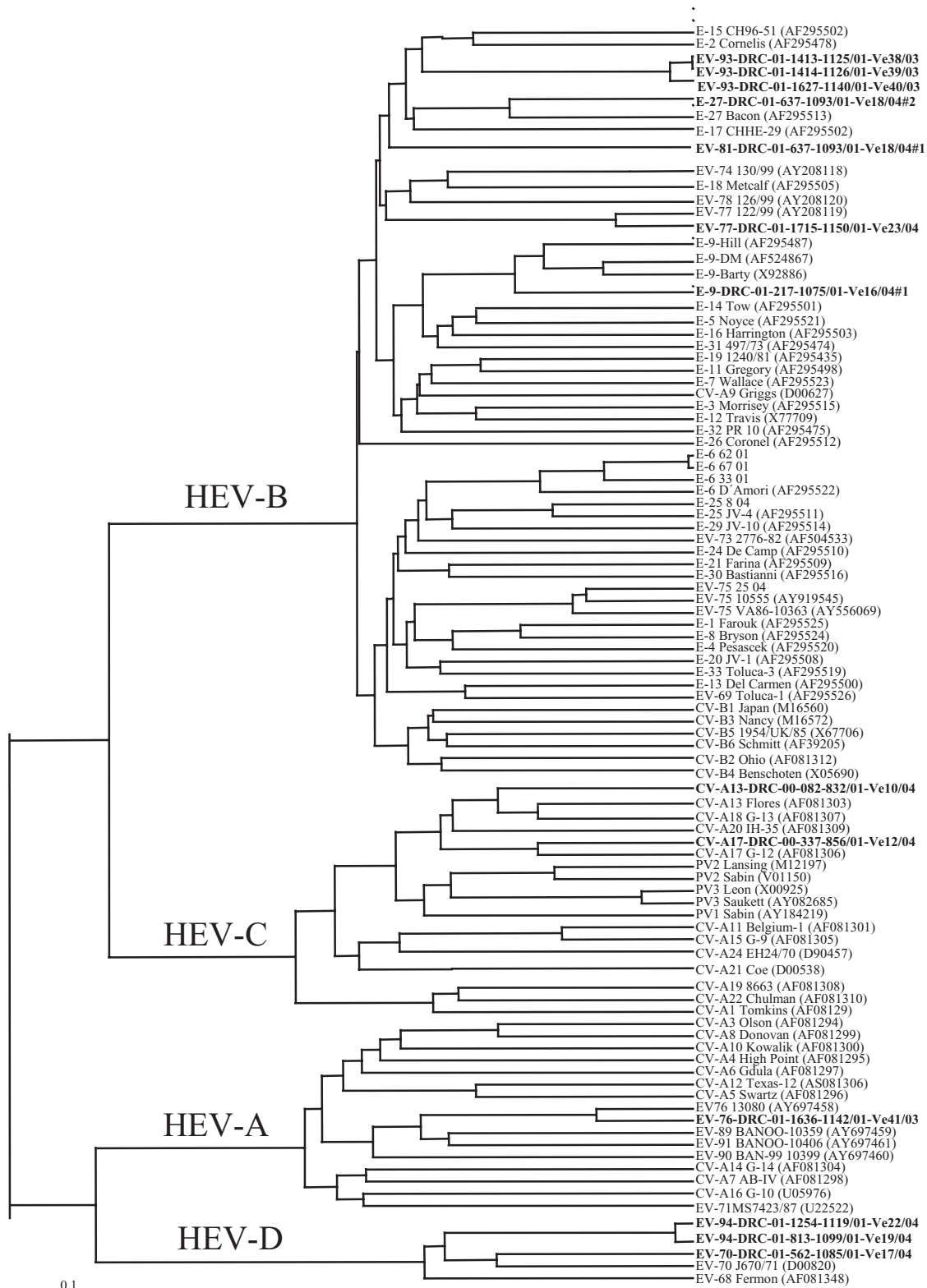
Five children between 2 and 13 years were infected with EV-93 or EV-94. All had progressive paralysis of their legs, and three had also fever. Two children were lost from follow-up. The other three recovered from their acute flaccid paralysis without sequel.

DISCUSSION

Isolates that fail neutralization attempts may contain multiple strains, genetically drifted strains or even new enterovirus types [Muir et al., 1998]. In this study,

TABLE III. Results from Typing Adenovirus Isolates From 18 Children With Acute Flaccid Paralysis

Adenovirus	Subgroup	2000	2001	Total
2	C	4	0	4
6	C	3	1	4
7	B	1	1	2
8	D	0	3	3
10	D	2	0	2
13	D	0	1	1
17	D	1	0	1
35	D	0	1	1
Total		11	7	18



0.1

Fig. 1. UPGMA dendrogram based on the complete amino acid sequence of the VP1 region of 101 enterovirus strains. The designations of the strains from the Democratic Republic of Congo are marked in bold. The strain designations are composed by laboratory serial numbers from Institute National de Recherche Biomedical in Kinshasa, (DRC- year-no), Centre National de Reference de Enterovirus in Lyon (no/year), The Swedish Institute of Infectious Disease Control (Ve no/year). For the GenBank strains accession numbers are provided.

TABLE IV. Comparison of Amino Acid and Nucleotide Identities of the Complete VP1 Region Between EV-93 Isolates and the Most Similar Prototype Strains Within HEV-B; E-2, E-15, and EV-80

	Amino acid (upper triangle)/nucleic acid (lower triangle) identity				
	Ve38/03	Ve40/03	E-2	E-15	EV-80
Ve38/03	—	99%	69%	72%	71%
Ve40/03	93%	—	68%	71%	70%
E-2	66%	66%	—	70%	76%
E-15	69%	68%	71%	—	68%
EV-80	65%	66%	68%	70%	—

13 enterovirus isolates were not typeable by conventional methods. Five of these contained two new enterovirus types, EV-93 and EV-94, from children with acute flaccid paralysis in the Democratic Republic of the Congo. The EV-93 strains may be widely spread in the country, since they were isolated from patients from geographically divergent parts; one in Kinshasa and another in Bas-Congo, two neighboring, South-Western provinces, and additionally one in the province of Kasai Oriental in the mid-South. Less than 1% of individuals infected with PV develop paralytic illness. If this also applies to non-polio enteroviruses, there may be a large group of individuals infected with these new enterovirus types, some of which may develop acute flaccid paralysis.

New criteria for defining enterovirus types by sequence analysis of the VP1 region have been proposed by Oberste et al. [2004b]. The VP1 sequence of a homotypic virus type should share at least 75% nucleotide sequence identity (<85% VP1 amino acid identity). The VP1 sequence of viruses with less than 70% identity to all known types (>85% amino acid identity) should tentatively represent a new previously not established type. Isolates with sequence identities between 70 and 75% are in a gray zone and needs further investigation to be classified [Oberste et al., 2004b]. In this study, the VP1 region of strains in four of the isolates, Ve10/04, Ve16/04#1, Ve17/04, and 18/04#2, showed 70–75% amino acid identity to the most similar prototype. Further characterization of these strains is needed to investigate whether some of them may represent new enterovirus types. Antigenic drift caused by genetic

TABLE V. Comparison of Amino Acid and Nucleotide Identities of the Complete VP1 Region Between EV-94 Isolates and the Prototype Strains of EV-68 and EV-70 Within HEV-D

	Amino acid (upper triangle) nucleic acid (lower triangle) identity			
	Ve19/04	Ve22/04	EV-68	EV-70
Ve19/04	—	98%	73%	72%
Ve22/04	97%	—	73%	71%
EV-68	68%	67%	—	70%
EV-70	66%	67%	65%	—

changes in serologically important epitopes might explain why neutralization attempts failed with these strains. Two isolates contained a mixture of two enterovirus types. One isolate, Ve16/04, contained E-9 and CV-A24, while the other, Ve18/04, contained E-27 and E-81.

The isolate Ve12/04 was shown by sequence analysis of the VP1 region to contain a CV-A17 strain. The amino acid sequence of this region was 93% identical and the nucleotide sequence 77% identical to the prototype. The reason for this strain not being neutralizable is not known, although it may be due to genetic drift resulting in amino acid changes in one or several neutralizing epitopes.

In this study, E-11, CV-A24, and PV type 1 were the most prevalent types found in children with acute flaccid paralysis in the Democratic Republic of the Congo. During 2000, 12 patients were infected with PV type 1, and none the following year. Vaccine campaigns against polio were difficult to carry through in the whole country due to internal conflicts. Therefore, polio has not been eradicated and is still causing paralytic disease. In Northern India, E-11 is the most commonly isolated non-polio enterovirus from children with acute flaccid paralysis [Kapoor et al., 2004]. Also a study from Tunisia showed that E-11 was the most prevalent enterovirus type in both acute flaccid paralysis patients and healthy individuals during 1992 and 2003 [Bahri et al., 2005]. There may be different explanations why E-11 and CV-A24 were the dominating types in our investigation. Infections with E-11 and especially CV-A24 occur worldwide both endemically and a variant of CV-A24, CV-A24v, often causes outbreaks [Dussart et al., 2005]. CV-A24 has previously not been associated with acute flaccid paralysis apart from one study from East Timor where the virus was isolated from one patient with acute flaccid paralysis in an outbreak of hemorrhagic conjunctivitis [Chaves et al., 2001]. HPeV type 1, which was isolated from one patient in this study, has also been associated with acute flaccid paralysis in an outbreak in Jamaica [Figeroa et al., 1989].

Since PV has almost been eradicated, it has become evident that also other viral agents may cause acute flaccid paralysis. The most common are West Nile Virus, Epstein–Barr virus (mainly Guillain–Barré syndrome) and non-polio enteroviruses [Solomon and Willison, 2003]. Besides PV, EV-71 is the most common enterovirus type associated with acute flaccid paralysis and has caused several outbreaks [Chen et al., 2001; Deshpande et al., 2003; Solomon and Willison, 2003]. Also adenoviruses, especially species B, have been isolated from stools from acute flaccid paralysis cases. In our study, 12% of the children were infected with more than one entero- or adenovirus type. Since both entero- and adenoviruses can be isolated from stools from healthy asymptomatic carriers and patients with clinical acute flaccid paralysis, their role in the paralytic illness is not considered proven [de Azevedo et al., 2004; Bahri et al., 2005]. The possible interaction between multiple viruses such as enteroviruses and

adenoviruses in dual infections may lead to a more severe disease pattern [Ooi et al., 2003]. Also for EV-71, associated with hand, foot, and mouth disease, adenoviruses or other enteroviruses have been suggested as cofactors in causing a more complicated and sometimes fatal disease [Chan et al., 2000]. In this investigation, the role is uncertain for the non-polio enteroviruses, not reported previously to cause paralytic disease, since only a few non-polio enteroviruses have been described to be associated with acute flaccid paralysis. E-33 has been reported to cause acute flaccid paralysis in a young boy [Grimwood et al., 2003]. Otherwise CV-A7, CV-A9, the CV-B types, and E-9 were besides EV-71 considered as the most prevalent types associated with acute flaccid paralysis [Gear, 1984; Grist and Bell, 1984; Huang et al., 1999]. The possibility that viruses may interact and thereby cause a more susceptible host resulting in a more severe illness as with acute flaccid paralysis might explain why types not usually associated with the paralytic illness were found in multiply infected patients with acute flaccid paralysis. In conclusion, three recently discovered enterovirus types, EV-76, EV-77, and EV-81 and the two new types, EV-93 and EV-94, with no available type-specific antisera, were found in the patients with acute flaccid paralysis in the Democratic Republic of the Congo, where EV-94 is the first new serotype found in HEV-D since more than 30 years.

ACKNOWLEDGMENTS

The sequences obtained in this study are deposited in GenBank with accession numbers EF127240–EF127251. This study was supported in part by the project VIZIER, LSHG-CT-2004-51196, funded by the European Union.

REFERENCES

- Bahri O, Rezig D, Ben Nejma-Oueslati B, Ben Yahia A, Ben Sassi J, Hogga N, Sadraoui A, Triki H. 2005. Enteroviruses in Tunisia: Virological surveillance over 12 years (1992–2003). *J Med Microb* 54:63–69.
- Brown B, Oberste SM, Maher K, Pallansch MA. 2003. Complete genomic sequencing shows that polioviruses and members of human enterovirus species C are closely related in the noncapsid coding region. *J Virol* 77:8973–8984.
- Chan LG, Parashar UD, Lye MS, Ong FGL, Zaki SR, Alexander JR, Ho KK, Han LL, Pallansch MA, Suleiman AB, Jegathesan M, Anderson LJ. 2000. Deaths of children during an outbreak of hand, foot and mouth disease in Sarawak, Malaysia, clinical and pathological characteristics of the disease. *Clin Inf Dis* 31:678–683.
- Chaves SS, Lobo S, Kennett M, Black J. 2001. Coxsackie virus A24 infection presenting as acute flaccid paralysis. *Lancet* 357:605.
- Chen C-Y, Chang Y-C, Huang C-C, Lui C-C, Lee K-W, Huang S-C. 2001. Acute flaccid paralysis in infants and young children with enterovirus 71 infection: MR imaging findings and clinical correlates. *AJNR Am J Neuroradiol* 22:200–205.
- Dayhoff MO, Schwartz RM, Orcutt BC. 1978. A model of evolutionary change in proteins. In Dayhoff MO, editor. *Atlas of Protein Sequence and Structure* Vol. 5 Suppl. 2. Washington DC: National Biomedical Research Foundation. pp 345–352.
- de Azevedo JPR, Nascimento LRS, Cortinovis MCS, Oliveira SS, da Costa EV, da Silva EE. 2004. Characterization of species B adenoviruses isolated from fecal specimens taken from poliomyelitis-suspected cases. *J Clin Virol* 31:248–252.
- Deshpande JM, Nadkarni SS, Francis PP. 2003. Enterovirus 71 isolated from case of acute flaccid paralysis in India represents a new genotype. *Curr Science* 84:10.
- Dussart P, Cartet G, Huguet P, Lèvêque N, Hajjar C, Morvan J, Vanderkerckhove J, Ferret K, Lina B, Chomel J-J, Norder H. 2005. Outbreak of acute hemorrhagic conjunctivitis in French Guiana and West Indies caused by Coxsackievirus A24 variant: Phylogenetic analysis reveals Asian import. *J Med Virol* 75:559–565.
- Felsenstein J. 1993. PHYLIP: Phylogeny inference package, version 53, University of Washington, Seattle, Washington.
- Figeroa JP, Ashley D, King D, Hull B. 1989. An outbreak of acute flaccid paralysis in Jamaica associated with echovirus type 22. *J Med Virol* 29:315–319.
- Gear JHS. 1984. Nonpolio causes of polio-like paralytic syndromes. *Rev Infect Dis* 6:S379–S384.
- Grimwood K, Huang QS, Sadleir LG, Nix WA, Kilpatrick DR, Oberste MS, Pallansch MA. 2003. Acute Flaccid paralysis from echovirus type 33 infection. *J Clin Microb* 41:2230–2232.
- Grist NR, Bell EJ. 1984. Paralytic poliomyelitis and nonpolio enteroviruses: Studies in Scotland. *Rev Infect Dis* 6:S385–S386.
- Huang C-C, Liu C-C, Chang Y-C, Chen C-Y, Wang S-T, Yeh T-F. 1999. Neurologic complications in children with enterovirus 71 infection. *N Engl J Med* 341:936–942.
- Hussain IHMI, Ali S, Sinnah M, Kurup D, Khoo TB, Thomas TGS, Apandi M, Taha AM. 2004. Five-year surveillance of acute flaccid paralysis in Malaysia. *J Peediatr Child Health* 40:127–130.
- Kabue JP, Mushiya F, Pukuta E, Mbaya N, Yogolelo R, Muyamuna E, Kandolo P, Mashako H, Muyembe-Tamfum JJ. 2004. Virological surveillance of acute flaccid paralysis in Democratic Republic of Congo from 1997–2001. *Med Trop* 54:137–144.
- Kapoor A, Patel DD, Kumar S, Ayyagari A, Dhole TN. 2004. Molecular characterization of echovirus 11 isolates from India. *Indian J Med Res* 119:149–156.
- Kumar S, Tamura K, Nei M. 1993. Molecular evolutionary genetics analysis version 1.02., Pennsylvania State University, Pennsylvania.
- Lina B, Pozzetto B, Andreoletti L, Beguier E, Bourlet T, Dussaix E, Grangeot-Keros L, Gratacap-Cavallier B, Henquell C, Legrand-Quillien MC, Novillo A, Palmer P, Petitjean J, Sandres K, Dubreuil P, Fleury H, Freymuth F, Leparc-Goffart I, Hober D, Izopet J, Kopecka H, Lazizi Y, Lafeuille H, Lebon P, Roseto A, Marchadier E, Masquelier B, Picard B, Puel J, Seigneurin JM, Wattré P, Aymard M. 1996. Multicenter evaluation of a commercially available PCR assay for diagnosing enterovirus infection in a panel of cerebrospinal fluid specimens. *J Clin Microbiol* 34:3002–3006.
- Lukashev AN. 2004. Role of recombination in evolution of enteroviruses. *Rev Med Virol* 15:157–167.
- Mendelsohn CL, Wimmer E, Racaniello VR. 1989. Cellular receptor for poliovirus: Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. *Cell* 56:855–865.
- Muir P, Kämmerer U, Korn K, Mulders MN, Pöyry T, Weissbrich B, Kandolf R, Cleator GM, Van Loon AM. 1998. Molecular typing of enteroviruses, current status and future requirements. *Clin Microb Rev* 11:202–227.
- Norder H, Bjerregaard L, Magnusius LO. 2001. Homotypic echoviruses share aminoterminal VP1 sequence homology applicable for typing. *J Med Virol* 63:35–44.
- Norder H, Bjerregaard L, Magnusius LO. 2002. Open reading frame sequence of an Asian enterovirus 73 strain reveals that the prototype from California is recombinant. *J Gen Virol* 83:1721–1728.
- Norder H, Bjerregaard L, Magnusius L, Lina B, Aymard M, Chomel J-J. 2003. Sequencing of ‘untypeable’ enteroviruses reveals two new types, EV-77 and EV-78, within human enterovirus type B and substitutions in the BC loop of the VP1 protein for known types. *J Gen Virol* 84:827–836.
- Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Pallansch MA. 1999a. Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification. *J Virol* 73:1941–1948.
- Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Flemister MR, Brown BA, Pallansch MA. 1999b. Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. *J Clin Microbiol* 37:1288–1293.
- Oberste MS, Maher K, Flemister MR, Marchetti G, Kilpatrick DR, Pallansch MA. 2000. Comparison of classic and molecular

- approaches for the identification of untypeable enteroviruses. *J Clin Microbiol* 38:1170–1174.
- Oberste MS, Schnurr D, Maher K, al-Busaidy S, Pallansch MA. 2001. Molecular identification of new picornaviruses and characterization of a proposed enterovirus 73 serotype. *J Gen Virol* 82:409–416.
- Oberste MS, William A, Maher K, Pallansch MA. 2003. Improved molecular identification of enteroviruses by RT-PCR and amplicon sequencing. *J Clin Virol* 26:375–377.
- Oberste MS, Michele SM, Maher K, Schnurr D, Cisterna D, Junttila N, Uddin M, Chomel J-J, Lau C-S, Rida W, al-Busaidy S, Norder H, Magnus L, Pallansch MA. 2004b. Molecular identification and characterization of two proposed new enterovirus serotypes, EV-74 and EV-75. *J Gen Virol* 85:3205–3212.
- Oberste MS, Maher K, Michele SM, Belliot G, Uddin M, Pallansch MA. 2005. Enteroviruses 76, 89, 90 and 91 represent a novel group within the species Human enterovirus A. *J Gen Virol* 86:445–451.
- Ooi MH, Wong SC, Clear D, Perera D, Krishnan S, Preston T, Tio PH, Willison HJ, Tedman B, Kneen R, Cardoso MJ, Solomon T. 2003. Adenovirus type 21-associated acute flaccid paralysis during an outbreak of hand-foot-and-mouth disease in Sarawak, Malaysia. *Clin Inf Dis* 36:550–559.
- Rosen L. 1960. A hemagglutination-inhibition technique for typing adenoviruses. *Am J Hyg* 71:120–128.
- Smura T, Junttila N, Blomqvist S, Norder H, Kajjalainen S, Paananen A, Magnus LO, Hovi T, Roivainen M. 2007. Enterovirus 94, a proposed new serotype in human enterovirus species D. *J Gen Virol* 88:849–858.
- Solomon T, Willison H. 2003. Infectious causes of acute flaccid paralysis. *Curr Opin Infect Dis* 16:375–381.
- WHO. 1990. Manual for the Virological investigation of poliomyelitis. Geneva: World Health Organization, WHO/EPI-CDS/POLIO/90.1.
- Wood DJ, Hull B. 1999. L20B cells simplify culture of polioviruses from clinical samples. *J Med Virol* 58:188–192.

Surveillance of enteroviruses in France, 2000–2004

D. Antona · N. Lévêque · J. J. Chomel · S. Dubrou ·
D. Lévy-Bruhl · B. Lina

© Springer-Verlag 2007

Abstract In the context of poliomyelitis eradication, a reinforced sentinel laboratory network for surveillance of enteroviruses (RSE) was implemented in France in January 2000, and the purpose of this report is to describe the results of the five first years of surveillance. From 2000 to 2004, the RSE laboratory network performed detailed surveillance of the circulating enteroviruses. No wild-type poliovirus was isolated from humans during the 5 years of surveillance, although two imported vaccine polioviruses were detected. During the same period, Sabin-like polioviruses were identified on five occasions in the sludge from sewage treatment plants, but no wild-type poliovirus was found. Over the 5 years of surveillance, information was collected from 192,598 clinical samples, including 39,276 cerebrospinal fluid specimens, of which 14.7% were positive for enteroviruses, 45,889 stool samples (4.3% positive for enteroviruses), 70,330 throat swabs (2.2% positive) and 14,243 sera (1.4% positive). The ten main nonpolio entero-

viruses typed were as follows, in decreasing order of frequency: E-30, E-13, E-6, CV-B5, E-11, CV-B4, E-9, E-7, CV-B1, and CV-B2. During the year 2000, an outbreak of aseptic meningitis due to three main enteroviruses (echoviruses type 30, 13, and 6) was monitored. Continued surveillance of enteroviruses is important to alert physicians and public health officials to changes in disease trends. Although the geographical coverage of the RSE network as well as the percentage of enteroviruses identified must be improved, the large number of samples tested for enteroviruses shows the ability of virology laboratories to detect the circulation of enteroviruses and to report the possible identification of poliovirus (wild-type, vaccine-derived, or Sabin-like).

Keywords Enterovirus · Poliovirus · Surveillance · France

Introduction

The human enteroviruses (classified in four species, HEV-A to HEV-D) belong to the genus *Enterovirus*, family *Picornaviridae*. They include coxsackieviruses A and B, echoviruses, numbered enteroviruses, and polioviruses 1–3. By far, the most common form of infection by any of the enteroviruses is asymptomatic or is manifest by no more than minor malaise. This is true not only for poliovirus infections but also for infections by coxsackieviruses, echoviruses, and the newer enterovirus serotypes [1–3]. Except poliomyelitis, diseases associated with enterovirus infections are not notifiable in France.

The World Health Organisation (WHO) European region was declared poliovirus free in June 2002. In France, the last indigenous and imported cases of poliomyelitis occurred in 1989 and in 1995, respectively.

D. Antona (✉) · D. Lévy-Bruhl
Département des Maladies Infectieuses,
Institut de Veille Sanitaire,
12 rue du Val d'Osne,
94415 Saint Maurice Cedex, France
e-mail: d.antona@invs.sante.fr

N. Lévêque · J. J. Chomel · B. Lina
Centre National de Référence pour les Entérovirus,
Centre Collaborateur OMS,
Laboratoire de Virologie du CHU de Lyon,
Domaine Rockefeller,
69373 Lyon Cedex 08, France

S. Dubrou
Laboratoire d'Hygiène de la Ville de Paris,
Mairie de Paris—DASES,
11 rue Georges Eastman,
75013 Paris, France

Although France did not implement acute flaccid paralysis (AFP) surveillance, the French national plan of action against poliomyelitis, endorsed in 1998, includes: (a) notification of polio cases (suspected and confirmed), as well as notification of wild-type, vaccine-derived polioviruses (VDPVs) and Sabin-like polioviruses identified in laboratory specimens, (b) overall immunisation with inactivated polio vaccine (the sole vaccine used in the country since 1986, with a 98% immunisation coverage in infants), and (c) surveillance of enteroviruses in humans and in environmental settings [4]. Furthermore, in 2004 France began implementing the process of laboratory containment of polioviruses, including not only wild-type strains but also VDPVs and Sabin-like polioviruses [5].

In the global context of poliomyelitis eradication, the surveillance of enteroviruses in humans was reinforced in 2000 [4, 6], and this paper describes the results of the first 5 years of this surveillance, performed as part of the national plan of action.

Materials and methods

Enhancement of enterovirus surveillance in humans

In January 2000, a reinforced sentinel laboratory network for surveillance of enteroviruses called RSE (Réseau de Surveillance des Entérovirus) was implemented as a result of the merging of two pre-existing surveillance networks. It is coordinated by the National Institute for Public Health Surveillance (Institut de Veille Sanitaire, InVS), which performs the epidemiological surveillance, together with the National Reference Centre for Enteroviruses (NRC), which performs microbiological investigations. The detection of any enterovirus from human samples is reported voluntarily to the RSE on a monthly basis by 30 laboratories scattered throughout mainland France (Fig. 1). All but one are located in a university setting and serve as regional reference laboratories, thereby collecting samples from at least 135 hospitals.

The objectives of the RSE network are to determine the patterns of circulation of the different enterovirus serotypes within the human population, to identify outbreaks (especially aseptic meningitis epidemics), to supply poliovirus surveillance by identifying imported strains (wild-type as well as vaccine and vaccine-derived strains), and to control any possible circulation of these viruses. The information collected includes the number and type of human specimens submitted for enterovirus detection by month, the hospital and ward of origin, and the distribution of specimens according to the age of the patients. For each sample positive for enterovirus, required information includes the date of collection, the clinical symptoms, the

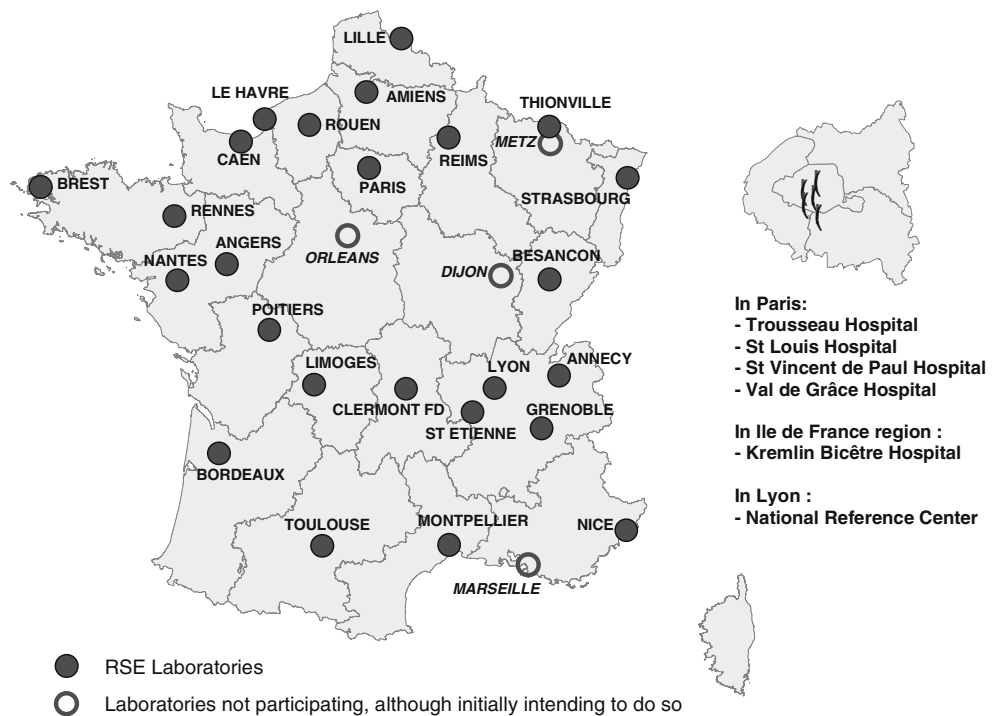
patient's age and gender, the methods used for virus detection (essentially culture and/or PCR), and, if available, the type of enterovirus identified by neutralisation or sequencing. In the RSE, the methods most commonly used for virus detection include virus isolation using at least one of the following cell lines: buffalo green monkey (BGM), human epidermoid carcinoma cells (Hep2), lung embryonic fibroblasts (MRC5), a recombinant murine cell line (L20B) which is specific for poliovirus isolation, and human rectal tumor cells (HRT), which are very sensitive for human parechoviruses. In most cases, specimens originate from stools, throat/nose or rectal swabs, and neutralization of the cytopathic effect is demonstrated in cell cultures using either monoclonal antiserum against the VP1 protein gene or Lim and Benyesh-Melnick (LBM) intersecting pools [7]. The reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) is used mainly on cerebrospinal fluid (CSF) and serum samples, with detection of the 5' noncoding region of the genome, but this region is inappropriate for identification [8]. Consecutive identification can then be processed by amplifying and sequencing a region of the VP1 protein gene that encompasses the BC loop [9]; although few laboratories of the RSE actually do the sequencing, they may send the strains to the NRC.

A coordinated follow-up is done by both the InVS and the NRC and includes a monthly validation of routine activity data and regular feedback through interim and annual reports. In case of poliovirus detection, immediate reporting is required in order to conduct an investigation. The strain is sent to the NRC in Lyon for virus serotyping and intratyping differentiation. The result must be confirmed as soon as possible by the European WHO Regional Reference Laboratory for Poliomyelitis (Robert Koch Institute, Berlin, Germany).

Enterovirus surveillance in the environment

Following WHO recommendations, the National Commission for the Certification of Poliomyelitis Eradication included environmental surveillance of poliovirus in its 1998 plan of action [4]. In France, the Laboratory of Hygiene of Paris (LHVP) is conducting this surveillance since 1975 in the "Ile de France" region, an urban area including Paris and environs, and in which 8 million people are living (13% of the total population). Each year, around 48 activated sludge samples and 72 sewage samples are collected from four wastewater treatment plants according to a 1-L grab sample procedure. Samples are obtained monthly and treated for viral examination without any concentration step. Four 96-well culture plates of BGM and Hep-2 cells seeded in suspension are inoculated with a 5-ml sample. Two blind passages are processed. Viral isolates are selected according to their typical cytopathic effect and

Fig. 1 Enhanced enterovirus surveillance: distribution of RSE laboratories as of 01/01/2005, France



tested for poliovirus identification by neutralization tests as described above. All poliovirus strains as well as a portion of other viral strains are sent to the NRC for virus identification and serotyping. In case of poliovirus identification, typing and intratyping differentiation is performed by the NRC and the result confirmed by the European WHO Regional Reference Laboratory for Poliomyelitis in Berlin.

Results

Population surveillance

From 2000 to 2004, neither a confirmed nor a suspected case of poliomyelitis was reported, and neither wild-type nor VDPV polioviruses were identified from the human biological samples submitted for virus serotyping within or outside the RSE network.

Overall data

The RSE network collected information from 192,598 samples including 39,276 (20.4%) CSF samples (of which 14.7% positive for enteroviruses), 45,889 (23.8%) stool samples (4.3% positive), 70,330 (36.5%) throat swabs (2.2% positive), and 14,243 (7.4%) serum samples (1.4% positive). Table 1 shows their distribution by type of sample and age group, along with the percentage of positive samples in each subgroup. The highest percentage of

positive detections was found in CSF specimens from children aged 5–14 years, of which 35.6% tested positive. Data collection increased over time, with 41,482 samples tested in 2004, versus 36,832 in 2000. As shown on Fig. 2, the geographic coverage of the network has improved over time, including data from southeastern France since the beginning of 2004.

Poliovirus

Children under 15 (WHO target population for AFP surveillance) accounted for 85% of the 34,247 stool samples tested for which the age of the patient was specified. During the 5 years of surveillance, two Sabin-like polioviruses were identified among a total of 45,889 stool specimens tested. The first one was a type 3 Sabin poliovirus found in 2002 in the diarrheic stools of a 4-month-old boy. This child had come from Algeria, where he had received two doses of oral polio vaccine (OPV). The second poliovirus was a type 1 strain found in 2003 in an 8-day-old baby born in Morocco, another country where OPV is used. Neither strain was isolated in the clinical context of paralysis; both were obtained from stool specimens tested as part of a check-up.

Nonpolio enteroviruses

Of the 192,598 samples analyzed by the RSE laboratories, enteroviruses were detected in 9,603 (5%), obtained from 8,978 patients. The circulation of enteroviruses showed

Table 1 Specimens submitted for detection of enterovirus and proportions with positive results: distribution of 192,598 specimens by origin of specimen and patient age group (RSE data, France, 2000–2004)

Type of specimen	No. of specimens tested (no. positive for enteroviruses)							
	Age < 1 year	Age 1–4 years	Age 5–14 years	Age 15–24 years	Age 25–49 years	Age ≥ 50 years	Age not specified ^a	Total
Cerebrospinal fluid	6,324 (17.1%)	2,992 (19.0%)	3,675 (35.6%)	2,086 (35.6%)	5,980 (10.1%)	7,095 (1.9%)	11,124 (15.6%)	39,276 (14.7%)
Stool	14,796 (5.4%)	9,515 (4.5%)	4,735 (4.6%)	1,345 (5.0%)	1,754 (10.0%)	2,102 (1.2%)	11,642 (2.5%)	45,889 (4.3%)
Nose, throat	21,406 (2.3%)	13,635 (2.7%)	6,669 (3.9%)	2,972 (2.2%)	7,457 (1.3%)	9,368 (0.3%)	8,823 (2.0%)	70,330 (2.2%)
Serum	773 (7.5%)	1,087 (1.7%)	1,149 (1.7%)	1,392 (0.7%)	4,488 (1.0%)	4,420 (0.5%)	934 (3.5%)	14,243 (1.4%)
Other (urine, mucous membranes, skin, amniotic fluid, biopsies)	3,495 (0.9%)	938 (3.0%)	1,225 (0.8%)	1,863 (0.4%)	6,604 (0.4%)	5,197 (0.5%)	3,538 (0.4%)	22,860 (0.6%)

^a Age not specified: a few laboratories do not specify the age for all patients tested, and the age is known only when patients are tested positive. Therefore, the latest were excluded from the computation of percentages of positive cases by age groups.

roughly the same seasonal pattern throughout the observation period, except in 2000, when an outbreak of aseptic meningitis occurred. As expected in a temperate country [1–3], the number of cases increased each year during summer and the beginning of fall, with a peak in July (uniformly observed in week 27), and then slowly decreased, except in 2004, when a second peak of the same size was observed during week 43 (Fig. 3).

The age distribution of patients who tested positive (age known for 8,914 patients) was as follows: 3,024 (34%) patients under 1 year of age, 1,678 (19%) between 1 and 4 years of age, 2,304 (26%) between 5 and 14 years of age, 456 (5%) between 15 and 24 years of age, 1,179 (13%)

between 25 and 49 years of age, and 273 (3%) more than 50 years of age. The case distribution according to gender shows a majority of male patients, with a sex ratio of 1.5 (5,018 males/3,436 females).

The RSE surveillance system is based on a voluntary laboratory network and is therefore not exhaustive in terms of the clinical description of cases. A precise clinical context was available for 5,445 (61%) patients. Central nervous system diseases were the most prevalent ($n=3,752$; 68.9%), among which meningitis counted for 67% ($n=3,646$) and encephalitis for 0.7% ($n=37$). Although the network is not intended to detect AFP cases, five cases of Guillain-Barré syndrome, one case of transverse myelitis,

Fig. 2 Enhanced enterovirus surveillance: evolution of RSE geographic coverage, France 2000–2004

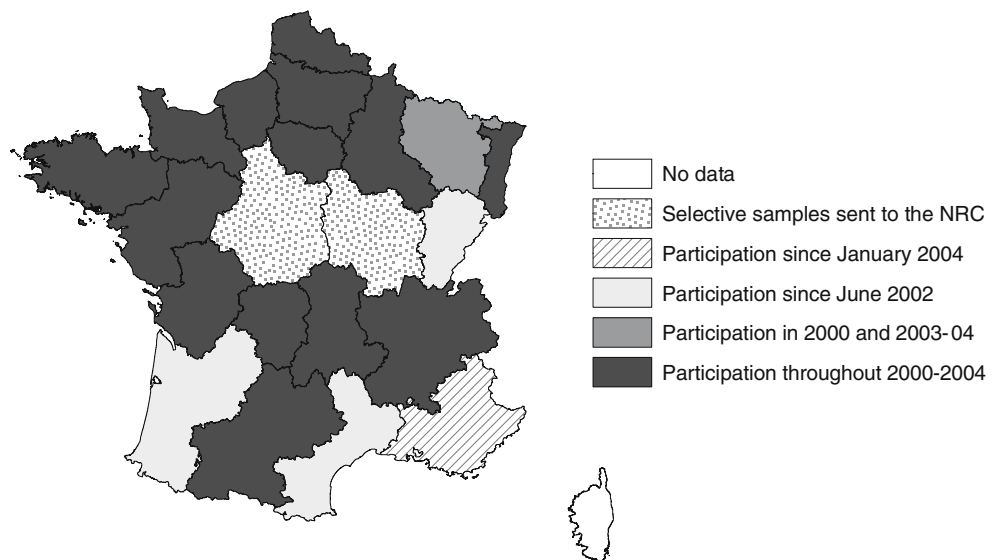
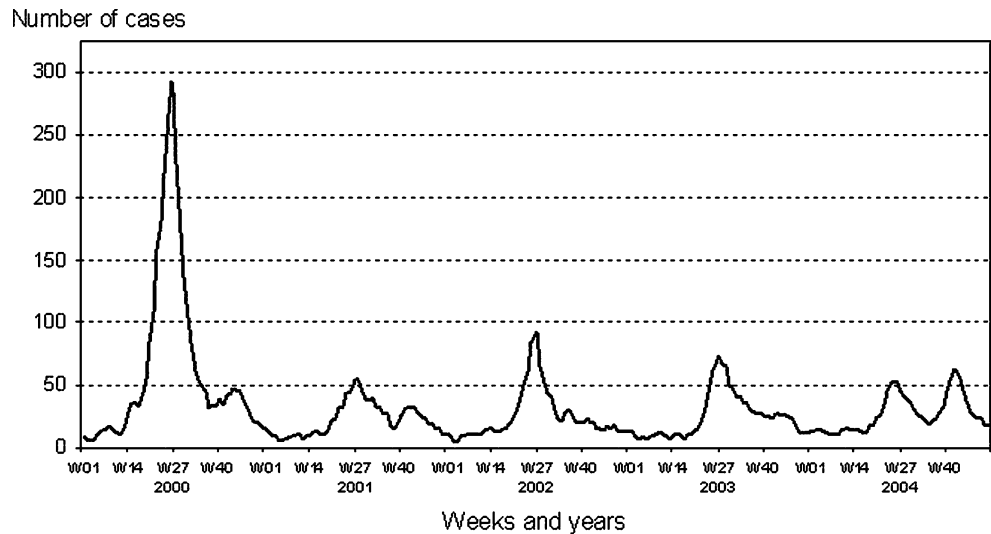


Fig. 3 Seasonal pattern of enterovirus circulation, RSE data, France 2000–2004 (distribution of cases per week, moving averages)



and four cases of mild paresis were described in children below 15 years of age. For each case, in addition to CSF samples, stools samples or rectal swabs and/or throat swabs were obtained, and the enteroviruses identified were CV-B2, CV-B3, and E-6.

The main other clinical syndromes comprised gastrointestinal, neuromuscular, and respiratory diseases, along with a few cases of cardiac diseases and hand, foot, and mouth disease. Table 2 shows the distribution of clinical syndromes according to age group.

A total of 8,978 patients tested positive for enteroviruses, but the strain was not subsequently typed in 4,758 (53%) patients and was typed as nonpolio enterovirus in 1,463 (16.3%) patients. Definitive identification was achieved in 2,757 (30.7%) patients (Table 3).

The ten main serotypes of nonpolio enterovirus circulating in humans from 2000 to 2004 belonged to the species Human Enterovirus B (HEV-B) and were, in

decreasing order, echovirus 30 (E-30), E-13, E-6, coxsackievirus B5 (CV-B5), E-11, CV-B4, E-9, E-7, CV-B1, and CV-B2.

During the 2000 meningitis outbreak, three main serotypes were isolated, accounting for 83% of the enteroviruses identified: E-30 (40%), E-13 (32%), and E-6 (11%) [10]. The epidemic started in the west of France (Brittany), spread to the Loire Valley, with a majority of cases caused by E-30, and then to the Picardie and Paris regions, where E-13 was mainly involved. E-6 circulated at a lower level through all regions at the same time, and continued to do so during 2001 and 2002, while E-30 and E-13 circulated less or not at all during 2001–2004. In 2002, the main serotype circulating was E-11, which spread throughout the country all year long, without any specific outbreak in time or place. In 2004, the main type circulating in summer was CV-B4 and in fall E-30, while E-7 and CV-B2 were circulating at a lower level during the entire period.

Table 2 Distribution of clinical syndromes reported for 5,404 patients positive for nonpolio enteroviruses, according to patient age group (RSE data, France 2000–2004)

Clinical syndrome	No. of positive patients						Total
	Age < 1 year	Age 1–4 years	Age 5–14 years	Age 15–24 years	Age 25–49 years	Age ≥ 50 years	
Central nervous system	757	637	1,329	254	613	124	3,714 (68.7%)
Infectious (no further details reported)	501	140	58	10	30	8	747 (13.8%)
Gastrointestinal	171	143	51	7	7	7	386 (7.2%)
Respiratory	126	69	15	6	4	7	227 (4.2%)
Neuromuscular	27	17	35	4	19	7	109 (2.0%)
Cardiac	7	6	3	2	14	13	45 (0.8%)
Hand, foot & mouth	7	22	2	1	3	2	37 (0.7%)
Other	44	35	20	8	18	14	139 (2.6%)
Total	1,640 (30.3%)	1,069 (19.8%)	1,513 (28.0%)	292 (5.4%)	708 (13.1%)	182 (3.4%)	5,404 (100%)

Table 3 Results of serotyping of nonpolio enteroviruses from 2,757 patients (RSE, France, 2000–2004)

Serotype	2000	2001	2002	2003	2004	Total
E-30	<i>525</i>	<i>44</i>	<i>15</i>	<i>6</i>	<i>49</i>	<i>639 (23.2%)</i>
E-13	<i>425</i>	<i>13</i>	<i>4</i>	<i>3</i>	<i>0</i>	<i>445 (16.1%)</i>
E-6	<i>147</i>	<i>62</i>	<i>74</i>	<i>10</i>	<i>10</i>	<i>303 (11.0%)</i>
CV-B5	<i>84</i>	<i>4</i>	<i>18</i>	<i>59</i>	<i>19</i>	<i>184 (6.7%)</i>
E-11	<i>12</i>	<i>18</i>	<i>115</i>	<i>15</i>	<i>10</i>	<i>170 (6.2%)</i>
CV-B4	<i>38</i>	<i>23</i>	<i>5</i>	<i>15</i>	<i>34</i>	<i>115 (4.2%)</i>
E-9	<i>1</i>	<i>23</i>	<i>16</i>	<i>40</i>	<i>23</i>	<i>103 (3.7%)</i>
E-7	<i>8</i>	<i>4</i>	<i>0</i>	<i>23</i>	<i>54</i>	<i>89 (3.2%)</i>
CV-B1	<i>11</i>	<i>1</i>	<i>34</i>	<i>30</i>	<i>5</i>	<i>81 (2.9%)</i>
CV-B2	<i>14</i>	<i>20</i>	<i>0</i>	<i>6</i>	<i>41</i>	<i>81 (2.9%)</i>
CV-B3	<i>0</i>	<i>3</i>	<i>25</i>	<i>21</i>	<i>16</i>	<i>65 (2.4%)</i>
E-5	<i>8</i>	<i>4</i>	<i>40</i>	<i>6</i>	<i>6</i>	<i>64 (2.3%)</i>
E-4	<i>0</i>	<i>2</i>	<i>23</i>	<i>18</i>	<i>3</i>	<i>46 (1.7%)</i>
CV-A9	<i>3</i>	<i>8</i>	<i>17</i>	<i>5</i>	<i>8</i>	<i>41 (1.5%)</i>
E-18	<i>11</i>	<i>5</i>	<i>17</i>	<i>2</i>	<i>2</i>	<i>37 (1.3%)</i>
E-25	<i>0</i>	<i>1</i>	<i>4</i>	<i>10</i>	<i>19</i>	<i>34 (1.2%)</i>
E-16	<i>3</i>	<i>9</i>	<i>8</i>	<i>6</i>	<i>4</i>	<i>30 (1.1%)</i>
E-21	<i>6</i>	<i>3</i>	<i>3</i>	<i>6</i>	<i>5</i>	<i>23 (0.8%)</i>
E-3	<i>3</i>	<i>1</i>	<i>10</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>19 (0.7%)</i>
E-17	<i>8</i>	<i>3</i>	<i>1</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>19 (0.7%)</i>
HPEV 1 ^a	<i>1</i>	<i>1</i>	<i>12</i>	<i>2</i>	<i>0</i>	<i>16 (0.6%)</i>
E-20	<i>0</i>	<i>2</i>	<i>4</i>	<i>4</i>	<i>1</i>	<i>11 (0.4%)</i>
E-14	<i>3</i>	<i>7</i>	<i>1</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>11 (0.4%)</i>
CV-A24	<i>0</i>	<i>2</i>	<i>4</i>	<i>4</i>	<i>0</i>	<i>10 (0.4%)</i>
CV-A16	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>2</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>10 (0.4%)</i>
E-31	<i>0</i>	<i>3</i>	<i>2</i>	<i>1</i>	<i>3</i>	<i>9 (0.3%)</i>
EV-71	<i>1</i>	<i>0</i>	<i>1</i>	<i>5</i>	<i>1</i>	<i>8 (0.3%)</i>
Other ^b	<i>10</i>	<i>19</i>	<i>9</i>	<i>28</i>	<i>28</i>	<i>94</i>
Total	<i>1,323</i>	<i>287</i>	<i>464</i>	<i>332</i>	<i>351</i>	<i>2,757 (100%)</i>

All strains identified belonged to the human enterovirus B species (HEV-B), except CV-A16 and CV-A24 (HEV-C) and EV-71 (HEV-A). Italics indicate the ten most common serotypes found each year and in total

E echovirus, *CV-A* or *CV-B* coxsackievirus A or B, *EV* enterovirus

^a Parechovirus 1 (E-22 previously) is now classified among *Parechovirus* and no longer among *Enterovirus*

^b Other serotypes identified, each of which accounted for less than 0.3% of the 5-year total

The distribution of the ten main serotypes is related to the age of the patients (Table 4). As a whole, they were more frequently identified among children below 15 years of age, with E-30 found more specifically among children between 5 and 14 years, and E-11, CV-B4, E-9, E-7, and CV-B2 in infants below 12 months.

Table 5 shows the distribution of the ten main serotypes according to clinical syndrome. As expected, the most frequent syndrome involved the central nervous system for most of the serotypes.

Environmental surveillance

From 2000 to 2004, 234 of the 237 (99%) sludge samples and 277 of the 356 (78%) sewage wastewater samples were positive for viruses. Of the viral strains isolated from the environment, 5,379 of 9,833 (55%) from sludge samples

and 2,299 of 3,230 (71%) from sewage specimens were tested for poliovirus through neutralization of the cytopathic effect.

The NRC received 1,015 isolates for typing. Coxsackieviruses B accounted for 62% of the strains, coxsackieviruses A for 0.5%, echoviruses for 3%, polioviruses for 0.5%, adenoviruses for 19%, and reoviruses for 15%.

Sabin-like polioviruses were identified on five occasions in the sludge from sewage treatment plants: serotype 2 in 2000, 2003, and 2004, and serotype 1 in 2001. No wild-type poliovirus was found.

The E-6 and E-13 types accounted for 3% of the strains identified during the summer of 2000, following the meningitis outbreak caused by these two types. As the aim of identification is based on polioviruses, it is difficult to draw precise correlations between the serotypes found in people living in the Paris region and those found in the

Table 4 Distribution of the ten main nonpolio enterovirus serotypes identified ($n=2,154$ patients), according to patients' age group (RSE data, France, 2000–2004)

Serotype	No. of patients tested positive for enteroviruses (% from each age group)						Total
	Age <1 year	Age 1–4 years	Age 5–14 years	Age 15–24 years	Age 25–49 years	Age \geq 50 years	
E-30	53 (8.5%)	104 (16.6%)	260 (41.5%)	46 (7.3%)	154 (24.6%)	10 (1.6%)	627 (100%)
E-13	113 (28.1%)	65 (16.2%)	137 (34.1%)	31 (7.7%)	56 (13.9%)	–	402 (100%)
E-6	78 (25.7%)	95 (31.4%)	84 (27.7%)	13 (4.3%)	27 (8.9%)	6 (2.0%)	303 (100%)
CV-B5	68 (37.2%)	47 (25.7%)	33 (18.0%)	4 (2.2%)	20 (10.9%)	11 (6.0%)	183 (100%)
E-11	101 (59.4%)	41 (24.1%)	19 (11.2%)	1 (0.6%)	8 (4.7%)	–	170 (100%)
CV-B4	48 (41.7%)	26 (22.6%)	21 (18.3%)	1 (0.9%)	14 (12.2%)	5(4.3%)	115 (100%)
E-9	50 (48.5%)	26 (25.2%)	16 (15.5%)	5 (4.9%)	6 (5.8%)	–	103 (100%)
E-7	49 (55.1%)	28 (31.5%)	9 (10.1%)	–	2 (2.2%)	1 (1.1%)	89 (100%)
CV-B1	30 (37.0%)	29 (35.8%)	11 (13.6%)	1 (1.2%)	8 (9.9%)	2 (2.5%)	81 (100%)
CV-B2	40 (49.4%)	25 (30.9%)	9 (11.1%)	1 (1.2%)	4 (4.9%)	2 (2.5%)	81 (100%)
Total	630 (29.2%)	486 (22.6%)	599 (27.8%)	103 (4.8%)	299 (13.9%)	37 (1.7%)	2,154 (100%)

E echovirus, *CV-B* coxsackievirus B

environment, due to the small numbers of enterovirus strains isolated in environmental samples and submitted for serotyping.

Discussion

From 2000 to 2004, the RSE laboratory network performed detailed surveillance of the circulating enteroviruses. No wild-type poliovirus was isolated during the 5 years of surveillance, although two imported vaccine polioviruses were detected in humans.

The geographic coverage of the RSE network has improved over time, although information collected in the southeast of France is still incomplete. Because this region, which borders the Mediterranean Sea, may be the site of a possible reintroduction of polioviruses to France from endemic countries, the surveillance would benefit from broader participation in the RSE network.

Enteroviruses are found in all parts of the world. Widely distributed throughout the year in tropical and semitropical regions, they are present in temperate climates at low levels in winter and spring but are found more commonly in summer and fall. Consistent with these data, our surveillance system showed a seasonal pattern of distribution, with the circulation of enteroviruses peaking in summer and slowly decreasing in the early fall. During 2004, which was not an epidemic year, a second peak of circulation was observed in the fall. This peak was slightly higher than the summer one and was probably linked to persisting mild temperatures, although no further increases in cases occurred later during the winter, as observed in 1999–2000 [11].

Over those years of surveillance, the ten main nonpolio enteroviruses typed were as follows, in decreasing order: E-30, E-13, E-6, CV-B5, E-11, CV-B4, E-9, E-7, CV-B1, and CV-B2. During 2000, the RSE described an outbreak of aseptic meningitis due to three main enteroviruses: E-30, E-13, and E-6. E-6 and E-30 are known to cause outbreaks of aseptic meningitis [10]. During the same time period, reports from other European countries showed concurrent increases in the incidence of E-30 as well as outbreaks of E-13 infections. In Belgium, during the 2000 outbreak, predominant enteroviruses were the same as those observed in France: E-30 (31%), E-13 (23%), and E-6 (20%) [12]. Outbreaks of E-30 were reported from Iceland, Kosovo, and the Netherlands in 2000 and from England and Wales, Scotland, Germany, and Ireland in 2001 [13].

In 2000, E-13 caused outbreaks in Spain, England and Wales, Scotland, Ireland, Germany, and the Netherlands [13–15]. Prior to 2000, E-13 was one of the less commonly isolated echovirus types, and since 1976, not any E-13 related outbreak was observed through previous surveillance in France. In England and Wales, between 1990 and 1999, out of 4,405 echoviruses isolated and typed, 25 (0.02%) were found to be type 13 [13]. In Spain, prior to the 2000 outbreak, the main circulating enteroviruses were E-30, E-9, E-6, and E-4 [16]. In Germany in 2001, the number of identifications of E-13 was more than double that in the previous year. Another small outbreak occurred in the Netherlands in which this virus accounted for 31 of 473 (7%) enteroviruses isolated in 2001 [13, 15]. Outside of European temperate countries, in the USA, E-13 accounted for 376 of the 1,584 (24%) enterovirus isolates reported in 2001 (29% of the isolates reported had a known serotype), compared with 74 isolates reported during 1970–

Table 5 Distribution of the 10 main serotypes of nonpolio enteroviruses identified from 1,656 patients, according to clinical syndrome, RSE data, 2000–2004

Serotype	No. of patients tested positive for enteroviruses (% from each clinical syndrome)								Total
	CNS syndrome	Infectious	Gastrointestinal	Respiratory	Neuromuscular	Cardiac	Hand, foot & mouth	Other	
E-30	471 (90.8%)	13 (2.5%)	10 (1.8%)	5 (1.0%)	16 (3.1%)	–	1 (0.2%)	3 (0.6%)	519 (100%)
E-13	281 (81.9%)	23 (6.7%)	15 (4.4%)	8 (2.3%)	11 (3.2%)	1 (0.3%)	–	4 (1.2%)	343 (100%)
E-6	176 (71.3%)	26 (10.5%)	16 (6.5%)	11 (4.5%)	7 (2.8%)	2 (0.8%)	1 (0.4%)	8 (3.2%)	247 (100%)
E-11	37 (33.0%)	28 (25.0%)	17 (15.2%)	21 (18.8%)	3 (2.7%)	–	1 (0.9%)	5 (4.5%)	112 (100%)
CV-B5	57 (51.4%)	22 (19.8%)	8 (7.2%)	13 (11.7%)	4 (3.6%)	1 (0.9%)	–	6 (5.4%)	111 (100%)
E-9	40 (49.4%)	24 (29.6%)	9 (11.1%)	4 (4.9%)	–	–	–	4 (4.9%)	81 (100%)
E-7	27 (36.0%)	28 (37.3%)	5 (6.7%)	6 (8.0%)	–	–	–	9 (12.0%)	75 (100%)
CV-B1	18 (29.5%)	23 (37.6%)	10 (16.4%)	4 (6.6%)	4 (6.6%)	–	–	2 (3.3%)	61 (100%)
CV-B4	19 (32.8%)	8 (13.8%)	12 (20.7%)	12 (20.7%)	1 (1.7%)	–	1 (1.7%)	5 (8.6%)	58 (100%)
CV-B2	14 (28.6%)	11 (22.4%)	10 (20.4%)	10 (20.4%)	1 (2.0%)	–	–	3 (6.1%)	49 (100%)
Total	1,140	206	112	94	47	4	4	49	1,656

CNS central nervous system, *E* echovirus, *CV-B* coxsackievirus B

2000 [17, 18]. During the following years, predominant circulating serotypes were E-9 and E-30 [19]. All characterized E-13 isolates from the USA, Europe, Asia, and Oceania recovered in 2000–2002 were at least 95% identical to each other in VP1 capsid gene sequence, but they were genetically distinct from E-13 isolates recovered before 2000 [17].

As far as clinical aspects are concerned, our findings are consistent with the literature [1–3, 17–19], with a majority of cases observed in people below 15 years of age and the most prevalent syndromes being diseases of the central nervous system, mainly aseptic meningitis, linked to the ten main enteroviruses typed. In the literature, the most frequent serotypes known to be involved in aseptic meningitis outbreaks are CV-A7, CV-A9, CV-B1 to CV-B5, E-2 to E-4, E-7, E-9, E-11, E-14, E-16 to E-19, E-25, E-30, E-33, and enterovirus 71 (EV-71). Sporadic cases of encephalitis may be observed, too (an average of 10 cases per year recorded in France through the RSE), as well as paralysis and ataxias alone [1–3].

The other clinical features linked to enteroviruses include hand, foot, and mouth disease, due mainly to CV-A16 and EV-71, mild respiratory syndromes related to CV-A21 and CV-B2 to CV-B5, acute myocarditis and pericarditis involv-

ing CV-B3, acute hemorrhagic conjunctivitis epidemics caused by the EV-70 and the CV-A24 variant, and digestive syndromes linked to echoviruses [2, 20]. The main types linked to neonatal diseases are E-11 (half of published cases) and CV-B (except type 6), which are involved in one-third of the cases [1].

If a large outbreak of viral meningitis occurs, as in 2000, it may become problematic to conduct a prospective identification of viruses on a large scale. Moreover, differentiation between polioviruses and nonpolio enteroviruses was not possible through the PCR assay most commonly used in the laboratories of the RSE. Each year, numerous enterovirus strains remained untypeable by the conventional neutralisation assay using Melnick intersecting pools because these pools were prepared in the 1960s from old strains described at that time and which probably had since undergone genetic changes [1]. Moreover, since then, new serotypes were discovered and were not included in the LBM pools. Partial sequencing of the VP1 protein gene and sequences alignment in the international GenBank databank made it possible to type 50% of the strains previously classified as untypeable. Furthermore, novel enteroviruses such as EV-74, EV-75, EV-76, EV-77, and EV-78 have been characterised by genotyping [21–23].

This explains why, in the RSE surveillance, half of the specimens were only characterized as enterovirus positive. To deal with this problem, two strategies were suggested. The first involves the collection of stools, rectal swabs, or throat swabs in addition to CSF specimens from patients suffering from aseptic meningitis in order to perform enterovirus isolation and serotyping for epidemiological data. The second involves the use of a second, polio-specific PCR on each CSF specimen that tests positive for enteroviruses. Characterisation of the enterovirus species A–D can be performed directly from the sample by using specific primers. More recently, the NRC has evaluated a new enterovirus PCR assay that is as sensitive as the one currently in use, which would make direct genotyping from CSF specimens possible. It performs direct sequencing the 3' part of the VP1 coding gene using defective primers. The limiting factor remains the low quantity of RNA found in CSF. Up to now, in France, the first strategy has been chosen as most suitable to field activities and financial constraints.

No wild-type poliovirus strain was detected from sludge or sewage during the 5 years of surveillance. Prior to 2000, the number of poliovirus isolates in the Parisian region decreased regularly since 1982 and corresponded to around one strain per year since 1991, in accordance with the decrease in the poliomyelitis incidence and the recommendation of exclusive use of inactivated polio vaccine in France since 1982. Up until 1990, poliovirus accounted for 10% of the enterovirus isolates recovered, with an equal distribution between wild-type, vaccine-derived, and indeterminate strains. Since 1990, only one wild-type poliovirus has been identified, in 1996. The strain belonged to the same lineage as the poliovirus 3-21267/Morocco 1977. Vaccine strains accounted for a very small part of the enteroviruses isolated. This environmental surveillance complements the surveillance of enteroviruses in humans in France, even though no direct correlation can be easily made between the two surveillance systems.

Continued surveillance of enteroviruses is important to alert physicians and public health officials of changes in disease trends. Since the establishment of the RSE in 2000, 30 laboratories have participated regularly in the surveillance network, and the high number of samples tested for enteroviruses shows the ability of the virology laboratories to monitor the circulation of enteroviruses and to report possible identifications of poliovirus (wild-type, Sabin-like, or VDPV). Monitoring the detection of poliovirus is an important aspect of the RSE's mission. Because of the immunization policy in place for the past 25 years, which requires the use of inactivated poliovirus vaccine only, the high immunization coverage rates, and the elimination of indigenous cases since 1989, reports of poliovirus to RSE reflect strains imported to France. Only two imported vaccine polioviruses were reported during the 5 years of

surveillance. Since then, for the first time, one type 2 VDPV was isolated in February 2006 from the stool samples of an 11-month-old child, transferred from Tunis to Paris for a bone marrow transplant in the context of an immune deficit at birth. He had received oral polio vaccine in Tunisia. He presented with severe diarrhoea, but no neurological signs; the strain was confirmed as nonvirulent by both the NRC in Lyon and the RKI in Berlin.

Because the possibility exists of an importation of a virulent VDPV or wild-type poliovirus from an endemic zone, it is necessary to enhance the capacity of the RSE network. This requires improvement in the geographic coverage (especially in south eastern France) as well as in the number of polio/nonpolio characterizations of enterovirus-positive specimens.

Acknowledgements Thanks to the RSE participating teams in: Amiens (D. Hecquet, G Duverlie), Angers (S. Kouyoumdjian, F. Lunel-Fabiani), Annecy (B. Chanzy), Besançon (A. Coaquette, G. Herbein), Bordeaux (H. Fleury, M.E. Lafon), Brest (M.C. Legrand, B. Picard), Caen (J. Petitjean, F. Freymuth), Clermont Ferrand (C. Henquell, H. Peigue-Lafeuille), Grenoble (B. Gratacap, J.M. Seigneurin), Kremlin-Bicêtre (I. Bouillery, C. Pallier, P. Nordman), Le Havre (A. Morel), Lille (A. De Wilde, P. Watre, D. Hober), Limoges (S. Alain, F. Denis, S. Rogez), Lyon (J.J. Chomel, N. Lévêque, B. Lina), Montpellier (M. Segondy, V. Foulongne), Nantes (S. Billaudel, M. Coste-Burel), Nice (A. Caramella, J.C. Lefebvre), Poitiers (A. Bourgoin, G. Agius), Reims (J. Carquin, L. Andreoletti, C. de Champs), Rennes (A. Depatureaux, R. Colimon), Rouen (M. Gueudin, F. Simon, C. Buffet-Janvresse), St. Etienne (O. Shabir, B. Pozzetto), Strasbourg (J.P. Gut, F. Stoll Keller), Thionville (C. Delamare, F. Hussenet), Toulouse (C. Mengelle, J. Izopet), Paris—St. Louis (C. Scieux, P. Lagrange), Paris—St. Vincent de Paul (P. Lebon), Paris—Trousseau (A. Dehée, A. Garbag-Chenon), and Paris—Val de Grâce (J. Maslin, E. Nicand, R. Teyssou). Thanks, also, to the team at the Laboratoire d'Hygiène de la Ville de Paris (S. Dubrou, D. Carlier), and special thanks to the technicians in each participating laboratory.

References

- Melnick JL (1997) Poliovirus and other enteroviruses. In: Evans AS, Kaslow RA (eds) *Viral infections of humans. Epidemiology and control*. Plenum, New York, pp 583–663
- Peigue-Lafeuille H (2003) Picornaviridae. In: Huraux JM, Nicolas JC, Agut H, Peigue-Lafeuille H (eds) *Traité de virologie médicale*. Editeur ESTEM, Paris, pp 399–405
- Pallansch MA, Roos RP (2001) Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. In: Knippe DM, Howley PM (eds) *Fields virology*. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp 723–775
- Anonymous (2000) Plan d'action de la Commission Nationale de Certification de l'éradication de la Poliomyélite: actualisation du plan d'action de juin 1998. Conduite à tenir devant un cas de polio suspect ou confirmé ou devant un isolement de poliovirus. http://www.invs.sante.fr/beh/2000/004647/beh_46_47_2000.pdf. Cited 13 Nov 2000
- Lerasle S (2005) Confinement des poliovirus en laboratoire. http://www.invs.sante.fr/beh/2005/39_40/beh_39_40_2005.pdf. Cited 11 Oct 2005

6. Antona D (2002) L'éradication des maladies infectieuses: l'exemple de la poliomyélite. *Médecine/Sciences* 18:55–61
7. Lim KA, Benyesh-Melnick M (1960) Typing of viruses by combinations of antiserum pools. Application to typing of enteroviruses (coxsackie and ECHO). *J Immunol* 84:309–317
8. Lina B, Pozzetto B, Andreoletti L, Beguier E, Bourlet T, Dussaix E, Grangeot-Keros L, Gratacap-Cavallier B, Henquell C, Legrand-Quillien MC et al (1996) Multicenter evaluating of a commercially available PCR assay for diagnosing enterovirus infection in a panel of cerebrospinal fluid specimens. *J Clin Microbiol* 34:3002–3006
9. Oberste MS, Nix WA, Maher K, Pallansch MA (2003) Improved molecular identification of enteroviruses by RT-PCR and amplicon sequencing. *J Clin Virol* 26:375–377
10. Chomel JJ, Antona D, Thouvenot D, Lina B (2003) Three ECHOvirus serotypes responsible for outbreak of aseptic meningitis in Rhone-Alpes region, France. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 22:191–193
11. Chambon M, Archimbaud C, Bailly JL, Henquell C, Regagnon C, Charbonne F, Peigue-Lafeuille H (2001) Circulation of enteroviruses and persistence of meningitis cases in the winter of 1999–2000. *J Med Virol* 2:340–347
12. Thoelen I, Lemey P, Van Der Donck I, Beuselinc K, Lindberg AM, Van Ranst M (2003) Molecular typing and epidemiology of enteroviruses identified from an outbreak of aseptic meningitis in Belgium during the summer of 2000. *J Med Virol* 70:420–429
13. Noah N, Reid F (2002) Recent increases in incidence of echoviruses 13 and 30 around Europe. <http://www.eurosurveillance.org/ew/2002/020214.asp#4>. Cited 14 Feb 2002
14. Trallero G, Casas I, Avellon A, Perez C, Tenorio A, De La Loma A (2003) First epidemic of aseptic meningitis due to echovirus type 13 among Spanish children. *Epidemiol Infect* 130:251–256
15. Diedrich S, Schreier E (2001) Aseptic meningitis in Germany associated with echovirus type 13. *BMC Infect Dis* 1:14
16. Trallero G, Casas I, Tenorio A, Echevarria JE, Castellanos A, Lozano A, Brena PP (2000) Enteroviruses in Spain: virological and epidemiological studies over 10 years (1988–97). *Epidemiol Infect* 124:497–506
17. Mullins JA, Khetsuriani N, Nix WA, Oberste MS, LaMonte A, Kilpatrick DR, Dunn J, Langer J, McMinn P, Huang QS, Grimwood K, Huang C, Pallansch MA (2004) Emergence of echovirus type 13 as a prominent enterovirus. *Clin Infect Dis* 38:70–77
18. Centers for Disease Control and Prevention (2002) Enterovirus surveillance—United States, 2000–2001. *Morb Mort Wkly Rep* 5146:1047–1049
19. Centers for Disease Control and Prevention (2006) Enterovirus surveillance—United States, 2002–2004. *Morb Mort Wkly Rep* 5506:153–156
20. Dussart P, Cartet G, Huguet P, Lévêque N, Hajjar C, Morvan J, Vanderkerckhove J, Ferret K, Lina B, Chomel JJ, Norder N (2005) An outbreak of acute hemorrhagic conjunctivitis during 2003 in French Guiana and Guadeloupe caused by coxsackie A24 variant: phylogenetic analysis reveals Asian import. *J Med Virol* 75:559–565
21. Oberste MS, Michele SM, Maher K, Schnurr D, Cisterna D, Junttila N, Uddin M, Chomel JJ, Lau CS, Ridha W, Al-Busaidy S, Norder H, Magnus LO, Pallansch MA (2004) Molecular identification and characterization of two proposed new enterovirus serotypes, EV74 and EV75. *J Gen Virol* 85:3205–3212
22. Oberste MS, Maher K, Michele SM, Belliot G, Uddin M, Pallansch MA (2005) Enteroviruses 76, 89, 90 and 91 represent a novel group within the species Human enterovirus A. *J Gen Virol* 86:445–451
23. Norder H, Bjerregaard L, Magnus L, Lina B, Aymard M, Chomel JJ (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. *J Gen Virol* 84:827–836

Two outbreaks of acute hemorrhagic conjunctivitis in Africa due to genotype III coxsackievirus A24 variant

N. Lévêque · I. L. Amine · G. Cartet · A. B. Hammani ·
Y. C. Khazraji · B. Lina · J. J. Muyembe · H. Norder ·
J. J. Chomel

Published online: 10 February 2007
© Springer-Verlag 2007

Abstract Reported here are two outbreaks of acute hemorrhagic conjunctivitis that occurred in the Democratic Republic of the Congo and in Morocco in the summers of 2003 and 2004, respectively, with a large impact on public health. Virus was isolated from the conjunctival swabs of 30 Congolese and 20 Moroccan patients. Enterovirus-specific cytopathic effect was observed in all samples. None of the

strains could be typed using a conventional neutralization assay with the Melnick intersecting pools; however, by sequencing the VP1 region, the viruses could be identified as coxsackie A24 variants. Phylogenetic analysis of the 3C protease region revealed that these strains were closely related to each other as well as to genotype III isolates detected in Korea in 2002, thus proving their worldwide spread. This is the first report of an epidemic of acute hemorrhagic conjunctivitis due to a coxsackievirus A24 variant in Africa since 1987 and the first ever from Morocco.

N. Lévêque (✉) · G. Cartet · B. Lina · J. J. Chomel
Centre National de Référence des entérovirus, Hôpital E. Herriot,
Hospices civils de Lyon,
Lyon, France
e-mail: nicolas.leveque@chu-lyon.fr

N. Lévêque · G. Cartet · B. Lina · J. J. Chomel
Laboratoire de Virologie et Pathogénèse Virale,
CNRS-UMR 5537, Faculté de Médecine RTH Laënnec,
69372 Lyon Cedex 08, France

I. L. Amine
Laboratoire de microbiologie,
Hôpital d'instruction des armées Mohamed V,
Rabat, Morocco

A. B. Hammani
Service d'ophtalmologie, Hôpital des spécialités,
Centre hospitalier universitaire Ibn Sina,
Rabat, Morocco

Y. C. Khazraji
Direction de l'épidémiologie et de la lutte contre les maladies,
Ministère de la santé,
Rabat, Morocco

J. J. Muyembe
Institut National de Recherche Bio-Médicale,
Kinshasa, Democratic Republic of Congo

H. Norder
Virological Department,
Swedish Institute for Infectious Disease Control,
Solna, Sweden

Introduction

Acute hemorrhagic conjunctivitis (AHC) is an epidemic form of highly contagious conjunctivitis, characterized by conjunctival hemorrhages. The first AHC outbreak was described in 1969 in Ghana, West Africa, and was called Apollo disease after the Apollo spacecraft moon landing that occurred the same year. The outbreak was caused by enterovirus 70 (EV70), which together with adenoviruses and a coxsackievirus A24 variant (CV-A24v), comprise the major etiological agents involved in AHC outbreaks worldwide [1].

CV-A24 belongs to the enterovirus genus, which consists of an icosahedral capsid made up of four structural proteins (VP1, VP2, VP3 and VP4), each of which has 60 copies enclosing a single-stranded sense-messenger polyadenylated RNA genome of approximately 7,400 nucleotides. Fecal-oral transmission is the classic mode of enteroviral spread [2]. CV-A24v is an antigenic variant of the CV-A24 strain that emerged in Singapore in 1970 [3]. There are three genotypes, designated I–III, of the variant of coxsackievirus A24, which are identified by phylogenetic analysis of the 3C protease region. The strains

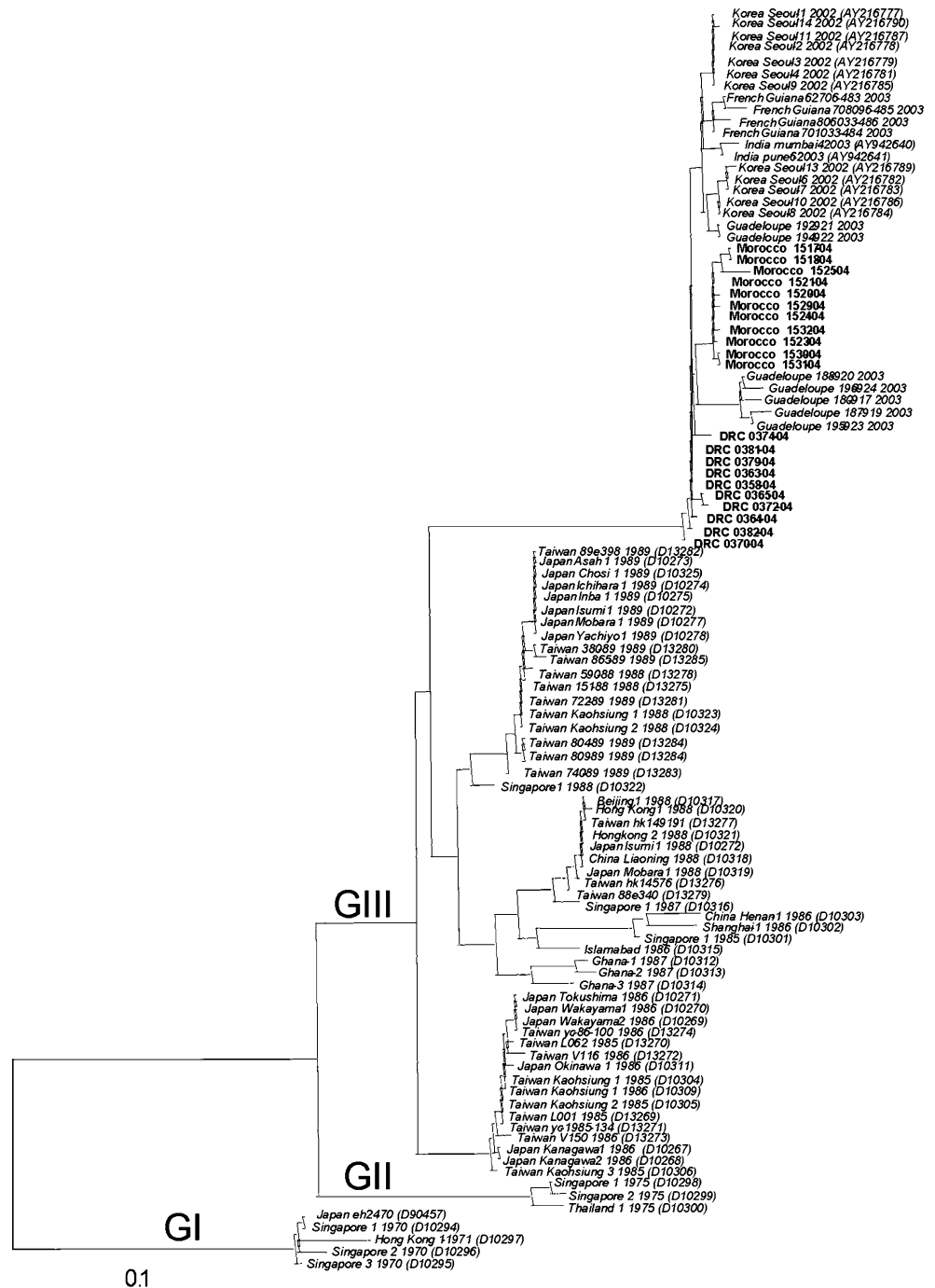
belonging to genotypes I and II were isolated in Singapore, Hong Kong, and Thailand during the 1970s, while genotype III comprised strains isolated between 1985 and 1995 in Japan, Taiwan, China, Hong Kong, Thailand, Singapore, Pakistan and Ghana. The genotype III strains could be further subdivided into six clusters, each formed by strains isolated from one outbreak [4].

Indeed, the epidemics of AHC caused by CV-A24v have always been explosive and extensive [5]. The reported attack rates have ranged from 19% in south Tunisia in 1981

to 48% of peninsular inhabitants of Malaysia in 2003 [6, 7]. Moreover, CV-A24v has become a reemerging pathogen during the last few years and thus poses a major problem for public health [8, 9].

In 2003 and 2004, two outbreaks of AHC occurred in the Democratic Republic of the Congo and in Morocco, respectively. Both were due to CVA-24v, making this report the first to describe an epidemic due to a coxsackievirus A24 variant in Africa since 1987 and the first ever in Morocco.

Fig. 1 Phylogenetic tree with 106 CV-A24 variant strains from a neighbor-joining dendrogram based on 511 nucleotides within the 3C protease region. Strains from DRC and Morocco are indicated in *bold*. Coxsackievirus A22 was used as outgroup



Materials and methods

Thirty conjunctival swabs collected at the Institut National de Recherche Bio-Medicale of Kinshasa in June 2003 and 20 collected at the military hospital of Rabat in September 2004 from patients with a clinical diagnosis of AHC were sent to the Centre National de Référence des entérovirus (Hospices civils de Lyon, Lyon, France) for analysis. After expression in PBS, 100 μ l of the swabs were inoculated onto four cell lines (HEp-2, BGM, MRC-5, HRT) and incubated for 5 days. The cells were checked daily for cytopathic effect (CPE). Two blind passages were performed when no CPE was observed. Viral isolates were then confirmed to be enterovirus by RT-PCR using primers directed towards the 5' untranslated region of the genome [10]. A neutralization assay was then performed to identify the enterovirus serotype using A to H and J to P Melnick intersecting pools [11]. When the strain could not be neutralized and remained untypeable, the type was determined by partial sequencing of the VP1 region that encompasses the BC loop, amplified with primers 292 as sense primer and 222 as anti-sense primer [12]. Cycle sequencing was performed by MWG BIOTECH in Ebersberg, Germany.

For phylogenetic study, 10 Congolese and 11 Moroccan strains were also amplified in the 3C protease region between nucleotide positions 5371 and 6044, with sense primer D1 and antisense primer U2 [4]. The sequences obtained were compared and aligned with the corresponding region of 75 CV-A24v sequences obtained from the previous outbreaks in Southeast Asia; 11 were obtained from a previously described outbreak in Guadeloupe and French Guiana in 2003 [9]. Genetic distances were calculated using the HKY method with a transversion/transition ratio of 6.74. Bootstrapping of 1,000 replicas was performed using the program SEQBOOT, and a neighbor-joining phylogenetic tree was constructed using the program neighbor in the Phylip program package, version 3.5c (Fig. 1) [13].

The 11 Moroccan and 10 Congolese strain sequences reported here were deposited in the GenBank sequence database under accession numbers DQ370153 to DQ370163 and DQ370143 to DQ370152, respectively.

Results and discussion

The first cases of AHC in the Democratic Republic of Congo occurred in March 2003. The outbreak peaked in June 2003 and was responsible for 2,500 cases reported in the city of Kinshasa. However, the morbidity rate was certainly higher, since many people did not consult a doctor and only the AHC cases in Kinshasa were registered, even

though different areas of the country and the city of Brazzaville in the Republic of the Congo were also affected. In Morocco, the AHC outbreak started in the suburbs of Casablanca during the last week of July 2004 with 923 reported cases (week 31), and it subsequently spread to the north and east of the country. From the beginning of August, the number of cases increased, with two peaks occurring in weeks 33 (7,237 cases) and 35 (9,868 cases) (Fig. 2). The number of cases started to decrease in week 36 and the epidemic had ended by week 40 in September. Overall, 32,785 cases were reported to the Direction de l'Epidémiologie et de Lutte contre les Maladies in Rabat within 3 months, corresponding with an attack rate of 0.1%. However, since many people did not consult a doctor and AHC became a notifiable disease only at the end of August, the actual morbidity rate would have been higher.

In the Moroccan outbreak, an enteroviral etiology was immediately suspected because of the strain's short incubation period and high infectivity, as indicated by the hundreds of cases reported within a short period of time. CV-A24v is known to be transmitted by close person-to-person contact. To date, no asymptomatic carrier has been reported. Water may have played a major role in the transmission of the virus in this outbreak. The sudden onset of the disease was reminiscent of the AHC epidemics caused by enterovirus type 70 in this country in 1970 and 1984 [14]. Moreover, the clinical symptoms were identical to the ones exhibited in those outbreaks, and recovery generally occurred without sequelae within 3–5 days. In order to determine the causative agent of the outbreak in 2004, samples were sent to France for virological investigation.

In total, 30 conjunctival swabs from the Democratic Republic of Congo and 20 from Morocco were received by the Centre National de Référence des entérovirus in Lyon, France, for further investigation. After inoculation onto four cell lines, a specific CPE for enteroviruses, excluding an adenovirus etiology, was observed in MRC5 and Hep-2 cell lines for the 50 samples, whereas CPE remained negative in buffalo green monkey and hamster rous tumor cell lines.

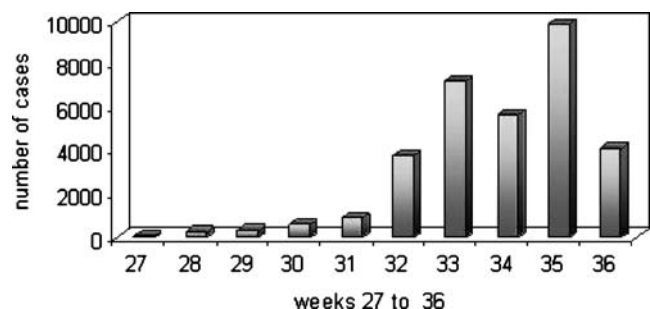


Fig. 2 Weekly distribution of AHC-related CV-A24 variant strains reported during the summer of 2004 in Morocco. Weeks 27–31 correspond with July while weeks 32–35 correspond with August

Confirmation by RT-PCR showed a band of 155 bp in agarose gel from all specimens, which is consistent with the pattern for enteroviruses. Conventional neutralization assay was then performed but failed to identify the enterovirus serotype. All enteroviruses were determined to be CV-A24v by partial sequencing of the VP1 region.

Until the beginning of the 1980s, AHC due to CV-A24v was confined to the countries of Southeast Asia, where the disease is now endemic. It then spread to other areas where no CV-A24v isolations had previously been reported [15]. The first report of CV-A24v in Africa came from Tunisia in November 1981 [6]. South of the Sahara, CV-A24v was responsible for an outbreak in Congo-Kinshasa in 1986. This epidemic was thought to have originated in Angola (J. Desmyter, personal communication, April 1987). The last reported outbreak of CV-A24v in Africa occurred in Ghana in May 1987 [16]. The following absence of reports suggested the virus had disappeared from Africa.

In this study, phylogenetic analysis based on the 3C protease region revealed that the Congolese and Moroccan strains were closely related to the strains involved in an outbreak that occurred in Korea in 2002 within genotype III (Fig. 1) [8]. The genetic similarities indicate a new instance of strains being introduced from Southeast Asia, as occurred in French Guiana and the West Indies in 2003 [9]. A potential link between the two African outbreaks reported here could come from Moroccan soldiers who were based in Congo-Kinshasa in 2003 and returned to Morocco for holidays in 2004.

Acknowledgments This study was supported by the Hospices Civils de Lyon and the Claude Bernard University, Lyon, France. The authors are thankful to the technicians of the Military Hospital of Rabat, Morocco, of the Centre National de Reference des entérovirus, Lyon, and of the Institut National de Recherche Bio-Medicale, Kinshasa, Democratic Republic of Congo. The experiments performed in this study comply with the current laws of the Democratic Republic of the Congo, France and the Kingdom of Morocco.

References

1. Chatterjee S, Quarcoopome CO, Apenteng A (1970) Unusual type of epidemic conjunctivitis in Ghana. *Br J Ophthalmol* 54:628–630
2. Melnick JL (1996) Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM (eds) *Fields virology*. Lippincott-Raven, Philadelphia, pp 655–712
3. Lim KH, Yin-Murphy M (1971) An epidemic of conjunctivitis in Singapore in 1970. *Singapore Med J* 12:247–249
4. Lin KH, Chern CL, Chu PY, Chang CH, Wang HL, Sheu MM, Huang WL, Pongsuwanna Y, Yamamoto S, Yoshino S, Ishiko H, Takeda N (2001) Genetic analysis of recent Taiwanese isolates of a variant of coxsackievirus A24. *J Med Virol* 64:269–274
5. Yin-Murphy MK, Lim H, Ho YM (1976) A coxsackievirus type A24 epidemic of acute conjunctivitis. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1:1–5
6. Nabli B, Daghfous T, Kamoun M, Romdhane K (1982) Second epidemic of acute hemorrhagic conjunctivitis in Tunisia. In: Henkind P (ed) *Acta XXIV international congress of ophthalmology*. Lippincott, Philadelphia, pp 212–215
7. Ghazali O, Chua KB, Ng KP, Hooi PS, Pallansch MA, Oberste MS, Chua KH, Mak JW (2003) An outbreak of acute haemorrhagic conjunctivitis in Melaka, Malaysia. *Singapore Med J* 44:511–516
8. Oh MD, Park S, Choi Y, Kim H, Lee K, Park W, Yoo Y, Kim EC, Choe K (2003) Acute hemorrhagic conjunctivitis caused by coxsackievirus A24 variant, South Korea, 2002. *Emerg Infect Dis* 9:1010–1012
9. Dussart P, Cartet G, Huguet P, Lévêque N, Hajjar C, Morvan J, Vanderkerckhove J, Ferret K, Lina B, Chomel JJ, Norder H (2005) Outbreak of acute hemorrhagic conjunctivitis in French Guiana and West Indies caused by coxsackievirus A24 variant: phylogenetic analysis reveals Asian import. *J Med Virol* 75:559–565
10. Lina B, Pozzetto B, Andreoletti L, Beguier E, Bourlet T, Dussaix E, Grangeot-Keros L, Gratacap-Cavallier B, Henquell C, Legrand-Quillien MC, Novillo A, Palmer P, Petitjean J, Sandres K, Dubreuil P, Fleury H, Freymuth F, Leparac-Goffart I, Hober D, Izopet J, Kopecka H, Lazizi Y, Lafeuille H, Lebon P, Roseto A, Marchadier E, Masquelier B, Picard B, Puel J, Seigneurin JM, Wattré P, Aymard M (1996) Multicenter evaluation of a commercially available PCR assay in a panel of cerebrospinal fluid specimens. *J Clin Microbiol* 34:3002–3006
11. Melnick JL, Schmidt NJ, Hampil B, Ho HH (1977) Lyophilized combination pools of enterovirus equine antisera: preparation and test procedures for the identification of fields strains of 19 group A coxsackievirus serotypes. *Intervirology* 4:172–181
12. Oberste MS, Maher K, Flemister MR, Marchetti G, Kilpatrick DR, Pallansch MA (2000) Comparison of classic and molecular approaches for the identification of ‘untypeable’ enteroviruses. *J Clin Microbiol* 38:1170–1174
13. Felsenstein J (1993) *PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c*. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle
14. Nejmi S, Gaudin OG, Chomel JJ, Bosshard S (1974) Isolation of a virus responsible for an outbreak of acute haemorrhagic conjunctivitis in Morocco. *J Hyg* 72:181–183
15. Ishiko H, Takeda N, Miyamura K, Kato N, Tanimura M, Lin KH, Yin-Murphy M, Tam JS, Mu GF, Yamazaki S (1992) Phylogenetic analysis of a coxsackievirus A24 variant: the most recent worldwide pandemic was caused by progenies of a virus prevalent around 1981. *Virology* 187:748–759
16. Brandful JA, Yoshii T, Adiku TK, Osei-Kwasi M, Ingle JA (1990) Epidemic acute hemorrhagic conjunctivitis due to coxsackie A24 variant in Ghana. *East Afr Med J* 67:878–886

RESUME en français

Le cycle cellulaire des entérovirus est connu grâce aux nombreux travaux publiés portant sur les poliovirus. Il reste néanmoins de nombreuses interrogations concernant les premières étapes de l'infection correspondant à l'attachement et à l'entrée du virus dans la cellule. Elles constituent pourtant des cibles potentielles pour de futurs antiviraux. Nous nous sommes donc intéressés aux étapes précoces de l'infection par echovirus 6, un des nombreux sérotypes du genre *Enterovirus*. A partir d'une souche isolée chez un patient, deux populations virales se distinguant par leur capacité à hémagglutiner (HAE6 et NHA6) ont été sélectionnées par passages successifs sur cellules PLC et HeLa. L'utilisation de composés chimiques et de formes mutées de protéines impliquées dans l'endocytose ont permis de caractériser leurs voies d'entrée. HAE6 semble pénétrer dans la cellule par un sous-type de radeaux lipidiques, les *caveolae*, alors que NHA6 a recours aux puits tapissés de clathrine. La comparaison des séquences codant pour les 4 protéines de capsid a ensuite révélé 4 substitutions d'acides aminés localisées dans des régions très exposées de la capsid virale impliquées dans la liaison du virus à son récepteur cellulaire, suggérant l'utilisation de récepteurs différents. Ainsi, une affinité 4 fois supérieure pour DAF, une protéine présente dans les radeaux lipidiques, orienterait l'endocytose de HAE6 vers les *caveolae*. Parmi les autres candidats potentiels évalués, ni les acides sialiques, ni l'intégrine VLA-2, ni CAR, le récepteur des coxsackie et adénovirus, interviennent dans l'infection par echovirus 6 tandis que les sulfates d'héparanes joueraient simplement le rôle de récepteurs d'attachement. Finalement, seule la co-expression de DAF et de CAR a permis l'infection productive par HAE6 et NHA6 de cellules CHO démontrant pour la première fois le rôle de CAR comme récepteur pour un echovirus. Ces données montrent qu'une souche virale isolée d'un patient est en fait constituée d'un mélange de quasi-espèces susceptibles d'entrer dans la cellule par différentes voies d'endocytose conférant au virus une capacité d'adaptation majeure aux multiples environnements rencontrés au cours de l'infection.

TITRE en anglais : Receptors and echovirus 6 endocytic pathways : Role of the quasi-species

RESUME en anglais

Two echovirus 6 (E6) strains were isolated from a clinical sample after successive sub-cultures in PLC and HeLa cells. The first strain retained its haemagglutinating capacity (HAE6) while the second became non-haemagglutinating (NHA6). The lack of competition between the two viral strains during coinfections suggested that each strain used a different cell entry pathway. We provide evidence showing that HAE6 used preferentially the lipid raft-dependent caveolae pathway, whereas NHA6 followed the clathrin-mediated pathway. Comparison of the sequences of HAE6 and NHA6 revealed 4 amino acid changes in the VP1, VP2 and VP3 capsid proteins distributed in domains which are known to be highly immunogenic or suggested to be involved in receptor binding. Virus binding assay showed that HAE6 was capable of binding to DAF-expressing cells but not NHA6 explaining the lipid raft-dependent pathway used by HAE6 as DAF is known to be localised in lipid raft domains. We then provide evidence that HAE6 and NHA6 replication was unaffected by neuraminidase and phospholipase C treatments suggesting that sialic acid and glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins were not essential for infection. Significant reduction of the viral load in the presence of heparin confirmed the role of heparan sulfates as an attachment molecule for echovirus 6. Single expression of CAR, DAF or VLA-2 could not mediate echovirus 6 infection whereas co-expression of DAF and CAR rendered CHO cells susceptible to infection showing evidence of the role of CAR as an echovirus receptor. Our results confirmed that a clinical isolate can be composed of a mixture of quasi-species capable of using different routes to achieve their entry into cells.

DISCIPLINE : Virologie, Ecologie Microbienne

MOTS-CLES : Echovirus 6, endocytose, quasi-espèces, récepteur, DAF, CAR

INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE :

Laboratoire de Virologie et Pathologie Humaine, CNRS FRE 3011, Faculté de Médecine RTH Laënnec, 69372 Lyon Cedex 08, France.