

Université de Poitiers

Faculté de Médecine et Pharmacie

ANNEE 2015

Thèse n°

MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE BIOLOGIE MEDICALE (décret du 23 janvier 2003)

et

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE (décret du 16 janvier 2004)

présentée et soutenue publiquement
le 23 Octobre 2015 à Poitiers
par Mr Emmanuel Lataud

**Etude de la permissivité du kératinocyte aux entérovirus
responsables du syndrome Pieds-Mains-Bouche (Coxsackievirus A16
et Entérovirus 71).**

Composition du Jury

Président : Monsieur le Professeur Nicolas Lévêque

Membres : Monsieur le Professeur Jean-Claude Lecron
Madame le Professeur Florence Morfin
Madame le Docteur Agnès Beby-Defaux
Madame le Docteur Elodie Couderc

Directrice de thèse : Madame le Docteur Agnès Beby-Defaux



UNIVERSITE DE POITIERS

Faculté de Médecine et de Pharmacie



Le Doyen,

Année universitaire 2014 - 2015

LISTE DES ENSEIGNANTS DE MEDECINE

Professeurs des Universités-Praticiens Hospitaliers

1. AGIUS Gérard, bactériologie-virologie
2. ALLAL Joseph, thérapeutique
3. BATAILLE Benoît, neurochirurgie
4. BRIDOUX Frank, néphrologie
5. BURUCOA Christophe, bactériologie - virologie
6. CARRETIER Michel, chirurgie générale
7. CHEZE-LE REST Catherine, biophysique et médecine nucléaire
8. CHRISTIAENS Luc, cardiologie
9. CORBI Pierre, chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
10. DEBAENE Bertrand, anesthésiologie réanimation
11. DEBIAIS Françoise, rhumatologie
12. DROUOT Xavier, physiologie
13. DUFOUR Xavier, Oto-Rhino-Laryngologie
14. EUGENE Michel, physiologie (**surnombre jusqu'en 08/2016**)
15. FAURE Jean-Pierre, anatomie
16. FRITEL Xavier, gynécologie-obstétrique
17. GAYET Louis-Etienne, chirurgie orthopédique et traumatologique
18. GICQUEL Ludovic, pédopsychiatrie
19. GILBERT Brigitte, génétique
20. GOMBERT Jean-Marc, immunologie
21. GOUJON Jean-Michel, anatomie et cytologie pathologiques
22. GUILHOT-GAUDEFFROY François, hématologie et transfusion
23. GUILLET Gérard, dermatologie
24. GUILLEVIN Rémy, radiologie et imagerie médicale
25. HADJADJ Samy, endocrinologie et maladies métaboliques
26. HAUET Thierry, biochimie et biologie moléculaire
27. HERPIN Daniel, cardiologie
28. HOUETO Jean-Luc, neurologie
29. INGRAND Pierre, biostatistiques, informatique médicale
30. IRANI Jacques, urologie
31. JABER Mohamed, cytologie et histologie
32. JAAFARI Nematollah, psychiatrie d'adultes
33. JAYLE Christophe, chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
34. KARAYAN-TAPON Lucie, cancérologie
35. KEMOUN Gilles, médecine physique et réadaptation (**en détachement 2 ans à compter de janvier 2014**)
36. KITZIS Alain, biologie cellulaire
37. KRAIMPS Jean-Louis, chirurgie générale
38. LECRON Jean-Claude, biochimie et biologie moléculaire
39. LEVARD Guillaume, chirurgie infantile
40. LEVEZIEL Nicolas, ophtalmologie
41. LEVILLAIN Pierre, anatomie et cytologie pathologiques
42. MACCHI Laurent, hématologie
43. MARECHAUD Richard, médecine interne
44. MAUCO Gérard, biochimie et biologie moléculaire
45. MEURICE Jean-Claude, pneumologie
46. MIGEOT Virginie, santé publique
47. MILLOT Frédéric, pédiatrie, oncologie pédiatrique
48. MIMOZ Olivier, anesthésiologie - réanimation
49. MORICHAU-BEAUCHANT Michel, hépato-gastro-entérologie
50. NEAU Jean-Philippe, neurologie
51. ORIOT Denis, pédiatrie
52. PACCALIN Marc, gériatrie
53. PAQUEREAU Joël, physiologie
54. PERAULT Marie-Christine, pharmacologie clinique
55. PERDRISOT Rémy, biophysique et médecine nucléaire
56. PIERRE Fabrice, gynécologie et obstétrique
57. POURRAT Olivier, médecine interne
58. PRIES Pierre, chirurgie orthopédique et traumatologique
59. RICCO Jean-Baptiste, chirurgie vasculaire
60. RICHER Jean-Pierre, anatomie
61. RIGOARD Philippe, neurochirurgie
62. ROBERT René, réanimation
63. ROBLOT France, maladies infectieuses, maladies tropicales
64. ROBLOT Pascal, médecine interne
65. RODIER Marie-Hélène, parasitologie et mycologie
66. SENON Jean-Louis, psychiatrie d'adultes (**surnombre jusqu'en 08/2017**)
67. SILVAIN Christine, hépato-gastro-entérologie
68. SOLAU-GERVAIS Elisabeth, rhumatologie
69. TASU Jean-Pierre, radiologie et imagerie médicale
70. TOUCHARD Guy, néphrologie
71. TOURANI Jean-Marc, cancérologie
72. WAGER Michel, neurochirurgie

Maîtres de Conférences des Universités-Praticiens Hospitaliers

1. ALBOUY-LLATY Marion, santé publique
2. ARIES Jacques, anesthésiologie - réanimation
3. BEBY-DEFAUX Agnès, bactériologie - virologie
4. BEN-BRIK Eric, médecine du travail
5. BILAN Frédéric, génétique
6. BOURMEYSTER Nicolas, biologie cellulaire
7. CASTEL Olivier, bactériologie - virologie - hygiène
8. CATEAU Estelle, parasitologie et mycologie
9. CREMNITER Julie, bactériologie - virologie
10. DAHYOT-FIZELIER Claire, anesthésiologie - réanimation
11. DIAZ Véronique, physiologie
12. FAVREAU Frédéric, biochimie et biologie moléculaire
13. FRASCA Denis, anesthésiologie - réanimation
14. HURET Jean-Loup, génétique
15. LAFAY Claire, pharmacologie clinique
16. SAPANET Michel, médecine légale
17. SCHNEIDER Fabrice, chirurgie vasculaire
18. THILLE Arnaud, réanimation
19. TOUGERON David, hépato-gastro-entérologie

Professeur des universités de médecine générale

GOMES DA CUNHA José

Professeurs associés de médecine générale

BINDER Philippe
VALETTE Thierry

Maîtres de Conférences associés de médecine générale

BIRAULT François
BOUSSAGEON Rémy
FRECHE Bernard
GIRARDEAU Stéphane
GRANDCOLIN Stéphanie
PARTHENAY Pascal
VICTOR-CHAPLET Valérie

Enseignants d'Anglais

DEBAIL Didier, professeur certifié
PERKINS Marguerite, maître de langue étrangère
SASU Elena, enseignant contractuel

Professeurs émérites

1. DORE Bertrand, urologie (08/2016)
2. FAUCHERE Jean-Louis, bactériologie – virologie (08/2015)
3. GIL Roger, neurologie (08/2017)
4. MAGNIN Guillaume, gynécologie-obstétrique (08/2016)
5. MARCELLI Daniel, pédopsychiatrie (08/2017)
6. MENU Paul, chirurgie thoracique et cardio-vasculaire (08/2017)

Professeurs et Maîtres de Conférences honoraires

1. ALCALAY Michel, rhumatologie
2. BABIN Michèle, anatomie et cytologie pathologiques
3. BABIN Philippe, anatomie et cytologie pathologiques
4. BARBIER Jacques, chirurgie générale (ex-émérite)
5. BARRIERE Michel, biochimie et biologie moléculaire
6. BECQ-GIRAUDON Bertrand, maladies infectieuses, maladies tropicales (ex-émérite)
7. BEGON François, biophysique, Médecine nucléaire
8. BOINOT Catherine, hématologie - transfusion
9. BONToux Daniel, rhumatologie (ex-émérite)
10. BURIN Pierre, histologie
11. CASTETS Monique, bactériologie -virologie – hygiène
12. CAVELLIER Jean-François, biophysique et médecine nucléaire
13. CHANSIGAUD Jean-Pierre, biologie du développement et de la reproduction
14. CLARAC Jean-Pierre, chirurgie orthopédique
15. DABAN Alain, cancérologie radiothérapie (ex-émérite)
16. DAGREGORIO Guy, chirurgie plastique et reconstructrice
17. DESMAREST Marie-Cécile, hématologie
18. DEMANGE Jean, cardiologie et maladies vasculaires
19. FONTANEL Jean-Pierre, Oto-Rhino Laryngologie (ex-émérite)
20. GOMBERT Jacques, biochimie
21. GRIGNON Bernadette, bactériologie
22. GUILLARD Olivier, biochimie et biologie moléculaire
23. JACQUEMIN Jean-Louis, parasitologie et mycologie médicale
24. KAMINA Pierre, anatomie (ex-émérite)
25. KLOSSEK Jean-Michel, Oto-Rhino-Laryngologie
26. LAPIERRE Françoise, neurochirurgie (ex-émérite)
27. LARSEN Christian-Jacques, biochimie et biologie moléculaire
28. MAIN de BOISSIERE Alain, pédiatrie
29. MARILLAUD Albert, physiologie
30. MORIN Michel, radiologie, imagerie médicale
31. POINTREAU Philippe, biochimie
32. REISS Daniel, biochimie
33. RIDEAU Yves, anatomie
34. SULTAN Yvette, hématologie et transfusion
35. TALLINEAU Claude, biochimie et biologie moléculaire
36. TANZER Joseph, hématologie et transfusion (ex-émérite)
37. VANDERMARCO Guy, radiologie et imagerie médicale

Remerciements

A Mr le Professeur Nicolas Lévêque pour avoir accepté de présider mon jury et sans qui je n'aurai pas appris ce que je sais aujourd'hui sur ces petits virus.

A Mr le Professeur Jean-Claude Lecron, à Mme le Docteur Elodie Couderc et à Mme le Professeur Florence Morfin pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

A Mme Agnès Beby-Defaux, pour avoir accepté de travailler avec moi sur ce sujet si éloigné de son domaine de prédilection et pour m'avoir « un peu » aidé. J'ai eu beaucoup de plaisir pendant ces presque 2 années à venir discuter de l'avancement (difficile) de cette thèse.

A Mr le Professeur Gérard Agius pour m'avoir accueilli dans son service.

Aux techniciennes de virologie en particulier Agnès, Martine, Isabelle, Christine, Marie-Pierre et toutes les autres pour leur gentillesse et pour toujours m'avoir aidé à résoudre tous les petits problèmes rencontrés pendant mes manip.

A Marie-Christine, sans ton dévouement et ton expertise cette thèse aurait été bien maigre. Merci beaucoup (sache que je te remercie en échelle logarithmique !).

A ceux que j'ai rencontrés durant mes premières années à Poitiers en particulier Xavier, Ossama, Camille et Antoine. Je garde en mémoire tous les moments passés à la BU de droit ou à la médiathèque ; les nombreuses pauses café place Notre-Dame avec les madeleines de la grange à pain à regarder tout et n'importe quoi.

A tous mes anciens co-internes et amis, surtout Victor mon co-interne Jamaïcain et Ala le Pacha, mais aussi Pégui, Michaud et René pour cette première année d'internat mémorable durant laquelle on s'est plutôt amusé.

A Louis depuis le jour de ton arrivée où tu râlais jusqu'aux visites à Saint-Martin, Saint-Barth, la Guadeloupe, nos sessions windsurf, surf et jetsurf, les trips en van, les Philippines et sûrement beaucoup d'autres aventures à venir.

A Ali, Aurélie et Jean-Marie pour ce semestre aux urgences où nous n'avons soigné personne, coincés à la machine à café.

A tous les internes rencontrés au CHU et surtout à Micka, Mathilde, Guillaume Vesselle, Juju Palacin, Aurore, Baptiste, Fabien, Matthieu et Julie.

A François pour avoir partagé nos centres d'intérêt à savoir les voitures, les soirées, Basshunter et beaucoup d'autres très bonnes références. Pour ton soutien quand c'était plus difficile mais surtout pour la fois où on a charié Micro.

A Manue, si je ne t'avais pas embêtée tous les jours jusqu'à ce que parfois tu me haïsses, je crois que j'aurais déprimé.

A Christophe pour m'avoir prêté ton super canap' quand j'étais à la rue, pour la journée barbecue à la Pierre Saint Martin et pour nous faire une référence au Sud-Ouest à peu près tous les jours.

A Françoise et Didier Stéfanini qui m'ont accueilli comme un membre de leur famille, pour les moments passés avec vous et pour votre soutien sans faille.

A toute l'équipe de La Rochelle en particulier Sylvain, Ana, Romain, Han, Pauline, Victor et Jérèm ; je suis très heureux d'avoir travaillé ? de vous avoir regardé travaillé ? d'être allé faire du bateau ? d'avoir déjeuné au resto ? Non, de vous avoir tenu compagnie durant cette année de grandes marées.

A ma famille,

Mes grands-parents dont j'aurai aimé avoir la présence en ce jour particulier.

A mes parents pour m'avoir poussé à travailler tant de fois et m'avoir donné l'envie d'être médecin.

A mon frère Quentin pour ne pas avoir fait Médecine comme nous tous et être aujourd'hui aussi cool.

A Marine pour toujours avoir donné l'exemple et pour m'avoir donné tes cours de P1 sans lesquels je ne serai peut-être jamais arrivé jusqu'ici.

A Olivier pour ajouter du vocabulaire latin dans nos discussions qui pourtant volent toujours très haut.

A Andréa, pour les 7 années formidables passées à tes côtés, merci pour ton amour et ton soutien.

Enfin à ces 11 années passées dans cette bonne ville de Poitiers que j'ai si souvent critiquée. Je retire tout ou partie de ce que j'ai dit.

Sommaire

1	Introduction	9
2	Les entérovirus.....	10
2.1	Historique	10
2.2	Classification	11
2.3	Structure du virus et protéines virales	12
2.4	Physiopathologie de l'infection et cycle de multiplication virale	14
2.5	Epidémiologie des infections à EV71 et CV-A16.....	19
2.6	Manifestations cliniques du syndrome PMB.....	21
2.7	Diagnostic virologique du syndrome PMB.....	24
2.8	Traitement antiviral et vaccins.....	25
3	Entérovirus et réponse immunitaire innée.....	26
3.1	RLRs	26
3.2	Activation de la synthèse d'IFN par les RLRs	29
3.3	TLRs.....	30
3.4	Induction de la réponse immunitaire innée par les entérovirus.....	32
3.5	Mécanismes d'échappement aux défenses antivirales.....	33
4	Les kératinocytes, une cible des entérovirus ?	35
5	Matériels et Méthodes	37
6	Résultats	41
7	Discussion.....	46
8	Conclusion	49
9	Bibliographie	50

Abréviations

ADN Acide désoxyribonucléique	MAVS Mitochondria-localized antiviral signaling
AP-1 Activator protein 1	MDA5 Melanoma differentiation associated protein 5
ARN acide ribonucléique	M-CSF Macrophage colony stimulating factor
BLAST Basic local alignment search tool	NK Natural killer
BCA BiCinchoninic Acid	NLR Nod-like receptor
CAR Coxsackie-adenovirus receptor	NSB3 Niveau de sécurité biologique 3
CARDS Caspases recruitment domains	ORF Open read frame
CD Cellule dendritique	PMB Pieds-mains-bouche
CHIKV Chikungunya virus	Poly(I:C) Polyinosic:polycytidylic acid
CNR Centre national de reference	PRR Pattern recognition receptor
CMH Complexe majeur d'histocompatibilité	PSGL-1 P-selectin glycoprotein ligand 1
CV-A16 Coxsackie A16	PVR Polio virus receptor
CV-B3 Coxsackievirus B3	RF replicative form
Ct Cycle Treshold	RI replicative intermediate
CTD C-terminal domain	RLR RIG-1 like receptor
DAF Decay accelerating factor	RT PCR reverse transcription polymerase chain reaction
E. coli Escherichia coli	SCARB2 Scavenger receptor class B member 2
ELISA Enzyme-linked immunosorbent assay	SLD stem loop domain
EMCV Encephalomyocarditis virus	STAT Signal transducer and activator of transcription
EV71 Entérovirus 71	TBS Tris-Buffered Saline
FBP Far upstream element binding protein	TIAC TBK1 IKK ϵ activation complex
GM-CSF Granulocyte macrophage colony stimulating factor	TIR Toll interleukin receptor
HEV Human enterovirus	TIMS TRAF interacting motifs
HRV Human rhinovirus	TLR Toll-like receptor
IFN Interféron	TMEV Theiler's murine encephalomyelitis virus
IFNAR Interferon α receptor	TNF Tumor necrosis factor
IRES Internal ribosome entry site	VSV Vesicular stomatitis virus
IRF Interferon regulating factor	WB Western blot
ISGF Interferon stimulated genes factor	
ISRE IRF stimulated response element	
LCR Liquide céphalo-rachidien	
LRR leucine rich repeat	
LT Lymphocyte T	

1 Introduction

Le syndrome pieds-mains-bouche se caractérise par une éruption maculo-papuleuse souvent associée à des vésicules au niveau de la paume des mains, des plantes de pieds et de la cavité buccale. Il atteint plus fréquemment les enfants et est le plus souvent bénin, cependant des complications neurologiques sévères à type d'encéphalite et de paralysie flasque ainsi que des complications cardiopulmonaires peuvent survenir. L'ampleur des épidémies de syndrome pieds-mains-bouche associée aux complications parfois mortelles impose aux pouvoirs publics et à la communauté scientifique d'étudier et de prendre des mesures contre les infections à entérovirus, particulièrement l'entérovirus 71 (EV71) et le coxsackievirus A16 (CV-A16), principaux virus impliqués dans ces épidémies. La transmission de la maladie intervient le plus souvent par voie orale mais également par contact avec les lésions cutanées. La physiopathologie de ce syndrome reste peu connue. Le virus est présent dans les vésicules mais l'identité des cellules productrices reste incertaine. Seules deux observations remontant aux années 70 et 80 ont rapporté la présence de particules virales dans les kératinocytes de lésions de patients atteints. Jusqu'à présent aucune étude concernant le tropisme des entérovirus pour les kératinocytes primaires n'a été publiée dans la littérature scientifique. Dans la perspective de l'arrivée de Nicolas Lévêque à la tête du Laboratoire de Virologie, une collaboration avec le Laboratoire Inflammation Tissus Epithéliaux Cytokines (LITEC, EA 4331) a été engagée. Le projet était d'étudier le tropisme de EV71 et CV-A16 pour les kératinocytes primaires et la réponse inflammatoire et immunitaire innée à cette infection. La première partie de ce projet a été initiée par mon travail de thèse. Parallèlement, un étudiant en M2, Antoine Sabourin a étudié la réponse inflammatoire et innée en réponse à l'infection des kératinocytes.

2 Les entérovirus

2.1 Historique

Les premières descriptions de maladies transmises par les entérovirus remontent à l'antiquité égyptienne. La Poliomyélite est probablement la maladie due à un entérovirus la plus célèbre. En Egypte des hiéroglyphes datant de 1400 av J-C représentaient des sujets invalides aux membres atrophiés (Figure 1). Des personnages célèbres contemporains ont été atteints par le poliovirus : Franklin D. Roosevelt ou Francis Ford Coppola. De grandes épidémies ont eu lieu jusqu'à l'apparition du vaccin anti-poliovirus en 1955. Depuis la maladie a été éradiquée dans les pays développés grâce à la vaccination massive de la population. Cependant les populations des pays les plus pauvres sont toujours concernées. De nos jours ce sont les grandes épidémies de syndrome PMB compliqué de formes neurologiques graves accompagnées de séquelles neurosensorielles touchant le Sud-Est asiatique préoccupent les pouvoirs publics. Avec l'augmentation de la population urbaine et l'accroissement des flux migratoires les pays développés ont un risque important de voir des épidémies de ce type se reproduire.



Figure 1. Représentation évoquant la poliomyélite dans l'Egypte ancienne

2.2 Classification

Les entérovirus appartiennent à la famille des *Picornaviridae* (Figure 2). Cette famille comprend 29 genres dont 5 comportent des virus pathogènes pour l'Homme : le genre *Enterovirus* dont le virus prototype est constitué par le poliovirus, le genre *Hepatovirus* (virus de l'hépatite A), le genre *Parechovirus*, le genre *Cardiovirus* (virus de l'encéphalomyocardite ou EMCV) et le genre *Kobuvirus* (virus Aichi) (<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy>).

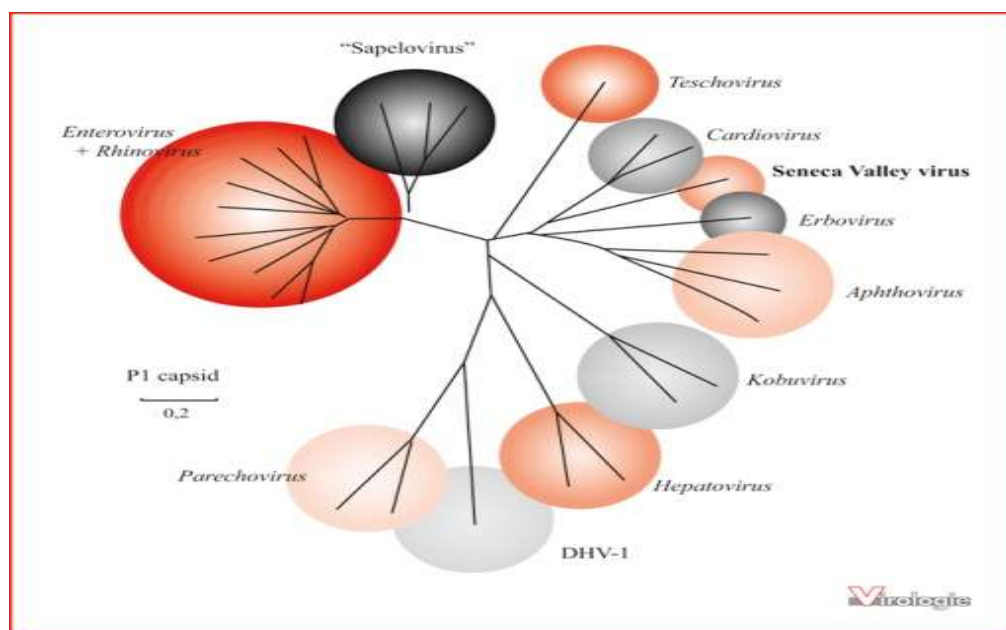


Figure 2. Arbre phylogénétique des *Picornaviridae* (d'après www.picornaviridae.com et Peigue-Lafeuille et al, 2014).

Les entérovirus humains (HEV) comprennent le poliovirus responsable de la poliomyélite et les entérovirus non poliomyélitiques responsables de pathologies multiples. La classification des entérovirus, auparavant réalisée par sérotypage, repose désormais sur le séquençage du génome viral. C'est la région 1D du génome codant la protéine de capsid VP1 qui est séquencée, puis comparée à l'aide du logiciel *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) afin de génotyper la souche d'entérovirus étudiée. L'identification moléculaire virale peut également être réalisée par une analyse phylogénétique qui met en œuvre une comparaison à partir d'un alignement de séquences multiples. Les numéros des génotypes ont été ensuite attribués dans l'ordre chronologique de leur découverte. Le genre *Enterovirus* comprend 12 espèces, les membres d'une même espèce partageant plus de 70% d'identité en acides aminés dans la région correspondant aux protéines de capsid, dont 7 inféodées à l'Homme correspondant à 4 espèces d'entérovirus (HEV) notées de A à D regroupant 116 génotypes connus ainsi qu'à 3 espèces de rhinovirus (HRV-A, HRV-B et HRV-C) (Tableau 1). Les entérovirus de l'espèce A comprennent 21 génotypes dont la majorité des Coxsackievirus A.

L'espèce B contient le plus grand nombre de génotypes (58) dont les Coxsackievirus B et les ECHOvirus. Les 3 génotypes de poliovirus appartiennent à l'espèce C (23 génotypes au total). Enfin, l'espèce D ne comprend que 3 génotypes d'entérovirus humains (Tableau 1). Le Coxsackievirus A16 (CV-A16) et l'entérovirus 71 (EV71), qui ont été les virus utilisés au cours de ce travail, appartiennent à l'espèce A.

Tableau 1: classification des entérovirus humains (d'après Solomon et al, 2010).

Serotype	
A	CV-A2-8, CV-A10, CV-A12, CV-A14, CV-A16, EV71, EV76, EV89-92
B	CV-A9, CV-B1-6, E1-7, E9, E11-21, E24-27, E29-33, EV69, EV73, EV74-75, EV77-88, EV93, EV97, EV98, EV100, EV101, EV106, EV107
C	CV-A1, CV-A11, CV-A13, CV-A17, CV-A19-A22, CV-A24, EV95, EV96, EV99, EV102, EV104, EV105, EV109, PV1-3
D	EV68, EV70, EV94

The Picornaviridae Study Group and the International Committee on Taxonomy of Viruses classified the Enterovirus genus into ten species, which include four human enterovirus species (A-D), three human rhinovirus species (A-C), bovine enterovirus, simian enterovirus A, and porcine enteroviruses (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdb/>). CV-A=coxsackievirus A. CV-B=coxsackievirus B. EV=enterovirus. E=echovirus. PV=poliovirus.

2.3 Structure du virus et protéines virales

Les entérovirus sont des virus de petite taille de 27 à 30 nm de diamètre, non enveloppés. Leur génome est constitué d'un brin d'ARN de polarité positive non segmenté d'une taille d'environ 7500 nucléotides, comportant un seul cadre de lecture (*open read frame ORF*) et possédant 2 séquences non codantes aux extrémités 5' et 3' (Figure 3).

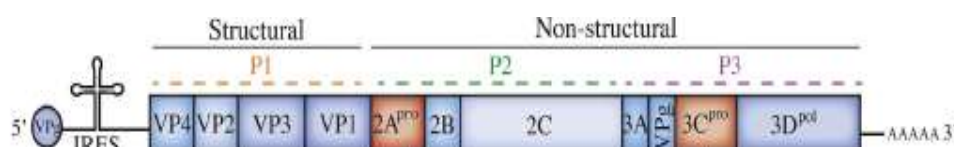


Figure 3. Génome des entérovirus (Harris & Coyne, 2009).

La région 5' non codante d'environ 750 nucléotides contient 6 domaines SLD (*Stem-loop Domain*) ou tige-boucle qui sont des structures secondaires complexes formées par repliement de l'ARN viral. La tige-boucle I encore appelée feuille de trèfle est indispensable à la synthèse des ARN viraux tandis que les tige-boucles II à VI constituent une structure appelée IRES (*Internal Ribosome Entry Site*), essentielle à l'initiation de la traduction du génome viral par les ribosomes cellulaires (Figure 4). Le génome des entérovirus n'ayant pas de coiffe en 5', cette région permet au génome viral d'être traduit même en condition de stress cellulaire où la traduction des ARN messagers (ARNm) cellulaires coiffés est inhibée du fait du clivage des facteurs d'initiation de la traduction eucaryotique par les protéases virales. L'extrémité 5' est liée de façon covalente au niveau du troisième acide aminé, une tyrosine, d'une petite protéine virale VPg (*Virion Protein Genome-linked*) de 22 acides

aminés (Fernández-Miragall *et al.*, 2009). L'extrémité 3' est courte, hautement structurée, d'une longueur de 75 à 100 nt et précède une queue poly(A). En interagissant avec les protéines virales et cellulaires, la région 3'NC favorise la formation du complexe de réplication du génome viral (Zoll *et al.*, 2009).

La région codante est traduite sous la forme d'une seule polyprotéine de plus de 2000 acides aminés. Les clivages successifs co- et post-traductionnels de la polyprotéine sont assurés par les trois protéases virales 2A, 3CD et 3C et génèrent l'ensemble des protéines virales (Figure 5) (Solomon *et al.*, 2010a). La séquence codante contient également des éléments de structure secondaire impliqués dans la réplication du génome viral. L'élément *cre* ou *cis-replicating element* sert de matrice à l'uridylation de la protéine VPg à l'extrémité 5' non codante nécessaire à l'amorçage de la réplication de l'ARN viral par l'ARN polymérase ARN dépendante 3D.

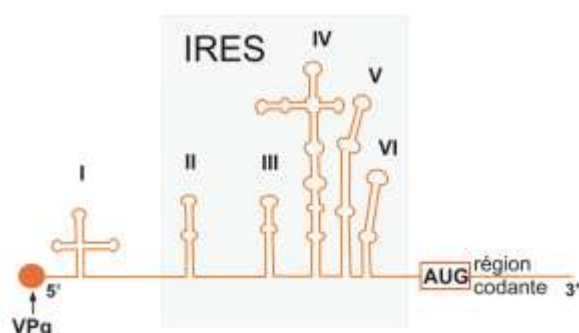


Figure 4. La région 5' non codante (www.microbes-edu.org)

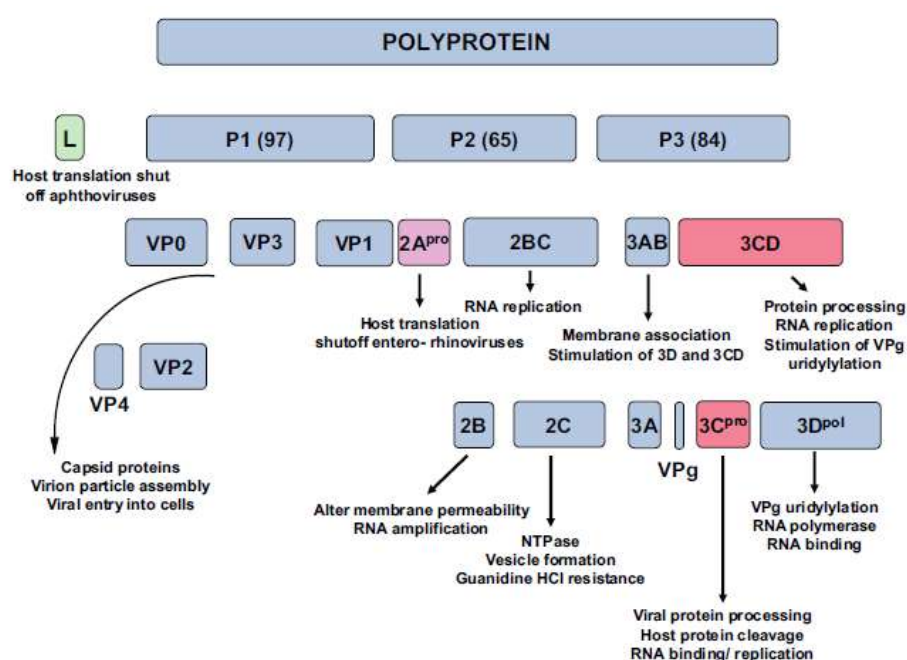


Figure 5. Maturation de la polyprotéine virale par clivage successifs et fonctions des protéines virales (Bedard & Semler, 2004)

Le polypeptide P1 est le précurseur des protéines structurales VP1, VP2, VP3 et VP4 qui constituent la capside virale. La capside icosaédrique de 75S est constituée de 60 protomères identiques de 14S, chacun composé des 4 protéines structurales : VP1 VP2 VP3 et VP4 (Figure 7). Les protomères sont organisés en 12 pentamères définissant des axes de symétrie d'ordre 5, 3 et 2. VP1, VP2 et VP3 comportent des épitopes neutralisants. La protéine VP4 n'est pas exposée à la surface de la capside sauf au cours du processus de décapsidation. Autour des axes de symétrie d'ordre 5 au niveau de la jonction de VP1 avec VP2 et VP3, une dépression nommée « canyon » sert de site d'attachement au récepteur cellulaire (Figure 7) (Jiang *et al.*, 2014)..

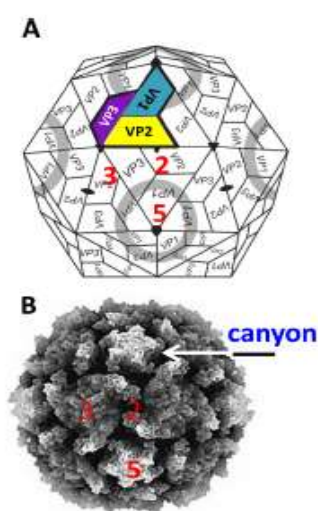


Figure 6. Structure de la capside virale (Jiang *et al.*, 2014)

2.4 Physiopathologie de l'infection et cycle de multiplication virale

La contamination est le plus souvent féco-orale, généralement par les mains sales, l'ingestion d'aliments ou d'eau souillés. Elle peut aussi intervenir par voie respiratoire, par contact avec des lésions cutanées, par contact oculaire et par voie transplacentaire. Le virus nu, résistant au pH acide, pénètre dans l'oropharynx et atteint l'intestin grêle. L'attachement a lieu à la surface des cellules épithéliales oropharyngées et des entérocytes par l'intermédiaire de récepteurs cellulaires spécifiques puis le virus est internalisé et traverse la muqueuse pharyngée et digestive pour atteindre les organes lymphoïdes : amygdales palatines, cryptes tonsillaires, plaques de Peyer, où il se multiplie (phase lymphatique) (Solomon *et al.*, 2010b). Le virus passe ensuite dans la circulation sanguine décrivant une phase virémique. Lors de la virémie, le virus peut atteindre les organes cibles : système nerveux central, cœur, poumons, foie, peau. Après atteinte et multiplication au niveau des organes cibles, il se produit une seconde virémie. L'excrétion du virus peut persister jusqu'à

2 semaines au niveau de la gorge et jusqu'à 11 semaines dans les selles (Solomon *et al.*, 2010a).

Les entérovirus ont un pouvoir cytolitique provoquant une destruction des cellules de l'organe infecté. La sécrétion d'anticorps neutralisants permet d'empêcher l'infection en bloquant la phase de virémie initiale. Ils apparaissent dans le sérum 7 à 10 jours après l'infection. De plus, les anticorps sécrétés dans l'oropharynx et l'intestin peuvent empêcher l'atteinte des tissus cibles (Andréoletti *et al.*, 2009). Lorsqu'un organe cible est atteint, le système immunitaire à médiation cellulaire associé à la production de *tumor necrosis factor alpha* (TNF α) et d'interféron γ (IFN- γ) va limiter la propagation de l'infection et permettre une clairance virale de l'organe infecté. Cette clairance se caractérise par l'absence de virus infectieux dans le tissu cible 5 à 14 jours après la phase d'invasion de l'organe (Henke *et al.*, 2008). La réponse cellulaire de type T avec les cellules K (*killer*) et NK (*natural killer*) joue un rôle prépondérant dans la réponse immune antivirale (Andréoletti *et al.*, 2009). Par ailleurs, les cellules dendritiques présentes dans les sous-muqueuses digestives ou respiratoires, par leur fonction de cellule présentatrice de l'antigène, vont amplifier les réponses T et B.

Différents récepteurs ont été identifiés pour les entérovirus, les principaux sont le *Polio Virus Receptor* (PVR ou CD155), spécifique des poliovirus, le *Coxsackie Adenovirus Receptor* (CAR), récepteur principal des coxsackievirus B et enfin l'ICAM-1, récepteur des rhinovirus (Lévêque *et al.*, 2008). Ces 3 récepteurs ont en commun une structure *immunoglobulin-like* qui fixe les virus au niveau du canyon de la capsid. Par ailleurs, les entérovirus possèdent aussi des co-récepteurs, l'un d'entre eux est le *Decay Accelerating Factor* (DAF), co-récepteur de certains coxsackievirus A et B, d'ECHOvirus hémagglutinants et de l'entérovirus 70 ; cependant ce co-récepteur ne suffit pas à lui seul à l'endocytose et la décapsidation du virus pour lesquelles la présence du récepteur principal est nécessaire (Lévêque *et al.*, 2008). Deux molécules ont été identifiées comme récepteurs cellulaires de l'EV71 : SCARB2 (*scavenger receptor class B member 2*), appelé également CD36L2, et PSGL-1 (*P-selectin glycoprotein ligand 1*), appelé également CD162. SCARB2 est également utilisé par le CV-A16. SCARB2 est largement exprimé par la plupart des cellules comme les neurones, l'épithélium pharyngé, notamment celui des cryptes tonsillaires, et l'épithélium intestinal (Muehlenbachs *et al.*, 2015). SCARB2 serait également exprimé par les kératinocytes cutanés (données du LITEC non publiées). Là encore, la fixation du virus intervient au niveau du canyon (Yamayoshi *et al.*, 2014). SCARB2 joue un rôle majeur dans les étapes précoces de l'infection de la cellule hôte par le virus notamment en facilitant l'internalisation par endocytose et la décapsidation. L'étape d'endocytose *via* SCARB2 implique les puits tapissés de clathrine (Figure 7).

PSGL-1 a une expression plus restreinte, limitée aux leucocytes, aux neurones, aux cellules dendritiques des ganglions lymphatiques, et aux macrophages de la muqueuse intestinale et des cryptes tonsillaires (He *et al.*, 2014). L'internalisation du virus après fixation à ce récepteur est dépendante de la cavéoline (Yamayoshi *et al.*, 2014) (Figure 7). Cependant certaines souches d'EV-A71 n'utilisent pas PSGL-1 et ne peuvent donc pas infecter des cellules exprimant ce récepteur (Lin & Shih, 2014).

D'autres récepteurs de l'EV-A71 ont été également décrits : Anx2 qui appartient à la famille des annexines, les acides sialiques situés sur les glycoprotéines de membrane, les sulfates d'héparane présents de façon quasi ubiquitaire sur les cellules, et récemment la vimentine (Du *et al.*, 2014). Cependant, seul SCARB2 semble capable de permettre à la fois l'attachement et la décapsidation de la particule virale.

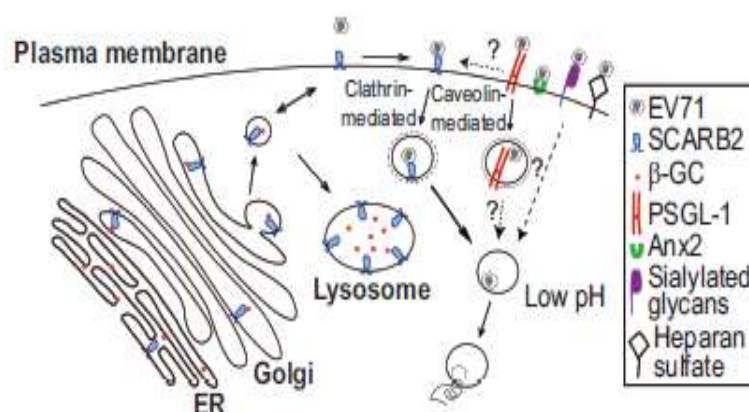


Figure 7. voies d'entrée dans la cellule (Yamayoshi *et al.*, 2014)

Après fixation aux récepteurs, le virus pénètre dans le cytoplasme par endocytose. Le pH acide (6.5-6.0) de la vésicule d'endocytose permet une série de changements dans la structure de la capsid, préalables au processus de décapsidation, qui devient instable et augmente de diamètre (environ 4%) ; la vésicule d'endocytose permet au génome décapsidé d'atteindre son site de réplication constitué de régions riches en membrane situées en périphérie du noyau (appareil de Golgi et réticulum endoplasmique) (Yamayoshi *et al.*, 2014). Le cycle réplcatif du virus est exclusivement intracytoplasmique (Figure 9).

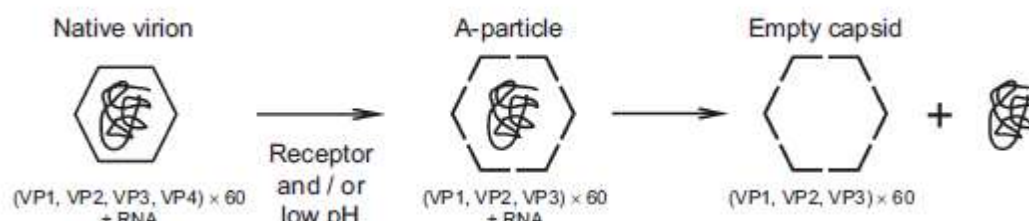


Figure 8. Modifications de la capside au cours de l'endocytose (Yamayoshi *et al.*, 2014)

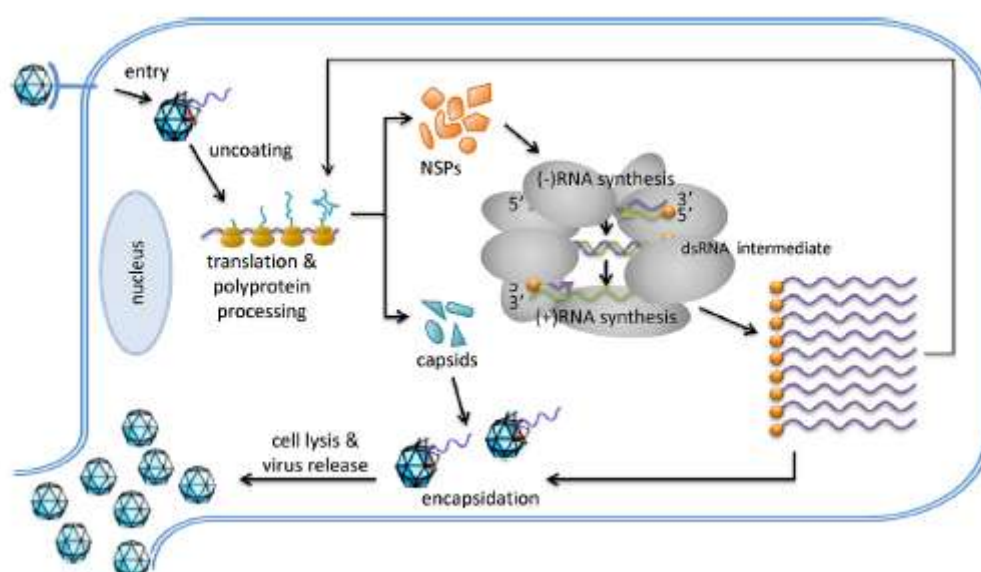


Figure 9. Cycle viral (Feng *et al.*, 2014)

L'ARN viral de polarité positive sera ensuite traduit directement. L'extrémité 5' est liée de façon covalente à la protéine VPg (3B), la structure IRES fixe des protéines cellulaires (ITAFS) permettant la stabilisation de la région 5' non codante, ceci permet ensuite le recrutement et la fixation des sous-unités ribosomales. De plus les protéases virales 3C et 2A inactivent différents facteurs d'initiation bloquant la traduction des ARNm de la cellule hôte et permettent de détourner les éléments nécessaires à la traduction du génome cellulaire au profit du virus. Par ailleurs, EV71 active l'autophagie cellulaire par la voie du protéasome et la voie des caspases, il en résulte notamment une dégradation de FBP2 (*far upstream element binding protein*) qui est un inhibiteur cellulaire de la réplication virale et donc un effet favorable sur la traduction du génome viral (Huang & Shih, 2014)

La réplication du génome a lieu dans une vésicule membranaire de la cellule hôte nommée complexe de réplication virale. Sa réplication implique une première étape de synthèse, par la polymérase virale, d'une molécule d'ARN complémentaire de polarité négative (*Shen et al.*, 2008). Les formes double-brin sont appelées formes répliquatives (RF) (Figure 10). A partir du brin anti-sens de polarité négative du double brin d'ARN, l'ARN polymérase va synthétiser de nombreux brins d'ARN complémentaires de polarité positive qui vont être soit encapsidés pour former des virions matures ou soit traduits amplifiant la synthèse intracytoplasmique des protéines virales; ce complexe formé d'un brin d'ARN négatif et de multiples brins d'ARN positifs en cours de synthèse est appelé forme intermédiaire de réplication (RI) (Bruns and Horvath, 2014a). Un unique brin d'ARN de polarité négative peut ainsi servir à la synthèse de nombreux brins d'ARN de polarité positive, il existe alors un excès de brins d'ARN chargés positivement dans les cellules infectées, avec un ratio de 30 à 50 brins d'ARN positifs pour un brin négatif. Le cycle complet de réplication virale se déroule en moyenne en 6 à 8 heures dans le cytoplasme de la cellule infectée. La libération des virions se produit par lyse de la membrane de la cellule hôte. Le taux d'erreur de l'ARN polymérase 3Dpol est d'une à deux bases lors de chaque réplication génomique, il en résulte un taux de mutation du gène VP1 de 4,2 à 4,6.10⁻³ substitution de nucléotide chaque année traduisant une vitesse importante de mutation du virus. Les virus mutants constituent une population à forte diversité génétique appelée quasi-espèce virale.

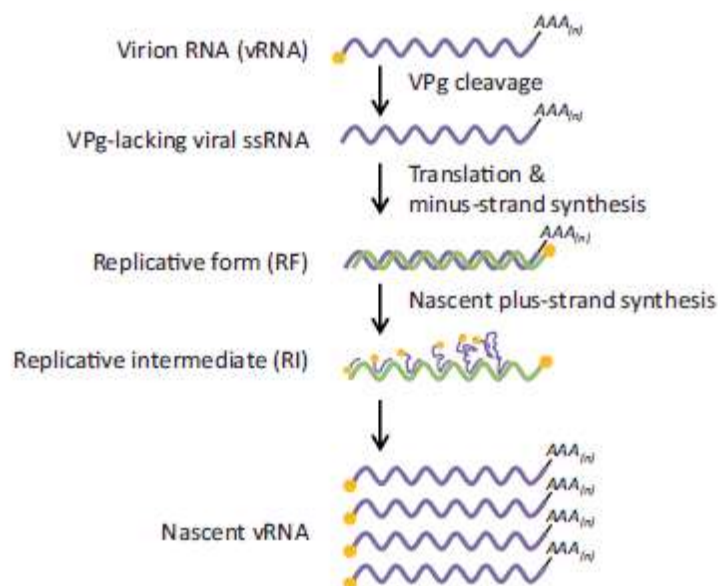


Figure 10. Etapes de la réplication virale (Feng et al., 2014)

2.5 Épidémiologie des infections à EV71 et CV-A16

La répartition des entérovirus est mondiale, la majorité des cas recensés proviennent de la région Asie-Pacifique regroupant les pays de l'Est de l'Asie (Chine, Corée du Sud), du Sud-Est asiatique (Vietnam, Thaïlande, Malaisie, Singapour, Taïwan) ainsi que l'Australie. Les pays occidentaux sont également atteints : Europe de l'Ouest et Etats-Unis plus particulièrement (Mao *et al.*, 2014a). On estime que les entérovirus sont responsables d'environ 1 milliard d'infections asymptomatiques chaque année dans le monde. On distingue différents types épidémiologiques selon le climat du pays étudié. Schématiquement, dans les pays tempérés ou froids, il existe une recrudescence d'infections à entérovirus au printemps et en été, tandis que pour les pays situés dans des régions sub-tropicales et tropicales, la distribution des cas se répartit sur l'année entière. Les facteurs de risque d'infection symptomatique sont l'âge jeune (moins de 5 ans) ou élevé (plus de 80 ans), le sexe masculin (sex ratio 1.5 à 2.5), l'origine ethnique africaine ou indienne et l'immunodépression (Dunn *et al.*, 2000). Nous nous focaliserons pour la suite sur les infections de type PMB dues à l'EV71 et au CV-A16.

EV71

L'EV71 a été isolé pour la première fois en 1969 en Californie lors d'une épidémie de méningites aseptiques et d'encéphalites qui toucha les USA, le Japon, l'Australie et la Suède (Schmidt *et al.*, 1974). Son implication dans le syndrome pieds-mains-bouche a été mise en évidence lors d'épidémies importantes au Japon en 1970 et en Bulgarie en 1971. Les premiers cas de décès attribués à EV71 ont été recensés à partir de cette période. Par la suite, quelques petites épidémies sporadiques eurent lieu dans les années 1985 en Australie et à Hong-Kong. La première grande épidémie asiatique à Sarawak (pays à préciser) toucha 2618 personnes et fit 34 décès. A Taïwan en 1998, 1,5 millions de personnes furent atteintes dont 405 enfants hospitalisés pour atteintes neurologiques et on recensa 78 décès. En 2008, la Chine connût sa première grande épidémie avec 126 décès pour 490 000 cas de PMB. Ce pays reste le premier concerné par les épidémies d'EV-A71 du fait de sa démographie. Les épidémies chinoises se sont succédées jusqu'en 2011 et 2012 où eurent lieu les plus grandes épidémies avec respectivement 1 619 706 cas pour 509 décès et 2 168 737 pour 567 décès (Yip *et al.*, 2013). Au total, depuis la mise en place en Chine en 2008 du réseau national de surveillance des syndromes pieds-mains-bouche, l'incidence n'a cessé d'augmenter ; le nombre total de sujets atteints dépasse 7 millions pour 2500 décès (Huang *et al.*, 2015). Parallèlement à ces grandes épidémies, de nombreuses autres de moindre importance eurent lieu dans les pays du Sud-Est asiatique. Les dernières épidémies à EV-

A71 des années 2000 se sont distinguées par une fréquence plus importante de cas d'encéphalites et de défaillances cardio-pulmonaires contrairement aux premières grandes épidémies des années 80 où la majorité des complications était des méningites aseptiques. Durant les quinze dernières années, l'EV-A71 a continué de circuler en Afrique, en Europe, en Amérique du Nord aux USA et en Amérique du Sud au Brésil provoquant sporadiquement des épidémies de faible importance (Figure 11). A la suite d'une épidémie, les souches circulent pendant 2 à 3 ans avant qu'apparaissent des changements antigéniques déclenchant de nouvelles épidémies (Yip *et al.*, 2013). Les récentes épidémies asiatiques ont vu circuler les sous-génogroupes B3-B5 et C3-C5. En Europe, les souches B0-B1-B2 circulant auparavant ont été remplacées par C1, C2 et C3 depuis les 15 dernières années. En France, entre 2000 et 2009 seuls des génotypes C étaient présents : des souches C1 entre 2000 et 2005, puis C2 à partir de 2007 (Schuffenecker *et al.*, 2011).

CV-A16

Le Coxsackievirus A16 est un des virus les plus fréquemment retrouvés dans les épidémies de syndrome pieds-mains-bouche. En 1994, l'Angleterre et le Pays de Galles connurent une épidémie majeure avec plus de 600 000 cas de syndrome pieds-mains-bouche dont 952 étaient dus au CV-A16 (Bendig and Fleming, 1996). De 1997 à 2007, le CV-A16 fut le principal responsable d'épidémies de PMB à Taiwan et Singapour. D'autres pays ont été touchés durant cette période comme l'Inde ou le Vietnam. En Chine, CV-A16 et EV-A71 co-circulent et sont alternativement l'agent majoritairement responsable des épidémies de syndrome PMB (Mao *et al.*, 2014b).

De nombreuses études ont été menées afin d'attribuer à un génotype ou un sous-génotype une plus grande incidence d'atteintes sévères et/ou mortelles. Cependant, il existe de nombreuses contradictions dans les résultats de ces différentes études qui ne permettent pas de conclure (McMinn *et al.*, 2001, van der Sanden *et al.*, 2009, Ooi *et al.*, 2007).

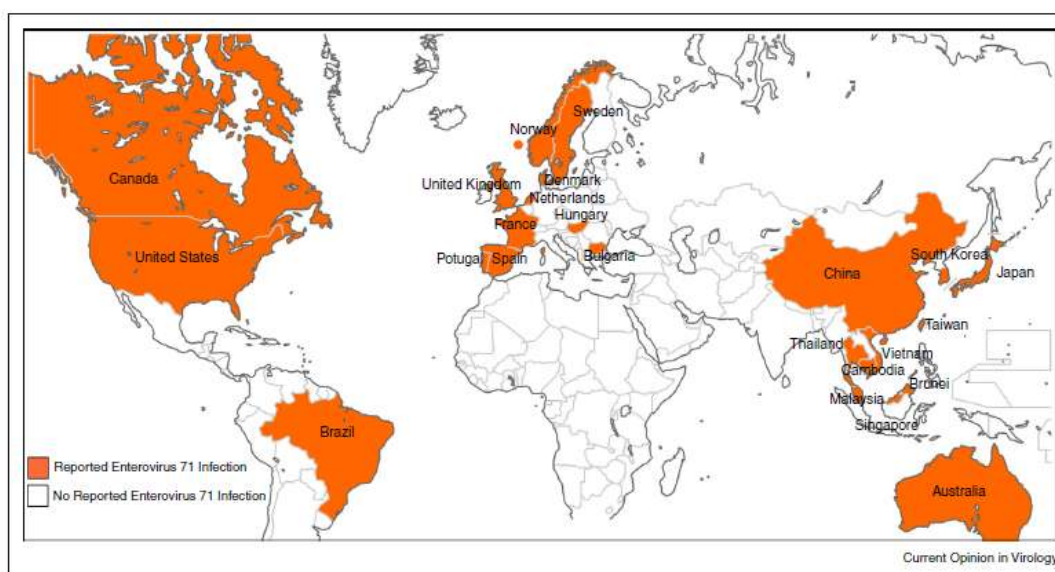
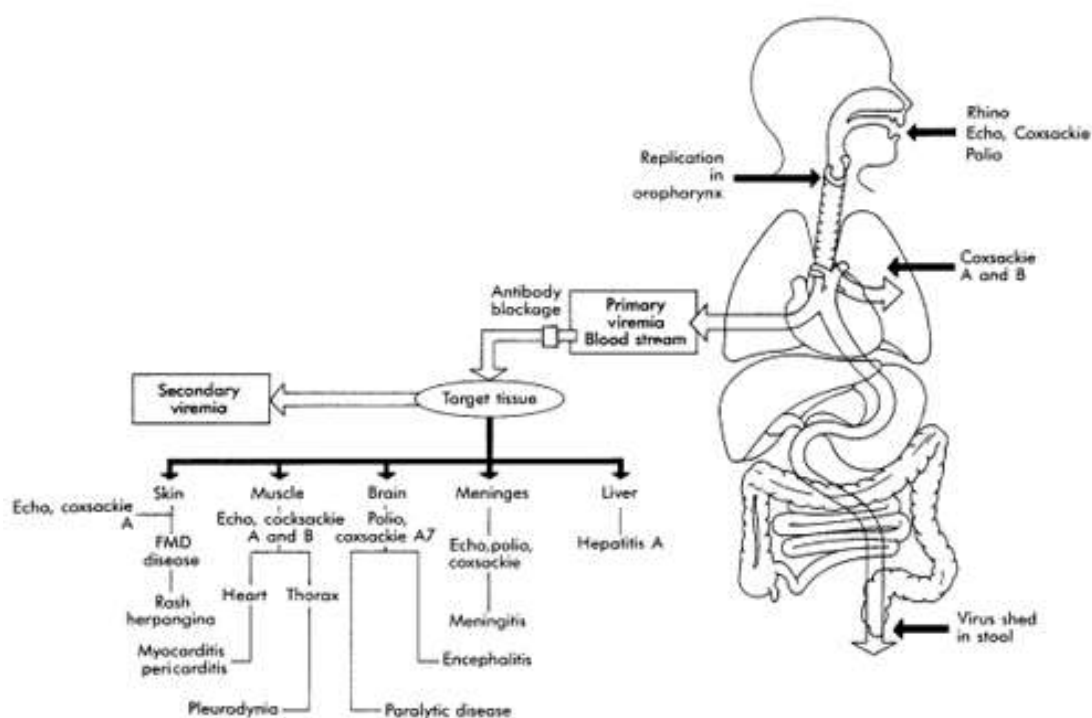


Figure 11. Infections à EV71 dans le monde (Huang and Shih, 2014)

2.6 Manifestations cliniques du syndrome PMB

Dans la majorité des cas, les infections à entérovirus sont asymptomatiques. Dans le cas contraire, les entérovirus peuvent être responsables de syndromes infectieux de manifestations et de gravité variées, allant du rhume banal à la paralysie flasque aiguë. Plus de 20 pathologies différentes ont été associées aux HEV. Les pathologies du système nerveux central sont les plus fréquentes, à type de méningite aseptique essentiellement, mais on les détecte également lors d'infections respiratoires hautes ou basses, de myocardites aiguës, d'herpangine ou encore de conjonctivite aiguë hémorragique. À côté des épisodes infectieux aiguës, les entérovirus sont à l'origine de pathologies chroniques, telles que le diabète de type 1 ou la cardiomyopathie dilatée, du fait de leur persistance dans l'organisme (Renois *et al.*, 2014)(figure 12). Enfin, certains entérovirus sont associés à des phénotypes particuliers. Ainsi, l'EV-A71 et le CV-A16 sont fréquemment identifiés comme causes de syndrome pieds-mains-bouche.



Figure

12. Principales atteintes organiques des entérovirus (meddean.luc.edu)

Le Syndrome pieds-mains-bouche

Le syndrome pieds-mains-bouche (*hand-foot-mouth-disease*) est une maladie bénigne hautement contagieuse atteignant principalement les enfants en bas âge (moins de 10 ans) mais également des sujets adultes. La maladie est présente partout dans le monde. Le plus souvent fréquents les virus impliqués sont les Coxsackievirus A (A6, A10 et A16) et l'EV-A71. L'incubation dure 3 à 6 jours, les premiers symptômes à apparaître sont une fièvre modérée, une sensation de malaise ainsi qu'une angine. Puis survient une éruption maculopapuleuse souvent associée à des vésicules au niveau de la paume des mains, des plantes de pieds et de la cavité buccale (Figure 13). Les lésions cutanées atteignant les paumes et les plantes sont situées généralement sur les bords latéraux. Les lésions de la cavité orale sont quant à elles localisées sur le pourtour buccal. Parfois il peut y avoir la présence de l'érythème sans que les lésions cutanées soient présentes, par ailleurs les lésions cutanées peuvent atteindre d'autres régions du corps (Figure 13D) et dans de rares cas les vésicules peuvent être de taille plus importante voire bulleuses (Kaminska et al., 2013). Le tableau clinique est relativement typique chez l'enfant, tandis que chez l'adulte l'érythème polymorphe et la syphilis font partie des diagnostics différentiels à éliminer. La guérison intervient spontanément au bout d'une à deux semaine(s) sans séquelle.



Figure 13 : lésions du syndrome pieds-mains-bouche (Kaminska et al., 2013)

Complications neurologiques du syndrome PMB

Les complications neurologiques du PMB sont rares mais peuvent être gravissimes avec des séquelles neurosensorielles sévères. Elles concernent principalement mais pas exclusivement les infections à EV-A71. En effet, l'EV-A71 et le CV-A16 sont capables d'atteindre le système nerveux central en passant la barrière hémato-méningée au cours de la phase virémique. Les atteintes du système nerveux central sont de plusieurs types : Les méningites aseptiques constituent les atteintes les plus fréquentes. Le tableau clinique débute brutalement et associe hyperthermie à 38-40°C, céphalées, vomissements, photophobie, raideur méningée. La ponction lombaire ramène un liquide clair avec une prédominance lymphocytaire, une protéinorachie légèrement augmentée, une normoglycorachie. En général, les méningites sont bénignes et évoluent favorablement en 1 à 2 semaines. La complication neurologique la plus sérieuse du syndrome PMB est l'encéphalite. Les encéphalites sont beaucoup plus rares, l'atteinte est généralisée et

provoque une dépression des fonctions neurologiques. Le tableau clinique débute par une fièvre à 38-40°C associée à une asthénie et un syndrome respiratoire supérieur. Puis survient une phase de confusion associée à une léthargie, l'évolution peut aller vers un coma ainsi qu'un état de mal épileptique. Enfin, EV-A71 et CV-A16 sont susceptibles d'engendrer une paralysie flasque aiguë. En revanche, contrairement aux poliovirus, l'EV-A71 et le CV-A16 engendrent des paralysies ayant tendance à régresser sans séquelles (Rotbart and Hayden, 2000).

Les atteintes du système nerveux central peuvent se compliquer d'atteintes du système nerveux autonome provoquant une insuffisance cardiaque aiguë compliquée d'œdème pulmonaire aigu dont l'issue peut être fatale (10 à 25%). Dans ces cas l'hospitalisation en soins intensifs est indispensable.

2.7 Diagnostic virologique du syndrome PMB

Le diagnostic du PMB est clinique. Cependant des analyses virologiques peuvent être nécessaires pour orienter le clinicien chez des patients présentant des formes atypiques ou des complications neurologiques. Le virus peut être mis directement en évidence.. Il existe différentes techniques de diagnostic direct. La RT-PCR dans le liquide vésiculaire par sa sensibilité, sa spécificité et le court délai de rendu des résultats constitue le *gold standard* pour le diagnostic du PMB à entérovirus. La région amplifiée est la région 5' non codante dont certaines régions sont conservées entre génotypes d'entérovirus ce qui permet de détecter une majorité des nombreux génotypes d'entérovirus. On parle de RT-PCR générique ou pan-entérovirus. Plusieurs trousseaux sont commercialisés mais ne permettent pas la quantification virale. Les entérovirus sont également des virus facilement cultivables sur différentes lignées cellulaires, les plus fréquemment utilisées étant les cellules Vero (cellules de rein de singe vert africain) et RD (*rhabdomyosarcoma cells*). Les virus possèdent un effet cytopathique visible généralement au bout de 48h pour les souches virulentes, ce délai peut augmenter selon l'entérovirus, l'inoculum et la virulence des souches cultivées. La mise en évidence des antigènes viraux est possible par immuno-fluorescence à l'aide d'anticorps dirigés contre la capsid.

L'identification du génotype ou sérotype peut être réalisée par méthode moléculaire (amplification suivie du séquençage de tout ou partie du gène codant la protéine de capsid VP1) ou par séroneutralisation avec des pools d'antisérums.

Les sites de multiplication virale étant principalement situés au niveau des voies digestives et respiratoires, la détection moléculaire ou l'isolement des entérovirus à partir d'un

prélèvement de selles ou de gorge est également possible mais ne représente pas toujours, en cas de positivité, une preuve formelle de leur responsabilité dans l'origine de la maladie. En cas de complications neurologiques, le génome des entérovirus peut être recherché par RT-PCR dans le LCR.

La sérologie présente un intérêt très limité en pratique courante. Elle peut être utile dans le cadre d'étude épidémiologique de séroprévalence des infections à EV-A71 ou CV-A16. La technique utilisée est alors une méthode par séroneutralisation utilisant des anticorps spécifiques anti-EV-A71 ou anti-CV-A16.

2.8 Traitement antiviral et vaccins

Il n'existe à ce jour aucun traitement spécifique, seules des mesures symptomatiques (médicaments antalgiques et antipyrétiques, réhydratation) sont appliquées. Des vaccins produits à partir de souche d'EV71 inactivés ont été testés avec succès lors d'essais cliniques, cependant ces vaccins ne protégeaient pas contre CV-A16. Des vaccins bivalents dirigés contre EV71 et CV-A16 ont été développés et testés sur l'animal avec succès mais ne procuraient d'immunité contre CVA6 et CVA10 qui font partie des souches responsables de syndrome pieds-mains-bouche (Liu *et al.*, 2014). Les recherches actuelles visent à développer un vaccin multivalent afin d'obtenir une immunité contre la majorité de virus responsables du syndrome pieds-mains-bouche et des complications neurologiques.

3 Entérovirus et réponse immunitaire innée

La réponse immunitaire innée est nécessaire pour l'induction de la réponse adaptative mais représente à elle seule une part importante de la défense antivirale mise en place par l'organisme pour lutter contre les infections virales. L'immunité innée est largement médiée par une famille de récepteurs nommée *Pattern Recognition Receptors* (PRRs). Ces récepteurs reconnaissent des motifs généraux présents à la surface des micro-organismes appelés PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*) et permettent ainsi la détection de multiples molécules pouvant être de nature différente (protéines, ARN, ADN...). Ces récepteurs sont hautement conservés entre les différentes espèces et constituent une des premières lignes de défense de l'organisme. Les PRRs se répartissent en 5 familles : les *Toll-like receptors* ou TLRs, les *RIG-1 like receptors* ou RLRs, les *NOD-like receptors* ou NLRs, les *C-type lectin receptors* et les *AIM-2 like receptors*. Certains de ces récepteurs sont exprimés à la surface des cellules et permettent la détection de micro-organismes dans le milieu extra-cellulaire tandis que d'autres sont localisés à l'intérieur de la cellule. Au cours d'une infection virale, les PRRs induisent des cascades de signalisation intra-cellulaire conduisant notamment à la production des interférons de type 1 (IFN α et β) et à l'activation de la voie NF- κ B, ce qui induit la production de médiateurs inflammatoires et de molécules ayant une activité anti-virale facilitant la réponse immunitaire et l'éradication des micro-organismes étrangers. L'activation chronique de ces récepteurs peut conduire à une inflammation pathologique.

3.1 RLRs

Les protéines de la famille des *RIG-1 like receptors* (RLRs) font partie de la superfamille des hélicases, elles comprennent trois protéines. Deux protéines majeures assurent un rôle dans la détection des ARN étrangers : RIG-1 (*Retinoic acid inducible gene 1*) et MDA5 (*melanoma differentiation associated protein 5*) et vont entraîner la production d'interféron de type I nécessaire à la réponse immunitaire anti-virale en interagissant avec la protéine MAVS (*mitochondria-localized antiviral signaling protein*) ancrée dans la paroi mitochondriale (Figure 14). Une troisième protéine LGP2 agirait comme régulateur des RLRs, son rôle n'est pas encore bien défini.

Les RLRs sont des hélicases cytoplasmiques reconnaissant les ARN qui ne sont pas produits par la cellule. RIG-1 et MDA5 sont constituées respectivement de 925 et 1025 acides aminés. Elles sont composées de 3 domaines distincts (Bruns & Horvath, 2014).

- Un domaine comprenant deux sites CARDS *Caspases Recruitment Domains* assurant l'interaction avec la protéine MAVS. Ils possèdent une structure en hélice α rigide et vont se fixer sur le site CARD de la protéine MAVS ancrée dans la paroi des mitochondries et dans la membrane des peroxysomes.
- Un domaine central DECH-Box hélicase comprenant des sous-domaines Hel1 (incluant des motifs hélicase Q, I, II et III) et Hel2 (incluant des motifs hélicase IV, V et VI). Ces 2 sous-domaines Hel sont reliés par un domaine d'insertion Hel2i.
- Un domaine C-terminal CTD nécessaire à l'autorégulation de l'action de la protéine et à la détection de l'ARN.

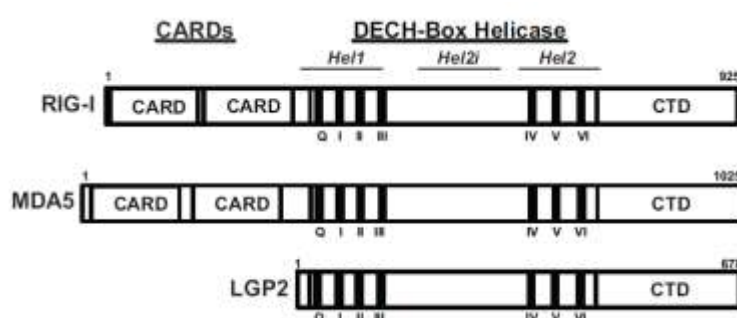


Figure 14. Structure des RLR (Bruns and Horvath, 2014b)

RIG-1 et MDA5 ne fixent pas les mêmes ligands. RIG-1 reconnaît préférentiellement les petits ARN de moins de 2kb et des extrémités 5' tri ou di-phosphates qui les différencient des ARN cellulaires possédant une coiffe en 5'. MDA5 reconnaît des ARN de taille plus importante et surtout des formes répliquatives intermédiaires double brin des virus à ARN simple brin. Cette affinité pour les brins d'ARN de grande taille a été mise en évidence en utilisant le poly(I:C) qui est un ARN double brin de synthèse. L'extrémité 5' triphosphate n'est pas un motif intervenant dans la reconnaissance par MDA5 (Triantafilou *et al.*, 2012). Lorsque RIG-1 ne fixe pas d'ARN, il y a un repli conformationnel du domaine CARDS sur le sous-domaine Hel2i. Cette conformation évite les interactions parasites avec le domaine CTD et permet à celui-ci d'être utilisé de façon optimale pour la détection des ARN. Lorsque

le domaine CTD détecte puis fixe un ARN, il se produit alors un dépliement de la protéine, qui va permettre aux domaines hélicase et CARDS d'être fonctionnels (Bruns and Horvath, 2014a). Il n'existe pas de système d'autorégulation chez MDA5. La régulation de l'activité de cette dernière s'effectue par ubiquitination et phosphorylation des domaines CARDS et par son association avec d'autres médiateurs antiviraux (Wu & Hur, 2015).

Le domaine CTD de RIG-1 et MDA5 assure la reconnaissance du brin d'ARN. Ce domaine est de forme concave et chargé positivement. Cela facilite le positionnement de l'ARN db sur le domaine CTD. Les deux domaines DECH-box hélicase comprennent des séquences hautement conservées constituées de deux sous-domaines RecA, composés de Hel1 et Hel2, qui permettent de coordonner la fixation de l'ARN double brin. De nombreuses molécules RIG-1 ou MDA5 vont se fixer sur les ARN double brin de façon à former une « chaîne » ou « filament » sur leur ligand. Cette disposition facilite l'oligomérisation des domaines CARDS et facilite la transduction du signal (Bruns and Horvath, 2014a). Cela permet secondairement l'activation des molécules MAVS situées sur les mitochondries qui vont alors former des polymères de haut poids moléculaire plus résistants. Les polymères néoformés possèdent la propriété d'activer à leur tour des molécules MAVS perpétuant et amplifiant le signal (figure 15). L'ubiquitine K63 intervient dans l'activation de RIG-1. La fixation de l'ubiquitine sur RIG-1, réalisée par la protéine TRIM-25 (*tripartite motif-containing protein 25*), facilite l'activation du signal. L'étude structurale de RIG-1 a montré que l'ubiquitine K63 permettait aux domaines CARDS de former un tétramère, cette conformation facilite l'activation et le regroupement des MAVS (Bruns and Horvath, 2014a).

Les MAVS sont des protéines de 540 acides aminés, elles sont ancrées dans la paroi mitochondriale et orientées vers le cytoplasme. Elles possèdent d'un domaine transmembranaire C-terminal (TM), une région riche en Proline nommée PRR (*proline rich repeat*) comprenant 3 motifs TIMS (*TRAF-interacting motifs*) et un domaine CARDS (*caspase recruitment domain*). La régulation de l'activité des MAVS est contrôlée par des modifications post traductionnelles comprenant la phosphorylation et la polyubiquitination par des molécules d'ubiquitine K63. La régulation négative des MAVS intervient avec l'ubiquitination sur des résidus Lysine par une ubiquitine K48 par l'ubiquitine-ligase E3. Ce marquage par l'ubiquitine K48 va entraîner la dégradation des MAVS par le protéasome (Rebsamen *et al.*, 2008).

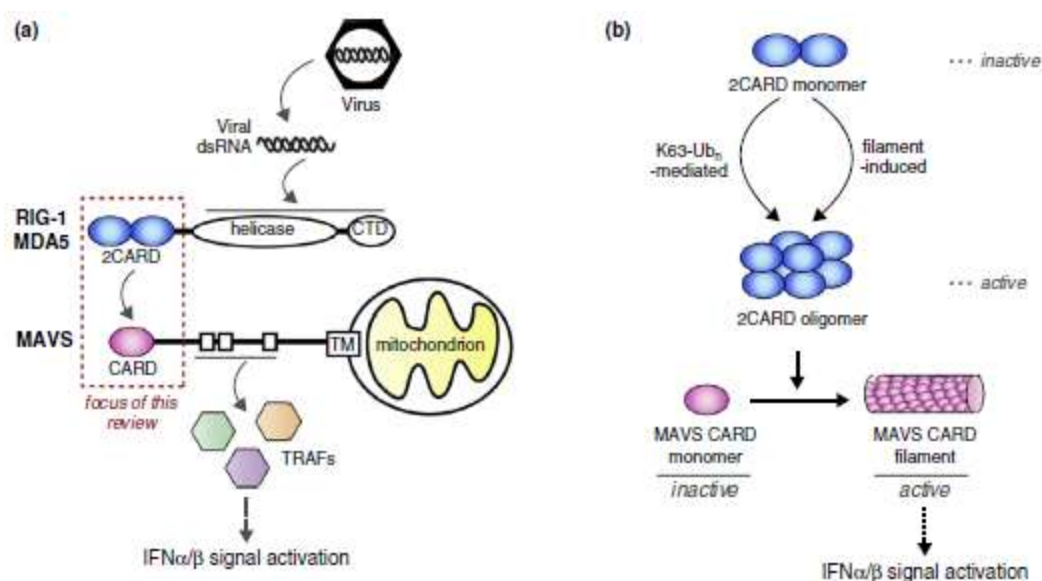


Figure 15. Reconnaissance et activation des RLR (Wu and Hur, 2015)

3.2 Activation de la synthèse d'IFN par les RLRs

Les MAVS interagissent avec TRAF3 pour activer les kinases TBK-1 et IKK- ϵ par l'intermédiaire d'un complexe TIAC (*TBK1 IKK ϵ activating complex*). Ces kinases vont à leur tour phosphoryler les facteurs de transcription IRF-3 et IRF-7. Une fois phosphorylés, IRF-3 et IRF-7 vont se dimériser sous forme d'hétérodimères et pénétrer dans le noyau cellulaire pour activer la transcription des gènes interféron α/β par l'intermédiaire des séquences IRE/ISRE (*IRF-binding element/IRF-stimulated response element*). Par ailleurs IRF-3 et IRF-7 existent aussi sous forme d'homodimères. IRF-3 sous forme homodimérique peut transactiver des gènes codant pour des cytokines et les homodimères d'IRF-7 activent les gènes codant pour l'interféron de type 1 pendant la phase d'amplification de la réponse immunitaire (cf infra) (Bouttier *et al.*, 2008). L'interféron est sécrété de façon autocrine et paracrine par la cellule. Toutes les cellules possédant le récepteur IFNAR peuvent être stimulées par l'interféron α/β . Le récepteur IFNAR est composé de 2 sous-unités IFNAR1 et 2 (Figure 16). Son activation par fixation de l'interféron permet le recrutement et la phosphorylation des tyrosine-kinases Tyk2 et Jak1. Leur activation va permettre la phosphorylation des facteurs de transcription STAT-1 et STAT-2 (*signal transducer and activator of transcription 1 et 2*). Il se produit alors une dimérisation des protéines STAT qui s'associent à IRF-9 et forment le complexe ISGF3 (*Interferon stimulated genes factor 3*). ISGF3 entre dans le noyau cellulaire et active la transcription des nombreux gènes codant pour des protéines ayant des propriétés antivirales ou de signalisation. Par ailleurs ces

protéines amplifient la réponse antivirale en exerçant un rétrocontrôle positif sur la synthèse d'interféron α/β (Bouttier *et al.*, 2008).

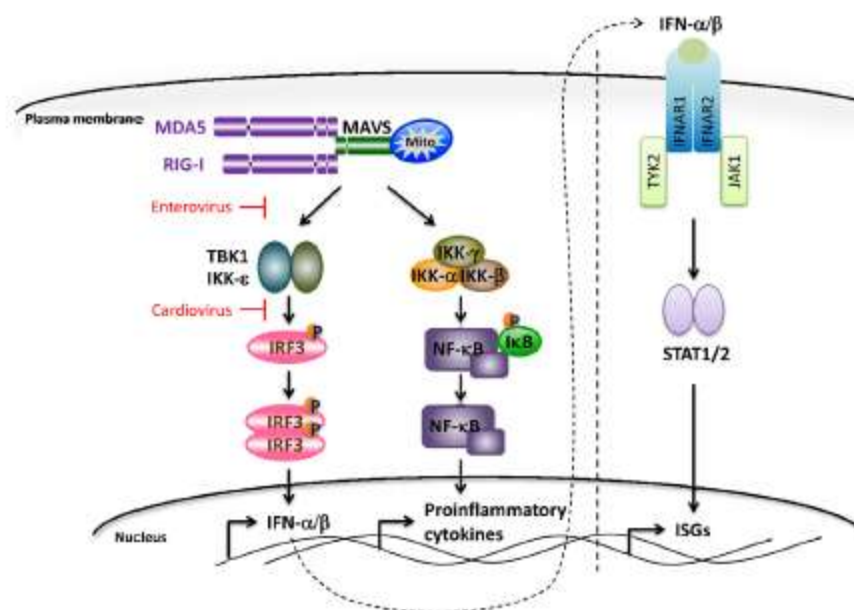


Figure 16. Activation de la synthèse d'interféron (Yang *et al.*, 2015)

3.3 TLRs

Les TLRs sont des PRRs transmembranaires homologues du récepteur Toll identifié la première fois chez *Drosophila melanogaster* en 1997. Chez la drosophile, il joue un rôle dans l'embryogénèse et dans la défense immunitaire anti-fongique. Chez l'Homme l'existence des TLRs et leur rôle pivot dans la réponse inflammatoire a été découverte dans les années 1990. A ce jour, 10 TLRs humains ont été identifiés et numérotés de 1 à 10 (O'Neill, 2006). Les différents TLRs reconnaissent de nombreux ligands présents chez les différents micro-organismes, allant des composants de la paroi bactérienne comme les acides lipotéchoïques, des antigènes de surface bactériens comme le lipopolysaccharide, des lipoprotéines bactériennes, ou encore des acides nucléiques sous forme ADN ou ARN. Les TLR 3, 7, 8 et 9 sont situés dans le compartiment endosomal avec un ancrage dans la membrane endosomale. Ils reconnaissent les acides nucléiques et jouent un rôle important dans la réponse anti-virale. Les autres TLRs, 1, 2, 5 et 10 sont localisés à la surface cellulaire et possèdent un ancrage transmembranaire (Figure 17). Les TLRs sont des glycoprotéines possédant un endodomaine C-terminal nommé *Toll/interleukin-1 receptor* (TIR) initialisant la transduction du signal. L'initiation du signal se fait par l'intermédiaire d'une protéine adaptatrice MyD88 pour la majorité des TLR. Ce domaine est très similaire à celui appartenant aux récepteurs à l'interleukine 1. La région transmembranaire des TLRs est

constituée d'une vingtaine de résidus neutres et le plus souvent hydrophobes disposés en hélice. Le domaine N-terminal est un ectodomaine de 550-800 acides aminés comportant environ 24 séquences d'acides aminés nommé LRRs (*Leucin rich repeats*) et jouant un rôle fondamental dans la fixation du ligand. Les motifs sont constitués de 22 à 29 résidus et espacés selon un intervalle distinct. Selon le TLR, l'ectodomaine sera soit situé dans le milieu extra-cellulaire soit dans l'endosome. Le TLR-3 reconnaît l'ARN double brin viral constituant soit le génome viral natif (*reoviridae*), soit, le plus souvent, des intermédiaires de réplication comme ceux produits par les entérovirus. Il est actif sous forme dimérique. L'ARN viral sous forme double brin peut se lier directement et simultanément à deux ectodomaines de TLR-3 induisant une dimérisation des TLR-3 ; il en résulte un rapprochement des deux endodomains TIR respectifs ce qui va permettre la transduction du signal. Le rapprochement des deux endodomains va permettre le recrutement et l'activation d'une protéine adaptatrice nommée TRIF (*TIR domain-containing adaptator-inducing IFN β*) qui va activer les facteurs de transcription IRF3 et IRF7 (*interferon regulating factor*) via les kinases TBK1 et IKK ϵ ainsi que NF- κ B et AP-1 (Figure 17) (O'Neill, 2006). Les facteurs IRF3 et IRF7 phosphorylés vont se dimériser et activer la transcription du gène codant l'interféron β . L'activation de NF- κ B induit la production de cytokines inflammatoires. Les TLR 7/8 sont très homologues. Leur ligand est l'ARN simple brin. Le TLR9 reconnaît l'ADN double brin. L'induction des IFN de type 1 liée à ces TLR passe par l'activation et l'homodimérisation d'IRF7 alors que l'activation de la signalisation inflammatoire se fait par l'intermédiaire de la protéine TRAF6 (Häcker *et al.*, 2011).

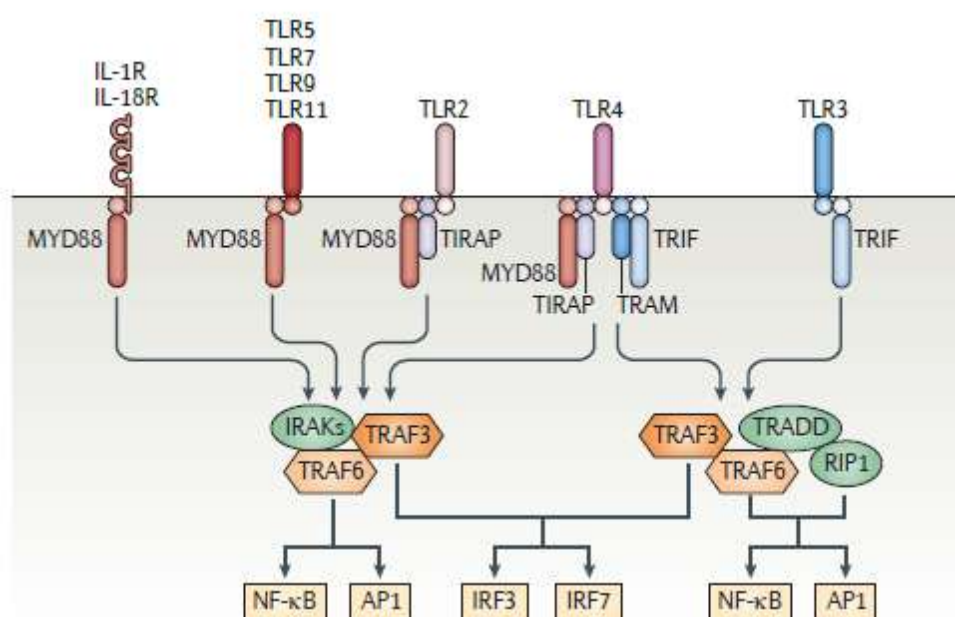


Figure 17. Les différents TLR et leur voie de signalisation (Häcker *et al.*, 2011)

3.4 Induction de la réponse immunitaire innée par les entérovirus

Les études visant à explorer quelles molécules de la réponse immunitaire innée étaient impliquées dans la reconnaissance des *Picornaviridae* a montré l'importance de TLR3 et MDA5, [pour revue Harris & Coyne, 2013 ; Feng *et al.*, 2014). Le rôle de TLR3 a été particulièrement mis en évidence pour les coxsackievirus B3 et B4. Plus récemment, le rôle de MDA5 comme senseur des EV71 a été établi. Différentes études ont montré que certaines formes d'ARN viral possédaient une meilleure affinité pour ce récepteur. Nous avons vu que lorsque l'entérovirus se réplique dans la cellule, l'ARN viral est présent sous plusieurs formes : sous forme répllicative double brin d'environ 7.5 kb et sous forme répllicative intermédiaire simple brin mais possédant quelques segments double brin. Il a été démontré que l'inhibition de la synthèse du brin d'ARN complémentaire et donc la formation de forme répliquatives réprimait l'induction de la réponse immunitaire médiée par les interférons α/β (Feng *et al.*, 2014). Cependant lorsque la formation de formes répliquatives est permise mais que la formation de formes intermédiaires est bloquée, la réponse immunitaire médiée par l'interféron α/β est plus importante. La forme intermédiaire peut aussi activer MDA5 mais plus modérément. Des expériences de transfection ont montré que les molécules d'ARN simple brin issues des *Picornaviridae* étaient de faibles inducteurs des interférons α/β (Feng *et al.*, 2012 ; Triantafilou *et al.*, 2012).

La littérature rapporte des discordances quant à l'importance de RIG-1 et MDA5 dans la réponse à l'infection. Feng *et al.* (2014) ont montré que des souris transgéniques déficientes en MDA5 ne produisaient pas d'IFN de type I en réponse à l'ARN de CV-B3 mais que cela n'était pas vrai pour des souris déficientes en RIG-1, suggérant que MDA5 mais pas RIG-1 est nécessaire à l'induction des IFN-I mais pas RIG-1. D'autres études avaient trouvé des résultats comparables pour le poliovirus, l'EMCV et le TMEV (Kato *et al.*, 2006 ; Gitlin *et al.*, 2010 ; Jin *et al.*, 2012). Parallèlement, Kato *et al.* (2014) rapportent que le virus de la stomatite vésiculeuse (VSV), un virus animal à ARN de polarité négative de la famille des *Rhabdoviridae*, était létal chez la souris déficiente en RIG-1 mais pas chez celle déficiente en MDA5 confirmant que RIG-1 et MDA5 ne reconnaissent pas les mêmes virus à ARN. Cependant les deux molécules activent la production d'interféron α/β après stimulation par le poly(I:C), suggérant que certaines formes d'un génome viral présentes au cours du cycle répliquatif peuvent les activer. Par ailleurs, la molécule LGP2 qui ne possède pas de domaine CARD et a été initialement identifiée comme un régulateur négatif de la signalisation associée aux RLR, serait importante pour la réponse IFN-I induite par les *Picornaviridae*

(Sato *et al.*, 2010). LGP2 faciliterait la reconnaissance des ARN viraux par RIG-1 et MDA5 par l'intermédiaire de son domaine ATPase.

Abe *et al* (2012) ont montré chez la souris déficiente en MAVS qu'il existait toujours une réponse immune médiée par l'IFN de type I après infection par le poliovirus ; cela démontre que la voie TLR3/TRIF reste un effecteur majeur de la réponse antivirale (Abe *et al.*, 2012). Le rôle précis de TLR3 reste encore à approfondir, les formes répliquatives doubles brins vont l'activer entraînant la transcription des gènes codant pour l'interféron (Harris and Coyne, 2013 ; Kato *et al.*, 2006).

3.5 Mécanismes d'échappement aux défenses antivirales

Les entérovirus possèdent des propriétés leur permettant d'inhiber les défenses immunitaires de l'hôte. Il existe différentes stratégies chez les entérovirus (Figure 18).

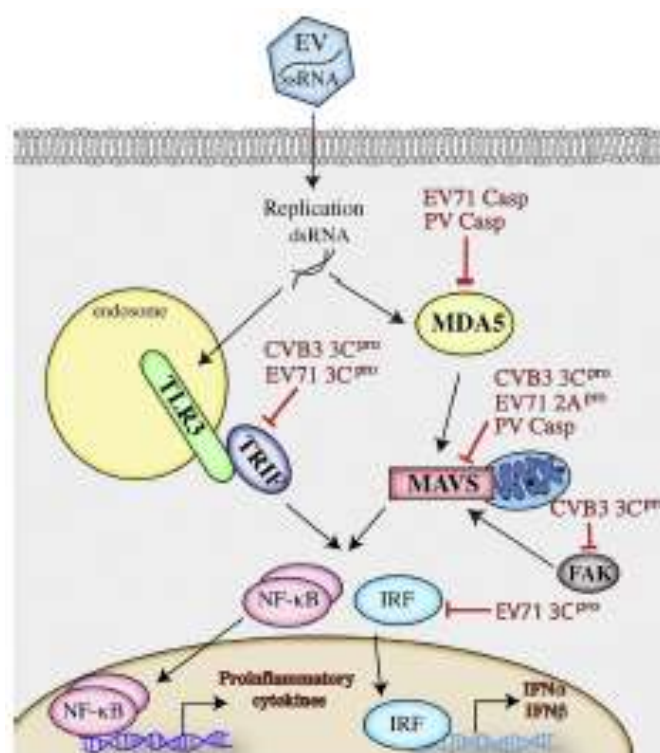


Figure 18. Mécanismes et sites d'action des entérovirus inhibant la réponse immunitaire innée médiée par les PRR (Harris and Coyne, 2013)

La première concerne la reconnaissance par la cellule hôte des molécules d'ARN étrangers possédant une extrémité 5' triphosphate. Les enzymes cellulaires vont dégrader ces ARN possédant cette extrémité. Le couplage de l'ARN viral à la protéine VPg le rend inaccessible

à ces enzymes. De plus l'ARN viral va rester le moins longtemps possible exposé grâce à sa structure IRES qui permet aux ribosomes cellulaires de le traduire rapidement.

D'autres stratégies concernent la voie des RLR et impliquent principalement les protéases virales 2A et 3C. La protéase virale 2A par sa structure, inhibe le regroupement des MAVS qui intervient normalement après activation de RIG-1, il n'y a donc pas de phosphorylation d'IRF-3 et par conséquent pas d'activation de ce dernier (Harris and Coyne, 2013). EV71, comme HRV-1 (*Human Rhinovirus1*), CV-B3 et le poliovirus induisent la dégradation de MDA5 (Barral et al., 2007). Ce clivage est principalement médié par la protéase 2A (Feng et al., 2014b). La protéase virale 3C a la propriété de cliver IRF-7 directement. L'absence de phosphorylation d'IRF-3 conjuguée au clivage d'IRF-7 empêche la transcription des gènes codant pour l'interféron α/β . La molécule adaptatrice MAVS est également ciblée par plusieurs entérovirus incluant HRV-1A, CV-B3 et EV71 par plusieurs mécanismes. Le clivage ferait intervenir la protéase 2A de EV71, la protéase 3C de CV-B3 et, dans le cas du rhinovirus 1, il impliquerait en plus des 2 protéases, la caspase 3 (Feng et al., 2014). Enfin, RIG-1 est également ciblé par plusieurs entérovirus dont CV-B3 et EV71 principalement par le biais de la protéase 3C (Barral et al., 2009; Feng et al., 2014b). EV71 inhibe la voie de signalisation associée à RIG-1 en empêchant la formation du complexe RIG-1/IPS-1 et la translocation nucléaire d'IRF3 (Lei et al., 2010). La signification de cette activité inhibitrice vis-à-vis de RIG-1, une molécule qui ne semble pas reconnaître ces virus, reste à élucider.

Le blocage de la voie de signalisation liée à TLR3 par les entérovirus intervient au niveau de TRIF. EV71 et CV-B3 induisent le clivage de TRIF empêchant l'activation du facteur de transcription NF-KB et la production d'IFN de type 1 (Harris and Coyne, 2013). Les poliovirus eux, sont capables d'activer la dégradation de TRIF par les caspases (Rebsamen et al., 2008).

Les entérovirus sont aussi capables de stopper le métabolisme habituel des cellules et de le détourner à leur avantage. Les protéases 2A et 3C sont capables d'inhiber la traduction des ARNm de la cellule hôte en clivant des facteurs d'initiation de la traduction comme les eIF (eIF4G et eIF4A) et PABP (PolyA-binding protein). Ces derniers se fixent sur l'extrémité 5' des ARNm cellulaires permettant ainsi la fixation des sous-unités ribosomales. Il en résulte donc un blocage de la synthèse des protéines cellulaires et donc de la plupart des molécules impliquées dans la réponse immunitaire ; ce phénomène est nommé *shut-off* cellulaire. Enfin, les protéines 2BC, 2C et 3A bloquent la sécrétion des protéines cellulaires (Cornell et al., 2006) et provoquent un réarrangement de l'organisation de la membrane cellulaire associant les complexes de réplication virale à cette dernière (uniprot.org).

4 Les kératinocytes, une cible des entérovirus ?

Les kératinocytes (KC) sont les principales cellules constituant la barrière cutanée (95% des cellules), les autres cellules qui composent l'épiderme sont les cellules de Langerhans, les lymphocytes – principalement des lymphocytes T CD8+ et les mélanocytes (Figure 19).

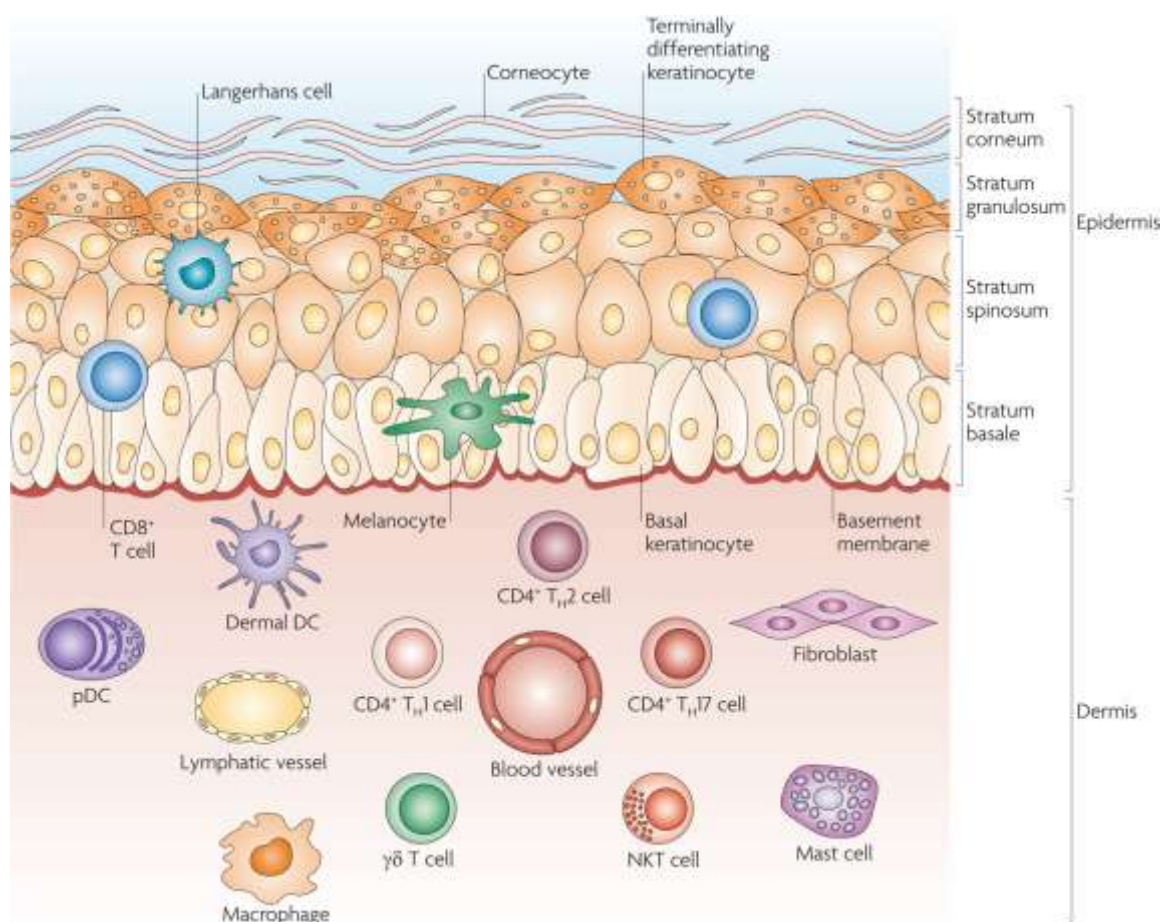


Figure 19. La peau et ses effecteurs cellulaires (Nestle *et al*, 2009).

Les kératinocytes jouent un rôle important dans la réponse immunitaire innée et participent également à la réponse adaptative (Nestlé *et al*, 2009). Ce sont les premières cellules de la peau à initier la réaction inflammatoire. Ils expriment de nombreux TLRs localisés à leur surface (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 et TLR6) et dans leurs endosomes (TLR3 et TLR9). De plus l'activation du TLR 3 permet l'expression du TLR7 qui détecte l'ARN simple brin. L'ensemble de ces TLRs permet aux kératinocytes d'activer la synthèse d'interféron de type I et de cytokines pro-inflammatoires (Nestle *et al.*, 2009). Ces cytokines permettent

notamment l'activation des cellules dendritiques et des lymphocytes T, et des facteurs de croissance pour les macrophages (M-CSF, GM-CSF) amplifiant le recrutement et l'activation des lymphocytes présents dans l'épiderme. Cette sécrétion peut être induite par de nombreuses molécules virales ou bactériennes. De plus, les kératinocytes produisent des peptides anti-microbiens qui peuvent agir directement sur les pathogènes, recruter des cellules de l'immunité et moduler la production de cytokines. En plus du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I), les kératinocytes peuvent exprimer à leur surface le CMH-II. Ils peuvent être considérés comme des cellules présentatrices d'antigènes non professionnelles. La physiopathologie du syndrome Pieds-Mains-Bouche n'est pas encore bien comprise. Les virus atteignent la peau suite à la virémie. Au niveau histologique, on observe sur les biopsies cutanées des lésions vésiculeuses, une nécrose de kératinocytes prédominant dans les couches superficielles de l'épiderme, un œdème et un infiltrat de polynucléaires neutrophiles dans l'épiderme (Figure 20). Il existe aussi un infiltrat lymphohistiocytaire périvasculaire.

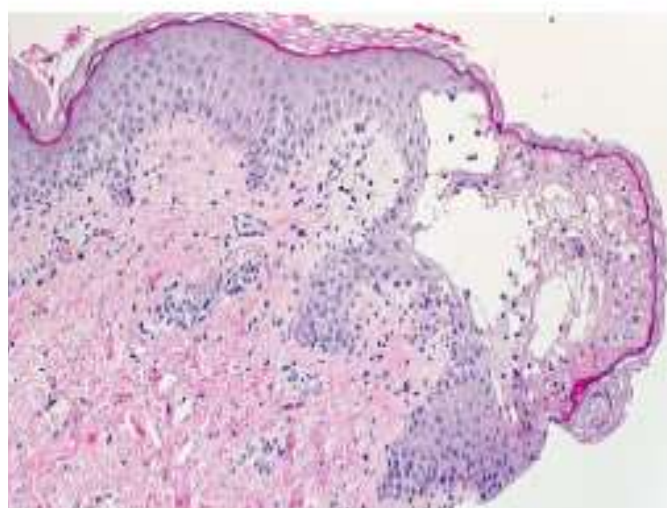


Figure 20. Coupe histologique d'une lésion de syndrome Pieds-Mains-Bouche (Muehlenbachs *et al.*, 2015)

Le tropisme des entérovirus responsables de ce syndrome pour les kératinocytes est étayé par l'histologie montrant des lésions dans l'épiderme et l'observation de particules virales de 20 à 24 nm dans le cytoplasme des cellules épithéliales par microscopie électronique (Kimura *et al.*, 1977 ; Haneke, 1985). Kimura *et al.* concluent en 1977 qu'il est possible que les lésions du syndrome Pieds-Mains-Bouche soient une manifestation de la prolifération des virus dans l'épiderme. Cependant, aucune étude n'a montré la permissivité des kératinocytes *in vitro*.

Objectifs du travail

L'objectif principal de notre travail était d'étudier la permissivité de kératinocytes primaires en culture pour l'EV71 et le CV-A16. Ce travail a d'abord consisté à mettre en place une RT-PCR entérovirus quantitative en temps réel afin de monitorer la production virale. Parallèlement à ce travail, un étudiant de M2, Antoine Sabourin, a étudié la réponse inflammatoire et immunitaire innée de ces cellules après contact avec le virus par RT-PCR quantitative. Les résultats ont montré une réponse faible qui a corroboré nos résultats infructueux des essais d'infection des kératinocytes. Notre travail s'est alors poursuivi par l'étude de l'expression de MDA5 et RIG-1 par western blot en réponse à l'infection par EV71 et CV-A16 dans des cellules permissives (HeLa) afin de caractériser la réponse à CV-A16 non explorée précédemment, ce qui a permis de mettre au point ces immunoblots dans le laboratoire.

5 Matériels et Méthodes

Plasmide

Nous avons utilisé un plasmide constitué par l'insertion de l'extrémité 5' non codante (séquence reverse-complémentaire donc synthèse de brins de polarité positive identiques au génome viral) correspondant aux nucléotides 5 à 764, soit 760 nucléotides, du CVB3 dans un vecteur pCR2.1 Topo® (Invitrogen) (Lévêque *et al.*, JCM).

Souches virales étudiées

Nous avons utilisé une souche de virus CV-A16 issue du laboratoire et une souche d'EV71 qui nous a été aimablement fournie par le CNR de Lyon.

Lignées cellulaires

Des cellules diploïdes MRC5 (fibroblastes de poumon de fœtus humain) ont été utilisées pour la production virale. Les kératinocytes ont été extraits à partir de plasties mammaires ou abdominales et préparés au LITEC après recueil du consentement éclairé des patientes et avis favorable du conseil national de bioéthique. La lignée HeLa (adénocarcinome du col de l'utérus associé à HPV18) a été utilisée pour l'étude de l'expression de RIG-1 et MDA5.

RT-PCR quantitative en temps réel

Des transcrits viraux ont été synthétisés à partir du plasmide recombinant dans le but de fabriquer une gamme de quantification (Leveque *et al.*, 2012). Dans un premier temps, le plasmide a été amplifié. Les plasmides ont été mis en contact avec les cellules compétentes (*E. coli* JM109) 30 minutes dans la glace, puis la transformation a été effectuée par choc thermique à 42°C pendant 45 secondes. La multiplication des plasmides a été obtenue en cultivant les bactéries pendant une nuit à 37°C dans un milieu de LB (Luria Bertani) supplémenté par de l'ampicilline à 50µg/ml. Les colonies ont été prélevées et placées dans des tubes contenant du milieu LB liquide en présence d'ampicilline puis incubées une nuit au bain marie à 37°C. L'extraction et la purification des plasmides ont été réalisées avec le kit Mini prep® (Qiagen). La quantité et la pureté des plasmides ont été contrôlées au spectromètre à UV à 260 et 280 nm de longueur d'onde. L'insertion de la séquence génétique du virus dans les plasmides a été vérifiée par électrophorèse en gel d'agarose 0.8% après digestion par les enzymes EcoR I et Hind III. Puis une amplification d'un clone a été réalisée (Maxiprep, Qiagen) en suivant les recommandations du fabricant. Les plasmides ont été linéarisés par l'enzyme de restriction HindIII, purifiés avec le kit Spin Handbook® (QIAGEN) et la concentration et la pureté ont été déterminées à l'aide d'un spectrophotomètre (UV visible NanoDrop®, Thermo Scientific). La transcription a été réalisée grâce au kit Mégascript T7® Ambion (Life Technologies) selon les recommandations du fabricant. L'ADN a été supprimé par adjonction de DNase. Les ARN transcrits ont été purifiés avec le kit RNeasy mini® (Qiagen) puis quantifiés au spectrophotomètre. La RT-PCR a été réalisée selon le protocole publié par Lévêque *et al.* (2012) à l'aide des réactifs One step qRT-PCR System Superscript III Platinum® (Invitrogen). A partir de ces ARN transcrits, une gamme de quantification comportant 7 points allant de 50 à 5.10^7 copies (équivalent-génomés) a été effectuée. Les mélanges réactionnels préparés pour la RT-PCR contenaient 200nM d'amorces sens (5'-CCCTGAATGCGGCTAATCC-3', positions 456 à 474 et anti-sens (5'-ATTGTCACCATAAGCAGCCA-3', positions 582 à 601) et 100nM de sonde (FAM-5'-AACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTC-3'-TAMRA, positions 539 à 566) ciblant la région 5' non codante. L'amplification a été effectuée à l'aide d'un thermocycleur en temps réel Real time PCR 7500® Fast (Applied Biosystems). Après une étape de rétro-transcription de 45 min, chaque cycle a été paramétré comme suit : 2 minutes de dénaturation à 95°C puis 15 secondes à 94°C; 1 minute d'élongation à 63°C puis 30 secondes à 68°C; 45 cycles ont été effectués pour chaque quantification.

La répétabilité et la reproductibilité de la RT-PCR ont été calculées à l'aide du logiciel Excel® (Microsoft). L'estimation de la limite de détection PCR notée *LD_{PCR}* a été calculée à partir de 6 dilutions indépendantes de 10, 100, 200, 300, 400 et 500 copies/PCR passées 10 fois chacune.

La valeur retenue, calculée selon la méthode des *probits*, correspondait à la plus petite dilution permettant d'obtenir une détection avec une probabilité de 95 %.

Culture des lignées cellulaires et production virale

Toutes les manipulations de CV-A16 et d'EV71 ont été effectuées dans le laboratoire NSB3 de virologie. Les cellules MRC5 ont été cultivées dans du milieu DMEM® (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Invitrogen) supplémenté en sérum de veau fœtal (SVF) 10% et incubées à 37°C en atmosphère enrichie à 5% de CO₂. Après obtention de 90% de confluence cellulaire, 10 équivalent-génomes/cellule ont été ajoutés. Les surnageants ont été récupérés 72h après, centrifugés à 2500 tours/min pour éliminer les débris cellulaires et la quantité d'ARN viral a été estimée par RT-PCR selon la méthode précédemment décrite. Le reste des surnageants a été conservé à -80°C.

Les kératinocytes ont été cultivés dans le milieu spécifique K-SFM (Invitrogen) supplémenté à 1% en facteurs de croissance fournis dans le kit. Les cellules ont ensuite été distribuées dans des plaques à 24 puits puis incubées à 37°C en atmosphère enrichie à 5% de CO₂. Une confluence de 80% était obtenue au bout de 4-5 jours soit environ 300 000 cellules par puits. Les cellules HeLa ont été cultivées dans du milieu DMEM supplémenté en glutamine et en SVF (10 %) à 37°C sous CO₂.

Inoculation des virus et prélèvements effectués

Les souches de CV-A16 et d'EV71 titrées à respectivement 10⁹ et 10¹² copies d'ARN viral par ml ont été inoculées aux kératinocytes afin d'obtenir des concentrations de 10 (eq/génomes) par cellule soit 3.10⁶ virus par puits. Des prélèvements de 100 µl de surnageant ont été effectués à 0h, 24h, 48h et 72h ; les culots cellulaires ont été récupérés à 72h et lavés en PBS. Les prélèvements de surnageant et des culots cellulaires étaient conservés à -80°C. Les ARN issus des prélèvements ont été extraits à l'aide du kit d'extraction manuelle QIAamp viral RNA Mini kit® (QIAGEN) puis élués dans un volume final de 70µl.

Immunofluorescence

L'immunofluorescence a été effectuée 24 h, 48 h et 72 h après l'infection des cellules cultivées sur lamelles déposées au fond des plaques à 24 puits. Le surnageant a été retiré, les lamelles ont été lavées trois fois au PBS puis fixées à l'acétone 95% à -30°C pendant 10 minutes. L'anticorps primaire dirigé contre la protéine de capsid VP1 a été ajouté et l'incubation a duré 30 min à 37°C en atmosphère humide (D3 IFA entérovirus®, Ingen). Après 3

lavages, l'anticorps secondaire dilué dans une solution de bleu Evans a été ajouté. Après une incubation de une heure à 37°C, les lamelles ont été lavées 3 fois, séchées et la lecture a été effectuée à l'aide d'un microscope à fluorescence au 1/40^{ème}. Un témoin positif a été réalisé sur les cellules HeLa, permissives aux virus.

Western blot

Les cellules HeLa ont été infectées par les virus CV-A16 ou EV71 ou mise en contact avec 10 µg/ml de poly(I :C) (HMW, InvivoGen), ou infectées puis mises en contact avec le poly(I :C). Après 24 h, les cellules ont été lysées dans un tampon composé de 10 mM de tampon Tris pH 7,5, 120 mM de NaCl, 0,3% de NP-40 10%, 0.1% de SDS 10% et de 10 µl d'inhibiteur de protéases (Roche). Les protéines extraites ont été quantifiées par méthode BCA (BCA protein assay, Pierce). Une électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes a été réalisée avec des dépôts de 30 µg de protéines (SDS-PAGE). Les protéines ont migré par application d'un courant électrique (105 V) en tampon Tris-glycine. Après migration un transfert a été réalisé sur une membrane de nitrocellulose par application d'un courant électrique (110 mA) pendant 1 h15. La membrane de nitrocellulose a été saturée par du lait écrémé à 5% dans du tampon TBS-Tween 1 % (TBS-T) pendant une heure à température ambiante sous agitation ensuite mise au contact d'anticorps spécifiques des protéines RIG-1 (Santa-Cruz Biotechnology, CS, SC-365630) ou MDA5 (Santa-Cruz biotechnology, H-300, SC-98911) toute la nuit dans du TBS-T sous agitation à 4°C. Après 3 lavages en TBS-T, des anticorps secondaires anti-lapin (RIG-1) ou anti-souris (MDA5) marqués à la peroxidase (Santa-Cruz Biotechnology) ont été rajoutés pendant 1 h à température ambiante sous agitation. La révélation a été faite par chemiluminescence à l'aide du kit ECL Plus® (Amersham GE healthcare).

6 Résultats

RT-PCR quantitative en temps réel

Pour la validation de la RT-PCR, la répétabilité a été mesurée sur 10 mesures consécutives sur 3 niveaux de charge virale (CV). Les résultats sont présentés dans le tableau 2. L'écart-type variait de 0,2 à 1,1 et le coefficient de variation de 0,58 à 4,2 % selon les niveaux de CV, les meilleurs résultats étant obtenus pour une CV de 5000 copies. La reproductibilité a été évaluée sur 3 niveaux de charge virale et sur 8 mesures. Les résultats sont présentés dans le tableau 3. L'écart-type allait de 0,56 à 0,73 et le coefficient de variation de 1,76 à 2,22 %. La force de l'association entre les moyennes des valeurs obtenues des Ct pour les différents niveaux de charge virale a été étudiée par le calcul de l'équation de la droite de régression (Figure 21). Les points de gamme à 50 et 5.10^7 copies par puits n'ont pas été intégrés compte tenu des variations observées (données non montrées). L'équation de la droite obtenue est $y = -3,2765x + 47,006$ et la valeur de $R^2 = 0,9895$. La limite de détection de la méthode (LOD), déterminée par analyse de probits, a été estimée à 1,65 log soit 45 copies par μl (Figure 22). L'intervalle de quantification linéaire est de 500 à 5 000 000 copies.

Tableau 2 : paramètres de répétabilité de la RT-PCR

paramètres	500 copies/ μl	5000 copies/ μl	5 000 000 copies/ μl
Moyenne	37.42	34.44	25.73
Ecart-type	1.03	0.20	0.61
CV %	2.74	0.58	2.22

Tableau 3: paramètres de reproductibilité de la RT-PCR

paramètres	2500 copies/ μl	50000 copies/ μl	5 000 000 copies/ μl
Moyenne	34.87	31.74	27.66
Ecart-type	0.73	0.56	1.1
CV %	2.1	1.76	4.2

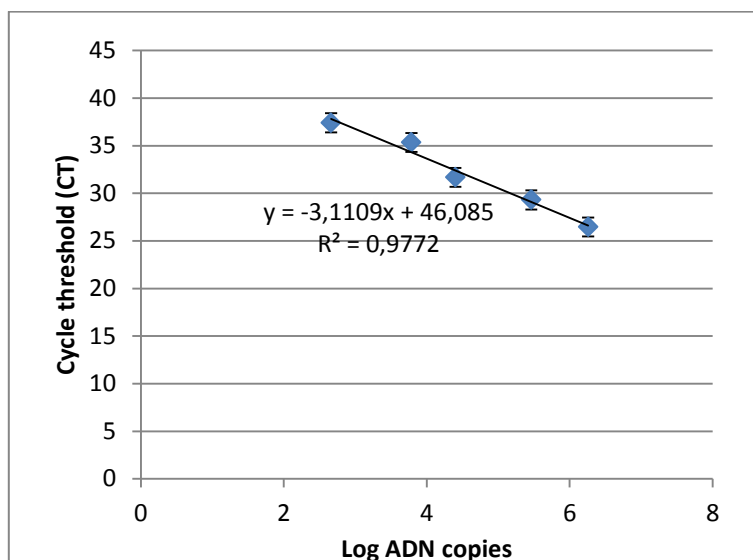


Figure 21. Droite de régression (moyenne des Ct en fonction de la charge virale)

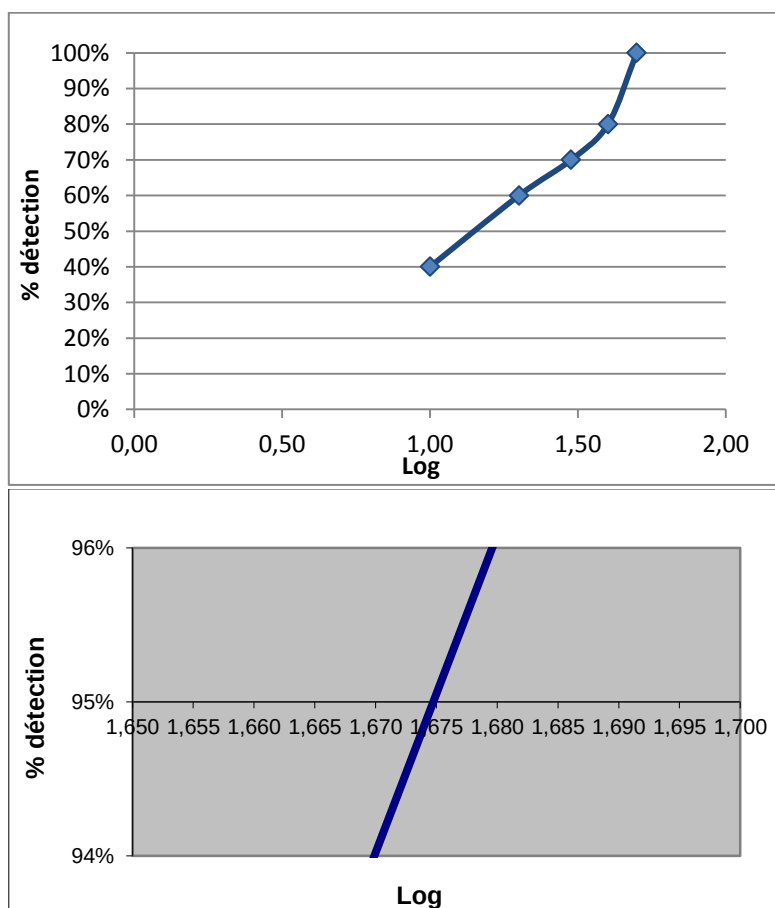
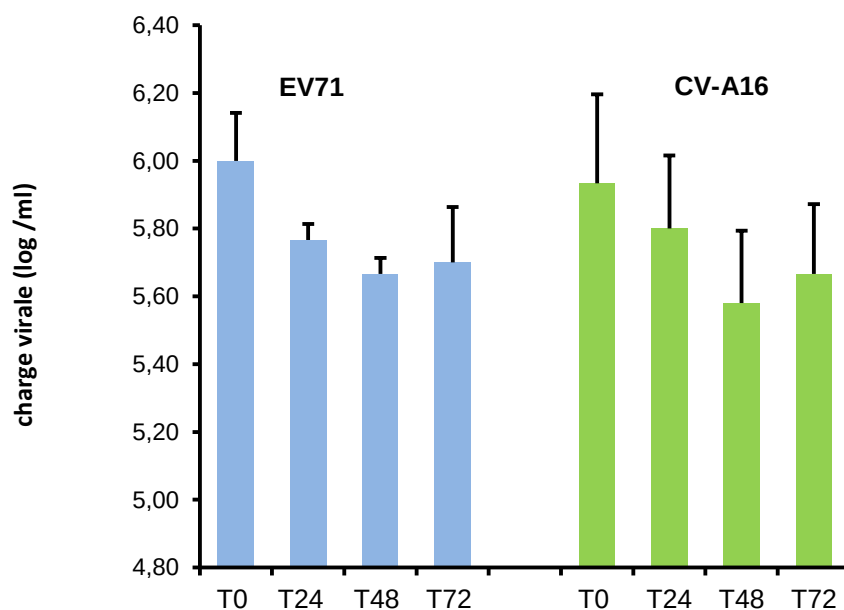


Figure 22. Estimation de la limite inférieure de détection à 95%

Concernant la culture des souches de CV-A16 et EV71 sur les kératinocytes, les prélèvements de surnageant effectués à 24h, 48h et 72h après l'inoculation n'ont pas montré d'augmentation significative de la concentration virale par rapport à T0 (Figure 23A). La recherche de l'ARN viral dans le culot cellulaire à 24h et 72h s'est avérée positive sans montrer de variation significative (Figure 23B).

A



B

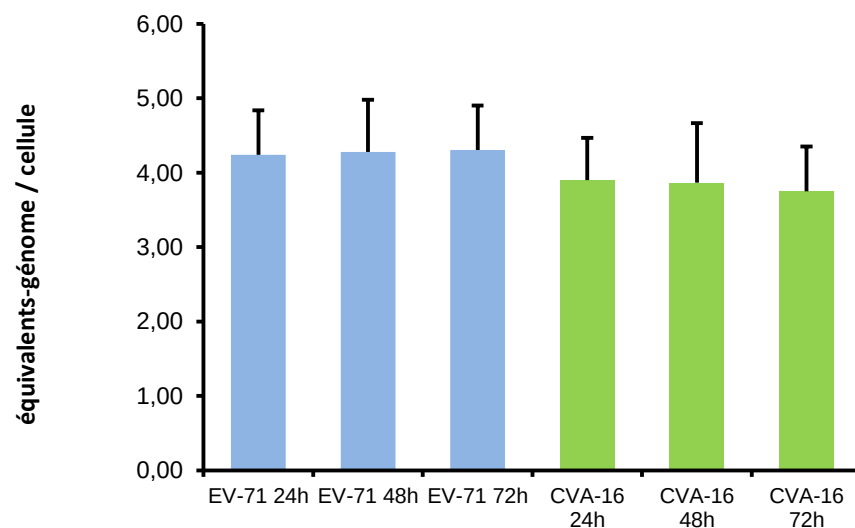


Figure 23. Quantification virale par RT-PCR (A dans le surnageant).(B dans le culot).

Détection des antigènes de capside VP1 par immunofluorescence

La recherche par immunofluorescence réalisée sur les kératinocytes n'a pas permis de mettre en évidence les antigènes VP1 de CV-A16 et EV71 jusqu'à 72h après l'infection quelle que soit la quantité de l'inoculum testée (Figure 24). Ces résultats suggèrent que dans les conditions utilisées, les kératinocytes en culture primaire ne sont pas permissifs à l'infection par EV71 ou CV-A16.

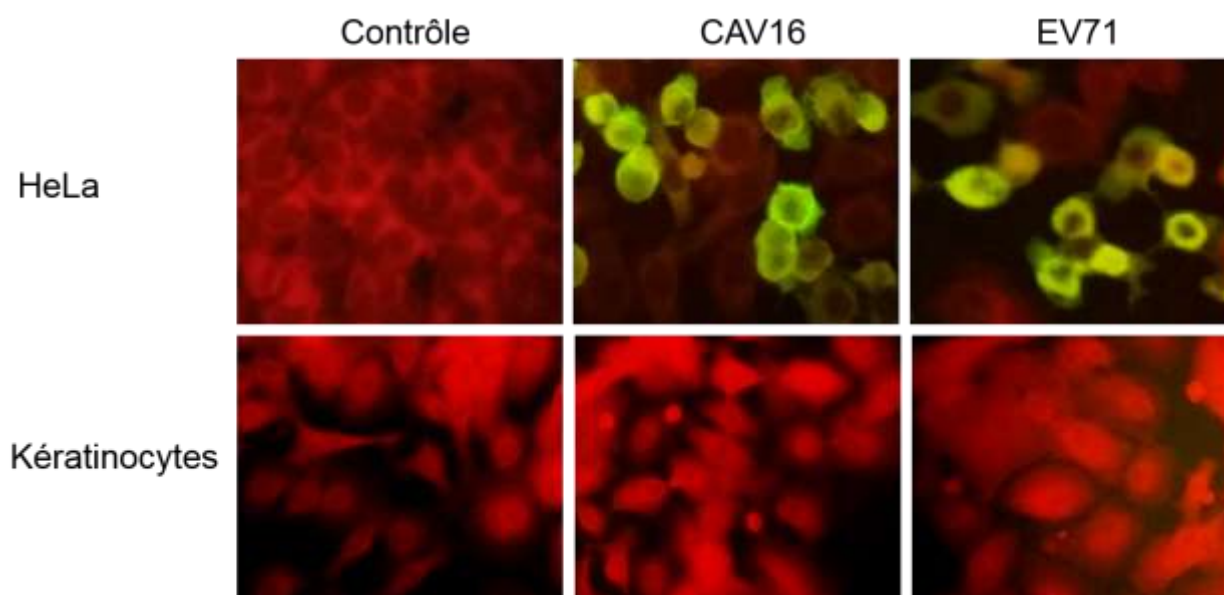


Figure 24. Détection de VP1 par immunofluorescence dans des cellules HeLa et des kératinocytes primaires infectés par CV-A16 ou EV71 72 h après infection.

Etude de l'impact de l'infection de cellules HeLa par EV71 et CV-A16 sur l'expression de RIG-1 et MDA5

La réponse interféron de type I induite par EV71 implique surtout MDA5 et également RIG-1 mais rien n'a été publié pour CV-A16. Nous avons étudié l'expression de RIG-1 et MDA5 par western blot réalisé 24 h après infection de cellules permissives (cellules HeLa) par EV71 et CV-A16. L'infection n'induit pas d'augmentation de l'expression de RIG-1 détectable par western blot contrairement au poly(I:C) qui l'augmente significativement (Figure 25). De plus, l'infection par EV71 ou CV-A16 ne modifie pas l'expression de RIG-1 induite par le poly(I:C). Concernant MDA5, la quantité de protéine native est augmentée de manière comparable dans les cellules infectées et/ou mises en contact avec le poly(I:C) par rapport au contrôle. On détecte une bande supplémentaire à environ 95 kDa en présence de EV71 et CV-A16, cette bande étant absente dans les cellules HeLa témoins et sous l'effet du poly(I:C) seul. Cette

bande est d'intensité plus importante dans les cellules infectées par EV71 que les cellules infectées par CV-A16. Cette protéine de plus bas poids moléculaire correspondrait à une forme clivée inactive de MDA5 (Kuo *et al.*, 2013 ; Feng *et al.*, 2014b).

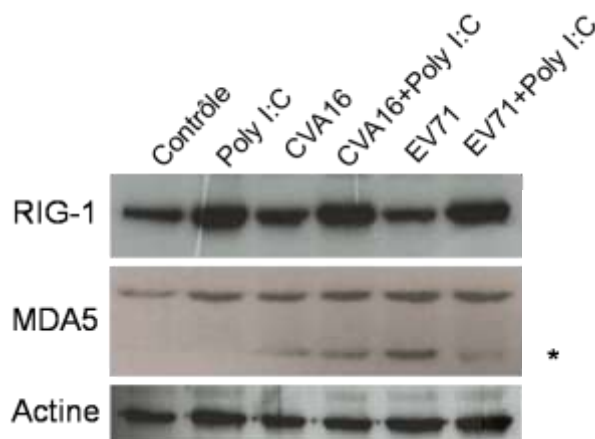


Figure 25. Expression de RIG-1 et MDA5 détectée par WB dans des cellules HeLa infectés par CV-A16 ou EV71 et/ou traitées par du poly(I:C) 24 h après infection.

Ces résultats montrent que CV-A16 est également capable d'induire un clivage de MDA5 même en présence de poly(I:C) suggérant que le virus utiliserait un mécanisme d'action commun à EV71 pour inhiber la réponse liée à MDA5.

7 Discussion

Les épidémies de syndrome pieds-mains-bouche sont un problème de santé publique dans les pays de l'Est et du Sud-Est asiatique et en devenir dans la majorité des pays du monde. Les espèces comme CV-A16 et EV71, responsables de complications graves, sont largement étudiées par la communauté scientifique. Cependant la physiopathologie de ce syndrome reste peu connue. Notre étude n'a pas permis de démontrer que les kératinocytes primaires étaient permissifs à l'infection par EV71 et CV-A16 *in vitro*. L'absence d'une augmentation significative de la quantité d'ARN viral estimée par RT-PCR dans le surnageant des cultures infectées conjuguée à l'absence de détection de VP1 par immunofluorescence dans les cellules infectées sont en faveur d'une absence de production virale. Nous avons détecté la présence du génome dans les extraits issus des culots cellulaires sans augmentation de la quantité au cours du temps. Ces résultats suggèrent que le virus est resté à la surface des cellules et n'a pas été éliminé par les lavages et/ou que le virus est entré mais ne s'est pas répliqué. Cette seconde hypothèse est renforcée par le fait que les récepteurs SCARB2 et PSGL1 sont présents à la surface des kératinocytes primaires (données du LITEC non publiées). Cependant, du fait d'une possible variabilité interindividuelle, il aurait été préférable de vérifier leur expression à la surface des cellules testées. Les kératinocytes pourraient être des cellules sensibles mais non ou faiblement permissives à l'infection comme cela a été récemment démontré pour le virus du Chikungunya (CHIKV) (Bernard *et al.*, 2015). Le CHIKV entre dans la cellule par endocytose mais ne se réplique que faiblement corroborant les résultats des analyses histologiques effectuées sur des biopsies cutanées d'animaux infectés (Bernard *et al.*, 2015 ; Couderc *et al.*, 2008). Cependant, contrairement à ce qui a été rapporté pour le CHIKV, la présence de particules virales a été observée par microscopie électronique dans le cytoplasme des kératinocytes des lésions cutané-muqueuses de patients atteints de syndrome pieds-mains-bouche (Kimura *et al.*, 1977 ; Hanecke *et al.*, 1996). Enfin, au moment de la rédaction des résultats de notre travail, une étude (Muehlenbachs *et al.*, 2015) a rapporté la détection d'antigènes viraux par immunohistochimie en utilisant des anticorps anti-VP1 dans le cytoplasme de kératinocytes localisés dans la moitié supérieure de l'épiderme (Figure 26).

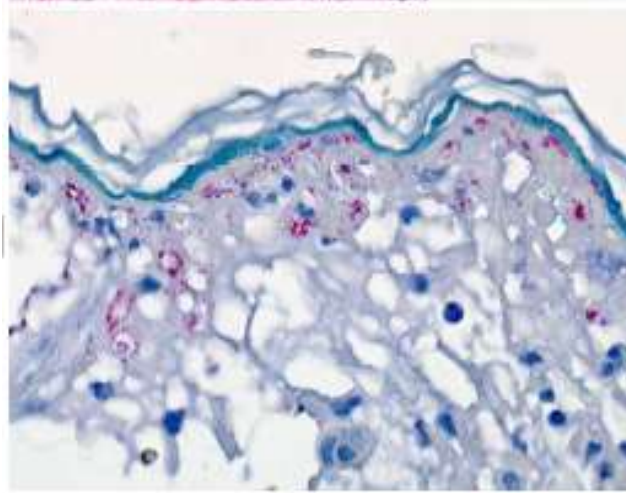


Figure 26. Détection de VP1 par immunohistochimie dans une lésion de syndrome pieds-mains-bouche (Muehlenbachs et al., 2015).

Ce résultat suggère que seuls des kératinocytes bien différenciés pourraient produire des virions. Cette donnée pourrait expliquer notre échec *in vitro*. On pourrait utiliser des facteurs de différenciation et également essayer d'infecter des kératinocytes en cultures organotypiques qui permettent d'obtenir des pseudo-épithéliums dont les cellules présentent différents stades de différenciation. Cette dépendance vis-à-vis de la différenciation est bien connue pour les papillomavirus qui ne peuvent pas se multiplier dans les kératinocytes primaires en culture car la production des virus est étroitement liée à la différenciation séquentielle des cellules, les protéines de capsid ne pouvant être synthétisées que dans les couches superficielles. Les entérovirus pénètrent dans la cellule cible par endocytose. Par ailleurs il est possible que les conditions d'expérimentation, notamment l'utilisation de surnageant de cellules MRC5 infectées non filtré, aient modifié le processus d'endocytose, les voies de signalisation, le trafic intracellulaire nucléo-cytoplasmique des kératinocytes et que par conséquent l'entrée voire la réplication virale n'aient pu se produire. De plus il est envisageable que la permissivité des kératinocytes soit hôte-dépendant. Toutes les personnes infectées par EV71 ou CV-A16 ne présentent pas de lésions cutanées. Antoine Sabourin, un étudiant en M2 qui a étudié en parallèle la réponse immunitaire innée et inflammatoire des kératinocytes à l'infection par CV-A16 et EV71, a montré une variabilité interindividuelle de la réponse. Nous avons fait des essais sur des kératinocytes provenant d'au moins trois patients différents mais idéalement, il faudrait disposer de kératinocytes de patients ayant eu un syndrome pieds-main-bouche. Le tropisme cellulaire pourrait aussi varier selon les souches virales. Nous n'avons testé qu'une souche de chaque virus. Enfin, nous avons fait des essais d'infection sans titrer la suspension virale mais en se basant sur la quantité d'ARN viral provenant du surnageant de culture des cellules MRC5 infectées. Il est possible que les quantités utilisées pour l'infection soient en définitive

insuffisantes pour ces cellules, la quantité d'ARN viral surestimant la quantité de particules virales infectieuses.

La capacité des kératinocytes à répondre à l'infection virale par la reconnaissance des ARN viraux par les RLR et le niveau d'efficacité des mécanismes mis en place par les virus pour y échapper pourraient contribuer à la pathogenèse du syndrome pieds-mains-bouche. L'importance de MDA5 dans la reconnaissance des *Picornaviridae* a été bien établie alors que la plupart des études rapportent que RIG-1 ne participerait pas ou peu à la reconnaissance de ces virus (Kato *et al.* 2006 ; Feng *et al.*, 2012). Antoine Sabourin a détecté par RT-PCR une augmentation modérée de l'expression de MDA5 dans les kératinocytes infectés par CV-A16 et de RIG-1 dans les cellules infectées par EV71. Nous n'avons pas mis en évidence d'augmentation de cette expression par western blot dans les kératinocytes infectés par EV71 ou CV-A16 (données non montrées). MDA5 reconnaît l'ARN de EV71 mais EV71 est capable d'induire une dégradation de MDA5 donnant une forme de clivage détectable par western blot (Kuo *et al.*, 2013 ; Feng *et al.*, 2014b). Cette dégradation est médiée par la protéase 2A (Feng *et al.*, 2014b). Nos résultats suggèrent que CV-A16 exerce la même action sur MDA5. MDA5 est également clivée par le poliovirus et CV-B3 (Kuo *et al.*, 2013 ; Feng *et al.*, 2014). Ces virus ont donc développé des stratégies communes pour échapper à la réponse immunitaire innée. Dans les cellules HeLa infectées, nos résultats n'ont pas montré d'augmentation de l'expression de RIG-1 par l'infection par CV-A16 ou EV71 contrairement au poly(I:C) ni de forme clivée, retrouvée antérieurement par Feng *et al.* (2014b) après infection de cellules HeLa R19. Il est possible que l'anticorps que nous avons utilisé ne reconnaisse pas le fragment clivé. D'autres essais avec un autre anticorps pourront être envisagés.

8 Conclusion

Notre travail n'a pas permis de démontrer que les kératinocytes primaires sont un site de réplication virale. Cette étude montre néanmoins des résultats encourageants, il serait intéressant de poursuivre l'exploration du tropisme de CV-A16 et EV71 pour les kératinocytes primaires en utilisant un panel de concentrations virales plus vaste afin de cibler plus précisément la concentration virale optimale et en utilisant des kératinocytes différenciés voire de l'épithélium reconstitué. De plus la transfection d'ARN génomiques viraux permettrait de déterminer si l'absence de permissivité est due à un défaut d'entrée ou un défaut de réplication. Les mécanismes d'endocytose des cellules cultivées pouvant être perturbés *in vitro*, il serait également pertinent de neutraliser au maximum des facteurs susceptible de d'inhiber l'internalisation des virus dans les kératinocytes et de modifier la réponse immunitaire et inflammatoire. L'atteinte des kératinocytes pourrait être médiée par les cellules dendritiques. Il est possible que les cellules dendritiques de la peau soient infectées lors de la virémie et constituent la première étape de l'infection cutanée. Les entérovirus sont capables de déjouer les défenses immunitaires de la cellule hôte, notamment MDA5. Si EV71 est largement étudié par les chercheurs, CVA-16 ne suscite pas autant d'intérêt. Nous avons montré que CV-A16, comme EV71 et d'autres entérovirus, était capable de dégrader MDA5 confirmant la conservation de mécanismes communs d'échappement à la réponse immunitaire innée développés par cette famille de virus. D'autres voies restent à explorer comme la voie liée à TLR3 ou le rôle des peptides antimicrobiens dont l'expression a été détectée à la suite de l'infection virale des kératinocytes par Antoine Sabourin, comme la bêta-défensine 2 ou la psoriasine (S100A7). Les quinze dernières années ont vu l'émergence de l'entérovirus 71 qui est devenu la première cause de syndrome pieds-mains-bouche et d'encéphalite virale en Asie et dans le Pacifique, suivies par le CV-A16. Une meilleure connaissance de la physiopathologie de l'infection est essentielle pour développer des agents antiviraux efficaces.

9 Bibliographie

- Abe, Y., Fujii, K., Nagata, N., Takeuchi, O., Akira, S., Oshiumi, H., Matsumoto, M., Seya, T., and Koike, S. (2012). The Toll-Like Receptor 3-Mediated Antiviral Response Is Important for Protection against Poliovirus Infection in Poliovirus Receptor Transgenic Mice. *J. Virol.* **86**, 185–194.
- Andréoletti, L., Lévêque, N., Boulagnon, C., Brasselet, C., and Fornes, P. (2009). Viral causes of human myocarditis. *Arch. Cardiovasc. Dis.* **102**, 559–568.
- Barral, P.M., Morrison, J.M., Drahoš, J., Gupta, P., Sarkar, D., Fisher, P.B., and Racaniello, V.R. (2007). MDA-5 is cleaved in poliovirus-infected cells. *J. Virol.* **81**, 3677–3684.
- Barral, P.M., Sarkar, D., Fisher, P.B., and Racaniello, V.R. (2009). RIG-I is cleaved during picornavirus infection. *Virology* **391**, 171–176.
- Bendig, J.W., and Fleming, D.M. (1996). Epidemiological, virological, and clinical features of an epidemic of hand, foot, and mouth disease in England and Wales. *Commun. Dis. Rep. CDR Rev.* **6**, R81–R86.
- Bernard, E., Hamel, R., Neyret, A., Ekcharyawat, P., Molès, J.-P., Simmons, G., Chazal, N., Desprès, P., Missé, D., and Briant, L. (2015). Human keratinocytes restrict chikungunya virus replication at a post-fusion step. *Virology* **476**, 1–10.
- Bouttier, M., Goncalves, C., Journo, C., Letienne, J., Piña, M., and Vitour, D. (2008). Virus et interféron: mécanismes d'induction et stratégies d'échappement. *Virologie* **12**, 159–173.
- Bruns, A.M., and Horvath, C.M. (2014a). Antiviral RNA recognition and assembly by RLR family innate immune sensors. *Cytokine Growth Factor Rev.* **25**, 507–512.
- Bruns, A.M., and Horvath, C.M. (2014b). Antiviral RNA recognition and assembly by RLR family innate immune sensors. *Cytokine Growth Factor Rev.* **25**, 507–512.
- Cornell, C.T., Kiosses, W.B., Harkins, S., and Whitton, J.L. (2006). Inhibition of Protein Trafficking by Coxsackievirus B3: Multiple Viral Proteins Target a Single Organelle. *J. Virol.* **80**, 6637–6647.
- DeBenedictis, C., Joubert, S., Zhang, G., Barria, M., and Ghohestani, R.F. (2001). Immune functions of the skin. *Clin. Dermatol.* **19**, 573–585.
- Du, N., Cong, H., Tian, H., Zhang, H., Zhang, W., Song, L., and Tien, P. (2014). Cell surface vimentin is an attachment receptor for enterovirus 71. *J. Virol.* **88**, 5816–5833.
- Dunn, J.J., Romero, J.R., Wasserman, R., and Rotbart, H.A. (2000). Stable enterovirus 5' nontranslated region over a 7-year period in a patient with agammaglobulinemia and chronic infection. *J. Infect. Dis.* **182**, 298–301.
- Feng, Q., Langereis, M.A., and van Kuppeveld, F.J.M. (2014). Induction and suppression of innate antiviral responses by picornaviruses. *Cytokine Growth Factor Rev.* **25**, 577–585.
- Fernández-Miragall, O., López de Quinto, S., and Martínez-Salas, E. (2009). Relevance of RNA structure for the activity of picornavirus IRES elements. *Virus Res.* **139**, 172–182.
- Häcker, H., Tseng, P.-H., and Karin, M. (2011). Expanding TRAF function: TRAF3 as a tri-faced immune regulator. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 457–468.
- Haneke, E. (1985). Electron microscopic demonstration of virus particles in hand, foot and mouth disease. *Dermatologica* **171**, 321–326.
- Harris, K.G., and Coyne, C.B. (2013). Enter at your own risk: How enteroviruses navigate the dangerous world of pattern recognition receptor signaling. *Cytokine* **63**, 230–236.
- He, Y., Ong, K.C., Gao, Z., Zhao, X., Anderson, V.M., McNutt, M.A., Wong, K.T., and Lu, M. (2014). Tonsillar crypt epithelium is an important extra-central nervous system site for viral replication in EV71 encephalomyelitis. *Am. J. Pathol.* **184**, 714–720.
- Henke, A., Jarasch, N., and Wutzler, P. (2008). Coxsackievirus B3 vaccines: use as an expression vector for prevention of myocarditis. *Expert Rev. Vaccines* **7**, 1557–1567.
- Huang, P.-N., and Shih, S.-R. (2014). Update on enterovirus 71 infection. *Curr. Opin. Virol.* **5**, 98–104.

- Huang, X., Wei, H., Wu, S., Du, Y., Liu, L., Su, J., Xu, Y., Wang, H., Li, X., Wang, Y., et al. (2015). Epidemiological and Etiological Characteristics of Hand, Foot, and Mouth Disease in Henan, China, 2008–2013. *Sci. Rep.* 5, 8904.
- Jiang, P., Liu, Y., Ma, H.-C., Paul, A.V., and Wimmer, E. (2014). Picornavirus morphogenesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* MMBR 78, 418–437.
- Kaminska, K., Martinetti, G., Lucchini, R., Kaya, G., and Mainetti, C. (2013). Coxsackievirus A6 and Hand, Foot and Mouth Disease: Three Case Reports of Familial Child-to-Immunocompetent Adult Transmission and a Literature Review. *Case Rep. Dermatol.* 5, 203–209.
- Kimura, A., Abe, M., and Nakao, T. (1977). Light and Electron Microscopic Study of Skin Lesions of Patients with the Hand, Foot and Mouth Disease. *Tohoku J. Exp. Med.* 122, 237–247.
- Lei, X., Liu, X., Ma, Y., Sun, Z., Yang, Y., Jin, Q., He, B., and Wang, J. (2010). The 3C Protein of Enterovirus 71 Inhibits Retinoid Acid-Inducible Gene I-Mediated Interferon Regulatory Factor 3 Activation and Type I Interferon Responses. *J. Virol.* 84, 8051–8061.
- Leveque, N., Jacques, J., Renois, F., Mely, S., and Andreoletti, L. (2008). Enteroviruses receptors and cell entry. *VIROLOGIE* 12, 175–185.
- Leveque, N., Renois, F., Talmud, D., Nguyen, Y., Lesaffre, F., Boulagnon, C., Bruneval, P., Fornes, P., and Andreoletti, L. (2012). Quantitative Genomic and Antigenomic Enterovirus RNA Detection in Explanted Heart Tissue Samples from Patients with End-Stage Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. *J. Clin. Microbiol.* 50, 3378–3380.
- Lin, J.-Y., and Shih, S.-R. (2014). Cell and tissue tropism of enterovirus 71 and other enteroviruses infections. *J. Biomed. Sci.* 21, 18.
- Liu, C.-C., Chow, Y.-H., Chong, P., and Klein, M. (2014). Prospect and challenges for the development of multivalent vaccines against hand, foot and mouth diseases. *Vaccine* 32, 6177–6182.
- Mao, Q., Wang, Y., Yao, X., Bian, L., Wu, X., Xu, M., and Liang, Z. (2014a). Coxsackievirus A16: epidemiology, diagnosis, and vaccine. *Hum. Vaccines Immunother.* 10, 360–367.
- Mao, Q., Wang, Y., Yao, X., Bian, L., Wu, X., Xu, M., and Liang, Z. (2014b). Coxsackievirus A16: Epidemiology, diagnosis, and vaccine. *Hum. Vaccines Immunother.* 10, 360–367.
- McMinn, P., Lindsay, K., Perera, D., Chan, H.M., Chan, K.P., and Cardosa, M.J. (2001). Phylogenetic analysis of enterovirus 71 strains isolated during linked epidemics in Malaysia, Singapore, and Western Australia. *J. Virol.* 75, 7732–7738.
- Muehlenbachs, A., Bhatnagar, J., and Zaki, S.R. (2015). Tissue tropism, pathology and pathogenesis of enterovirus infection: Tissue tropism, pathology and pathogenesis of enterovirus infection. *J. Pathol.* 235, 217–228.
- Nestle, F.O., Di Meglio, P., Qin, J.-Z., and Nickoloff, B.J. (2009). Skin immune sentinels in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.*
- O'Neill, L.A. (2006). How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know. *Curr. Opin. Immunol.* 18, 3–9.
- Ooi, M.H., Wong, S.C., Podin, Y., Akin, W., del Sel, S., Mohan, A., Chieng, C.H., Perera, D., Clear, D., Wong, D., et al. (2007). Human enterovirus 71 disease in Sarawak, Malaysia: a prospective clinical, virological, and molecular epidemiological study. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 44, 646–656.
- Rebsamen, M., Meylan, E., Curran, J., and Tschopp, J. (2008). The antiviral adaptor proteins Cardif and Trif are processed and inactivated by caspases. *Cell Death Differ.* 15, 1804–1811.
- Rotbart, H.A., and Hayden, F.G. (2000). Picornavirus infections: a primer for the practitioner. *Arch. Fam. Med.* 9, 913–920.
- van der Sanden, S., Koopmans, M., Uslu, G., van der Avoort, H., and Dutch Working Group for Clinical Virology (2009). Epidemiology of enterovirus 71 in the Netherlands, 1963 to 2008. *J. Clin. Microbiol.* 47, 2826–2833.
- Schmidt, N.J., Lennette, E.H., and Ho, H.H. (1974). An apparently new enterovirus isolated from patients with disease of the central nervous system. *J. Infect. Dis.* 129, 304–309.
- Schuffenecker, I., Mirand, A., Antona, D., Henquell, C., Chomel, J.-J., Archimbaud, C., Billaud, G., Peigue-Lafeuille, H., Lina, B., and Bailly, J.-L. (2011). Epidemiology of human enterovirus 71 infections in France, 2000–2009. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 50, 50–56.
- Shen, M., Reitman, Z.J., Zhao, Y., Moustafa, I., Wang, Q., Arnold, J.J., Pathak, H.B., and Cameron, C.E. (2008). Picornavirus genome replication. Identification of the surface of the poliovirus (PV) 3C dimer that interacts with PV 3Dpol during VPg uridylylation and construction of a structural model for the PV 3C2-3Dpol complex. *J. Biol. Chem.* 283, 875–888.

- Solomon, T., Lewthwaite, P., Perera, D., Cardoso, M.J., McMinn, P., and Ooi, M.H. (2010a). Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of enterovirus 71. *Lancet Infect. Dis.* *10*, 778–790.
- Solomon, T., Lewthwaite, P., Perera, D., Cardoso, M.J., McMinn, P., and Ooi, M.H. (2010b). Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of enterovirus 71. *Lancet Infect. Dis.* *10*, 778–790.
- Triantafilou, K., Vakakis, E., Kar, S., Richer, E., Evans, G.L., and Triantafilou, M. (2012). Visualisation of direct interaction of MDA5 and the dsRNA replicative intermediate form of positive strand RNA viruses. *J. Cell Sci.* *125*, 4761–4769.
- Wu, B., and Hur, S. (2015). How RIG-I like receptors activate MAVS. *Curr. Opin. Virol.* *12*, 91–98.
- Yamayoshi, S., Fujii, K., and Koike, S. (2014). Receptors for enterovirus 71. *Emerg. Microbes Infect.* *3*, e53.
- Yang, J., Yang, C., Guo, N., Zhu, K., Kaiming, L., Zhang, N., Zhao, H., Cui, Y., Chen, L., Wang, H., et al. (2015). Type I interferons triggered through the TLR3-TRIF pathway control Coxsackievirus A16 infection in young mice. *J. Virol.* *JVI.01627–15*.
- Yip, C.C.Y., Lau, S.K.P., Woo, P.C.Y., and Yuen, K.-Y. (2013). Human enterovirus 71 epidemics: what's next? *Emerg. Health Threats J.* *6*, 19780.
- Zoll, J., Heus, H.A., van Kuppeveld, F.J.M., and Melchers, W.J.G. (2009). The structure-function relationship of the enterovirus 3'-UTR. *Virus Res.* *139*, 209–216.

Résumé

Le Coxsackievirus A-16 et l'Entérovirus 71 sont des entérovirus appartenant à la famille des *Picornaviridae*. Ils sont responsables de larges épidémies de syndrome pieds-mains-bouche dans de nombreux pays et particulièrement en Asie et commencent à émerger en Europe. Cette maladie, qui atteint principalement le jeune enfant, est bénigne dans la majorité des cas mais peut se compliquer d'atteintes neurologiques sévères à type d'encéphalite ou de paralysie flasque et de complications cardiopulmonaires. Bien que la présence de ces entérovirus dans les lésions cutanées soit connue depuis longtemps, l'identité des cellules cibles cutanées reste incertaine. Nous avons étudié le tropisme des virus pour les kératinocytes primaires en recherchant d'une part une production de CV-A16 et EV71 dans le surnageant des cellules infectées et dans le culot des cultures de kératinocytes primaires en utilisant une RT-PCR ciblant la région 5' non codante du génome viral et une technique d'immunofluorescence pour détecter les antigènes de capsid VP1. Par ailleurs nous avons étudié l'expression des senseurs cytoplasmiques MDA5 et RIG-1, impliqués dans la reconnaissance des ARN viraux et l'induction de la réponse immunitaire innée, par western-blot en infectant des cellules permissives Hela avec CV-A16 et EV71. Nos résultats n'ont pas montré d'augmentation de la charge virale dans le surnageant et le culot des cultures de kératinocytes primaires et la détection des protéines de capsid par immunofluorescence s'est avérée négative. L'expression de MDA5 et RIG-1 n'a pas été modifiée suite à l'infection virale, cependant nous avons mis en évidence une dégradation de MDA5 par CV-A16 comme cela l'avait été montré pour EV71 et d'autres entérovirus, suggérant un mécanisme commun d'échappement à la réponse immunitaire innée.

En conclusion, dans les conditions expérimentales utilisées, les kératinocytes primaires ne se sont pas avérés permissifs à l'infection. Cependant, la permissivité des kératinocytes pourrait dépendre de leur différenciation et de facteurs hôte-dépendants. Il serait par conséquent intéressant de poursuivre l'exploration du tropisme de CV-A16 et EV71 en utilisant des kératinocytes différenciés voire des épithéliums reconstitués. Enfin, la transfection d'ARN génomiques viraux permettrait de différencier un défaut d'entrée d'un défaut de réplication. Dans ce dernier cas, la caractérisation de facteurs cellulaires inhibant la réplication serait essentielle afin d'envisager de nouvelles stratégies antivirales.

Mots-clés :

Entérovirus – syndrome pieds-mains-bouche – EV71 – CV-A16 – kératinocytes – tropisme – RT-PCR – réponse immunitaire innée – RIG-1 – MDA5

SERMENT



En présence des Maîtres de cette école, de mes chers condisciples et devant l'effigie d'Hippocrate, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine. Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail. Admis dans l'intérieur des maisons mes yeux ne verront pas ce qu'il s'y passe ; ma langue taira les secrets qui me seront confiés, et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime. Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses !
Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque !



