

UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

ANNEE : 2018

THESES 2018 TOU3 2064

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement
par

PIERNE Karen

**CRITERES DE PRESCRIPTION ET INTERET MEDICO-ECONOMIQUE DE
LA DETECTION MOLECULAIRE RAPIDE DES ENTEROVIRUS DANS LE
LCR**

Etude rétrospective menée sur l'année 2016 auprès des enfants admis aux urgences
pédiatriques du Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse

Le 24 octobre 2018

Directeurs de thèse : Docteurs MANSUY Jean-Michel & MENGELLE Catherine

JURY

Président : PASQUIER Christophe
1^{er} assesseur : CLAUDET Isabelle
2^{ème} assesseur : GROUTEAU Erick
3^{ème} assesseur : MANSUY Jean-Michel
4^{ème} assesseur : MENGELLE Catherine

UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

ANNEE : 2018

THESES 2018 TOU3 2064

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement
par

PIERNE Karen

**CRITERES DE PRESCRIPTION ET INTERET MEDICO-ECONOMIQUE DE
LA DETECTION MOLECULAIRE RAPIDE DES ENTEROVIRUS DANS LE
LCR**

Etude rétrospective menée sur l'année 2016 auprès des enfants admis aux urgences
pédiatriques du Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse

Le 24 octobre 2018

Directeurs de thèse : Docteurs MANSUY Jean-Michel & MENGELLE Catherine

JURY

Président : PASQUIER Christophe
1^{er} assesseur : CLAUDET Isabelle
2^{ème} assesseur : GROUTEAU Erick
3^{ème} assesseur : MANSUY Jean-Michel
4^{ème} assesseur : MENGELLE Catherine

PERSONNEL ENSEIGNANT
de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de l'Université Paul Sabatier
au 08 janvier 2018

Professeurs Emérites

M. BENOIST H.	Immunologie
M. BERNADOU J.	Chimie Thérapeutique
M. CAMPISTRON G.	Physiologie
M. CHAVANT L.	Mycologie
M. MOULIS C.	Pharmacognosie
M. ROUGE P.	Biologie Cellulaire
M. SIE P.	Hématologie

Professeurs des Universités

Hospitalo-Universitaires

Mme AYYOUB M.	Immunologie
M. CHATELUT E.	Pharmacologie
M. FAVRE G.	Biochimie
Mme GANDIA P.	Pharmacologie
M. PARINI A.	Physiologie
M. PASQUIER C. (Doyen)	Bactériologie - Virologie
Mme ROQUES C.	Bactériologie - Virologie
Mme ROUSSIN A.	Pharmacologie
Mme SALLERIN B.	Pharmacie Clinique
M. VALENTIN A.	Parasitologie

Universitaires

Mme BARRE A.	Biologie
Mme BAZIARD G.	Chimie pharmaceutique
Mme BENDERBOUS S.	Mathématiques – Biostat
Mme BERNARDES-GÉNISSON V.	Chimie thérapeutique
Mme COUDERC B.	Biochimie
M. CUSSAC D. (Vice-Doyen)	Physiologie
Mme SIXOU S.	Biochimie
M. FABRE N.	Pharmacognosie
M. GAIRIN J-E.	Pharmacologie
Mme GIROD-FULLANA S.	Pharmacie Galénique
Mme MULLER-STAU MONT C.	Toxicologie - Séméiologie
Mme NEPVEU F.	Chimie analytique
M. SALLES B.	Toxicologie
M. SEGUI B.	Biologie Cellulaire
M. SOUCHARD J-P.	Chimie analytique
Mme TABOULET F.	Droit Pharmaceutique
M. VERHAEGHE P.	Chimie Thérapeutique

Maîtres de Conférences des Universités

Hospitalo-Universitaires

M. CESTAC P.	Pharmacie Clinique
Mme DE MAS MANSAT V. (*)	Hématologie
Mme JUILLARD-CONDAT B.	Droit Pharmaceutique
M. PUISSET F.	Pharmacie Clinique
Mme ROUZAUD-LABORDE C.	Pharmacie Clinique
Mme SERONIE-VIVIEN S.	Biochimie
Mme THOMAS F. (*)	Pharmacologie

Universitaires

Mme ARELLANO C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme AUTHIER H.	Parasitologie
M. BERGE M. (*)	Bactériologie - Virologie
Mme BON C.	Biophysique
M. BOUJILA J. (*)	Chimie analytique
Mme BOUTET E. (*)	Toxicologie - Sémiologie
M. BROUILLET F.	Pharmacie Galénique
Mme CABOU C.	Physiologie
Mme CAZALBOU S. (*)	Pharmacie Galénique
Mme CHAPUY-REGAUD S.	Bactériologie - Virologie
Mme COLACIOS-VIATGE C.	Immunologie
Mme COSTE A. (*)	Parasitologie
M. DELCOURT N.	Biochimie
Mme DERAËVE C.	Chimie Thérapeutique
Mme ECHINARD-DOUIN V.	Physiologie
Mme EL GARAH F.	Chimie Pharmaceutique
Mme EL HAGE S.	Chimie Pharmaceutique
Mme FALLONE F.	Toxicologie
Mme FERNANDEZ-VIDAL A.	Toxicologie
Mme HALOVA-LAJOIE B.	Chimie Pharmaceutique
Mme JOUANJUS E.	Pharmacologie
Mme LAJOIE-MAZENC I.	Biochimie
Mme LEFEVRE L.	Physiologie
Mme LE LAMER A-C.	Pharmacognosie
M. LEMARIE A.	Biochimie
M. MARTI G.	Pharmacognosie
Mme MIREY G. (*)	Toxicologie
Mme MONFERRAN S.	Biochimie
M. OLICHON A.	Biochimie
Mme REYBIER-VUATTOUX K. (*)	Chimie Analytique
M. SAINTE-MARIE Y.	Physiologie
M. STIGLIANI J-L.	Chimie Pharmaceutique
M. SUDOR J. (*)	Chimie Analytique
Mme TERRISSE A-D.	Hématologie
Mme TOURRETTE-DIALO A.	Pharmacie Galénique
Mme VANSTEELANDT M.	Pharmacognosie
Mme WHITE-KONING M. (*)	Mathématiques

(*) Titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

Enseignants non titulaires

Assistants Hospitalo-Universitaires

Mme COOL C.	Physiologie
M. MOUMENI A.	Biochimie
M. METSU D.	Pharmacologie
Mme PALUDETTO M.N.	Chimie thérapeutique
M. PAGES A.	Pharmacie Clinique
M. PERES M.	Immunologie
Mme SALABERT A.S	Biophysique

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Christophe PASQUIER,

Je vous remercie d'avoir accepté de présider ce jury et de l'intérêt que vous avez bien voulu porter à mon travail.

Merci pour vos enseignements, depuis la première année de pharmacie jusqu'à ce jour. C'est pour moi un honneur de terminer mes études sous votre direction.

Veillez trouver ici l'expression de toute ma reconnaissance et de mon profond respect.

A Madame le Professeur Isabelle CLAUDET,

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de siéger au sein de ce jury et de juger mon travail.

Merci pour votre enthousiasme à ce projet et de nous faire bénéficier de votre expertise clinique sur le sujet.

Je vous prie d'accepter l'expression de toute ma considération et de ma plus profonde estime.

A Monsieur le Docteur Erick GROUTEAU,

Merci d'avoir pris le temps de répondre à mes questions et pour vos conseils avisés tout au long de ce travail. J'espère qu'il sera à la hauteur de votre exigence.

Veillez trouver ici le témoignage de ma plus sincère gratitude.

A Monsieur le Docteur Jean-Michel MANSUY,

Un grand merci d'avoir accepté de diriger cette thèse. Je vous remercie sincèrement pour vos précieux conseils, vos encouragements, votre implication et votre disponibilité tout au long de ce travail. Merci également pour votre bonne humeur et votre partage de connaissances au cours de ces quatre années d'internat.

A Madame le Docteur Catherine MENGELLE,

Je vous remercie chaleureusement pour la confiance que vous m'avez accordée en me proposant ce travail. Merci pour votre soutien, votre motivation, votre disponibilité, et vos relectures jusqu'à la dernière minute.

Un immense merci à **Muriel**, sans toi tout aurait été tellement plus compliqué ! Merci infiniment pour ton aide, ta disponibilité et ta bonne humeur tout au long de cet internat. Veille bien sur Pepper !

A **Chloé Dimeglio**, ça a été un plaisir de travailler avec toi. Un grand merci pour m'avoir éclairé sur l'univers obscur des statistiques, pour ta gentillesse et ta patience devant mes nombreuses interrogations.

A mes **Parents**, que je ne remercierai jamais assez. C'est grâce à vous si je suis là aujourd'hui, merci pour votre amour, votre générosité et vos conseils. Vous avez été d'un soutien sans faille en toutes circonstances et je vous en remercie. Une page se tourne aujourd'hui et vous allez enfin avoir un peu de répit, promis les examens c'est fini !

A mon frère, **Kévin**. Tu as toujours été un modèle pour moi. Merci pour tous les bons moments passés et à venir. Je te souhaite beaucoup de bonheur avec **Solenne** dans cette nouvelle année qui t'attend.

A **Papi et Mamie, Tonton et Myriam**, malgré la distance qui nous sépare, je pense bien à vous et j'espère vous retrouver bientôt.

A ma belle-famille **Corinne, mamie Eliette et papi Lucien**. Merci de m'avoir accueillie parmi vous. Votre bienveillance et votre soutien me font chaud au cœur, et c'est toujours un plaisir de se retrouver sous le chant des cigales.

A **Frédérique**, parce que depuis tout ce temps rien n'a changé. Je te souhaite beaucoup de bonheur dans le pays des Caribous.

A la **Pharma family** : Claire, Cyrielle, Inès, Laurie & Laurie, Mailys, Marina, Morgane, Yoan, voilà bientôt dix ans que l'on s'est rencontré et malgré des départs aux quatre coins de la France nous voilà toujours aussi soudés. Merci à vous d'être là dans les moments heureux et les plus difficiles. Vos retours dans la ville rose promettent de belles soirées à venir.

Marlou, je me rappelle encore du premier jour à Esquirol, il s'en est passé des choses depuis !
Merci pour cette amitié indestructible, on a encore tout un planning de choses à faire alors
vivement les prochaines vacances !

Je tiens également à remercier toutes les personnes que j'ai pu rencontrer au cours de ces
quatre dernières années et qui ont contribué à rendre cet internat inoubliable :

Agnès, Ali (merci pour ta bonne humeur au quotidien), Anaëlle (hâte de rencontrer enfin ton
petit bout de chou), Anaïs, Anthony, Camille C, Camille V, Claudia, Elodie, Etienne,
Grégoire, Hadrien, Hélène (ça y est, on ne nous confondra plus!), Julien L, Imane, Laurie
(merci pour tes encouragements dans cette dernière ligne droite), Louisa, Manu et Morgane,
Marion (merci pour toutes les superbes soirées), Morgane M, Morwenn (pour m'avoir fait
découvrir Tarbes autrement), Nono (sans qui le stage d'hémato n'aurait pas été le même),
Rapha (merci pour tes précieux conseils informatiques), Sabine, Sam, Stella, Thibaut,
Thomas, Tiphaine et Tom.

Merci également aux assistantes Pauline et Clémence de m'avoir transmis votre passion pour
la bactériologie, j'espère un jour atteindre vos connaissances !

Un grand merci à tous les techniciens qui m'ont formée tout au long de ces années :

Julien & Damien, Lucie, Chloé, Jennifer, Anaïs, Alex, Karim, Sarah, Carole, Cathy, Séverine,
Sophie... et tous ceux que j'oublie.

Et bien sûr merci à toi **Quentin**,

Merci pour ta patience à toute épreuve, ton optimisme, ton oreille attentive, tes conseils, et
pour tout ce que tu m'apportes au quotidien. Un seul mot ne suffirait à exprimer tout l'amour
que j'ai pour toi.

J'ai hâte de commencer cette nouvelle vie avec toi et de poursuivre la découverte du monde à
tes côtés.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	4
TABLE DES MATIERES	7
TABLE DES ILLUSTRATIONS	9
TABLE DES TABLEAUX.....	10
LISTE DES ABREVIATIONS	11
INTRODUCTION.....	13
DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES.....	15
1) Caractéristiques générales	15
1. Taxonomie	15
2. Structure et propriétés physico-chimiques des entérovirus	17
3. Cycle viral.....	21
2) Physiopathologie et manifestations cliniques des infections à entérovirus.....	26
1. Physiopathologie	26
2. Manifestations cliniques liées aux infections à entérovirus	29
3) Epidémiologie	38
1. Répartition des infections à entérovirus	38
2. Facteurs de risque	39
3. Système de surveillance des entérovirus (France – Monde)	42
4. Principaux sérotypes impliquées en pathologie.....	44
5. Quelques chiffres	46
4) Diagnostic biologique d'une méningite à entérovirus.....	48
1. Analyse du Liquide Céphalo-Rachidien : critères biochimiques et cytologiques	48
2. Prélèvements associés au Liquide Céphalo-Rachidien	49
3. Mise en évidence du virus au sein des prélèvements	51
4. Pratique au Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse	53
5) Pronostic, traitement, et prévention des infections à entérovirus.....	54
1. Entérovirus non poliomyélitiques.....	54
2. Entérovirus poliomyélitiques.....	55
OBJECTIFS DES TRAVAUX DE LA THESE	57
MATERIELS ET METHODES	58

1) Patients	58
2) Méthode.....	58
1. Recueil des données.....	58
2. Analyse statistique	60
3. PCR utilisées au Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse.....	61
RESULTATS	70
1) Epidémiologie des PCR Enterovirus dans le Liquide Céphalo-Rachidien au cours des deux dernières années	70
2) Caractéristiques de la population	71
3) Paramètres cliniques.....	73
1. Hyperthermie	73
2. Risque d'infection materno-foetale	73
4) Paramètres biologiques	74
1. Données concernant le Liquide Céphalo-Rachidien	74
2. Autres analyses biologiques	77
5) Prise en charge des patients.....	80
1. Conditions de prélèvement et communication des résultats.....	80
2. Hospitalisation et durée de séjour.....	80
3. Prise en charge thérapeutique	81
4. Codification du séjour	83
5. Valorisation du séjour.....	83
6) Analyse univariée	84
1. Variables qualitatives	84
2. Variables quantitatives continues	87
3. Variable quantitative discrète	89
7) Analyse multivariée.....	90
DISCUSSION	92
CONCLUSION	100
BIBLIOGRAPHIE	102

TABLE DES ILLUSTRATIONS

<u>Figure 1</u> : Espèces pathogènes pour l'homme et détail des sérotypes d'entérovirus	17
<u>Figure 2</u> : Structure des particules virales	18
<u>Figure 3</u> : Organisation du génome viral des entérovirus	20
<u>Figure 4</u> : Cycle de réplication des entérovirus.....	23
<u>Figure 5</u> : Schéma simplifié de la réplication du génome des entérovirus.....	25
<u>Figure 6</u> : Physiopathologie des infections à entérovirus.....	28
<u>Figure 7</u> : Répartition des infections à entérovirus en France selon les années	39
<u>Figure 8</u> : Répartition des infections à entérovirus selon l'âge des patients	40
<u>Figure 9</u> : Répartition des LCR positifs à entérovirus selon l'âge des patients	41
<u>Figure 10</u> : Distribution des types d'entérovirus associés aux infections à LCR EV positif ...	45
<u>Figure 11</u> : Répartition du nombre d'infections à entérovirus au cours des trois dernières années	47
<u>Figure 12</u> : Représentation du système GeneXpert®.....	63
<u>Figure 13</u> : Réactifs du kit Xpert EV assay	64
<u>Figure 14</u> : Espèces détectées par la PCR Cepheid-EV	65
<u>Figure 15</u> : Principe de la RT-PCR en une seule étape	67
<u>Figure 16</u> : Principe de la PCR.....	68
<u>Figure 17</u> : Répartition des résultats de PCR EV au cours des deux dernières années.....	71
<u>Figure 18</u> : Répartition des LCR positifs à EV en 2016 chez les enfants de moins de 15 ans.	72

TABLE DES TABLEAUX

<u>Tableau 1</u> : Sérotypes d'EV circulants prédominants en fonction des années.....	46
<u>Tableau 2</u> : Prélèvements recommandés en fonction des manifestations cliniques.....	50
<u>Tableau 3</u> : Programme de la PCR LDT-EV appliqué au laboratoire de Virologie.....	68
<u>Tableau 4</u> : Tableau récapitulatif des principales caractéristiques cliniques relevées	74
<u>Tableau 5</u> : Cellularité des LCR.....	75
<u>Tableau 6</u> : Tableau récapitulatif des principales caractéristiques biologiques du LCR.....	75
<u>Tableau 7</u> : Germes retrouvés pour chaque patient ayant des hémocultures positives	77
<u>Tableau 8</u> : Tableau récapitulatif des valeurs de CRP et PCT	78
<u>Tableau 9</u> : Détection des entérovirus sur les prélèvements périphériques.....	80
<u>Tableau 10</u> : Tableau récapitulatif des durées d'hospitalisation	81
<u>Tableau 11</u> : Libellé des diagnostics retenus pour le séjour des patients.....	83
<u>Tableau 12</u> : Analyse univariée entre les variables qualitatives et le type de PCR réalisé	86
<u>Tableau 13</u> : Analyse univariée entre les variables quantitatives continues et le type de PCR réalisé	88
<u>Tableau 14</u> : Analyse univariée entre la variable quantitative discrète et le type de PCR réalisé	89
<u>Tableau 15</u> : Modèle initial de l'analyse multivariée.....	90
<u>Tableau 16</u> : Modèle final de l'analyse multivariée	91

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN :	Acide Désoxyribonucléique
ADNc :	ADN complémentaire
ARN :	Acide Ribonucléique
ARNm :	ARN messenger
BLAST :	Basic Local Alignment Search Tool
CDC :	Centers for Disease Control and Prevention
CH :	Centre Hospitalier
CHU :	Centre Hospitalier Universitaire
CMV :	Cytomégalovirus
CNR :	Centre National de Référence
CNREV :	Centre National de Référence des Entérovirus
CRP :	Protéine C-Réactive
Ct :	Cycle threshold
CV :	Coxsackie Virus
DIM :	Département d'Information Médicale
dNTPs :	Deoxynucleotide triphosphates
EBV :	Epstein-Barr Virus
ECBU :	Examen Cytobactériologique des Urines
ECDC :	European Centre for Disease Prevention and Control
Echovirus :	Enteric Cytopathogenic Human Orphan Virus
ECG :	Electrocardiogramme
ELISA :	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ES :	Erreur Standard
EV :	Entérovirus
GHM :	Groupe Homogène de Malades
HAS :	Haute Autorité de Santé
HSV :	Herpes Simplex Virus
IC :	Intervalle de Confiance
IMEP :	Initiative Mondiale pour l'Eradication de la Poliomyélite
IMF :	Infection Materno-Fœtale

InVS :	Institut de Veille Sanitaire
IRES :	Internal Ribosome Entry Site
LBA :	Lavage Broncho-Alvéolaire
LCR :	Liquide Céphalo-Rachidien
LDT :	Laboratory Developed Test
NC :	Non Codante
NESS :	National Enterovirus Surveillance System
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
OR :	Odds Ratio
ORF :	Open Reading Frame
OSCOUR :	Organisation de la Surveillance COordonnée des Urgences
PABP :	Poly(A) Binding Protein
PCBP :	Poly(C) Binding Protein
PCR :	Polymerase Chain Reaction
PCT :	Procalcitonine
PNN :	Polynucléaires Neutrophiles
PPAV :	Poliomyélite Paralytique Associée à la Vaccination
PVDVc :	Poliovirus circulant dérivé d'une souche vaccinale
PVR :	Polio Virus Receptor
QCMD :	Quality Control for Molecular Diagnostics
RSE :	Réseau de Surveillance des Entérovirus
RT-PCR :	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
SAB :	Sérum Albumine Bovin
SPC/IC :	Sample Processing Control/Internal Control
SNC :	Système Nerveux Central
TDM :	Tomodensitométrie
VHB :	Virus de l'Hépatite B
VHC :	Virus de l'Hépatite C
VIH :	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VP :	Viral Protein
VPg :	Viral Protein genome-linked
VZV :	Varicella-Zoster Virus

INTRODUCTION

Les entérovirus sont des agents infectieux viraux responsables de tableaux cliniques très variés, de l'infection asymptomatique aux atteintes graves et potentiellement mortelles. La poliomyélite, entérovirose majeure, est connue depuis l'antiquité comme l'illustrent des stèles de l'ancienne Egypte. Si aujourd'hui cette pathologie est en voie d'éradication grâce à une politique vaccinale mondiale, de nombreuses épidémies liées à la circulation d'autres entérovirus sont régulièrement rapportées et font l'objet d'une surveillance accrue au niveau mondial.

Les entérovirus sont actuellement la première cause de méningite aseptique aiguë. Concernant principalement les enfants et les nourrissons, cette affection demeure le plus souvent bénigne, ne nécessitant alors qu'un traitement symptomatique limité. L'absence de spécificité des signes cliniques et des paramètres biologiques observés dans ces méningites rend leur différenciation difficile des méningites bactériennes qui constituent une véritable urgence thérapeutique.

C'est dans ce contexte que des méthodes diagnostiques toujours plus performantes ont été mises au point. D'abord détectés par techniques de culture cellulaire, les entérovirus sont aujourd'hui mis en évidence essentiellement par amplification génomique au moyen de techniques moléculaires. L'évolution des technologies a également débouché sur le développement de méthodes moléculaires dites rapides permettant la détection du génome viral en moins de trois heures.

Pour les patients, l'apport de ces techniques est incontestable et reconnu par les « tutelles sanitaires » permettant leur inscription récente à la nomenclature des actes de biologie médicale.

Au laboratoire de Virologie du Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse, deux techniques de biologie moléculaire peuvent être utilisées devant une suspicion de méningite à entérovirus ; l'une, unitaire, onéreuse et permettant l'obtention rapide d'un résultat à partir

d'un liquide cérébro-spinal, l'autre, développée en interne, et réalisable en série sur un large panel d'échantillons.

Dans un contexte où l'économie budgétaire occupe une part importante des réflexions, nous nous sommes intéressés au bénéfice d'utilisation de la technique rapide par rapport à la technique « classique » sur la prise en charge des patients.

Dans la première partie de ce travail, nous aborderons les données actuelles des connaissances sur les entérovirus.

La deuxième partie sera consacrée à l'analyse, à partir des dossiers médicaux de patients admis aux urgences pédiatriques en 2016, des critères de prescription en faveur de l'une ou l'autre technique, et de l'impact médical et économique en rapport à la prise en charge des nourrissons et des enfants.

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

1) Caractéristiques générales

1. Taxonomie

Les entérovirus sont des petits virus appartenant à l'ordre des *Picornavirales* et à la famille des *Picornaviridae* qui doit son nom à l'association de « pico » signifiant « petit » en grec ancien, du mot « RNA » pour leur génome à ARN, et de « virus ».

Cette famille regroupe actuellement plus de 40 genres, notamment celui des *Enterovirus*, au sein duquel on distingue 15 espèces : 12 espèces d'entérovirus classées de A à L, et 3 espèces de rhinovirus classées de A à C¹.

Parmi les espèces d'entérovirus, 7 sont pathogènes pour l'homme : il s'agit des *Enterovirus A*, *Enterovirus B*, *Enterovirus C*, *Enterovirus D*, et des 3 *Rhinovirus* (Figure 1).

A ce jour, les quatre espèces d'entérovirus pathogènes sont représentées par 116 sérotypes et celles des rhinovirus par 167 sérotypes¹.

S'ils sont aujourd'hui classés en 12 espèces, les entérovirus étaient à l'origine répartis en quatre groupes : celui des poliovirus, des coxsackievirus A et B et celui des échovirus².

Cette classification était établie en fonction de plusieurs paramètres, notamment leur effet cytopathogène en culture cellulaire et leur pouvoir pathogène (effets neurologiques et manifestations systémiques). C'est ainsi que le groupe des poliovirus regroupait les virus responsables de paralysie flasque chez l'homme. Les coxsackievirus A (CV-A) provoquaient des paralysies flasques chez les souriceaux nouveau-nés, des atteintes du Système Nerveux Central (SNC) et l'herpangine chez l'homme, tandis que les coxsackievirus B (CV-B) étaient à l'origine de paralysies spastiques chez les souriceaux nouveau-nés et étaient responsables chez l'homme d'affections cardiaques et neurologiques. Enfin, le groupe des échovirus (pour Enteric Cytopathogenic Human Orphan virus) se caractérisait par l'absence de pathogénicité, aussi bien chez les souriceaux nouveau-nés que chez l'homme³.

Au sein de chaque groupe, le sérotype du virus était ensuite déterminé au moyen d'antisérums spécifiques dirigés contre des antigènes de capsid⁴.

Cette première classification a rapidement vu apparaître ses limites avec la découverte de nouveaux entérovirus (dont certains furent sérotypés en échovirus et pourtant responsables de pathologies humaines et/ou animales) et par la complexité croissante des groupements antigéniques à analyser par les sérums neutralisants.

Dès les années 2000, la biologie moléculaire est donc logiquement venue supplanter cette ancienne technique de sérotypage, permettant alors la découverte de nouveaux sérotypes et une profonde révision de la classification des entérovirus. Ces derniers sont désormais répartis en fonction de leurs caractéristiques génomiques comparées à une large base de données.

D'après Stanway *et al.*⁵, dans cette nouvelle classification, les souches d'entérovirus doivent partager au sein d'une même espèce :

- Plus de 70% d'acides aminés identiques au niveau de la polyprotéine précurseur,
- Plus de 60% d'acides aminés identiques au niveau de la protéine de capsid VP1,
- Plus de 70% d'acides aminés identiques au niveau des protéines non structurales 2C + 3CD,
- Une gamme limitée de récepteurs de cellules hôtes,
- Une gamme d'hôtes naturels limitée,
- Une composition de base du génome (G + C) qui ne varie pas de plus de 2,5%,
- Un degré significatif de compatibilité dans le traitement protéolytique, la réplication, l'encapsidation et la recombinaison génétique.

En pratique, le génotypage et l'identification des souches se fait le plus souvent à partir du gène 1D des entérovirus codant une protéine de capsid VP1 qui sera analysé par la méthode BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) et par analyse phylogénétique. Deux souches sont considérées comme appartenant au même sérotype si les séquences nucléotidiques du gène 1D présentent plus de 75% de similitude.

A noter que les nouveaux sérotypes mis en évidence sont désormais dénommés par l'appellation « *Enterovirus* » suivie d'un numéro correspondant à leur ordre de découverte.

Espèces	Types
<i>Enterovirus A</i> (EV-A)	25 types : coxsackievirus A2 (CV-A2) à CV-A8, CV-A10, CV-A12, CV-A14, CV-A16, entérovirus A71 (EV-A71), EV-A76, EV-A89, EV-A90 à EV-A92, EV-A114, EV-A119, EV-A120, EV-A121
<i>Enterovirus B</i> (EV-B)	63 types : CV-B1 à CV-B6, CV-A9, échovirus 1 (E-1) à E-7, E-9, E-11 à E-21, E-24 à E-27, E-29 à E-33, entérovirus B69 (EV-B69), EV-B73 à EV-B75, EV-B77 à EV-B88, EV-B93, EV-B97, EV-B98, EV-B100, EV-B101, EV-B106, EV-B107
<i>Enterovirus C</i> (EV-C)	23 types : poliovirus (PV)-1, PV-2, PV-3, coxsackievirus A1 (CV-A1), CV-A11, CV-A13, CV-A17, CV-A19, CV-A20, CV-A21, CV-A22, CV-A24, EV-C95, EV-C96, EV-C99, EV-C102, EV-C104, EV-C105, EV-C109, EV-C113, EV-C116, EV-C117 et EV-C118
<i>Enterovirus D</i> (EV-D)	5 types : EV-D68, EV-D70, EV-D94, EV-D111
<i>Rhinovirus A</i> (RVA)	80 types : rhinovirus (RV) A1, A2, A7 à A13, A15, A16, A18 à A25, A28 à A34, A36, A38 à A41, A43, A45 à A47, A49 à A51, A53 à A68, A71, A73 à A78, A80 à A82, A85, A88 à A90, A94, A96, A100 à A109
<i>Rhinovirus B</i> (RVB)	32 type : rhinovirus (RV) B3 à B6, B14, B17, B26, B27, B35, B37, B42, B48, B52, B69, B70, B72, B79, B83, B84, B86, B91, B92, B93, B97, B99, B100 à B106.
<i>Rhinovirus C</i> (RVC)	55 types : RVC1 à RVC55

Figure 1 : Espèces pathogènes pour l'homme et détail des sérotypes d'entérovirus ⁶

2. Structure et propriétés physico-chimiques des entérovirus

Les entérovirus sont des virus à ARN, de petite taille (30 nm de diamètre), non enveloppés, et entourés d'une coque protéique ou capside⁷.

Cette capside qui entoure le génome est de nature icosaédrique, et formée de 60 sous-unités appelées « protomères » tous identiques. Ces derniers sont constitués de quatre protéines de structures dites VP (Viral Protein) et sont disposés de manière à définir des axes de symétrie d'ordre 5, 3 et 2 (Figure 2). Ces protéines de capside VP sont désignées en fonction de leur masse moléculaire décroissante : VP1 pour la plus grande, suivie de VP2, VP3 et VP4 pour la plus petite⁷.

Au sein de chaque protomère, les protéines VP1, VP2 et VP3 sont exposées à la surface du virion tandis que la protéine VP4 réside à l'intérieur et reste en étroite association avec le génome.

Les trois protéines (VP1, VP2 et VP3) s'organisent à la surface de manière à former des dépressions ou « canyons » qui constituent le site d'interaction du virus avec son récepteur. Au fond de ce canyon se trouve une poche hydrophobe occupée par une substance lipidique

qui stabiliserait le virion⁸. Les canyons sont, quant à eux, entourés de zones en plateau proéminent ou « mesa » qui correspondent à la zone de jonction entre les protomères au niveau de VP1.

Ces trois protéines de surface partagent la même structure secondaire, à savoir une succession de huit feuillets bêta antiparallèles organisés en tonneau de type « gâteau roulé », une structure que l'on retrouve également parmi les autres membres de la famille des *Picornaviridae*.

Comme décrit plus haut, la protéine VP1 est essentielle à l'identification des souches et nous verrons par la suite qu'elle joue également un rôle central dans l'assemblage des particules virales et l'entrée dans les cellules.

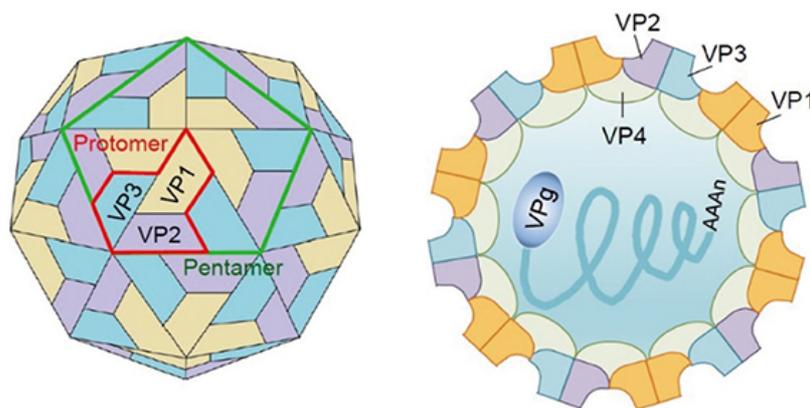


Figure 2 : Structure des particules virales

Les protéines VP1, VP2 et VP3 s'organisent à la surface des virions tandis que VP4 est interne.

Les quatre protéines de capsidie sont regroupées en protomères tous identiques (lignes rouges).

5 protomères constituent un pentamère (lignes vertes) et 12 pentamères associés au génome forment une particule virale⁹.

Le génome des entérovirus est une molécule d'ARN monocaténaire, linéaire, non segmentée et de polarité positive. Elle a un poids moléculaire de $2,58 \cdot 10^6$ Da et est constituée d'environ 7500 nucléotides qui coderont 11 protéines virales : les 4 protéines de capsidie (VP) et au moins 7 protéines non structurales⁷.

Ce génome est composé de deux régions non codantes (NC) : une longue région non codante au niveau de l'extrémité 5' (variable de 494 à 1451 nucléotides), et une plus courte au niveau de l'extrémité 3' (variable de 25 à 795 nucléotides), entourant un seul cadre de lecture ouvert ou ORF¹⁰.

La région 5' NC est composée de six structures secondaires dites en tige-boucle du fait des repliements de l'ARN. La première tige-boucle est un élément multifonctionnel appelé OriL dit aussi en feuille de trèfle ou « cloverleaf » qui est fondamental à la réplication et la traduction virale. Les autres domaines de la région 5'NC constituent l'IRES (Internal Ribosome Entry Site), une structure impliquée dans l'initiation de la traduction qui permet l'interaction avec les ribosomes cellulaires¹¹.

Au niveau de cette région, on note également la présence d'une petite protéine virale VPg (Viral Protein genome-linked), de 22 à 25 acides aminés, qui est reliée de manière covalente à l'extrémité 5' (Figure 3).

Cette région 5'NC a la particularité d'être hautement conservée entre les différentes espèces d'entérovirus d'où son utilisation actuelle en biologie moléculaire pour l'identification du genre *Enterovirus*¹¹.

La région 3' NC est également formée de repliements complexes en tige-boucle et possède un élément cis-régulateur dit OriR. Celui-ci joue un rôle essentiel dans l'initiation de la synthèse de l'ARN en interagissant avec l'élément OriL de la région 5'NC.

Par ailleurs, la région 3'NC est reliée à une queue poly-adénylée de longueur variable¹¹.

En ce qui concerne le cadre de lecture ouvert, il est d'abord traduit en une polyprotéine d'environ 250 kDa (et de 2200 AA) qui est subdivisée en trois régions : P1, P2 et P3 (Figure 3).

Au moment de l'assemblage des virions, la région P1 donnera une première protéine précurseur qui sera clivée pour donner les protéines de structures VP1, VP3, et VP0 ; cette dernière étant ensuite elle-même clivée en VP2 et VP4.

Les régions P2 et P3 codent les protéines non structurales impliquées dans les étapes de traduction et maturation des protéines virales, ainsi que dans la réplication du génome viral : ce sont les protéases 2A^{pro}, et 3C^{pro}, les protéines 3A, 2B, 2C, VPg, et l'ARN polymérase ARN dépendante ou protéine 3D^{pol}¹¹.

Cette région codante contient aussi un élément cis-régulateur ou OriI qui jouera un rôle important dans la réplication de l'ARN car il servira de matrice pour l'uridylation de la protéine VPg (cf partie réplication).

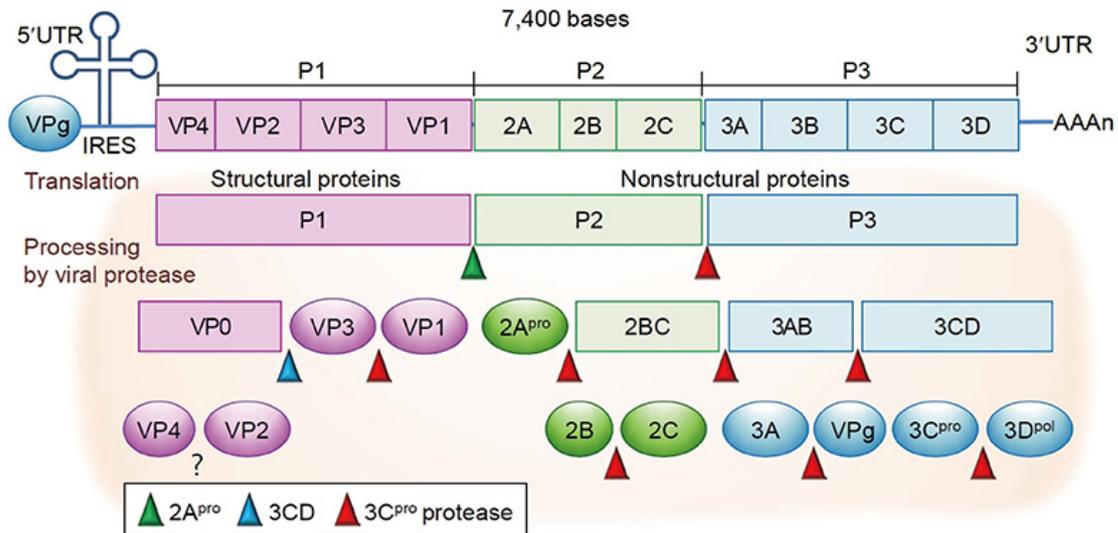


Figure 3 : Organisation du génome viral des entérovirus

Le génome des entérovirus est constitué d'une région 5'NC formée par un premier élément en feuille de trèfle, suivi d'une structure dite IRES, d'un cadre de lecture ouvert, et d'une région 3'NC reliée à une queue poly-ADP. La région codante sera d'abord traduite en une polyprotéine précurseur formée des régions P1, P2 et P3 qui sera par la suite clivée pour donner les protéines de capsid et les protéines non structurales⁹.

Il apparaît important de souligner que le matériel génétique des entérovirus est soumis à de nombreuses variations au cours de leur circulation et au cours du temps. En effet, au cours de leur réplication, des mutations ponctuelles spontanées apparaissent du fait du taux d'erreur important de l'ARN polymérase et de l'absence de système correcteur. De plus, il peut y avoir des phénomènes de recombinaison génétique entre deux souches d'entérovirus d'une même espèce au cours du cycle de réplication.

Ces variations génomiques permettent aux entérovirus de mieux s'adapter aux pressions de sélection de l'environnement et ont des répercussions directes sur leur virulence et leur pouvoir pathogène².

A propos des propriétés physico-chimiques des entérovirus, on peut noter que l'absence d'enveloppe leur confère une grande résistance. Celle-ci se traduit non seulement par une

persistance du virus à pH acide (d'où la résistance au pH acide de l'estomac) mais également aux solvants lipidiques et aux désinfectants usuels tels que l'alcool à 70%, l'isopropanol et les ammoniums quaternaires^{2,3,7}.

Leur inactivation est possible après chauffage (à 50°C), dessiccation, ou mise en contact avec certains désinfectants chimiques comme le formaldéhyde, l'hypochlorite de sodium ou encore l'acide chlorhydrique 0,1N^{2,3,7}.

De par ces propriétés, les entérovirus gardent leur pouvoir infectieux quelques jours à température ambiante, quelques semaines à 4°C et des années après congélation à -80°C.

3. Cycle viral

La première étape du cycle viral consiste à l'attachement du virus aux récepteurs cellulaires membranaires. Ceux-ci sont déterminants pour la spécificité d'hôte, mais aussi pour le tropisme cellulaire et la pathologie provoquée par les entérovirus. En effet, tous les entérovirus ne partagent pas les mêmes récepteurs cellulaires : à titre d'exemple, les différents types de poliovirus infectent les cellules via le même récepteur PVR ce qui n'est pas le cas des coxsackievirus.

De plus, si certains entérovirus interagissent avec la cellule par l'intermédiaire d'un seul récepteur (cas des poliovirus et des CV-B), d'autres nécessiteront l'interaction avec des co-récepteurs⁸.

Après fixation aux récepteurs cellulaires, le virus entre dans une phase de décapsidation : la protéine VP1 subit un changement conformationnel dans sa partie N-terminale et la protéine VP4 est externalisée. Cela est à l'origine de la formation d'un pore membranaire par lequel l'ARN viral sera relargué dans le cytoplasme cellulaire¹¹.

Pour les poliovirus, l'ARN viral pourrait pénétrer dans le cytoplasme via les endosomes cellulaires, ce mécanisme étant également observé pour certains rhinovirus.

Lorsqu'il rejoint le cytoplasme cellulaire, le génome viral voit ensuite sa protéine VPg relarguée de l'extrémité 5'NC avant de rentrer dans une phase de traduction. En effet, l'ARN viral est directement utilisé comme ARNm et traduit en protéines virales.

On peut remarquer que les ARNm des *Picornavirus* sont dépourvus de coiffe au niveau de leur extrémité 5' terminale ; cette coiffe permettant habituellement d'initier la traduction. Chez les entérovirus, c'est la séquence IRES qui assurera cette initiation en recrutant la sous unité 40S du ribosome.

De plus, lors du cycle de réplication, les *Picornavirus* prennent le contrôle de la machinerie cellulaire : ils inhibent la synthèse protéique et la production d'ARNm de la cellule tandis que d'autres protéines cellulaires sont mises à profit pour la synthèse de protéines virales. Ceci explique que la réplication des entérovirus ne puisse avoir lieu que dans le cytoplasme des cellules hôtes.

Ce mécanisme d'inhibition cellulaire varie suivant le type d'entérovirus et est relativement rapide : il survient moins d'une heure après la fixation du virus à son récepteur et devient complet après deux heures⁷.

L'étape de traduction donnera alors naissance à une première polyprotéine composée des régions P1, P2 et P3. Elle sera par la suite clivée au niveau de domaines protéinases et donnera après maturation les protéines de capsides et les protéines non structurales que nous avons décrites plus haut. A noter que les clivages ne sont pas assurés par des protéases cellulaires mais par les protéinases virales 3C^{pro} et 2A^{pro} (Figure 3).

Une fois les protéines virales synthétisées, et notamment l'ARN polymérase, l'ARN viral pourra être utilisé comme matrice pour la synthèse de nouveau matériel génétique.

Cette synthèse ne pourra cependant pas avoir lieu en même temps que la traduction, la régulation entre ces deux mécanismes étant assurée par la variation de concentration de la protéine 3CD, qui nous allons voir, joue un rôle dans la réplication du génome viral.

Cette réplication débutera par la copie du brin d'ARN en un brin de polarité négative (ou anti-génomique) qui par la suite servira lui-même de matrice à la synthèse de multiples brins d'ARN de polarité positive (Figure 4).

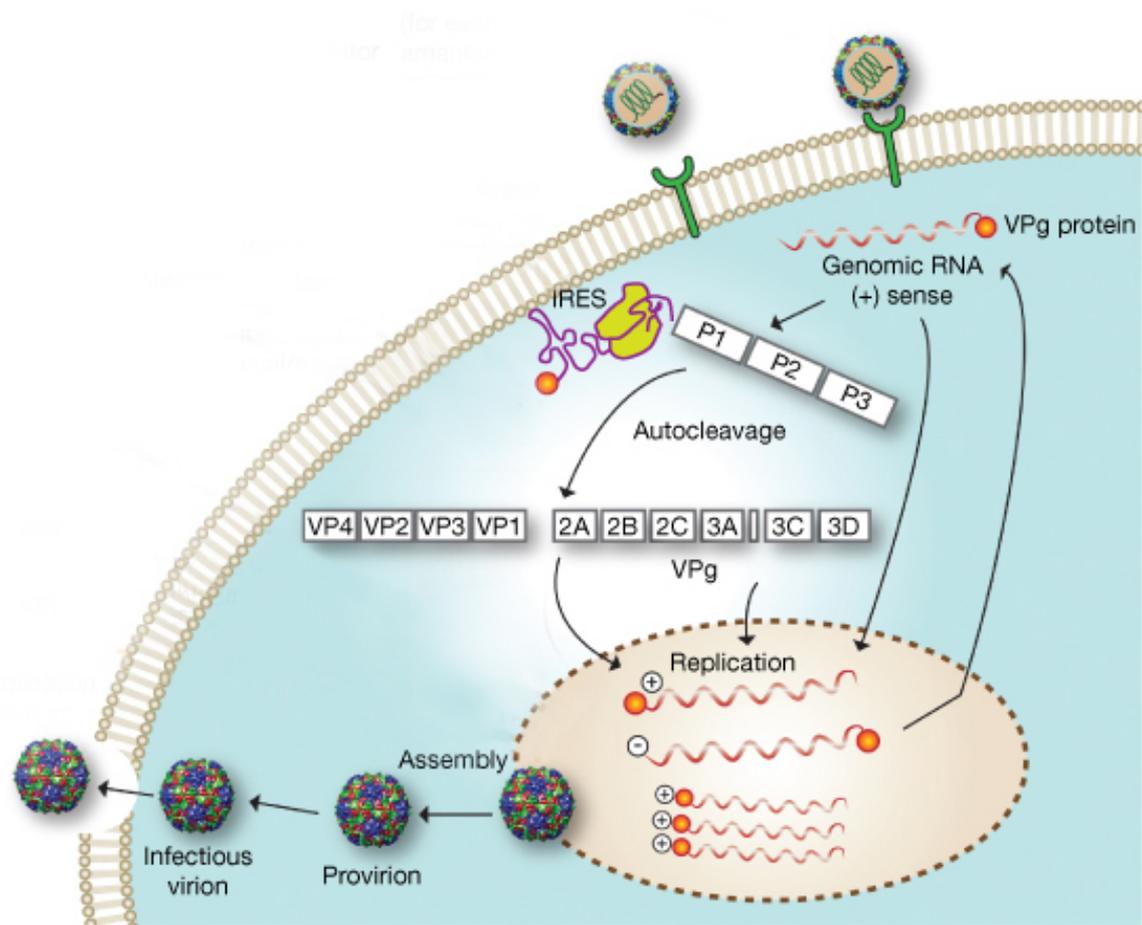


Figure 4 : Cycle de réplication des entérovirus

Après fixation à ses récepteurs cellulaires, le virus subit une première étape de décapsidation et le matériel génétique est relargué au niveau du cytoplasme cellulaire. C'est là que se dérouleront les étapes de traduction des protéines virales et d'amplification du génome.

Les brins d'ARN néo-synthétisés pourront ensuite rentrer à nouveau dans un cycle de réplication ou aboutir à la formation de nouvelles particules virales.⁹

La synthèse du premier brin négatif fait intervenir la structure en feuille de trèfle de la région 5'NC. En effet, c'est à ce niveau que des protéines cellulaires dites PCBP (pour Poly(C) Binding Protein) et la protéine virale 3CD vont se fixer (Figure 5). Les PCBP interagissent ensuite avec d'autres protéines appelées PABP (pour Poly(A) Binding Protein) qui sont quant à elles fixées sur la queue poly-A de la région 3'NC. Cette liaison va induire un repliement du génome viral et la polymérase virale 3D^{pol} sera recrutée par la protéine 3CD¹¹.

L'élongation pourra commencer après fixation d'une amorce sur la queue polyA. Cette amorce correspond en fait à la protéine VPg uridylée en VPg-pUpU grâce à la polymérase 3D^{pol} et à l'élément cis-régulateur OriI qui servira de matrice à l'uridylation.

Une fois l'élongation terminée, les deux brins complémentaires (ou formes répliquatives), seront ensuite dissociés par la protéine 2C ayant une fonction hélicase.

Le brin négatif libéré deviendra alors le support de fixation de la polymérase 3D^{pol} et de Vpg-pUpU qui servira à nouveau d'amorce pour la synthèse du brin d'ARN de polarité positive.

Par ce mécanisme, une même molécule d'ARN de charge négative peut induire la production simultanée de six molécules d'ARN de polarité positive. Ces nouveaux ARN viraux pourront ensuite soit servir de matrice et rentrer dans un nouveau cycle de réplication, soit être encapsidés avec les protéines virales et former de nouveaux virions.

Le cycle viral se termine alors après 6 à 8h² par la libération des particules virales néo-synthétisées suite à la lyse cellulaire (un autre mécanisme de libération utilisant des vésicules autophagiques pourrait aussi être utilisé).

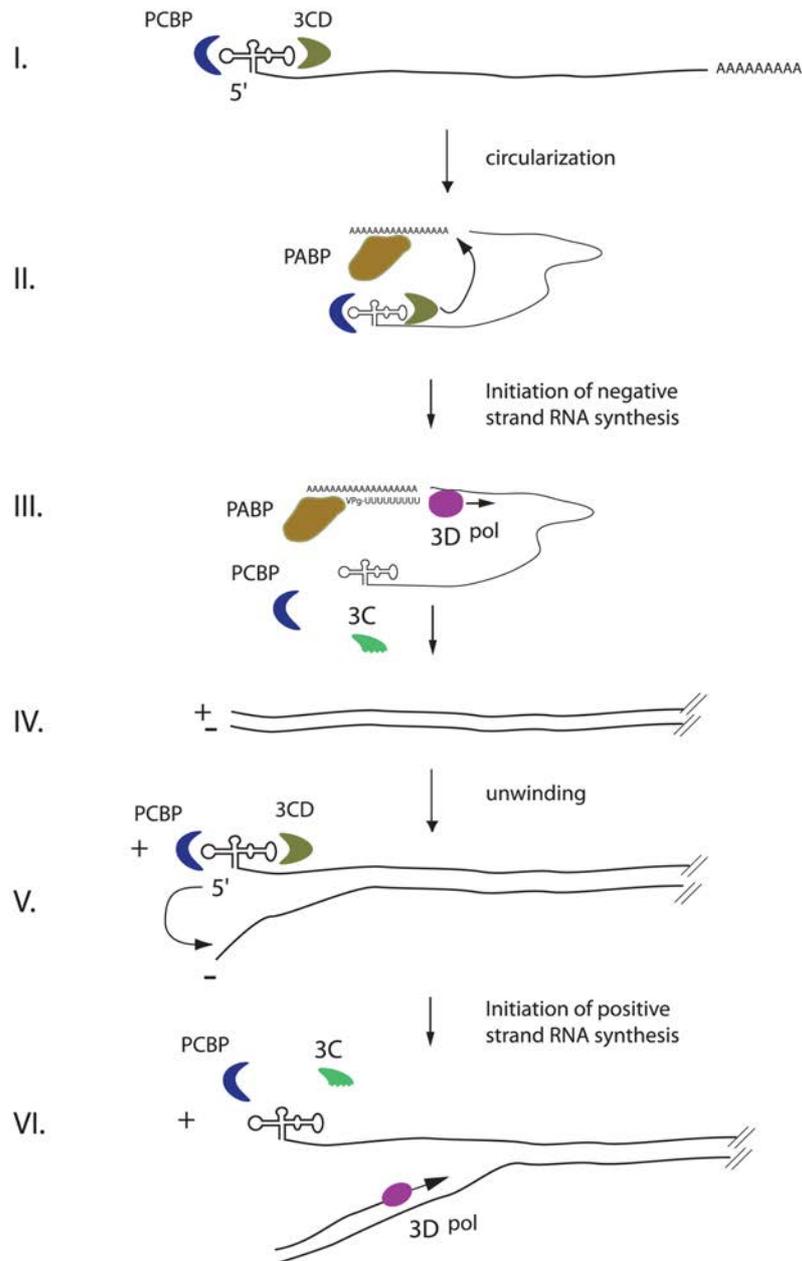


Figure 5 : Schéma simplifié de la répllication du génome des entérovirus¹²

I : Fixation des PCBP et de la protéine 3CD sur la cloverleaf de la région 5'NC du génome viral

II : Interaction entre les protéines PCBP et PABP entraînant une circularisation du génome

III : Recrutement de la polymérase et début de l'élongation

IV : Formation de deux brins complémentaires ou formes réplificatives

V : Séparation des formes réplificatives

VI : Synthèse des brins de polarité positive à partir du brin négatif

2) Physiopathologie et manifestations cliniques des infections à entérovirus

1. Physiopathologie

Chez l'homme, la transmission des entérovirus peut être directe ou indirecte. Elle se fait majoritairement par voie fécale-orale mais on observe dans certains cas, une transmission aérienne, voire dans des situations plus rares, une transmission conjonctivale, cutanée (par l'intermédiaire de lésions) ou même materno-foetale^{2,7,13}.

Durant le contagion, le virus subit une première phase de multiplication au niveau du site dit de « réplication primaire », c'est-à-dire au niveau de la muqueuse épithéliale du rhinopharynx et des tissus lymphatiques. Ceux-ci correspondent d'abord aux amygdales et à la lamina propria de l'oropharynx mais la réplication se poursuit ensuite dans le système lymphoïde intestinal au niveau des plaques de Peyer de l'iléon^{2,7} (Figure 6).

La majorité des infections à entérovirus sont généralement contrôlées par le système immunitaire à ce stade, le patient restant peu symptomatique voire asymptomatique.

Dans les autres cas, le virus gagne les ganglions lymphatiques (cervicaux et mésentériques) et entraîne une première virémie où l'on pourra voir apparaître des signes cliniques variés et non spécifiques (malaise général, fièvre, céphalées, rash cutané, myalgies) pouvant être accompagnés de manifestations oro-pharyngées (pharyngite), oculaires (conjonctivite), respiratoires (rhino-pharyngite) ou gastro-intestinales (nausées, vomissements, douleurs abdominales, diarrhées, perte d'appétit).

Cette virémie permet au virus de se disséminer dans l'organisme et d'atteindre les organes cibles (tels que le cœur, le SNC, les muscles striés, le tractus respiratoire, le pancréas, etc.) où il sera responsable de manifestations cliniques plus spécifiques. Le tropisme cellulaire dépendra des sérotypes ; les cibles cellulaires des entérovirus étant relativement variées, allant des simples cellules épithéliales aux cardiomyocytes et aux neurones¹³.

Par la suite, une seconde phase de réplication au niveau des organes cibles se mettra en place et sera l'objet d'une deuxième virémie, de plus grande intensité, qui pourra être à l'origine d'une infection (ou d'une ré-infection) du système nerveux central².

Le parcours du virus se terminera par son excrétion qui dure généralement quelques semaines au niveau oral (2 semaines en moyenne) et peut persister 3 à 4 mois dans les fécès⁷.

Entre l'exposition initiale au virus et la survenue des premières manifestations cliniques, se déroule une durée variable qui correspond à la période de réplication initiale mais aussi à la durée d'incubation. Celle-ci dépend principalement du mode de transmission et des organes cibles atteints. En effet, elle peut être courte, de l'ordre de 12h à 24h pour les conjonctivites à entérovirus, car l'inoculation est directe via des objets souillés ou des mains contaminées. Par contre, pour les infections des voies respiratoires supérieures et les gastro entérites, elle est plutôt de 2 à 3 jours. Pour les infections systémiques mineures, elle varie entre 1 à 3 jours (rarement plus de 5 jours). La période d'incubation la plus longue est finalement celle qui précédera les infections du SNC : entre 7 à 21 jours après exposition, voire jusqu'à 35 jours dans les cas extrêmes⁷.

On soulignera qu'au sein d'une même famille, la transmission d'un sujet contaminé à un autre est très rapide et la plupart des sujets contacts sont infectés en 4-5 jours⁷.

La contamination par les entérovirus est d'autant plus facile que ce sont des virus résistants à de nombreux détergents.

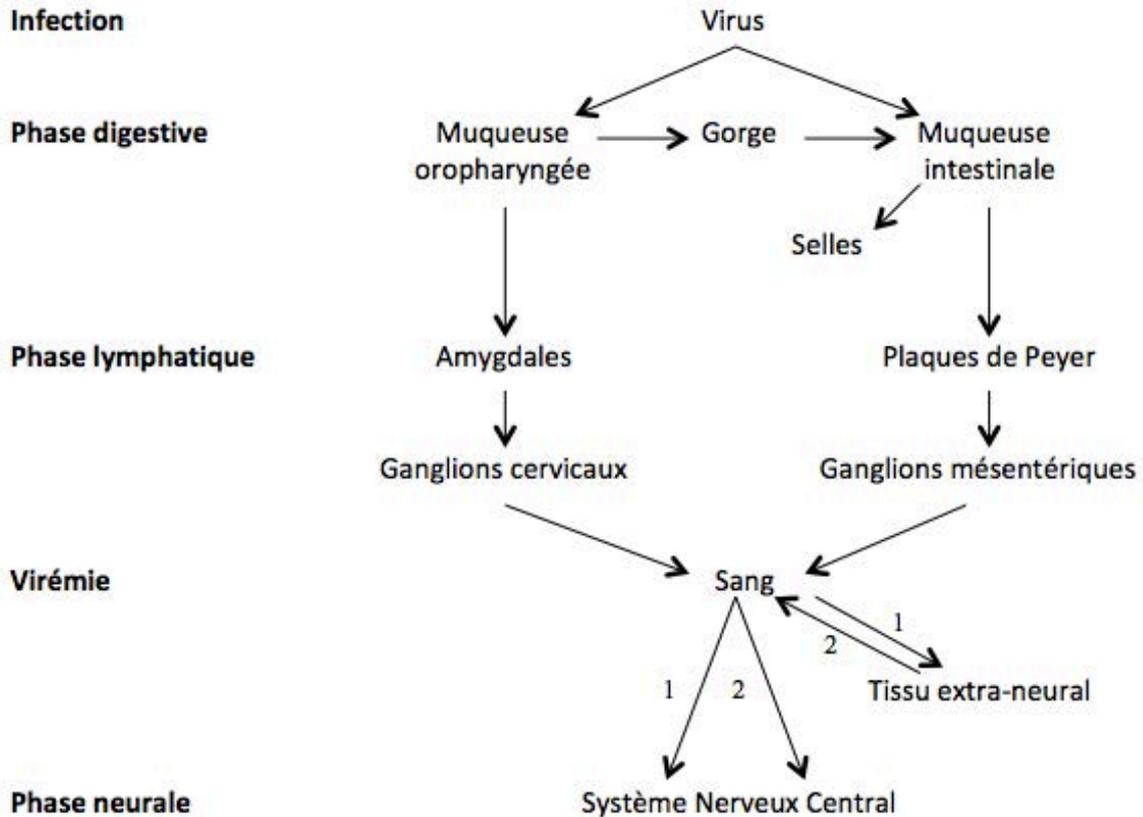


Figure 6 : Physiopathologie des infections à entérovirus⁷

La survenue d'infections du SNC peut faire suite à la première virémie, mais c'est principalement au cours de la deuxième virémie, de plus grande intensité, qu'elles apparaîtront.

De plus, les entérovirus sont responsables d'un effet cytopathogène important et l'infection dont ils sont responsables s'accompagne généralement d'une réaction inflammatoire avec une production d'anticorps neutralisants dans les 7 à 10 jours. Ces anticorps ne protègent pas d'une ré-infection à entérovirus mais permettent, le cas échéant, de limiter la réplication virale au site de réplication primaire et réduire ainsi la virémie et empêcher les infections tissulaires secondaires².

Par ailleurs, il est intéressant de noter qu'il n'existe pas d'immunité croisée entre les différentes espèces d'entérovirus, ceci explique alors la nécessité d'avoir un vaccin dirigé contre les trois sérotypes de poliovirus pour assurer une protection contre la poliomyélite³.

2. Manifestations cliniques liées aux infections à entérovirus

Les entérovirus peuvent être responsables de manifestations cliniques très diverses allant du tableau asymptomatique (la majorité des cas) à l'infection grave menaçant le pronostic vital.

Nous distinguerons ici les infections du SNC des autres pathologies qui regroupent à la fois le syndrome pieds-mains-bouche, l'herpangine, les pleurodynies, les infections respiratoires, les infections cutanées, les myocardites et péricardites, les infections néonatales systémiques, les pancréatites, les hépatites et autres maladies fébriles systémiques¹³.

Les infections à entérovirus surviennent généralement avant l'âge de 10 ans et on remarque une corrélation entre l'âge du patient et le profil clinique de la maladie. En effet, les infections du SNC concernent plutôt les 5-15 ans tandis que les myocardites sont plus fréquemment retrouvées chez les 20-40 ans. En ce qui concerne les infections sévères (myocardites, infection du SNC et sepsis), elles sont plutôt retrouvées chez le nouveau-né et l'enfant, par contre le syndrome pieds-mains-bouche se voit essentiellement chez les enfants de moins de 5ans¹³.

L'âge sera ainsi un élément clé du diagnostic, de même que les signes cliniques (pour certains spécifiques des entérovirus) et la notion d'infection en collectivité. Des prélèvements biologiques pourront par la suite confirmer ce diagnostic, notamment en cas de méningite, ce que nous aborderons dans la partie 4 (*Diagnostic biologique d'une méningite à entérovirus*).

Le type d'affection et le pronostic des infections à entérovirus dépendent pour beaucoup du sérotype responsable, mais aussi de la charge virale infectante, de l'organe cible, du sexe et du statut immunitaire du patient². Quant au traitement, il est symptomatique devant l'absence d'antiviraux spécifiques et peut nécessiter une hospitalisation notamment dans le cas des infections du SNC.

i. *Infections du Système Nerveux Central*

Si tous les entérovirus ont un tropisme neurologique, les infections du SNC restent heureusement une complication rare des infections à entérovirus⁷. Les atteintes diffèrent selon

le sérotype, certains virus induisant des lésions préférentielles du tractus pyramidal comme les poliovirus, ce qui n'est pas le cas des coxsackievirus par exemple¹⁴.

a. Méningites aseptiques

Parmi les infections du SNC, on retrouve en premier lieu les méningites aseptiques. Elles touchent majoritairement les jeunes enfants entre 5 et 15 ans et représentent la manifestation neurologique la plus fréquente causée par les entérovirus^{7,13}.

D'un point de vue clinique, elles se traduisent par l'apparition brutale d'une fièvre entre 38 et 40°C et d'un syndrome méningé d'intensité variable associant céphalées, vomissements, photophobie, irritabilité, troubles de la conscience voire convulsions ou coma, et troubles végétatifs (bradycardie, pauses respiratoires, élévation tensionnelle). La raideur de nuque peut être franche tout comme elle peut être uniquement subjective, et les signes de Kerning (flexion des cuisses et des jambes lors des tentatives de repli des cuisses sur le bassin, jambes étendues) et Bruzinski (flexion involontaire des membres inférieurs lors de l'antéflexion de la nuque) sont généralement présents.

Elle est parfois associée à des signes cliniques non spécifiques comme un rash cutané, une conjonctivite hémorragique, une diarrhée ou une toux.

De plus, des prodromes précèdent parfois l'apparition de la méningite. Ils se traduisent par un syndrome pseudo grippal regroupant une fièvre légère, des myalgies, des signes oro-pharyngés, une sensation de malaise, une anorexie, et des troubles digestifs tels que diarrhées, nausées et vomissements⁷

La nature et l'intensité des symptômes de la méningite à entérovirus varient selon l'âge du patient. En effet, si les signes décrits précédemment se retrouvent chez les enfants et les jeunes adultes, ce n'est pas le cas des nourrissons pour lesquels les manifestations cliniques sont souvent limitées à la présence d'une fièvre.

On notera également que chez les jeunes enfants, c'est plutôt l'irritabilité qui est au premier plan tandis que ce sont les céphalées chez les plus grands.

Le traitement reste dans tous les cas purement symptomatique et le pronostic est habituellement favorable (exception pour le nouveau-né), la guérison étant spontanée et sans séquelle en quelques jours. Seule l'asthénie pourra persister plusieurs semaines^{6,7}.

Les types les plus fréquemment retrouvés lors des méningites aseptiques sont coxsackievirus A et B, les échovirus, et l'EV71⁷. Ce dernier est plus fréquemment associé au syndrome pied-main-bouche, mais une souche émergente a provoqué ces dernières années des épidémies avec des tableaux neurologiques sévères en Asie Pacifique¹⁵. De plus, des cas d'atteintes neuro-méningées associées aux infections respiratoires ont aussi été rapportées avec l'entérovirus EV68.

b. Encéphalites

Les entérovirus sont également impliqués dans la survenue d'encéphalite, survenant *de novo*, ou compliquant une méningite, notamment chez les nourrissons de moins de deux semaines. Le tableau clinique peut ressembler à celui d'une encéphalite herpétique mais les atteintes ne sont généralement pas focales et provoquent plutôt une dépression généralisée des fonctions neurologiques^{2,3}.

En plus des signes d'atteinte méningée, les encéphalites se caractérisent par l'apparition de troubles cognitifs et du comportement, et peuvent s'accompagner de convulsions voire de coma. Ces manifestations sont généralement modérées et transitoires d'où le bon pronostic des encéphalites à entérovirus. Cependant, ceci n'est pas toujours vérifié, notamment dans le cas des infections néonatales dues aux coxsackies du groupe B, et chez les patients immunodéprimés ou présentant un déficit immunitaire humoral (hypo ou agammaglobulinémie), où l'encéphalite peut devenir chronique^{15,16}.

Là encore, les principaux entérovirus responsables sont les coxsackievirus, les échovirus et l'EV71.

c. Poliomyélite antérieure aigue

Si l'infection par les poliovirus reste dans 90% des cas asymptomatique, dans un cas sur 200, elle conduit à une paralysie irréversible¹⁷ : la poliomyélite antérieure aigüe. Cette pathologie neurologique grave a aujourd'hui pratiquement disparu grâce aux programmes de vaccination mondiaux, mais peut réapparaître dans certaines conditions de guerre ou d'absence de système de santé. Elle reste donc un problème de santé publique majeur dans les pays en développement.

Maladie plutôt de l'enfance, elle se retrouve aussi chez les adultes selon le niveau d'hygiène.

Causée par les trois sérotypes de poliovirus, elle affecte les motoneurons du système nerveux central ce qui est à l'origine d'une paralysie flasque irréversible. Celle-ci s'étend rapidement, en 48 à 72h, et peut entraîner la mort par détresse respiratoire si les motoneurons respiratoires sont atteints⁷.

Dans la poliomyélite, on peut distinguer trois types de paralysie⁷ :

- Les paralysies avec atteinte bulbaire : elles correspondent à 10-15% des paralysies poliomyélitiques. Dans ce cas, les motoneurons de la région bulbaire et du tronc cérébral sont touchés, ce qui a pour conséquence une atteinte des nerfs crâniens VII, IX et X. Les patients présentent des difficultés de phonation et de déglutition. D'autres nerfs crâniens peuvent également être affectés, de même qu'une atteinte de la formation réticulée peut survenir et entraîner des difficultés respiratoires et des problèmes cardiovasculaires.
- Les paralysies bulbo-spinales : avec une atteinte spinale qui se complique dans un second temps d'une atteinte bulbaire avec détresse respiratoire.
- Les paralysies spinales : c'est le type de paralysie le plus fréquent. L'atteinte concerne les motoneurons de la corne antérieure de la moelle épinière ce qui entraîne une paralysie asymétrique, flasque, plus proximale que distale, avec une perte des réflexes mais une absence de troubles sensitifs.

D'après la littérature, des signes cliniques aspécifiques tels que de la fièvre, des céphalées, des nausées et vomissements, ou encore des maux de gorge, peuvent survenir 24 à 48h avant le début de la paralysie. De plus, des douleurs à type de crampes ou fasciculations peuvent être observées dans une extrémité le jour précédent le début de la paralysie.

Une récupération musculaire peut être observée dans le mois suivant l'infection dans les zones où la fibre nerveuse est restée intacte, et au niveau des petits groupements musculaires. En revanche, de graves séquelles sont généralement présentes en cas de paralysie sévère des membres.

D'après les données de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 5 à 10% des personnes atteintes de paralysie décéderont par un arrêt des muscles respiratoires¹⁷.

Il convient de préciser que depuis 1988, l'OMS a lancé une campagne de vaccination mondiale contre le poliovirus (cf. partie 3) 3. *Système de surveillance des entérovirus (France – Monde)*). Des vaccins oraux vivants atténués contenant les trois sérotypes de poliovirus sont utilisés dans les zones à risque, à l'origine de progrès considérables dans l'éradication de la maladie. Cependant, lorsque la couverture vaccinale est insuffisante, ces souches vaccinales peuvent subir un phénomène de réversion par mutation et recombinaison avec des entérovirus circulants. Il en découle de nouvelles souches de poliovirus neuropathogènes issues des souches vaccinales (PVDVc pour Poliovirus circulant dérivé d'une souche vaccinale), capables de circuler et pouvant donner lieu à de rares cas de poliomyélite paralytique aigue associée à la vaccination¹⁸ (PPAV).

Si les poliovirus sont les premiers responsables de paralysies, quelques entérovirus non poliomyélitiques ont aussi été retrouvés lors de paralysies flasques aigues. C'est le cas notamment des EV70, EV71, de certains coxsackievirus A (A4, A11, A6, A7, A9) et B (B2-6), et d'échovirus (E1, E3, E4, E6, E9, E11, E14, E19, E30)^{2,6}.

d. Autres atteintes du Système Nerveux Central

La survenue d'ataxies cérébelleuses à entérovirus a également été observée suite à différentes infections à entérovirus.

De plus, les entérovirus sont probablement responsables d'autres atteintes du SNC qui ne sont pas encore clairement établies. A titre d'exemple, le coxsackievirus A9 a été isolé du Liquide Céphalo-Rachidien (LCR) d'un patient atteint d'hémiplégie infantile aigue sans que la relation causale n'ait pu être prouvée¹⁹.

Il est aujourd'hui reconnu que les entérovirus sont des virus persistants dans l'organisme, impliquant des mécanismes d'échappement du système immunitaire de l'hôte et de mutation du virus¹¹. De ce fait, ils pourraient être responsables de pathologies neurologiques tardives¹⁴. En effet, on sait aujourd'hui que des cas de syndromes post-poliomyélitique ont été rapportés des années après l'infection, et que des maladies auto-immunes comme le diabète, des myopathies inflammatoires chroniques et des myocardites chroniques ont été induites par la persistance de leur matériel génétique. Les conséquences au long cours au niveau du SNC restent donc encore à élucider.

ii. *Autres infections provoquées par les entérovirus*

De manière plus fréquente, les entérovirus sont responsables d'atteintes extra-neurales de natures variées, certaines étant spécifiques de ce genre tandis que d'autres se retrouvent au cours de différentes infections virales⁷.

a. Infections spécifiques des entérovirus

Deux infections sont spécifiques des entérovirus : le syndrome pieds-mains-bouche et l'herpangine.

Toutes deux très contagieuses, elles sont souvent retrouvées sous la forme de petites épidémies chez les jeunes enfants (<5ans) même si certains adultes peuvent également contracter la maladie.

Le syndrome pieds-mains-bouche doit son appellation à la survenue d'une éruption cutanée localisée au niveau des zones péri-unguéales, de la paume des mains, de la plante des pieds, des fesses et de l'oropharynx²⁰.

Au niveau de la bouche, ce sont des vésicules grisâtres et oblongues qui renferment le virus et qui évoluent par la suite en petits ulcères à l'origine de douleurs locales et un refus d'alimentation chez le tout petit.

Sur le reste du corps, les lésions sont classiquement papulo-vésiculeuses et non douloureuses. C'est un syndrome qui s'accompagne généralement de signes généraux aspécifiques notamment de fièvre et de sensation de malaise²⁰.

La fièvre chute généralement en 48h et l'ensemble des manifestations cliniques disparaît spontanément en 5 à 10 jours⁷.

Dans plus de 90% des cas, le syndrome pieds-mains-bouche est provoqué par les *Enterovirus A*, même si d'autres espèces peuvent également en être responsables (coxsackievirus B2, B5, échovirus E4, E9, E11)⁷. Si les sérotypes EV71 et CV-A16 étaient autrefois prédominants, il semblerait que les virus CV-A6 et CV-A10 viennent progressivement les remplacer²⁰.

De plus, longtemps considérée comme une affection bénigne, avec une symptomatologie caractéristique, les cas actuels remettent en question ces affirmations. En effet, le CV-A6 a été à l'origine de manifestations cutanées atypiques avec des éruptions au niveau du tronc et des extrémités. De plus, des complications sont aujourd'hui démontrées comme l'onychomadèse et les atteintes neurologiques^{13,20}.

L'herpangine est une maladie qui se caractérise par l'apparition de petites vésicules translucides localisées au niveau des piliers amygdaliens, du pharynx postérieur et du voile du palais, le reste de la bouche et du corps étant généralement épargné²¹. Ces vésicules sont entourées d'une zone érythémateuse et vont s'ulcérer après 24h, donnant des lésions légèrement plus grandes que dans le syndrome pieds-mains-bouche et responsables de maux de gorge et d'odynophagie²².

Là encore, la maladie s'accompagne de signes généraux notamment d'une fièvre élevée et un quart des patients présentera des vomissements et des douleurs abdominales. Chez les jeunes enfants, la maladie se traduira aussi par des signes d'irritabilité et une anorexie.

Le pronostic est habituellement très favorable, la guérison étant généralement observée après une semaine. Comme pour le syndrome pieds-mains-bouche, les *Enterovirus A* sont majoritairement retrouvés dans cette pathologie, les principaux sérotypes associés étant cette fois les coxsackievirus A1-6, A8, A10 et A22²¹.

A côté des deux tableaux, une autre pathologie reste spécifique des entérovirus. Il s'agit de la pleurodynie ou myalgie épidermique, encore appelée maladie de Bornholm.

Elle associe une fièvre à des douleurs thoraciques et abdominales provoquées par une atteinte du diaphragme (bien que dans certains cas la myalgie puisse concerner des muscles du dos, du cou ou des membres).

Les patients ressentent ainsi une douleur majorée par la toux ou la respiration profonde.

Des signes précurseurs tels que des céphalées, des vomissements, une infection des voies aériennes supérieures, une sensation de malaise et une anorexie peuvent parfois être présents.

Plutôt retrouvée chez les enfants et les jeunes adultes, la maladie de Bornholm est principalement due au coxsackievirus B même si des coxsackievirus A et certains échovirus ont aussi été rapportés.

C'est une pathologie au pronostic favorable, la récupération étant complète quelques jours (jusqu'à trois semaines) après l'infection. Cependant, elle peut se compliquer dans de rares situations d'une orchite, de méningite ou de péricardite à entérovirus, voire être la cause de myalgies chroniques.

b. Infections non spécifiques

La plupart des infections à entérovirus sont finalement asymptomatiques (près d'un tiers)²⁰ ou se traduisent par des signes cliniques frustrés que l'on retrouve classiquement au cours d'infections virales.

On retrouvera par exemple la présence d'un syndrome pseudo-grippal avec une fièvre entre 38 et 40°C, des signes de gastro-entérite (diarrhée et vomissements), d'infection des voies respiratoires, ou cutanés. Chez les nourrissons, l'infection virale peut également donner une anorexie voire une léthargie².

C'est un syndrome de bon pronostic et de résolution rapide (environ cinq jours), la difficulté principale étant le diagnostic différentiel avec un sepsis d'ordre bactérien ou herpétique.

Parmi les infections non spécifiques, ce sont les infections des voies respiratoires à entérovirus qui sont les plus fréquentes. Survenant dans un contexte fébrile ou non, elles concernent principalement les voies aériennes supérieures mais peuvent aussi atteindre les voies respiratoires basses.

Elles sont majoritairement dues aux échovirus et coxsackievirus A et B, et sont cliniquement indifférenciables des autres agents provoquant des infections respiratoires. Nous verrons par la suite que des épidémies à EV68 ont été rapportées, tout comme des cas sévères d'infections respiratoires à EV71 et EV104^{7,11,13}.

Les entérovirus, et notamment les coxsackievirus A, peuvent également être responsables d'atteintes cutanées. Celles-ci se manifestent par des éruptions de type maculopapuleuses, parfois vésiculaire, qui apparaissent dans un contexte fébrile. Elles sont non prurigineuses et essentiellement localisées au niveau du tronc bien que dans de rares cas on les retrouve au niveau du visage et des extrémités. Ces manifestations aspécifiques disparaissent le plus souvent après une semaine.

Au sein des manifestations cutanées, on peut aussi citer le syndrome de Gianotti-Crosti. Survenant chez les enfants entre 2 et 6 ans, il se caractérise par l'apparition d'un érythème papuleux, sur les fesses, les joues et les membres inférieurs. Les papules sont confluentes et peu prurigineuses. Les patients présentent généralement une splénomégalie ou des adénopathies associées, le tout dans un contexte fébrile. La régression est plus longue (environ 3 semaines) et s'accompagne d'une desquamation furfuracée².

Par ailleurs, l'échovirus 16 donne l'exanthème de Boston : une éruption de type morbiliforme ou rubelliforme, diffuse, non prurigineuse et sans desquamation⁷.

Enfin, des exanthèmes plus classiques peuvent s'observer lors d'infections par les coxsackievirus B, les échovirus, les poliovirus et l'EV71⁷.

Les myocardites et péricardites constituent un autre tableau clinique provoqué par les entérovirus. Les myocardites se caractérisent notamment par la présence d'une douleur précordiale, d'une dyspnée, d'une tachycardie et de palpitations, le tout associé à des troubles du rythme visibles à l'électrocardiogramme (ECG). Lors des péricardites, le tableau clinique se compose d'une douleur thoracique éventuellement associée à une dyspnée, qui sont toutes deux dépendantes de la position et de la respiration. Un frottement péricardique, des modifications à l'ECG et parfois la présence d'un épanchement péricardique sont aussi présents.

Dans les deux cas, ces manifestations apparaissent dans un contexte de fièvre survenant deux à trois semaines après des symptômes variés, évocateurs d'une infection virale¹³.

Ces affections cardiaques sont principalement liées à des infections par les coxsackievirus B. La population concernée est ici différente, les adultes jeunes (entre 20 et 40 ans), les femmes enceintes (1^{er} trimestre) et les nourrissons de moins de 6 mois, étant les cibles préférentielles². Dans de rares cas, ce sont les coxsackievirus A, les échovirus et les poliovirus qui ont été impliqués.

Le plus souvent, la récupération est totale après plusieurs semaines, néanmoins il existe un risque que la pathologie se chronicise et entraîne une cardiomyopathie dilatée pouvant évoluer elle-même en insuffisance cardiaque.

D'autres cas plus exceptionnels de myocardites d'emblées fulminantes évoluent très rapidement vers un choc cardiogénique et peuvent conduire au décès brutal du patient.

Si les myocardites et péricardites représentent les manifestations cardiaques les plus courantes, des cas d'infarctus du myocarde ont aussi pu être décrits dans la littérature².

Chez le nouveau-né, les entérovirus peuvent être responsables d'infections néonatales systémiques. Ce sont des infections très sévères au tableau clinique variable, pouvant se traduire par des manifestations hémorragiques, des atteintes respiratoires, cardiaques, hépatiques, et/ou cérébrales et pouvant aller jusqu'au coma. De mauvais pronostic, elles sont essentiellement provoquées par les coxsackievirus B et les échovirus^{2,13}.

Les infections néonatales systémiques apparaissent généralement dans les 3 à 5 jours suivant la naissance et sont le plus souvent acquises au moment de l'accouchement, une infection maternelle péri-natale étant en cause¹³. Cependant, elles sont dans de rares cas d'origine nosocomiale et surviennent alors plus tardivement (10 à 14 jours après l'accouchement) avec des signes cliniques de moindre ampleur. D'après la littérature, la prématurité, le sexe masculin, et l'infection maternelle dans les deux semaines précédant l'accouchement, seraient des facteurs de risque de survenue de ces infections²².

Enfin, d'autres pathologies ont été imputées aux entérovirus telles que le syndrome de fatigue post-viral (ou syndrome de fatigue chronique), des pancréatites, des hépatites (coxsackievirus B, échovirus), des conjonctivites hémorragiques, des arthrites, des orchites et même des cas de diabète juvénile.

3) Epidémiologie

1. Répartition des infections à entérovirus

i. Toutes infections confondues

Les entérovirus sont retrouvés dans le monde entier mais leur circulation dépend de critères géographiques et temporels⁷. Si dans les régions tropicales, ils sont présents toute l'année, on observe en revanche une saisonnalité dans les zones tempérées.

C'est ainsi qu'en France, on peut observer une augmentation des diagnostics d'infections à entérovirus durant l'été et l'automne, tout comme aux Etats-Unis²³. La majorité des infections survient en juin-juillet bien que le pic infectieux puisse être décrit dès le mois de mai²⁴.

D'après le relevé des données de Santé Publique (ancien InVS), en 2017, le pic estival d'infection à entérovirus était observé la semaine 26 (soit du 26 juin au 2 juillet) et était suivi d'un second pic, de moindre ampleur, au cours de la semaine 43 (soit du 23 au 29 octobre)²⁴.

Cette répartition des infections à entérovirus reste sensiblement la même depuis 2010 : le premier pic étant toujours détecté autour de la semaine 27 et le second, moins important, en automne (Figure 7).

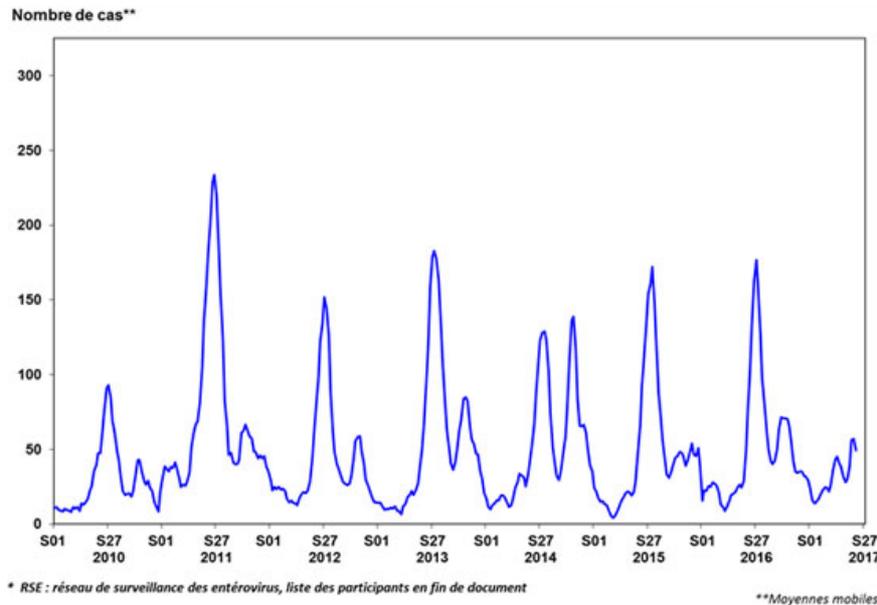


Figure 7 : Répartition des infections à entérovirus en France selon les années²⁴

Deux pics infectieux sont généralement observés : un premier majoritaire en été et un second moins important en automne.

ii. Cas des méningites à entérovirus

Les méningites à entérovirus prédominent également en été. En 2017, le pic infectieux était observé durant la semaine 28, sans recrudescence automnale²⁵. Cependant, il faut garder à l'esprit que les méningites à entérovirus peuvent aussi survenir en hiver, c'est notamment le cas de 30% des cas de méningites⁶.

2. Facteurs de risque

Si la maladie peut se diagnostiquer à la fois chez les adultes et les enfants, les données de la littérature montrent que le jeune âge est associé à un risque plus important de contracter la

maladie et que celle-ci sera d'autant plus grave⁷. Cette information dépend cependant du sérotype impliqué, en cas d'infection par le poliovirus par exemple, ce seront au contraire les adolescents et les adultes qui développeront le plus de complications⁶.

D'après les données du rapport de CNREV (Centre National de Référence des Entérovirus), la cible des entérovirus est majoritairement les enfants de 1 à 4 ans, suivi de près par les nourrissons de 29 jours à 11 mois²⁵. Par contre, l'incidence chez les adultes est beaucoup plus faible (Figure 8).

Chez les adultes, il s'agirait le plus souvent d'une infection due à la transmission par des enfants eux-mêmes malades. En effet, il a été démontré que le risque était multiplié par 15 lorsqu'un enfant malade est présent au sein d'une famille, cela étant probablement expliqué par le non- respect des règles strictes d'hygiène et des changements des couches chez le tout petit⁶.

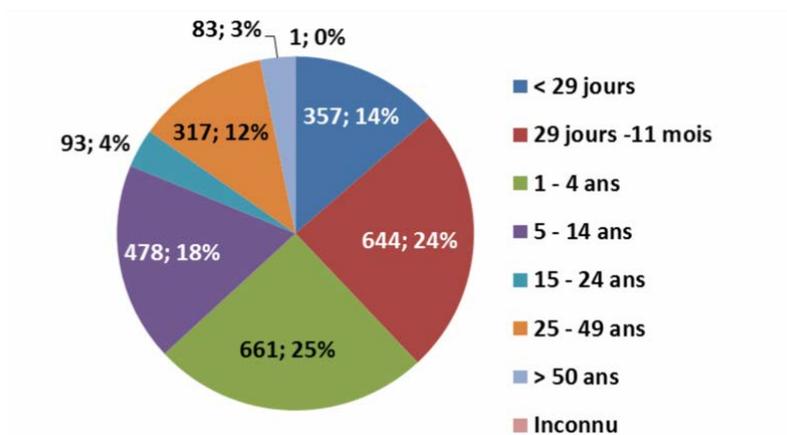


Figure 8 : Répartition des infections à entérovirus selon l'âge des patients²⁵

Les nourrissons et les jeunes enfants de moins de 5 ans sont la cible majoritaire des entérovirus.

En ce qui concerne les méningites à entérovirus, elles seraient aussi prédominantes chez les enfants (5 à 8 fois plus importantes que chez les adultes²²). Par contre la tranche d'âge est légèrement différente de celle de toutes les infections confondues à EV : il est décrit une part plus importante de méningites chez les enfants de moins de 29 jours et ceux d'âge variant de 5 à 14 ans²⁵ (Figure 9).

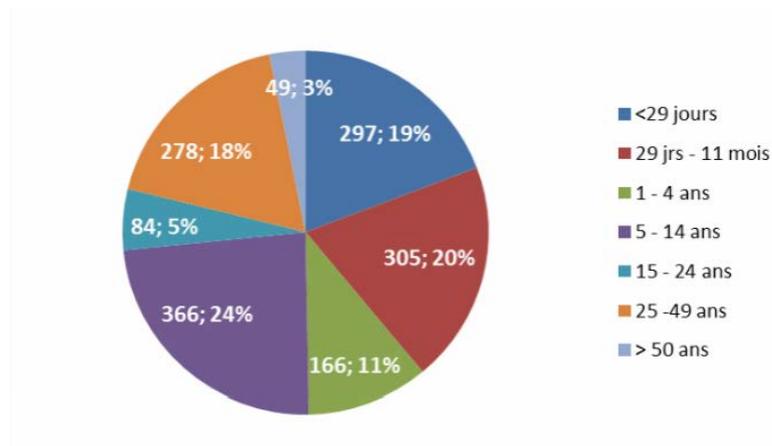


Figure 9 : Répartition des LCR positifs à entérovirus selon l'âge des patients²⁵

Les méningites à entérovirus concernent principalement les nouveaux nés et les nourrissons de moins d'un an, et les enfants de 5 à 14ans.

Un autre facteur de risque des infections à entérovirus serait le sexe du patient. Les sujets de sexe masculin seraient plus enclins à développer des infections à entérovirus (notamment à poliovirus) avec des cas souvent plus graves que chez les femmes⁶. Le rapport des infections à EV homme/femme est généralement compris entre 1,5:1 à 2,5:1. Cette remarque se vérifie avec les données du CNREV : en 2016 le rapport des infections à EV était de 1,37 soit 1521 hommes pour 1110 femmes²⁵.

La transmission des entérovirus étant essentiellement fécale-orale, on comprend également qu'elle puisse être favorisée selon les conditions démographiques (surpeuplement) et socio-économiques de certains pays, en particulier suivant les normes d'hygiène et les mesures d'assainissement des eaux appliquées⁷.

A propos de la poliomyélite, d'autres facteurs de risque ont été décrits à ce jour. C'est ainsi que l'amygdalectomie augmente le risque de développer une poliomyélite bulbaire ; les sujets présentant un déficit immunitaire cellulaire (lymphocytes B) ou une grossesse sont plus exposés au risque de développer une infection grave à poliovirus ; enfin la gravité de la paralysie poliomyélitique est clairement reliée à l'intensité de l'activité physique du patient dans les 48 heures qui suivent la paralysie²⁶.

L'activité physique aurait donc un rôle non négligeable dans les infections à entérovirus puisqu'elle serait aussi associée à une plus forte incidence et gravité de la méningite aseptique à échovirus⁶.

3. Système de surveillance des entérovirus (France – Monde)

Les infections à entérovirus, plus particulièrement la poliomyélite, demeurent une préoccupation mondiale et font aujourd'hui l'objet d'une surveillance se déclinant à plusieurs échelles.

Au niveau international, c'est l'OMS qui coordonne les différents réseaux de surveillance de la poliomyélite, des paralysies flasques aiguës et des poliovirus sauvages et vaccinaux, que ce soit chez les malades ou dans l'environnement via une surveillance des eaux usées⁶.

En mai 1988, elle a lancé un programme d'éradication mondiale de la poliomyélite : Initiative Mondiale pour l'Eradication de la Poliomyélite ou IMEP. Celui-ci visait à élargir la vaccination des populations et à dépister et prendre en charge rapidement les cas d'infection au moyen d'une surveillance adaptée.

L'objectif de l'IMEP était fixé pour l'année 2000 mais l'éradication définitive n'étant pas atteinte, un nouveau plan stratégique pour l'éradication de la poliomyélite et l'assaut final contre la maladie a été élaboré. En revanche depuis son lancement, le nombre de cas a baissé de plus de 99% en 2017, avec seulement 37 cas notifiés de poliomyélites. De plus, le poliovirus de type 2 a été éradiqué en 1999, et le dernier cas de poliovirus de type 3 a été signalé au Nigeria en 2012¹⁷.

Aux Etats Unis, il existe depuis 1960 un système de surveillance dit NESS (National Enterovirus Surveillance System) sous l'égide du CDC. C'est un système passif qui repose sur le recueil de données de laboratoires volontaires transmettant des informations sur les entérovirus et paréchovirus détectés. Il permet ainsi d'évaluer la circulation des entérovirus et des paréchovirus sur ce territoire^{23,27}.

L'ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) est quant à lui un réseau de surveillance européen qui identifie, évalue et communique les menaces actuelles et

émergentes liées aux maladies infectieuses. Le suivi des entérovirus en Europe fait ainsi parti de leurs missions²⁸.

A l'échelle nationale, c'est un réseau de laboratoires volontaires (une trentaine à ce jour) regroupé sous le nom de Réseau de Surveillance des Entérovirus (RSE), qui assure depuis 2000 la surveillance des infections à entérovirus, principalement les infections neuro-méningées. Ce réseau est coordonné à la fois par le CNR localisé à Lyon et son laboratoire associé à Clermont-Ferrand, mais aussi par Santé publique France (ancien InVS).

Il recueille de manière mensuelle les données d'activité concernant les diagnostics d'infection à entérovirus dans différents Centres Hospitaliers (CH) et Centres Hospitaliers Universitaires (CHU) de France. Ces données permettent ensuite de surveiller la circulation des entérovirus et notamment l'absence de circulation de poliovirus par géotypage. En outre, il permet d'alerter précocement en cas d'épidémie de grande ampleur ou de présentations cliniques inhabituelles²⁴.

Un deuxième réseau national OSCOUR (Organisation de la Surveillance COordonnée des URgences), assure également la surveillance des infections à entérovirus en évaluant le passage des patients aux urgences pour une méningite virale. Il couvre actuellement près de 90% des services d'urgences adultes et pédiatriques²⁴.

Enfin, des systèmes de surveillance sont mis en place au fil du temps en fonction des données épidémiologiques. Par exemple, suite à l'émergence de l'EV71 en Asie du Sud-Est, la maladie pieds-mains-bouche a fait l'objet d'une surveillance communautaire en France. Celle-ci était d'abord réalisée par un réseau spécifique à Clermont-Ferrand qui s'est ensuite étendu au niveau national.

De même, une notification à l'hôpital Necker en 2016 signalant un nombre important d'atteintes neurologiques sévères à EV68 a nécessité la mise en place d'une surveillance nationale renforcée de ce virus²⁵.

Rappelons que tous les cas sévères d'infections à entérovirus doivent désormais être signalés à Santé Publique France.

4. Principaux sérotypes impliqués en pathologie

i. *Cas des infections du Système Nerveux Central*

Bien que tous les entérovirus aient un potentiel neurotrope, certains sérotypes sont plus souvent retrouvés responsables de méningites. D'après les données de 2017 de Santé Publique France, il s'agirait des échovirus E30, E6, E11, E13, E18 et du coxsackievirus B5²⁴.

Si on regarde plus en détail la répartition des entérovirus responsables d'infections neuro-méningées sur l'année 2016 en France, on constate plutôt une prédominance des entérovirus E6, E30 et E9 chez les patients qui présentaient des signes neurologiques, et des sérotypes E5, CV-B5 et EV71 chez les nourrissons de moins de 24 mois²⁵ (Figure 10).

Il faut savoir qu'au cours d'une année, plusieurs sérotypes circulent en même temps, mais au moment des pics épidémiques, un sérotype devient généralement prédominant (responsable de plus de 50% des cas de méningites)²⁴. Cependant, cette observation ne se vérifie pas toujours dans les zones tropicales où les infections sont plutôt mixtes⁷.

Lors de ces vingt dernières années, deux sérotypes se sont distingués par le nombre croissant et la sévérité des atteintes neurologiques qu'ils provoquaient : l'EV71 et l'EV68²⁴.

L'entérovirus EV71 est le sérotype qui donne à ce jour les manifestations neurologiques les plus graves avec notamment des tableaux d'encéphalites. En 2008, il a été responsable d'épidémies de maladie pieds-mains-bouche en Chine et plus tard en Asie du Sud-Est, qui se sont pour certaines compliquées de paralysies flasques aiguës et d'encéphalites potentiellement mortelles²⁵. De plus, en mai 2016, il a été responsable d'atteintes neurologiques à type d'encéphalite, de rhombencéphalite et de paralysies flasques aiguës chez de nombreux enfants en Catalogne. En France, en juillet 2016, il a causé 5 cas de myélites et encéphalomyélites en un mois²⁹. L'entérovirus EV71 étant jusqu'alors responsable de cas sporadiques en France, c'est l'apparition de ces foyers épidémiques inhabituels qui ont justifié la mise en place de systèmes de surveillance que nous avons décrit plus haut²⁴.

L'EV68 est habituellement à l'origine de manifestations de type respiratoire. Cependant, il a été en 2014 puis en 2016, associé à deux épidémies de myélites flasques aiguës aux Etats-Unis³⁰ et responsable d'atteintes neurologiques chez des enfants en 2016 signalés à l'hôpital

Necker-Enfants en France. Sa surveillance est donc elle aussi renforcée, d'autant plus que sa circulation est actuellement en augmentation en France.

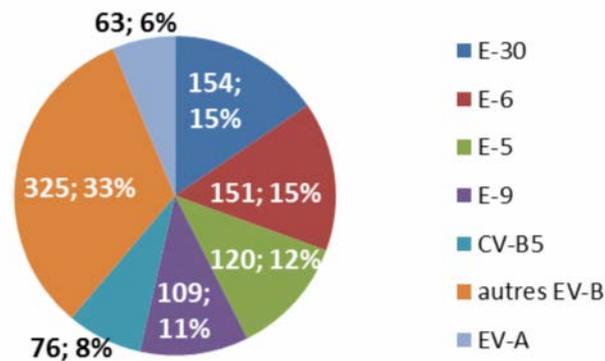


Figure 10 : Distribution des types d'entérovirus associés aux infections à LCR EV positif

Données issues des déclarations du RSE en 2016 (n=998 dossiers)²⁵.

En 2016, les échovirus ont été les principaux sérotypes impliqués en pathologie du SNC.

ii. Cas des autres infections

Les autres pathologies provoquées par les entérovirus sont généralement associées à d'autres sérotypes que ceux vus précédemment.

En France, on retrouve ainsi fréquemment²⁴ :

- Pour le syndrome pieds-mains-bouche : les coxsackievirus A6, A16 et A10, et plus rarement à l'entérovirus EV71 (contrairement à ce qui est actuellement observé en Asie)
- Pour les infections néonatales fébriles : les coxsackievirus B et à l'échovirus 11
- Pour les syndromes respiratoires : l'EV68
- Pour les atteintes cardiaques : le coxsackievirus B
- Pour les syndromes digestifs (diarrhées, hépatites) : les échovirus

On peut également remarquer que dans les Dom-Tom et autres régions tropicales, des épidémies de conjonctivites hémorragiques survenues en 2014 et 2017 étaient dues au CV-A24²⁴.

iii. Répartition des sérotypes en fonction des années

Comme nous le montre les données du CNR, la circulation des entérovirus est variable chaque année. On peut cependant constater que l'E30 revient assez fréquemment et que l'année 2016 se caractérise par la prédominance de l'EV68³¹ (Tableau 1).

<i>Année</i>	<i>Principaux entérovirus identifiés*</i>
2005	E30 (61%)
2006	CV-B5 (21%), E13 (13%), E30 (11%)
2007	E11 (24%), E18 (12%)
2008	E30 (35%), CV-A9 (14%)
2009	E30 (60%)
2010	E6 (12%), E11 (10%)
2011	E6v (49%)
2012	CV-B4 (15%), E11 (11%), CV-B5 (10%)
2013	E30 (54%)
2014	E30 (14%), E16 (12%), EV68 (11%)
2015	CV-B5 (26%), E6 (24%), E9 (11%)
2016	EV68 (11%)
2017	E6 (39%), CV-B5 (16%), E5 (12%).
2018	E30 (27%), E9 (27%), E25 (13%).

* les autres virus comptaient pour moins de 10% du total des entérovirus identifiés.

Tableau 1 : Sérotypes d'EV circulants prédominants en fonction des années^{31,32}

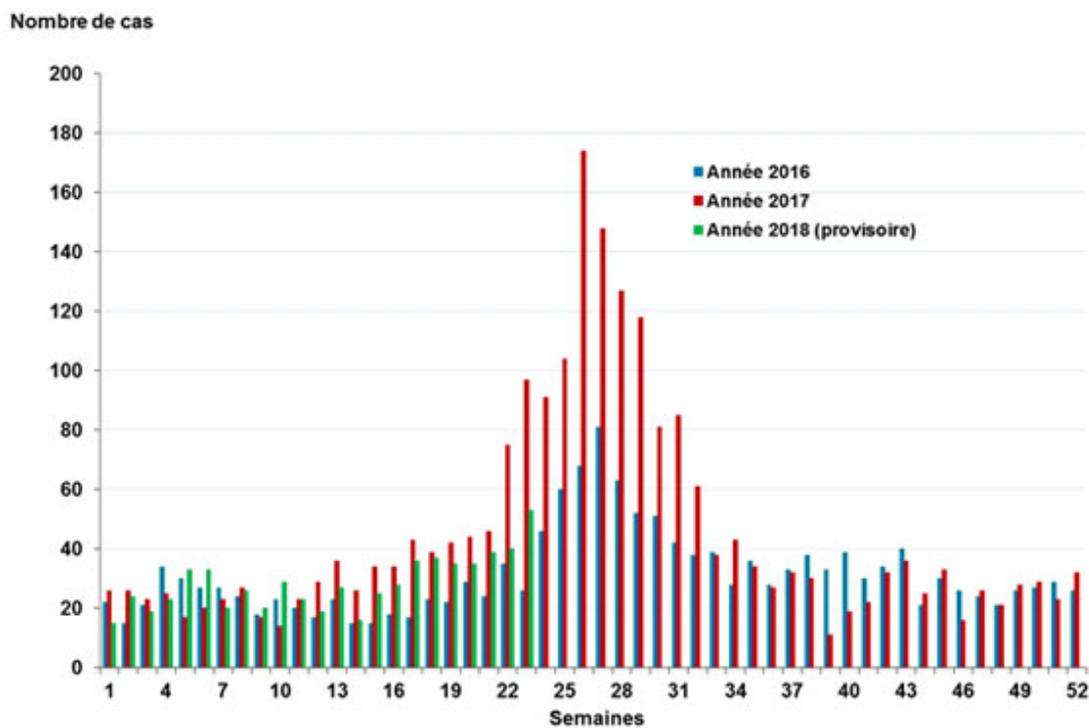
5. Quelques chiffres

Chaque année, environ 10 à 15 millions d'infections à entérovirus sont recensées aux Etats Unis, dont 7000 cas de méningites aseptiques. Ce taux de méningite est en réalité largement sous-estimé, les méningites virales étant pour la plupart non déclarées, et le nombre réel de cas avoisinerait plutôt les 70.000^{6,33}. Si en France, le chiffre est moins important, il n'en reste pas moins négligeable. Le dernier rapport du CNR faisait l'objet de plus de 2100 infections à

entérovirus en 2016. La plupart des patients (75%) présentaient de la fièvre et un peu moins de la moitié (40%) des signes neurologiques dont 26% un syndrome méningé.

A ce jour, la majorité des méningites sont d'origine virale avec pour principale étiologie les entérovirus, que ce soit chez l'adulte ou l'enfant³⁴. Près de 1400 méningites à entérovirus sont décrites chaque année en France³³. Heureusement, l'incidence des encéphalites est bien inférieure avec moins d'une dizaine de cas par an, de même que les cas d'ataxies et de paralysies sont très rares²⁴.

D'après les premières données sur l'année 2018, la distribution des méningites à entérovirus suit le même schéma que les années précédentes, avec une très légère augmentation dès le mois d'avril et une incidence un peu inférieure à celle observée en 2017²⁴ (Figure 11).



* Données Oscour/Santé Publique France; hôpitaux constants 2015-17 (274 services d'urgences adulte, 253 pédiatriques)

Figure 11 : Répartition du nombre d'infections à entérovirus au cours des trois dernières années²⁴

La distribution du nombre de cas est sensiblement la même chaque année avec un pic observé aux alentours de la semaine 28.

4) Diagnostic biologique d'une méningite à entérovirus

Le diagnostic biologique de certitude d'une méningite à entérovirus repose sur la détection de l'ARN viral par biologie moléculaire dans le LCR prélevé chez le patient. C'est un diagnostic prospectif qui nécessite une réponse rapide car il va conditionner la prise en charge du patient. Outre la détection du génome viral, d'autres critères comme la biochimie et la cytochimie du LCR constituent des éléments d'orientation qui peuvent conforter le diagnostic et qui étaient au premier plan avant l'ère de la PCR.

1. Analyse du Liquide Céphalo-Rachidien : critères biochimiques et cytologiques

Il est communément admis que les méningites à entérovirus sont des méningites à liquide clair et majoritairement lymphocytaire. Si ces critères se vérifient dans la plupart des cas, il faut cependant remarquer qu'ils ne sont pas toujours présents, l'examen cytologique pouvant même s'avérer peu discriminant pour le diagnostic.

Tout d'abord, concernant le caractère lymphocytaire du LCR, c'est une notion à considérer avec précaution. En effet, la formule leucocytaire est finalement très souvent retrouvée mixte, voire à prédominance granulocytaire, en cas de ponction très précoce dans l'histoire de la maladie⁶. C'est dans les 8 à 48h que le LCR deviendra essentiellement lymphocytaire, ce qui était autrefois un critère observé lors des ponctions lombaires de contrôle^{6,7}.

Autre critère variable : la pléiocytose. Elle se caractérise par une élévation des éléments nucléés du LCR. Généralement moins franche que dans les méningites bactériennes, le nombre de leucocytes se situe habituellement aux alentours de 100/mm³ (100-300/mm³ ²²) bien que des cas avec des valeurs normales ou au contraire beaucoup plus élevées ont pu être décrits^{6,7}.

Si la pléiocytose est généralement caractéristique des méningites, elle peut faire défaut dans 30% des cas⁶. Cela peut s'expliquer par la précocité du prélèvement (dans les premières heures de la maladie) ou le très jeune âge du patient (<3mois)^{6,35}. En effet, chez les nouveaux nés, 20% des LCR seront avec une pléiocytose pauvre, c'est-à-dire inférieure à 250

cellules/mm³. Il faut cependant remarquer que dans 10% des cas chez le nouveau-né, le LCR peut au contraire présenter plus de 1000 cellules/mm³ ^{6,36}.

D'après Song *et al.* ³⁷, les enfants avec un LCR sans pléiocytose présentent, comparativement à ceux qui en ont une, des signes cliniques (fièvre, vomissements et céphalées) moins importants, une protéinorachie moins élevée, un taux de leucocytes périphérique inférieur et une CRP (pour Protéine C-Réactive) plus basse. Cela suggérerait donc une relation entre l'importance de l'inflammation intrathécale et la présentation clinique typique de la méningite.

Au niveau de la biochimie, la glycorachie est habituellement normale même si quelques cas d'hypoglycorachie sont parfois observés. Quant à la protéinorachie, elle est normale ou parfois modérément augmentée, plus particulièrement chez l'enfant ^{6,22}.

D'autres paramètres sont généralement utilisés pour distinguer méningite virale ou bactérienne, même si aucune distinction ne pourra être faite avec les entérovirus en particulier. Il s'agit par exemple de la procalcitonine (PCT) : une PCT au seuil de 0,5ng/mL permettrait de différencier les deux étiologies avec une sensibilité de 99% et une spécificité de 83% ³⁸.

Des règles de décisions existent également, permettant au clinicien de s'orienter davantage vers l'une ou l'autre des étiologies. Trois sont à ce jour validées : le score d'Hoen, le Bacterial Meningitis Score ou encore le Meningitest, et combinent des critères biologiques que nous avons décrits plus haut associés à des paramètres cliniques ³⁸.

Enfin, plusieurs études ont également mis en évidence l'utilité des lactates dans le diagnostic différentiel entre méningites virales et bactériennes ^{39,40}.

2. Prélèvements associés au Liquide Céphalo-Rachidien

Outre la détection du génome viral dans le LCR, d'autres sites de prélèvements peuvent conforter le diagnostic d'infection à entérovirus notamment en cas de contexte épidémique ou d'impossibilité de réalisation d'une ponction lombaire. Par ailleurs, il est généralement recommandé de combiner plusieurs prélèvements sur des sites différents, la sensibilité de détection du virus étant ainsi augmentée ⁴¹.

Selon les recommandations de l’OMS, les selles, lieu d’excrétion virale, constituent un prélèvement de choix dans la détection des entérovirus. Prélèvement simple et non invasif, il est aussi celui qui présente la plus grande sensibilité⁴¹, le virus étant présent avec une charge virale plus importante que dans le LCR⁴² et pouvant persister plus d’un mois à ce niveau^{7,43}. Cependant, du fait de cette persistance accrue, il conviendra d’interpréter toute détection positive avec précaution en interprétant le résultat avec la symptomatologie clinique pour ne pas méconnaître un simple portage asymptomatique. Cela est d’autant plus vrai chez le patient immunodéprimé pour lequel l’entérovirus est parfois détecté pendant des années au niveau des selles.

En cas d’infections neurologiques, Harvala *et al.*⁴² recommandent en 2018 la détection des entérovirus au niveau du LCR mais aussi des prélèvements périphériques, à savoir les selles et la gorge. En effet, la réplication virale mais également l’excrétion du virus se déroulant au niveau oropharyngé, il apparaît judicieux d’effectuer des prélèvements de gorge où le virus sera présent en quantité plus importante, et pourra persister jusqu’à deux semaines⁴².

Des prélèvements respiratoires tels que des aspirations ou des écouvillonnages nasopharyngés, et du LBA sont également recommandés pour la recherche de certains sérotypes, comme l’EV68, préférentiellement retrouvé à ces niveaux et dans une moindre mesure dans les selles ou le LCR⁴².

Par ailleurs, d’autres prélèvements seront à réaliser en fonction du tableau clinique. Ces derniers sont résumés dans le tableau ci-dessous^{42,43}.

<i>Manifestations cliniques</i>	<i>Prélèvements</i>
Myocardite et pathologies cardiaques	Biopsie cardiaque, liquide péricardique Prélèvement respiratoire, sanguin, LCR
Conjonctivite hémorragique	Ecouvillonnage conjonctival
Méningite/méningoencéphalite	LCR + selles + prélèvement de gorge ou respiratoire Sang
Manifestations respiratoire/myélite flasque aigue	Prélèvement du tractus respiratoire, LBA Selles
Syndrome pieds-mains-bouche	Lésions vésiculeuses Gorge + selles
Rash maculopapuleux	Selles + gorge + oropharynx + nasopharynx
Infection néonatale systémique	Sang LCR + selles + prélèvement respiratoire
Pleurodynie Suspicion poliovirus	Liquide pleural + selles Selles

Tableau 2 : Prélèvements recommandés en fonction des manifestations cliniques⁴²

A noter que les prélèvements doivent être habituellement effectués dans les 4 jours suivant le début des symptômes (exception faite pour les selles et prélèvements respiratoires, où la durée de détection du virus est plus longue).

3. Mise en évidence du virus au sein des prélèvements

Si la mise en évidence des entérovirus fait aujourd'hui appel à des techniques de plus en plus performantes, il faut savoir que la technique la plus ancienne, à savoir la culture cellulaire orientée, reste toujours la méthode de référence, notamment pour le programme de surveillance des entérovirus établi par l'OMS.

Cette technique consiste à mettre en culture plusieurs lignées cellulaires humaines ou animales puis à les inoculer avec les prélèvements à analyser. Différents types de lignées cellulaires sont nécessaires du fait de l'existence de plusieurs espèces d'entérovirus et de la variabilité des récepteurs cellulaires utilisés entre souches². En cas d'infection par les entérovirus, on observera après quelques jours (2 à 12 jours) un effet cytopathogène rendant alors la cellule réfringente. Cet effet cytopathique pourra être confirmé par immunofluorescence indirecte ou immunohistochimie au moyen d'anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine VP1. Enfin le virus sera identifié par la technique de séroneutralisation³³.

Méthode permettant d'isoler le virus et d'effectuer des analyses épidémiologiques de typage, la culture cellulaire présente l'inconvénient d'être longue et fastidieuse. De plus, certains virus ne se multiplient pas en culture cellulaire pas comme les CV-A, sérotypes 1 à 6, c'est pourquoi elle a été progressivement supplantée en routine par les techniques de biologie moléculaire.

Dès les années 1990, l'amélioration des connaissances de la structure des entérovirus a permis la mise au point de méthodes de détection par le génome viral³³. C'est ainsi que la RT-PCR ciblant les entérovirus a vu le jour. Comme nous l'avons décrit plus haut, elle repose sur la détection de la région 5'NC très conservée au sein du genre *Enterovirus*.

Technique plus sensible que la culture cellulaire, notamment dans le LCR et les prélèvements respiratoires⁴⁴, elle s'est aussi avérée être très spécifique et surtout beaucoup plus rapide, les résultats pouvant être obtenus en quelques heures. De plus, contrairement aux autres méthodes, elle ne nécessite qu'une petite quantité de matériel.

La détection génomique a connu par ailleurs de nombreuses évolutions, la RT-PCR initialement en point final étant aujourd'hui remplacée par des RT-PCR en temps réel. Celles-ci présentent l'avantage d'être encore plus rapide (moins de 4h) et de nécessiter moins de manipulations et par conséquent moins de contamination de l'échantillon⁶.

Par ailleurs, des trousse commerciales avec un système complètement fermé ont été mises au point et permettent aujourd'hui d'obtenir un résultat en 2h.

Si de nouvelles trousse commerciales de plus en plus performantes ne cessent de voir le jour, il faut néanmoins garder à l'esprit que des PCR dites maisons sont toujours d'actualité et leurs résultats n'en sont pas moins inférieurs d'après les résultats des contrôles de qualité européens QCMD⁶.

Toutes ces techniques de RT-PCR permettent de rendre un résultat qualitatif (positif ou négatif), voire quantitatif si une gamme est utilisée³³.

D'autres méthodes se basant sur des techniques de séquençage ont également été mises au point. Elles permettent non seulement la détection mais aussi l'identification génotypique des souches à partir des séquences codantes de la polymérase ou des protéines structurales de capsid comme VP1 et VP2^{2,33}. Ces techniques permettent ainsi de réaliser des études épidémiologiques, indispensables pour la surveillance et le programme d'éradication des entérovirus.

Suite au rapport de la Haute Autorité de Santé (HAS) en 2014, la détection du génome des entérovirus par amplification génique dans le LCR est désormais devenue une analyse inscrite à la nomenclature des actes de biologie médicale. Elle précise cependant que cet examen doit se faire après examen biochimique et microscopique du LCR et apporte une aide diagnostic dans le cadre des méningites aiguës d'étiologie indéterminée. De plus, l'intérêt de ces techniques moléculaires réside dans le fait que les résultats doivent être obtenus dans les 24h, et en tout cas dans un délai inférieur à 48h, après la ponction³³.

A contrario, la sérologie virale est une analyse qui est maintenant non remboursée par l'Assurance maladie. Réalisé par ELISA ou séroneutralisation, ce moyen de diagnostic indirect est en effet peu utile lors d'une infection aiguë à entérovirus car elle fait part d'un trop grand nombre de réactions croisées entre sérotypes et d'une faible sensibilité^{42,45}. Par ailleurs, la population étant aujourd'hui majoritairement vaccinée contre la poliomyélite, un

suivi en cinétique est nécessaire afin de voir apparaître une éventuelle ascension du titre d'anticorps après 15 jours témoignant d'une infection active.

La sérologie virale pourrait seulement contribuer au diagnostic des infections cardiaques à entérovirus lorsque des prélèvements locaux, à type de biopsie myocardique ou liquide péritonéal, sont impossibles⁴².

4. Pratique au Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse

Au laboratoire de virologie du CHU de Toulouse, deux techniques de PCR qualitatives sont actuellement utilisées pour la détection des entérovirus : une RT-PCR en temps réel développée en interne et une RT-PCR en temps réel automatisée.

La technique première PCR dite « maison » est une technique réalisée pour tous les services demandeurs durant les jours ouvrables du laboratoire. Elle a été mise au point d'après les données de Verstrepen *et al.*⁴⁴, et s'applique pour la recherche des entérovirus dans plusieurs prélèvements : LCR, sang total, liquide de ponctions (liquide pleural, liquide péricardique), LBA, prélèvements cutanéomuqueux (vésicules cutanées et nasopharynx), selles, prélèvements de gorge, aspirations nasales et biopsie.

Dans cette technique, l'extraction est automatisée, de même que la rétro-transcription et l'amplification qui se font en une seule étape, ce qui permet un rendu de résultats en deux jours.

Ce délai peut être trop long pour orienter la prise en charge des méningites au sein des services de pédiatrie et explique le recours à une deuxième technique de PCR. C'est une RT-PCR entièrement automatisée (de l'extraction à la détection) réalisée sur le système GeneXpert de la société Cepheid (trousse Xpert EVTM). Elle présente l'avantage d'être simple d'utilisation et surtout rapide puisqu'elle permet l'obtention d'un résultat en un peu plus de deux heures et demie.

Son usage est réservé aux LCR, sur prescription explicite, provenant des urgences pédiatriques en horaire de garde de nuit (de 18h à 8h) mais aussi en semaine ainsi que les samedis matins.

Tous les échantillons retrouvés positifs sont ensuite déclarés et adressés pour typage au Réseau de Surveillance des Entérovirus que nous avons décrit plus haut.

5) Pronostic, traitement, et prévention des infections à entérovirus

1. Entérovirus non poliomyélitiques

La majorité des infections à entérovirus non poliomyélitiques se traduisent par des signes cliniques peu spécifiques et sont de bon pronostic.

Dans les cas les plus graves, comme lors des atteintes du SNC, une hospitalisation peut être nécessaire mais le seul traitement reste symptomatique.

Actuellement en cours d'études, plusieurs molécules ont montré un effet prometteur dans l'amélioration des signes cliniques, notamment en cas d'encéphalite, et seront peut-être un jour commercialisées pour le traitement des infections à entérovirus¹⁴.

Le Pléconaril est une molécule active contre de nombreux entérovirus qui se lie à la protéine de capsid VP1 et induit un changement conformationnel. Ce dernier aura pour conséquences d'empêcher l'attachement du virus à son récepteur cellulaire et de bloquer le relargage de l'ARN viral de la nucléocapside¹⁴.

Le Pléconaril a la particularité de traverser la barrière hémato-encéphalique et de persister à une concentration suffisante dans le LCR pour exercer son action inhibitrice. Dans leur étude, Desmond *et al.*⁴⁶ ont montré qu'il réduisait significativement la durée des signes cliniques (céphalées) y compris chez les patients immunodéprimés. Abzug *et al.*⁴⁷ ont quant à eux, mis en évidence une réduction du temps de portage et une amélioration de la survie dans le cas d'infections néonatales traitées par Pléconaril.

Lors des épidémies à EV71 en Asie, des immunoglobulines ont été administrées par voie intraveineuse en supposant que ces dernières neutraliseraient le virus et auraient des

propriétés non inflammatoires⁴⁸, mais des études supplémentaires sont nécessaires pour prouver une telle efficacité dans les infections à entérovirus.

Ajoutons que la Ribavirine, déjà commercialisée dans d'autres indications, a aussi fait l'objet d'études sur son action sur les entérovirus. D'après la littérature, cet analogue nucléosidique induirait des mutations génomiques après incorporation au génome viral, responsable par la suite de production de virions non infectieux et de la mort du virus¹⁴. Si son efficacité sur EV71 semble prometteuse, il convient de signaler que des cas de résistance ont aussi été démontrés avec les poliovirus¹⁴.

Des vaccins candidats ont été mis au point, notamment contre l'EV71 en Chine, afin de prévenir la maladie pieds-mains-bouche. Monovalents et dirigés contre la souche d'entérovirus prédominante au sein de chaque région, ces vaccins à l'efficacité plutôt prometteuse ont rapidement vu leur limite. En effet, la protection n'est pas croisée entre les différents sérotypes d'entérovirus alors que plusieurs souches sont généralement circulantes. La mise au point d'autres vaccins est aujourd'hui encore à l'étude mais les phénomènes de mutations spontanées et les recombinaisons génomiques compliquent leur développement²⁰.

En ce qui concerne les autres moyens de prévention, des mesures d'hygiène simples sont recommandées par le CDC afin d'éviter les transmissions et tout risque de contamination⁴⁹. Elles consistent à se laver régulièrement les mains au savon, surtout après passage aux sanitaires et changement des couches, d'éviter tout contact rapproché avec des personnes malades, en évitant par exemple de serrer les mains, et enfin de nettoyer et désinfecter régulièrement toutes les surfaces de contact.

2. Entérovirus poliomyélitiques

Il n'existe pas à ce jour de traitement curatif contre la poliomyélite mais seulement une prise en charge des handicaps provoqués par la maladie. Seule la vaccination permet la prévention de la maladie, c'est pourquoi l'OMS a lancé, comme nous l'avons décrit plus haut, un programme d'éradication de la poliomyélite en mettant en place un vaste réseau de surveillance et programme de vaccination de tous les enfants dans le monde.

Le premier vaccin anti-poliomyélique fut mis au point aux Etats Unis par Jonas Salk en 1954 et en parallèle par Pierre Lépine en France en 1957. Vaccins inactivés, ils permettent une immunisation contre les trois sérotypes de poliovirus mais nécessitent des rappels réguliers et présentent un certain coût. Ils ont par la suite été mis de côté au profit d'un nouveau vaccin oral développé par Albert Sabin en 1961. Ce dernier, de type vaccin vivant atténué, présentait l'avantage d'une immunisation plus rapide avec une méthode d'utilisation plus simple et un moindre coup. Il a malheureusement été la source d'accidents paralytiques d'où la recommandation en 1982, par la Direction Générale de la Santé, d'utiliser en France le vaccin inactivé. Actuellement, c'est ce dernier qui est privilégié en pratique courante, le vaccin oral étant réservé aux situations épidémiques.

En France, la poliomyélite est une maladie à déclaration obligatoire depuis 1936 et la vaccination a été rendue obligatoire en 1964.

Grâce à ces méthodes de prévention, l'OMS a déclaré en 2015 l'éradication du poliovirus de type 2 et aucun cas de poliovirus de type 3 n'a été signalé depuis 2012. Seul le poliovirus de type 1 circulerait encore dans trois pays : le Pakistan, le Nigeria et l'Afghanistan. D'après le rapport de Martinez⁵⁰, le nombre annuel de cas est stable depuis 2016 mais le problème majeur dans l'éradication du virus réside dans la difficulté des accès aux soins dans certaines régions où règne l'insécurité. Pour le Nigeria, la circulation du poliovirus reste indétectable depuis 2016 mais là encore des problèmes d'insécurité entravent l'accès à la vaccination et à la surveillance de la circulation des entérovirus⁵¹. Ce pays est actuellement confronté à une épidémie provoquée par la circulation d'une souche de poliovirus de type 2 dérivée de la souche vaccinale avec des débuts de paralysies déclarées en juillet 2018. Une surveillance renforcée et permanente apparaît donc nécessaire dans l'espoir d'atteindre dans les années à venir les objectifs d'éradication des poliovirus⁵².

OBJECTIFS DES TRAVAUX DE LA THESE

La virologie moléculaire étant devenue un outil clé dans le diagnostic des méningites à entérovirus, des techniques de plus en plus performantes ont été développées au cours de ces dernières années.

Au Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse, l'une d'entre elles est utilisée : la PCR Cepheid Enterovirus (ou PCR Cepheid-EV) du système GeneXpert®.

Cependant, son coût élevé a dû restreindre son usage au diagnostic des méningites à entérovirus (EV) chez les patients admis aux urgences pédiatriques pour lesquels une demande expresse a été notifiée, et durant des horaires bien définies. Les autres prescriptions de recherche d'entérovirus sont alors effectuées par une technique de PCR développée en interne (ou LDT-EV pour Laboratory Developed Test Enterovirus).

L'objectif de ce travail consiste à analyser les critères favorisant la prescription de l'une ou l'autre des techniques de PCR, et à connaître l'impact médical et économique que peut avoir l'utilisation de chacune de ces méthodes dans la prise en charge des jeunes patients.

MATERIELS ET METHODES

1) Patients

Il s'agit d'une étude rétrospective menée au CHU de Toulouse sur des patients pour lesquels une PCR entérovirus était retrouvée positive dans le liquide céphalo rachidien. Ces patients avaient été admis initialement dans le service des urgences pédiatriques de l'Hôpital des Enfants et étaient âgés de 0 à 15 ans.

La période d'étude s'étendait sur l'année 2016, du 1^{er} janvier au 31 décembre.

Au vu de l'ensemble de ces critères, 78 enfants ont ainsi été inclus.

2) Méthode

1. Recueil des données

La sélection des patients a été réalisée à partir d'une extraction des résultats de PCR entérovirus dans le LCR positives en 2016, sur le Système Informatique du Laboratoire MOLIS.

Des données démographiques, cliniques, biologiques et thérapeutiques ont par la suite été colligées, de même que des informations sur les séjours des patients concernés. Ces renseignements ont été issus à la fois de MOLIS (données biologiques et de séjour) mais également des dossiers papiers des patients et des logiciels informatiques ORBIS® et URQUAL® (pour toutes les autres données).

Ajoutons que les données de codification de séjour des patients en Groupe Homogène de Malades (GHM), les libellés des diagnostics, et les valorisations des séjours ont été fournis par le Département d'Information Médicale du CHU (DIM).

Pour chaque patient, plusieurs données ont été réunies :

- Données démographiques :
 - **Age** (avec une distinction entre les enfants de moins de 3 mois et de plus d'un an)
 - **Sexe**

- Données cliniques :
 - **Motif d'hospitalisation et diagnostic retenu**
 - **Température maximale du patient**
 - Durée d'évolution de la fièvre avant réalisation de la ponction lombaire
 - Durée totale des symptômes (céphalées, vomissements, fièvre ou autre) avant la ponction lombaire
 - **Présence de critères de mauvaise tolérance de la fièvre**
 - Présence de facteurs d'infections materno-fœtales (IMF) et le cas échéant, type de facteur d'IMF

- Données biologiques :
 - CRP initiale, **CRP maximale** et nombre total de dosages de CRP réalisés
 - PCT initiale, **PCT maximale** et nombre total de dosages de PCT réalisés
 - Bilans de sérologie
 - Résultats bactériologiques divers (**hémocultures**, coproculture, examen cytobactériologique des urines (ECBU) et autres analyses bactériologiques)
 - Résultats virologiques (obtenus sur échantillons de sang total, écouvillonnage naso-pharyngé, prélèvement de gorge ou de selles)

- Données concernant le LCR :
 - **Prélèvement effectué en garde de nuit ou le week-end**
 - **Communication téléphonique au service des résultats positifs**
 - **Type de PCR réalisée** (PCR Cepheid-EV ou PCR LDT-EV)
 - **Hypoglycorachie**
 - **Hyperprotéinorachie**
 - **Cellularité (nombre d'éléments nucléés, normalité en rapport avec l'âge du patient, nombre de polynucléaires neutrophiles, de lymphocytes, de**

monocytes et en fonction, **type cellulaire du LCR : granulocytaire, lympho-monocytaire ou panaché**)

- Autres résultats virologiques (détection moléculaire de CMV, HSV, VZV et EBV)
- Résultats bactériologiques

- Données thérapeutiques :
 - **Soins de réanimation** (expansion volémique)
 - Réalisation d'imagerie (**scanner cérébral**)
 - Antibiothérapie administrée avant la ponction lombaire
 - **Traitement** (antibiotique ou antiviral) **suite à la ponction lombaire et durée du traitement**
 - Diagnostic associé à la méningite justifiant la poursuite d'une antibiothérapie

- Données de séjour du patient :
 - **Période épidémique pour les EV** (de mai à octobre)
 - **Hospitalisation en aval du patient** et le cas échéant service concerné
 - **Durée d'hospitalisation aux urgences et dans les services d'aval**
 - **Durée totale du séjour, en heures et en jours facturés**
 - **Valorisation du séjour**
 - **Diagnostic de méningite retenu et libellé détaillé du diagnostic**

L'ensemble des données a été reporté dans un tableur au moyen du logiciel Microsoft Excel. C'est ensuite par un regard critique porté sur les résultats de ces données collectées que nous avons retenu celles qui semblaient les plus pertinentes pour l'analyse statistique : il s'agit de celles mises en caractères gras dans la liste ci-dessus (cf partie Résultats).

2. Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée par le logiciel STATA.

Elle reposait dans un premier temps sur une analyse univariée nous permettant de mettre en évidence une éventuelle association entre chaque paramètre à étudier (ou variables

explicatives) et notre « outcome » (ou variable à expliquer) à savoir le type de PCR (LDT-EV ou Cepheid-EV).

Dans cette analyse, des tests d'indépendance du Chi2 ou des tests exacts de Fisher (si $n < 5$) ont été utilisés pour les variables qualitatives et quantitatives discrètes, et des tests de Student pour les variables quantitatives continues.

Le lien entre deux paramètres était considéré comme significatif si la valeur du p était inférieure ou égale à 0,05.

Par la suite, toutes les variables explicatives qui étaient associées à notre « outcome » de manière suffisamment forte (c'est-à-dire avec une valeur du $p \leq 0,20$) ont été incluses dans le modèle initial de la seconde partie de l'analyse. Cette dernière consistait en une régression logistique permettant de relier notre « outcome » (type de PCR) aux variables explicatives en tenant compte des facteurs de confusion potentiels.

Une procédure dite « pas à pas descendante » nous a alors conduit au modèle final où seules les variables ayant un seuil de significativité inférieur à 0,05 ont été conservées.

Dans ce modèle d'analyse multivariée, la force de l'association entre la variable explicative et notre variable d'intérêt a pu être estimée au moyen d'odds ratio (OR).

3. PCR utilisées au Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse

Comme nous l'avons vu plus haut, deux types de PCR sont réalisées au CHU de Toulouse. Une première PCR développée en interne, ou LDT-EV, est réalisée quotidiennement en horaire de journée et les jours ouvrables de la semaine. Cette technique analyse au plus 30 échantillons par série et nécessite une extraction préalable de l'ARN viral. Elle permet un délai de rendu de résultats variable, entre 24h et 72h, selon l'heure de réception du prélèvement.

La deuxième PCR, ou Cepheid-EV, est réservée aux LCR prélevés aux urgences pédiatriques pour lesquels une demande expresse du clinicien a été notifiée. Cette PCR est effectuée lors des périodes de gardes de nuit et de weekend mais peut également être réalisée en journée si la clinique le justifie. Les analyses sont ainsi effectuées au coup par coup avec un délai de rendu de résultats de 2h30.

i. *PCR Cepheid Enterovirus*

a. Principes généraux

Il s'agit d'une RT-PCR en temps réel entièrement automatisée (de l'extraction à la détection) réalisée dans un système fermé.

Elle permet une détection qualitative de l'ARN des entérovirus dans des échantillons de LCR et présente entre autres l'avantage d'être rapide ; le résultat étant obtenu en 2h30.

Cette PCR nécessite un système d'automate dit GeneXpert® qui se compose de l'appareil effectuant les analyses ainsi que d'un ordinateur où le logiciel correspondant est installé (Figure 12).

Deux automates de ce type existent actuellement au CHU de Toulouse, un système GeneXpert® à 4 positions réservé au traitement des LCR en période de garde, et un second système GeneXpert® GX-XVI à 12 positions qui reste en « backup » dans cette indication. Il est en effet utilisé en routine pour d'autres détections de microbiologie.

Toutes les étapes de la PCR se déroulent ensuite dans une cassette fournie dans la trousse Xpert EV assay. Cette trousse comprend également des réactifs qui seront déposés, comme le LCR, dans des zones dédiées de la cassette. Celle-ci sera introduite dans l'automate GeneXpert® et à l'issue de la PCR, les résultats (qui comprennent également l'analyse d'un contrôle interne) seront affichés par le logiciel informatique.

Ces cassettes ont la particularité d'être jetables et à usage unique, limitant ainsi tout risque de contamination croisée des échantillons.



Figure 12 : Représentation du système GeneXpert®

A gauche, les cassettes où seront introduits les réactifs et le LCR. Elles seront installées dans le dispositif à leur droite, lui-même relié à un ordinateur permettant l'enregistrement des échantillons et la lecture des résultats.

Le kit Xpert EV assay se compose de 4 réactifs liquides qui peuvent être conservés à température ambiante (2-28°C) et doivent être utilisés dans les 30 minutes après ouverture. Trois réactifs doivent être déposés dans leur totalité, et par ordre séquentiel, dans la cassette au niveau de trois emplacements dédiés. Seul le réactif 4 nécessite un dépôt précis de 140µL. A ce réactif de lyse est ajoutée la même quantité de LCR à analyser.

Catégories de réactifs (Figure 13) :

- Le réactif 1 ou réactif de fixation doit ainsi être introduit dans le puits 1
- Le réactif 2 ou réactif de lavage dans le puits 2
- Le réactif 3 ou réactif d'élution dans le puits 3
- 140 µL de réactif 4 ou réactif de lyse dans le puits 4S

A côté de ces 4 réactifs liquides, des réactifs sous formes de billes lyophilisées sont déjà présents dans chaque cassette :

- Des billes de réactifs 1 contenant la transcriptase inverse, les nucléotides (dNTPs), l'inhibiteur de ribonucléases et du sérum albumine bovin (SAB)
- Des billes de réactifs 2 avec les amorces anti-sens d'oligonucléotides et du SAB
- Des billes de réactifs 3 avec la polymérase, des dNTPs et du SAB
- Des billes de réactifs 4 avec les amorces sens d'oligonucléotides, les sondes d'oligonucléotides aux étiquettes fluorescentes et du SAB
- Des billes de réactifs 5 avec le contrôle interne SCI/IC et du SAB



Figure 13 : Réactifs du kit Xpert EV assay

La préparation de l'échantillon est simple puisqu'elle consiste à introduire chaque réactif dans un puits spécifique puis le LCR au niveau de la cassette.

La procédure se veut être simple et rapide puisque le fournisseur assure pouvoir réaliser la préparation de la cassette en moins de 5 minutes.

Une fois tous les réactifs et le LCR introduits, une étape d'enregistrement de la cassette est nécessaire sur le logiciel GeneXpert Dx de l'ordinateur avant de l'insérer au niveau du système GeneXpert.

Comme pour la PCR LDT-EV que nous allons détailler plus bas, la PCR automatisée débute par une étape d'extraction de l'ARN viral. Elle est ensuite suivie de la synthèse d'ADN complémentaire avant de subir les étapes finales d'amplification et de détection.

L'amplification peut être suivie après quelques minutes au moyen de courbes d'amplification sur le logiciel informatique. En cas de résultats positifs, le nombre de cycle de sortie ou cycle threshold (Ct) est également notifié.

Dans cette technique, deux contrôles internes sont utilisés. Le premier contrôle interne ou SPC/IC correspond à pseudo-virion d'ARN encapsidé qui est inclus dans chaque cassette sous forme de billes de réactifs. Il permet de valider les différentes étapes de la PCR en vérifiant notamment le traitement approprié du virus cible et l'absence d'inhibiteurs.

Le deuxième contrôle, appelé contrôle de la sonde, permet quant à lui de vérifier la bonne réhydratation des réactifs, l'intégrité de la sonde et le niveau de remplissage du tube de réaction à l'intérieur de la cassette. Son analyse est réalisée automatiquement par l'instrument avant le début de chaque PCR.

Si le contrôle de la sonde est valide lors de la PCR et que le contrôle interne est amplifié, alors les résultats de la PCR seront valides.

Ils seront « POSITIFS » si le système a détecté l'ARN d'entérovirus, ou « NEGATIFS » dans le cas contraire. En revanche, si le contrôle interne reste négatif, le résultat de l'échantillon devient « INVALID », sauf dans le cas particulier où de l'ARN amplifié dans l'échantillon est entré en compétition avec le contrôle. Dans ce cas le résultat de la détection des EV est « POSITIF ».

Enfin, devant un contrôle de la sonde en échec (« FAIL »), la technique ne peut être validée et les résultats des échantillons apparaîtront en « ERROR ».

b. Caractéristiques et performances de la méthode

Les amorces de la PCR Cepheid EV ciblent la région 5'NC du génome de l'entérovirus qui est comprise entre les nucléotides 452 et 596. Cela offre la possibilité d'un large panel de détection avec notamment les trois espèces de poliovirus et les principaux coxsackievirus et échovirus.

La liste des espèces détectées par la PCR Cepheid-EV est ainsi résumée dans le tableau ci-après : seul le coxsackievirus A1 n'est pas détecté par cette technique (Figure 14).

Species	Serotypes
A	Coxsackie A2-A8, A10, A12, A14, A16, EV71
B	Coxsackie A9, B1-B6, Echo 1-7, 9, 11-21, 24-27, 29-33, EV69
C*	Coxsackie A11, A13, A15, A17-22, A24
D	EV68, EV70
Poliovirus	Poliovirus 1-3

Figure 14 : Espèces détectées par la PCR Cepheid-EV

Les trois types de poliovirus, de nombreux échovirus, coxsackievirus A et B, et les entérovirus émergents EV68 et EV71 sont détectés par la méthode.

D'après les données du fournisseur, la technique présente de bonnes sensibilité et spécificité analytiques, avec une reproductibilité d'au moins 90%. De plus, elle peut être appliquée en cas de liquides sanguins ou hyperprotéiques.

ii. *PCR Enterovirus « maison » ou Laboratory Developed Test Enterovirus*

La PCR utilisée en routine pour la recherche d'entérovirus est une RT-PCR qualitative développée en interne. Contrairement à la PCR Cepheid-EV, nous avons vu dans la première partie qu'elle est validée pour la recherche des entérovirus dans de nombreux prélèvements (sang, LCR, liquides de lavage broncho-alvéolaire, liquides pleuraux, liquides péricardiques, prélèvements cutanéomuqueux, selles, prélèvements de gorge, aspirations nasales et biopsies).

Une étape préalable à cette RT-PCR consiste en l'extraction du matériel génétique à partir des échantillons à analyser. Cette extraction est réalisée sur l'automate MagNA Pure™ 96 au moyen de la trousse « MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit™ » de la société Roche Diagnostics ; le principe de cet automate repose sur une extraction au moyen de billes magnétiques.

Au cours de cette étape, une extraction d'ARN d'un contrôle positif interne (qui correspond à un entérovirus obtenu par culture) est également réalisée. Ce témoin sera par la suite analysé comme les échantillons et servira à valider le déroulement correct de l'ensemble de la technique.

La deuxième étape correspond à la synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) à partir du brin d'ARN extrait. Elle repose sur des enzymes, les transcriptases inverses (ou Reverse Transcriptase), qui sont des ADN polymérases ARN dépendantes. Elle est initiée à partir d'une amorce spécifique, appelée RNC1.

Une fois le brin d'ADN complémentaire synthétisé, la PCR, c'est à dire l'amplification de l'ADN, pourra commencer.

Au laboratoire de virologie du CHU de Toulouse, ces étapes de rétro-transcription et d'amplification sont réalisées sur l'automate LightCycler II et au sein d'un même tube

(capillaire) de réaction, la technique est ainsi qualifiée de « one step ». Ce type de RT-PCR en une seule étape présente l'avantage d'être plus simple qu'une technique en deux étapes où la transcription inverse est réalisée dans un premier contenant puis l'amplification dans un autre à partir de l'ADNc néo-synthétisé.

De plus, elle permet de réduire les risques de contamination et de variation, et elle peut être employée pour un grand nombre d'échantillons (Figure 15).

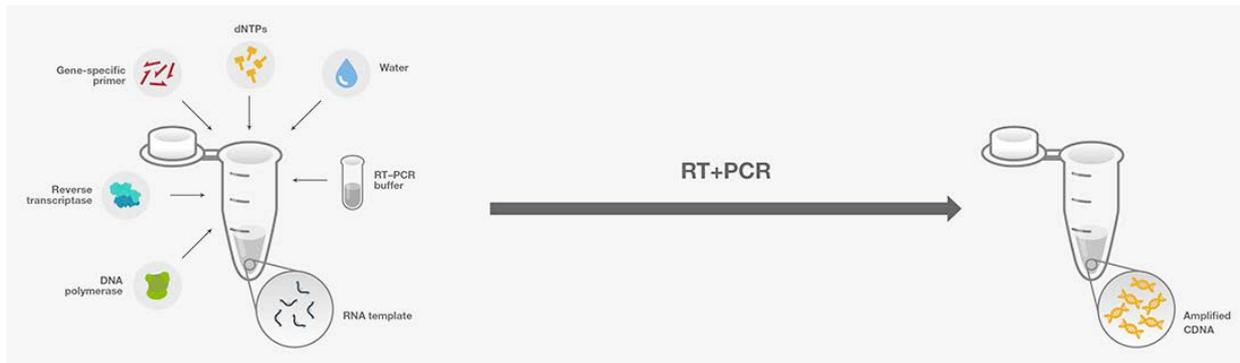


Figure 15 : Principe de la RT-PCR en une seule étape

L'ensemble des réactifs nécessaires à la rétro-transcription et à l'amplification du génome est introduit dès le départ avec l'ARN. Toute la réaction se déroulera dans un même tube, il n'y aura pas d'étape de recueil de l'ADNc puis amplification dans un second tube en présence de nouveaux réactifs comme dans la RT-PR en deux étapes.

Une fois la synthèse d'ADNc effectuée, la PCR se déroule alors par une succession de cycles alternant une phase de dénaturation des doubles brins synthétisés, une phase d'hybridation des amorces (sens et anti-sens) sur chacun des brins séparés, et une phase d'élongation (Figure 16).

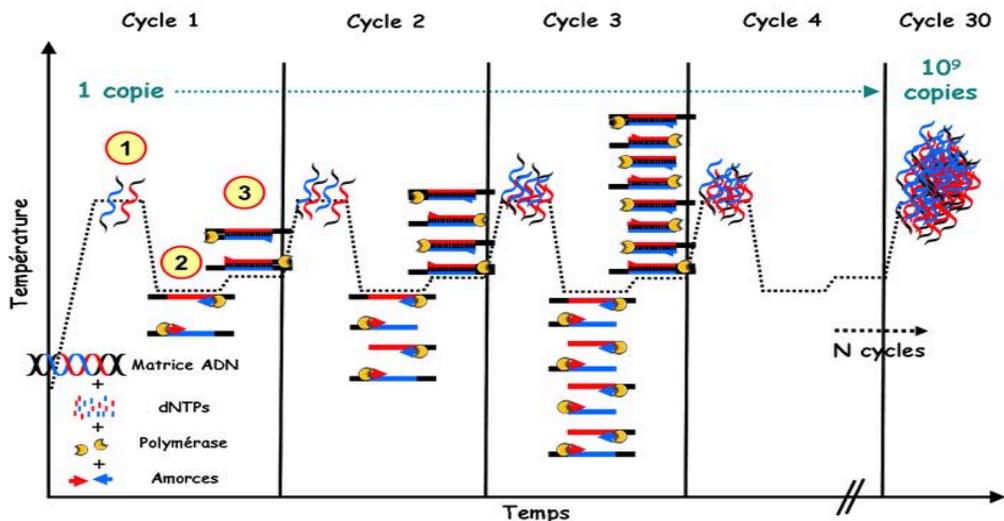


Figure 16 : Principe de la PCR

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

Chaque cycle se produit à une température et pendant une durée bien spécifiques (Tableau 3). En effet, si la phase de dénaturation nécessite une température élevée afin de séparer les doubles brins, la phase d'hybridation des amorces doit se faire à une température beaucoup plus basse (température d'hybridation), qui doit à nouveau augmenter lors de la phase d'élongation pour permettre à la polymérase d'agir dans des conditions optimales.

A la fin de l'élongation, des brins d'amplification de 151 paires de base sont obtenus.

<i>Étapes</i>	<i>Dénomination sur Light Cycler</i>	<i>Programme</i>	<i>Nb de cycles</i>	<i>Mesure de fluorescence : CODE L.C</i>
Reverse transcriptase	RT	55 minutes à 49°C	X1	Pas de mesure : NONE
Dénaturation initiale	DENAT	10 minutes à 93°C	X1	Pas de mesure : NONE
Amplification	PCR	15 secondes à 93°C (dénat.)		Pas de mesure : NONE
		10 secondes à 57°C (hybridation)	X43	Pas de mesure : NONE
		60 secondes à 61° C Rampe 0.5°C/ secondes		Mesure : SINGLE
Refroidissement	COOLING	30 secondes à 40°C	X1	Pas de mesure : NONE

Tableau 3 : Programme de la PCR LDT-EV appliqué au laboratoire de virologie

Au cours de l'élongation, chaque brin néo-synthétisé sera détecté en temps réel par une sonde à hydrolyse de type Taqman qui émettra une fluorescence. L'émission sera détectée sur un canal choisi de l'automate et le Ct de chaque échantillon sera précisé en cas de résultats positifs.

A côté du contrôle positif, un blanc de la méthode est systématiquement réalisé au moyen d'un capillaire contenant de l'eau distillée et le mix réactionnel dans le LightCycler. Les résultats de la PCR seront ainsi valides si le contrôle ressort positif et le blanc négatif.

Cette RT-PCR a été mise au point selon les données de Verstrepen *et al.*⁴⁴ et permet la détection de la grande majorité des sérotypes d'entérovirus.

Les réactifs nécessaires à la rétro-transcription et à l'amplification sont apportés par le kit « SuperScript III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR System » de la société Invitrogen (enzymes et mélange d'ions, de désoxynucléotides, de tampons de réaction et de MgSO₄).

En ce qui concerne les amorces et la sonde, elles sont commandées auprès de différents fournisseurs (Eurofins et Sigma-Aldrich) et sont initialement sous formes lyophilisées, une étape de dilution efficace est nécessaire avant la PCR.

Trois types d'amorces spécifiques de la région non codante 5'NC sont utilisées :

- Une amorce pour la rétro-transcription : 5' CAC YGG ATG GCC 3'
- Une amorce sens : 5' CCC TGA ATG CGG CTA ATC C 3'
- Une amorce anti-sens : 5' ATT GTC ACC ATA AGC AGC CA 3'

Quant à la sonde, il s'agit d'une séquence 5'-6FAM-AAC CGA CTA CTT TGG GTG TCC GTG TT XT C—PH (X = TAMRA), détectée sur le canal 530 / 640 du LightCycler.

RESULTATS

1) Epidémiologie des PCR Enterovirus dans le Liquide Céphalo-Rachidien au cours des deux dernières années

Au cours de l'année 2016, 600 PCR EV, toutes techniques confondues, ont été réalisées sur des LCR d'enfants de moins de 15 ans prélevés dans les services pédiatriques du CHU de Toulouse.

Certains résultats ont été exclus de l'étude :

35 PCR (28 PCR EV négatives et 7 PCR EV positives) ont été effectuées pour un même échantillon par les deux méthodes (LDT-EV et Cepheid-EV) et ont été comptabilisées une seule fois en cas de résultats concordants. Elles ont été répertoriées dans la catégorie PCR Cepheid-EV, cette PCR étant logiquement effectuée en cas d'urgence et son résultat étant rendu rapidement.

3 résultats de PCR étaient discordants entre les deux techniques et 6 résultats de PCR Cepheid-EV étaient ininterprétables. Ces échantillons n'ont pas été retenus.

24 enfants ont également bénéficié à deux reprises de la recherche d'EV sur des échantillons différents reçus à quelques heures d'intervalle. Ils ont été comptabilisés une seule fois par la méthode Cepheid-EV dès lors qu'elle était réalisée.

En appliquant ces critères, on retient au cours de l'année 2016, 78 PCR EV positives qui feront l'objet de notre étude et 447 PCR EV négatives.

Si l'année 2016 a été sélectionnée pour ce travail, c'est qu'elle fait part d'une répartition statistique plus homogène entre les deux groupes de PCR EV positives (Cepheid-EV vs LDT-EV). En effet, sur les 78 PCR EV positives, 34 ont été détectées par la méthode LDT-EV et 44 par la méthode Cepheid-EV.

A contrario, si l'on évalue l'année 2017, 612 PCR EV ont été effectuées sur des échantillons de LCR chez les moins de 15 ans.

En appliquant les mêmes conditions que précédemment, 447 PCR EV étaient négatives et 117 positives. Parmi ces dernières, 104 PCR EV étaient réalisées par la trousse Cepheid-EV et 13 par la technique LDT-EV, ce qui constitue une inégalité d'effectif trop importante pour une étude comparative entre les deux méthodes.

Toutes ces données sont résumées dans les figures ci-dessous.

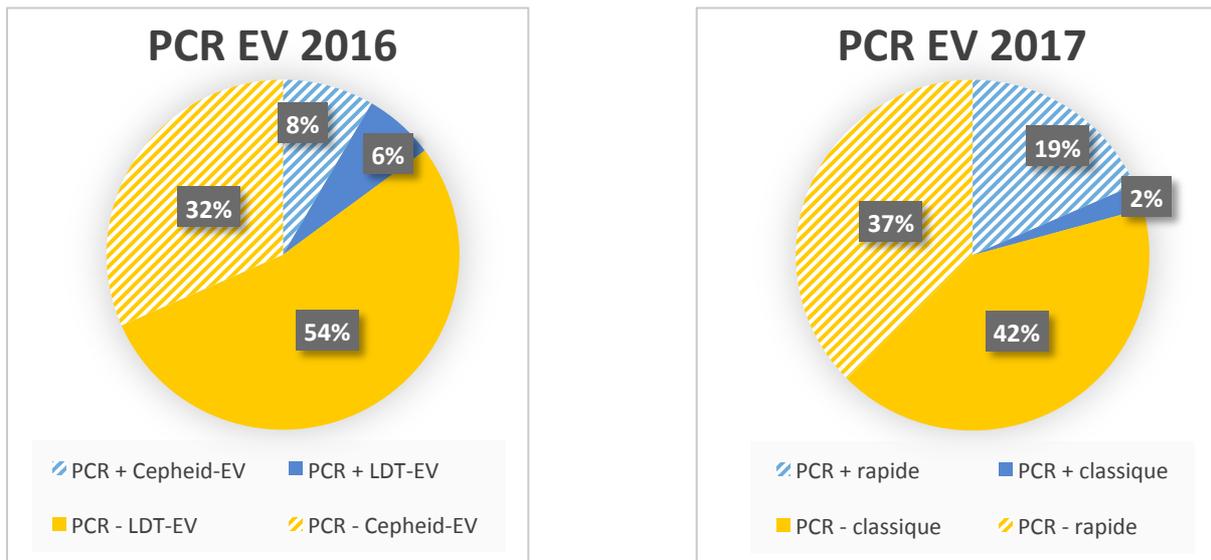


Figure 17 : Répartition des résultats de PCR EV au cours des deux dernières années

Au cours de l'année 2016, des proportions presque équivalentes de PCR LDT-EV et PCR Cepheid-EV ont été détectées positives (en bleu sur les graphiques) contrairement à l'année 2017 où les résultats positifs étaient prédominants en PCR Cepheid-EV. Pour ces deux années, respectivement 86% et 79% des échantillons ont été négatifs (en jaune sur les graphiques).

2) Caractéristiques de la population

Parmi les 78 enfants pour lesquels une détection d'EV dans le LCR s'est avérée positive, 42 (53,8%) étaient âgés de moins de 3 mois, 2 (2,6%) avaient un âge compris entre 3 mois et 1 an, et 34 (43,6%) étaient âgés de plus d'un an.

L'âge variait ainsi de 0 à 178 mois avec une moyenne de 39 mois et une médiane de 2 mois.

Le sex-ratio H/F était de 1,89 avec 51 enfants de sexe masculin et 27 de sexe féminin.

D'après les données de Santé Publique France, les épidémies principales à entérovirus se déclarent généralement en juin-juillet et sont suivies d'une seconde épidémie de moindre ampleur au mois d'octobre. Cependant, certaines épidémies peuvent débuter dès le mois de mai.

Il a ainsi été décidé d'attribuer aux échantillons prélevés entre le 1^{er} mai et le 31 octobre le critère « prélèvement réalisé en période épidémique ».

56 (71,8%) enfants avaient contracté une méningite à EV en période épidémique alors que 22 (28,2%) l'avaient contracté en dehors de cette période.

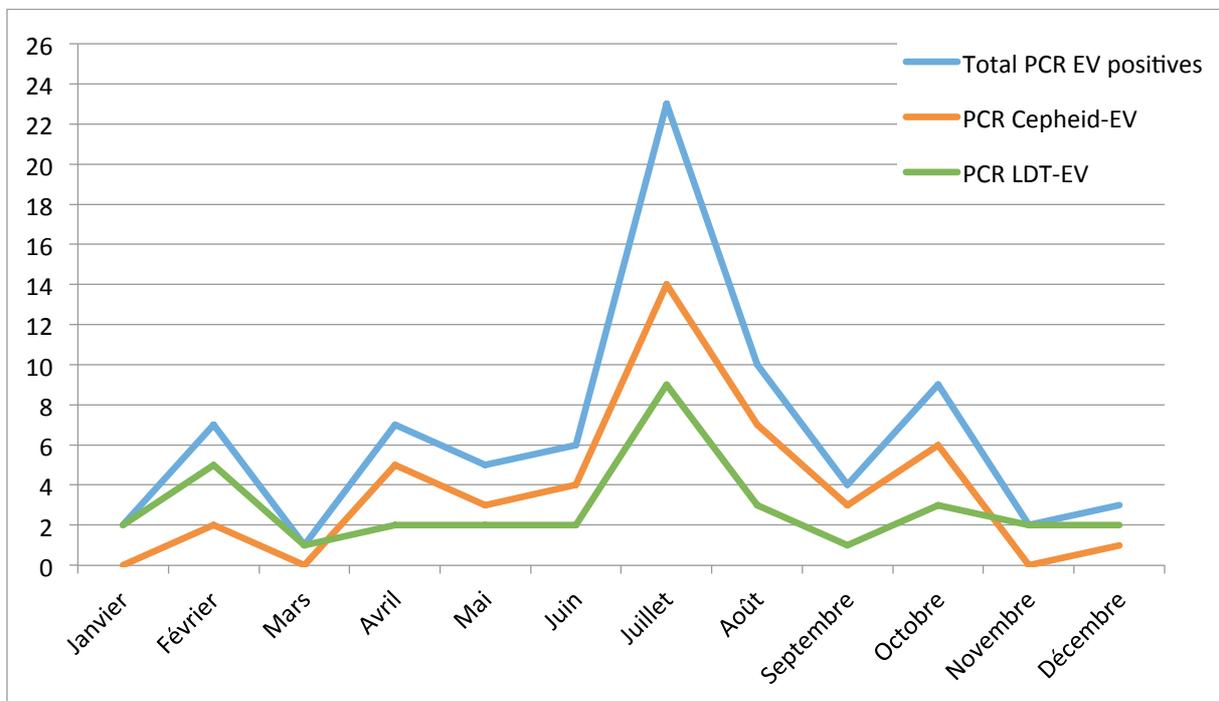


Figure 18 : Répartition des LCR positifs à EV en 2016 chez les enfants de moins de 15 ans

Dans notre étude, un premier pic de méningites était observé en juillet-août suivi d'un second pic de moindre ampleur en automne.

3) Paramètres cliniques

1. Hyperthermie

La température moyenne dans notre population était de 38°C, ce qui correspondait également à la médiane de notre série.

A l'admission ou au cours de leur séjour aux urgences pédiatriques, 46 (59%) enfants présentaient une fièvre variant de 38°C à 39,4°C (les autres patients avaient une température inférieure à 38°C).

Parmi les enfants fébriles, 9 présentaient des critères de mauvaise tolérance de la fièvre (geignements, temps de recoloration cutané \geq 3sec, cyanose péri-buccale, somnolence, téguments marbrés et froids...etc.).

D'après l'interrogatoire des parents, la durée de la fièvre avant la ponction lombaire était en moyenne de 17,6h, avec des extrêmes de 2h et 120h.

La durée totale des symptômes ayant conduit à consulter (fièvre, céphalées, vomissements ou autres manifestations cliniques) est légèrement plus longue et varie de 3h à 168h (soit 32,4h en moyenne).

L'hyperthermie était l'une des raisons principales de consultation aux urgences. Les motifs d'admission dans notre population ont pu être regroupés en trois catégories :

- Hyperthermie et convulsions fébriles : 46/78 (59%)
- Signes évocateurs de méningite à type de céphalées, tremblements, méningisme, nausées et vomissements : 29/78 (37,2%)
- Autre motif de consultation qui regroupe dyspnée, problèmes alimentaires du nouveau-né et douleurs abdominales : 3/78 (3,8%)

2. Risque d'infection materno-foetale

Nous avons relevé le risque d'infection materno-foetale pour les 42 enfants âgés de 0 à 3 mois.

14 (33,3%) enfants présentaient des facteurs de risque :

- 6 enfants pour lesquels le liquide amniotique était teinté ou méconial,
- 3 enfants pour lesquels la durée de rupture de la poche des eaux était supérieure à 12h,
- 3 enfants ont présenté une fièvre maternelle autour de la naissance,
- 1 enfant était né d'une mère avec un prélèvement vaginal positif à streptocoque B mais sans information concernant son traitement,
- Enfin, 1 enfant avait reçu une antibiothérapie à la naissance pour une IMF non documentée.

Ce paramètre se déclinant en plusieurs catégories et ne concernant que trop peu d'enfants, il n'a pas été retenu pour l'analyse statistique.

Données cliniques	n/N	%	IC 95%
Motif admission :			
- Hyperthermie	46/78	59,0	[48,06 - 69,89]
- Signes neurologiques	29/78	37,2	[26,45 - 47,90]
- Autre	3/78	3,8	[0,00 - 8,11]
Hyperthermie	46/78	59,0	[48,06 - 69,89]
- Avec critères de mauvaise tolérance	9/46	19,6	[8,10 - 31,03]
Facteurs d'IMF	14/42	33,3	[19,08 - 47,59]

Tableau 4 : Tableau récapitulatif des principales caractéristiques cliniques relevées

4) Paramètres biologiques

1. Données concernant le Liquide Céphalo-Rachidien

Les valeurs des principales caractéristiques biologiques des LCR sont retranscrites dans les tableaux ci-après.

Données biologiques	Effectif (N)	Moyenne	Ecart type	Valeur min	Valeur max	IC 95%
Nbre éléments nucléés (/mm ³)	78	150,6	326,2	0,2	1970	[78,21 - 222,99]
Nbre PNN (/mm ³)	56	44,5	32,2	0	92	[36,07 - 52,93]
Nbre lymphocytes (/mm ³)	53	28,5	23,6	3	93	[22,15 - 34,85]
Nbre monocytes (/mm ³)	53	27,6	27,6	0	90	[20,17 - 35,03]

Tableau 5 : Cellularité des LCR

Sur 78 enfants, 22 n'ont pas eu de formule réalisée en cytologie et 3 ont bénéficié seulement d'une détermination du nombre de PNN.

Données biologiques	n/N	%	IC 95%
Cellularité anormale pour l'âge	53/78	67,9	[57, 59 - 78,31]
Type de LCR si anormal :			
• LCR granulocytaire	19/53	35,8	[22,94 - 48,76]
• LCR lympho-monocytaire	24/53	45,3	[31,88 - 58,68]
• LCR panaché	6/53	11,3	[2,79 - 19,85]
• Formule non réalisée	4/53	7,55	[0,44 - 14,66]
Hypoglycorachie	14/78	17,9	[9,43 - 26,47]
Hyperprotéinorachie	17/77	22,1	[12,81 - 31,34]
Bactériologie stérile	76/77	98,7	[96,17 - 100,00]
Recherche autres viroses dans le LCR			
• HSV	76/78	97,4	[93,93 - 100,00]
• CMV	46/78	59,0	[48,06 - 69,89]
• VZV	12/78	15,4	[7,38 - 23,39]
• EBV	2/78	2,6	[0,00 - 6,07]
• Arbovirose	1/78	1,3	[0,00 - 3,78]
Autre virose positive dans le LCR	0/78	0	[0,00 - 0,00]

Tableau 6 : Tableau récapitulatif des principales caractéristiques biologiques du LCR

i. *Cellularité*

Des seuils d'éléments nucléés ont été définis par tranche d'âge :

- un seuil de 30 éléments nucléés/mm³ était choisi pour les enfants de moins d'un mois,
- il était abaissé à 20 éléments nucléés/mm³ pour les enfants de 1 à 3 mois,
- et à 5 éléments nucléés/mm³ pour les autres enfants.

Tout LCR avec un nombre d'éléments nucléés au-dessus de ces seuils était alors considéré comme anormal, ce qui était le cas pour une majorité de nos patients (67,9%).

Le nombre d'éléments nucléés était très variable selon les échantillons, variant de 0,2 à près de 2000 éléments/mm³ (Tableau 5). Cependant, on ne note pas de prédominance franche d'un type de LCR ; la répartition entre les LCR granulocytaires et lympho-monocytaires étant sensiblement équivalente, seul le LCR de type panaché apparaît en minorité (Tableau 6).

ii. *Paramètres biochimiques et bactériologiques*

Près d'un cinquième des LCR avait des paramètres biochimiques en faveur d'une méningite bactérienne : une hypoglycorachie était retrouvée dans 17,9% des cas et une hyperprotéinorachie dans 22,1%. Cependant, la bactériologie du LCR s'est avérée négative dans la majorité des cas (98,7%).

Du *S. epidermidis* avait poussé en culture en quantité très peu abondante pour un seul LCR. Au vu du type de germe et de la cellularité pauvre de ce LCR (22 éléments nucléés pour un enfant de 8 ans et demi), le diagnostic de méningite bactérienne n'a pas été retenu.

Les résultats bactériologiques du LCR étant essentiellement stériles, ils n'ont alors pas été pris en compte pour le reste de notre analyse.

iii. *Recherche d'autres viroses*

Dans plus de 97% des cas, la recherche des virus herpes simplex 1 et 2 est effectuée conjointement à la recherche des entérovirus. La recherche de cytomégalovirus est demandée dans plus de la moitié des cas (59%) et celle d'autres viroses est prescrite de manière plus exceptionnelle (<20%).

Une PCR arbovirose a été prescrite chez un enfant fébrile de retour de voyage en Guyane. Il présentait un tableau associant une crise convulsive généralisée hyperthermique, des selles glaireuses mais non sanglantes et une éruption hémorragique rétro-auriculaire gauche. Aucune prophylaxie anti-palustre ni mesure de protection anti-moustique n'avait été prise durant le séjour.

Au cours de notre étude, aucune autre virose que l'entérovirus n'a été mise en évidence, ce qui permettait d'exclure une autre atteinte virale pouvant potentiellement impacter la prise en charge des patients.

2. Autres analyses biologiques

D'autres analyses biologiques ont été réalisées au cours de l'hospitalisation.

i. *Hémocultures*

68 (87,2%) enfants ont bénéficié de prélèvements d'hémocultures. La plupart n'ont eu qu'une seule paire de réalisée, seuls trois patients en ont eu davantage (jusqu'à 3 paires).

Parmi ces 68 patients, 5 (7,4%) ont eu des hémocultures positives mais les résultats bactériologiques étaient à chaque fois compatibles avec une contamination et les patients n'ont pas été traités pour cela :

Patient	Germe retrouvé en culture
- Patient 1	<i>Staphylococcus hominis</i>
- Patient 2	<i>Staphylococcus pasteurii</i>
- Patient 3	<i>Streptococcus mitis</i> et <i>salivarius</i>
- Patient 4	<i>Staphylococcus capitis</i>
- Patient 5	<i>Staphylococcus epidermidis</i>

Tableau 7 : Germes retrouvés pour chaque patient ayant des hémocultures positives

Le nombre et la positivité des hémocultures n'ont pas été retenus pour la suite de l'étude, seule la présence ou non d'hémocultures a été conservée comme critère de prescription.

ii. *Sérologies*

Seuls deux enfants étaient prélevés en vue de sérologies virales.

Une sérologie dengue a été prescrite chez un enfant rentrant de Guyane montrant un résultat négatif.

Des sérologies VIH, VHB et VHC (négatives) ont été prescrites chez un deuxième enfant.

iii. *Protéine C Réactive et Procalcitonine*

Nous avons relevé les valeurs initiales de la PCT et de la CRP lors du premier bilan biologique du patient, et les valeurs maximales atteintes lors du séjour.

Les données sont regroupées dans le tableau ci-dessous.

Données biologiques	Effectif (N)	Moyenne	Ecart type	Valeur min	Valeur max	IC 95%
CRP initiale (mg/L)	77	9,5	10,3	0,3	58,7	[7,2 - 11,8]
CRP maximale (mg/L)	77	13,8	19,7	0,3	138,6	[9,4 - 18,2]
PCT initiale (ng/mL)	55	0,22	0,19	0,1	0,97	[0,17 - 0,27]
PCT maximale (ng/mL)	55	0,36	0,92	0,1	6,79	[0,12 - 0,6]

Tableau 8 : Tableau récapitulatif des valeurs de CRP et PCT

Dans notre étude, la CRP a été prescrite pour la presque totalité des patients (77/78).

Les valeurs sont très étendues puisque la CRP initiale varie de 0,3 à 58,7mg/L et la CRP maximale atteint parfois des valeurs très élevées à plus de 100mg/L.

Si 31 patients n'ont eu qu'une seule prescription, cette dernière a pu être souvent répétée : 2 fois pour 26 patients, 3 fois pour 12 patients, 4 fois pour 3 patients, 5 fois pour 4 patients et 6 fois pour un seul patient.

Pour notre étude, nous avons décidé d'utiliser la valeur maximale de la CRP pour chaque patient.

La PCT a été prescrite pour 55 patients (70,5%). Là encore, les valeurs sont très différentes selon les enfants, variant de 0,1 à 6,79ng/mL.

La valeur de PCT moyenne était de 0,36ng/mL pour une valeur médiane de 0,15ng/mL.

On peut remarquer que le patient ayant eu la PCT maximale à 6,79ng/mL se trouve être celui qui avait aussi la CRP maximale à 138,6mg/mL. Cet enfant était âgé d'un mois et se présentait aux urgences pour une hyperthermie. Son LCR était de cellularité normale et aucun prélèvement bactériologique n'a été retrouvé positif par la suite.

Contrairement à la CRP, la prescription de PCT n'a que très peu été répétée (seulement pour 3 patients) au cours de l'hospitalisation des enfants.

Nous avons décidé que la PCT était un critère de prescription intéressant à prendre en compte pour notre analyse comparative.

Nous avons distingué les valeurs de PCT <0,2ng/mL qui traduisent une infection sévère ou bactérienne peu probable (soit 36/55 patients), de celles \geq 0,2ng/mL (19/55 enfants) ne pouvant écarter ce diagnostic.

iv. *Examen Cytobactériologique des Urines*

Plus de la moitié (42/78) des enfants ont bénéficié d'un ECBU au cours de leur séjour. Les résultats de cytologie et de bactériologie restent assez hétérogènes : 3 ECBU étaient positifs, 19 étaient polymicrobiens avec trois espèces retrouvées en culture, 10 étaient stériles, et 10 présentaient une bactériurie significative sans leucocyturie.

L'interprétation des ECBU se faisant davantage selon le contexte clinique que sur les valeurs seuils des résultats cytologiques et bactériologiques, ce critère n'a pas été retenu pour l'analyse des critères de prescription.

v. *Recherche d'entérovirus sur les prélèvements périphériques*

Les entérovirus ont été détectés dans la majorité des cas au niveau des sites périphériques.

Type de prélèvement	Nombre de positifs/nombre de demande	%
Gorge	15/15	100
Naso-pharyngé	9/14	64,3
Selles	8/10	80
Sang	0/1	0

Tableau 9 : Détection des entérovirus sur les prélèvements périphériques

5) Prise en charge des patients

1. Conditions de prélèvement et communication des résultats

Concernant les conditions de prélèvement, 43/78 (55,1%) ponctions lombaires ont été effectuées durant des horaires de garde de nuit (de 18h à 8h du matin) et 19/78 (24,4%) lors de créneaux de week-end (du samedi 8h au lundi 8h).

Chaque appel téléphonique étant tracé par son locuteur dans notre Système Informatique de Laboratoire, nous avons relevé tous les résultats de PCR EV où il avait été notifié une communication des résultats. De manière globale, plus de la moitié des résultats positifs ont été communiqués par téléphone aux services soit 52/78 prélèvements (66,7%).

Parmi les résultats téléphonés, une majorité était issue de la PCR Cepheid-EV soit 37/52, contre seulement 15/52 de la PCR LDT-EV.

On constate que la plupart des appels (42/52) concernait des prélèvements réalisés en horaire de garde de nuit (28/52 appels) ou de week-end (14/52 appels).

2. Hospitalisation et durée de séjour

Suite à leur passage aux urgences, 65/78 enfants ont été transférés dans un service pour la poursuite de leur hospitalisation. Le service d'hospitalisation le plus fréquent était la pédiatrie générale (58/65), les autres services étaient : Soins Intensifs néonatal (3/65), Unité de relai hivernal (1/65), E2 médecine (1/65) et B2 médecine chirurgie (2/65).

Seul le critère « présence d'une hospitalisation en aval » sera retenu pour notre analyse comparative.

La durée moyenne de passage aux urgences était de 9,90h avec un minimum de 4,38h et un maximum de 19,65h.

La durée moyenne d'hospitalisation dans les services d'aval était plus longue, de l'ordre de 44h.

Quant à la durée moyenne de tout le séjour des enfants, elle était d'un peu moins de deux jours soit 46,6h avec des variations selon les enfants entre 6h et 181,6h. Cette durée était en moyenne plus longue pour les enfants de moins de 3 mois (63,2h) que pour les enfants plus âgés (27,2h). De plus, elle était en moyenne de 40h pour le groupe PCR Cepheid-EV et de 55h pour celui de la PCR LDT-EV.

Données biologiques	Effectif (N)	Moyenne	Ecart type	Valeur min	Valeur max	IC 95%
Durée hospitalisation urgences (h)	78	9,90	3,26	4,38	19,65	[9,18 - 10,62]
Durée hospitalisation services d'aval (h)	65	44,0	30,4	5,52	170,03	[36,61 - 51,39]
Durée totale hospitalisation (h)	78	46,6	32,3	6	181,66	[39,42 - 53,78]

Tableau 10 : Tableau récapitulatif des durées d'hospitalisation

3. Prise en charge thérapeutique

D'après l'anamnèse, trois patients (3,8%) avaient reçu une antibiothérapie précédant la ponction lombaire :

- Pour l'un d'entre eux, il s'agissait du traitement d'une angine par Amoxicilline ayant été débuté 5 jours auparavant.
- Le second avait reçu une dose d'Amoxicilline dans la journée précédant son hospitalisation pour une pharyngite et un début de bronchiolite.

- Enfin, le dernier avait eu de la Ceftriaxone cinq heures avant la ponction lombaire, pour un tableau clinique associant des paresthésies, un purpura pétéchial et des céphalées frontales intenses.

Ce paramètre « antibiothérapie précoce » ne concernant que 3 enfants et n'ayant pas de conséquence sur la suite de la prise en charge (instauration d'une antibiothérapie à dose méningée chez deux enfants, et arrêt pour celui qui avait une angine), il n'a pas été conservé pour la suite.

Au cours de leur séjour, 5 (6,4%) enfants ont nécessité le recours à un remplissage vasculaire. On notera que 4 de ces enfants présentaient des critères de mauvaise tolérance de la fièvre. Pour le dernier, aucune information n'était clairement notifiée à ce sujet.

7/78 (9,0%) patients ont également bénéficié d'une imagerie cérébrale (TDM), normale à chaque fois.

30/78 (38.5%) enfants ont reçu un traitement anti-infectieux suite à la ponction lombaire.

Les traitements ont été regroupés en 3 catégories :

- o Antibiothérapie associée à de l'Aciclovir : 6/78 (7.7%)
- o Antibiothérapie seule : 21/78 (26.9%)
- o Aciclovir seul : 3/78 (3.8%)

L'antibiothérapie était à chaque fois administrée à dose méningée et suivait différents schémas :

- C3G + Amoxicilline + Aminoside : 17/78
- C3G + Aminoside : 5/78
- Céfotaxime seule : 4/78
- Autre antibiothérapie : 1/78

La durée des traitements (antibiotique ou antiviral) a été définie comme la période écoulée entre la première administration et la fin d'effet de la dernière prise (ou injection).

Pour trois patients, elle n'a pas été retenue en raison d'un diagnostic associé à la méningite virale nécessitant une antibiothérapie prolongée (pyélite, angine streptococcique et foyer de néphrite).

Pour les autres patients la durée du traitement anti-infectieux variait de 6h à 77,5h, avec une moyenne de 25,8h et un écart type de 20,4.

4. Codification du séjour

Les libellés de diagnostic retenu pour chaque séjour correspondant à des GHM différents ont été relevés.

Deux patients ont été considérés comme externes car leur passage aux urgences était trop court. Pour ces deux patients, la codification et la valorisation des séjours n'ont pu être établies.

Nous avons dans un premier temps classés ces libellés en deux catégories : méningite virale (54/76) ou non (22/76), puis en 5 sous-catégories qui figurent dans le tableau ci-dessous (Tableau 11).

Libellé du séjour	n/N	%	IC 95%
Méningite virale, très courte durée	23/76	30,2%	[19,93 - 40,59]
Méningite virale, niveau 1	23/76	30,2%	[19,93 - 40,59]
Méningite virale, niveau 2	5/76	6,6%	[1,01 - 12,15]
Méningite virale, niveau 3	3/76	3,9%	[0,00 - 8,33]
Autre	22/76	28,9%	[18,75 - 39,14]

Tableau 11 : Libellé des diagnostics retenus pour le séjour des patients

5. Valorisation du séjour

La durée de séjour des patients a aussi été recueillie en « jours facturés », où un « jour facturé » correspond à une nuit passée à l'hôpital.

- Un jour de séjour a été facturé pour 22/78 enfants,
- Deux jours pour 30/78 enfants,
- Trois jours pour 11/78 enfants,
- 4 à 7 jours pour 5/78 enfants,
- et 0 jour (passage uniquement aux urgences en journée) pour 10/78 enfants.

Enfin, nous avons également inclus dans notre étude la valorisation attribuée pour chaque séjour (76/78 patients). Elle s'étend de 544,59 euros à 9130,64 euros.

La moyenne de la valorisation était ainsi de 1850,80 euros avec une médiane proche à 1910,71 euros.

6) Analyse univariée

Une éventuelle association entre le type de PCR réalisée (LDT-EV ou Cepheid-EV) et les paramètres démographiques, cliniques, biologiques et de prise en charge des patients, a ensuite été étudiée.

Les résultats sont résumés ci-dessous.

1. Variables qualitatives

Caractéristiques/Type de PCR	PCR LDT-EV	PCR Cepheid-EV	p
Age < 3 mois			*
Oui	22	20	0,09
Non	12	24	
Age > 1 an			*
Oui	10	24	0,03
Non	24	20	
Sexe			*
Masculin	23	28	0,71
Féminin	11	16	
Période épidémique			*
Oui	20	36	0,03
Non	14	8	

Caractéristiques/Type de PCR	PCR LDT-EV	PCR Cepheid-EV	p
Garde de nuit			*
Oui	21	22	0,30
Non	13	22	
Garde de week-end			*
Oui	6	13	0,23
Non	28	31	
Communication des résultats			*
Oui	15	38	<u><0,01</u>
Non	19	6	
Hospitalisation en aval			+
Oui	30	35	0,37
Non	4	9	
Expansion volémique			+
Oui	4	1	0,16
Non	30	43	
Traitement anti-infectieux			+
Antibiotique + antiviral	4	2	0,13
Antibiotique seul	12	9	
Antiviral seul	0	3	
Pas de traitement	18	30	
Type de LCR			+
Granulocytaire	6	13	0,13
Lympho-monocytaire	9	15	
Panaché	1	5	
Normal	15	10	
Hypoglycorachie			*
Oui	6	8	0,95
Non	28	36	
Hyperprotéïnorachie			*
Oui	9	8	0,41
Non	25	35	

Caractéristiques/Type de PCR	PCR LDT-EV	PCR Cepheid-EV	p
Hémocultures			+
Oui	30	38	1,00
Non	4	6	
PCT			*
≥0,2	12	7	0,14
<0,2	13	23	
Absence d'analyse	9	14	
Scanner cérébral			+
Oui	3	5	1,00
Non	31	39	
Critère mauvaise tolérance de la fièvre			+
Oui	12	4	0,01
Non	19	37	
Patient apyrétique	3	3	
Motif d'admission			+
Hyperthermie	23	23	0,21
Signes évocateurs de méningite	9	20	
Autre	2	1	
Diagnostic de méningite virale			*
Oui	20	34	0,03
Non	14	8	
Libellé du séjour détaillé			+
Méningite virale très courte durée	5	18	0,05
Méningite virale, niveau 1	11	12	
Méningite virale, niveau 2	2	3	
Méningite virale, niveau 3	2	1	
Autre	14	8	

* Test du Chi2

+ Test Exact de Fisher

Tableau 12 : Analyse univariée entre les variables qualitatives et le type de PCR réalisé

Les paramètres significativement associés à un type de PCR sont caractérisés par une valeur du $p \leq 0,05$.

C'est ainsi que les critères significativement associés à la réalisation de la PCR Cepheid-EV sont : l'âge >1 an ($p=0,03$), la période épidémique ($p=0,03$) et la présence de critères de mauvaise tolérance de la fièvre ($p=0,01$).

D'autres variables sont également significativement associées à l'utilisation de la PCR Cepheid-EV comme la communication des résultats ($p < 0,01$), le diagnostic de méningite virale ($p=0,03$) et le libellé de séjour détaillé ($p=0,05$).

Afin de tenir compte des biais de confusion, toutes les variables ayant une valeur du $p \leq 0,20$ ont également été incluses dans l'analyse multivariée. Il s'agit des paramètres : âge < 3 mois, recours à une expansion volémique, recours à un traitement suite à la ponction lombaire, type de LCR et caractéristique de la PCT.

De plus, bien que la variable « sexe » ait une valeur du $p > 0,20$, elle est décrite dans la littérature comme un facteur de confusion dans la survenue de méningite à entérovirus. Elle a alors été ajoutée à la deuxième partie de notre analyse statistique.

2. Variables quantitatives continues

	Observations	Moyenne	Std. Dev.	IC 95%	p
Age (mois)					0,04
PCR LDT-EV	34	25,68	47,62	[9,06 – 42,29]	
PCR Cepheid-EV	44	49,22	51,93	[33,43 – 65,00]	
Durée hospitalisation aux urgences (h)					0,40
PCR LDT-EV	34	9,55	3,26	[8,41 – 10,69]	
PCR Cepheid-EV	44	10,18	3,26	[9,21 – 11,14]	
Durée hospitalisation services d'aval (h)					0,04
PCR LDT-EV	34	45,44	33,65	[34,13 – 56,75]	
PCR Cepheid-EV	44	29,89	29,77	[20,84 – 38,94]	

	Observations	Moyenne	Std. Dev.	IC 95%	p
Durée totale d'hospitalisation (h)					0,04
PCR LDT-EV	34	54,99	33,71	[43,22 – 66,75]	
PCR Cepheid-EV	44	39,84	30,27	[30,63 – 49,04]	
Durée traitement anti- infectieux (h)					0,10
PCR LDT-EV	32	12,45	20,66	[5,29 – 19,61]	
PCR Cepheid-EV	43	6,38	14,02	[2,20 – 10,56]	
Nb éléments nucléés LCR (/mm ³)					0,19
PCR LDT-EV	34	94,99	207,72	[22,52 – 167,47]	
PCR Cepheid-EV	44	193,68	391,19	[74,75 – 312,62]	
CRP max (mg/L)					0,14
PCR LDT-EV	34	17,53	25,44	[8,67 – 24,20]	
PCR Cepheid-EV	43	10,84	13,09	[6,81 – 14,87]	
Température du patient (°C)					0,49
PCR LDT-EV	34	37,93	0,72	[37,68 – 38,18]	
PCR Cepheid-EV	44	38,93	0,65	[37,84 – 38,23]	
Valorisation du séjour (euros)					0,10
PCR LDT-EV	34	2201,46	1678,88	[1615,67 – 2787,25]	
PCR Cepheid-EV	42	1566,92	1623,54	[1060,99 – 2072,85]	

Test de Student

Tableau 13 : Analyse univariée entre les variables quantitatives continues et le type de PCR réalisé

Pour les variables continues, les mêmes critères s'appliquent que pour les variables discrètes.

L'analyse univariée montre un lien significatif entre l'âge du patient et la prescription d'une PCR Cepheid-EV (p=0.04).

De plus, la durée d'hospitalisation des patients dans les services d'aval (p=0.04) et la durée totale d'hospitalisation (p=0.04) sont significativement associées à la prescription d'une PCR Cepheid-EV.

Quatre autres variables avec une valeur du $p \leq 0,20$ sont également retenues pour l'analyse multivariée : la durée de traitement suite à la ponction lombaire, le nombre d'éléments nucléés du LCR, la valeur de la CRP maximale et la valorisation du séjour.

3. Variable quantitative discrète

	PCR LDT-EV	PCR Cepheid-EV	p
Durée hospitalisation en jours facturés			0.22
0	3	7	
1	7	15	
2	15	15	
3	6	5	
4	1	0	
5	2	0	
6	1	0	
7	0	1	

Test de Fisher

Tableau 14 : Analyse univariée entre la variable quantitative discrète et le type de PCR réalisé

La durée de séjour en jours facturés ne montre pas d'association significative avec la prescription d'un type de PCR EV.

7) Analyse multivariée

D'après les résultats de l'analyse univariée, le modèle initial de l'analyse multivariée prenait donc en compte 18 variables :

Facteur de risque associé	OR	ES	z	P> z	IC 95%
Données de prescription					
Age (mois)	0.99	0.01	-0.61	0.54	0.98 - 1.01
Sexe	0.77	0.63	-0.32	0.75	0.15 - 3.83
Période épidémique	0.14	0.12	-2.38	0.02	0.03 - 0.71
Critère mauvaise tolérance de la fièvre	1.51	0.66	0.95	0.34	0.64 – 3.55
Nb éléments nucléés LCR	1.00	0.00	-0.43	0.67	0.99 - 1.00
Type LCR	1.50	0.72	0.85	0.40	0.58 - 3.84
PCT	0.45	0.26	-1.39	0.17	0.14 - 1.39
CRP max	1.00	0.02	0.43	0.67	0.97 – 1.06
Données de prise en charge					
Résultats communiqués	0.13	0.10	-2.72	0.01	0.03 - 0.57
Durée hospitalisation services d'aval	1.17	0.14	1.39	0.17	0.94 - 1.46
Durée totale d'hospitalisation	0.85	0.10	-1.42	0.16	0.67 - 1.07
Expansion volémique	2.21	3.64	0.48	0.63	0.09 - 56.08
Traitement anti-infectieux	1.16	0.43	0.42	0.68	0.56 – 2.41
Durée traitement anti-infectieux	1.03	0.04	0.92	0.36	0.96 - 1.11
Valorisation du séjour	1.00	0.00	-0.23	0.82	0.99 - 1.00
Diagnostic de méningite virale	0.13	0.55	-0.48	0.63	0.00 – 604,46
Libellé du séjour détaillé	2.82	3.92	0.74	0.46	0.18 – 43.18

OR : Odds Ratio ; ES : Erreur Standard ; IC : Intervalle de Confiance

Tableau 15 : Modèle initial de l'analyse multivariée

L'analyse descendante pas à pas nous a conduit à un modèle final où 3 variables se détachent et expliquent 21% de la variance de notre variable à expliquer *id est* le type de PCR réalisé.

Ces variables concernent la prescription de la PCR (période épidémique) et la prise en charge des enfants (communication des résultats et durée de traitement anti-infectieux).

Avec un Odds Ratio supérieur à 1, nos résultats mettaient en évidence que la prescription d'une PCR LDT-EV était significativement associée à une durée de traitement plus longue.

Par contre, la période épidémique était moins reliée à sa prescription de même que les résultats étaient significativement moins communiqués avec cette technique (Tableau 16).

Facteur de risque associé	OR	ES	z	P> z	IC 95%
Période épidémique	0.18	0.12	-2.59	0.010	0.05 - 0.66
Résultats communiqués	0.15	0.10	-3.00	0.003	0.05 - 0.52
Durée traitement post-PL	1.03	0.02	2.04	0.041	1.00 - 1.07

OR : Odds Ratio ; ES : Erreur Standard ; IC : Intervalle de Confiance

$R^2 = 0,21$

Tableau 16 : Modèle final de l'analyse multivariée

DISCUSSION

Les méningites à entérovirus restent aujourd'hui la principale étiologie des méningites aseptiques. Affections de bon pronostic, il n'est pas toujours évident de les distinguer des méningites bactériennes, qui peuvent être à l'inverse graves et responsables de lourdes séquelles, ce qui justifie une prise en charge en urgence. Des détections moléculaires dites rapides ont été mises au point au fil des ans, apportant un diagnostic précoce de la méningite à entérovirus.

Si cet outil permet de conforter le diagnostic du clinicien et de rassurer le patient, nous avons voulu vérifier que la prise en charge qui en découlait était également plus adaptée, notamment chez les enfants. En effet, ces derniers étant souvent amenés à recevoir une antibiothérapie du fait de la gravité potentielle de l'infection et de la difficulté de communication, nous nous sommes interrogés sur l'impact thérapeutique et économique que pouvait avoir un délai de rendu de résultats plus rapide de PCR EV dans le LCR.

Par ailleurs, la PCR EV rapide utilisée au CHU de Toulouse étant réalisée à la demande précise du clinicien, nous avons voulu étudier si certains critères orientaient leur choix de prescription.

Si des études similaires ont déjà été réalisées par le passé, aucune encore ne comparait l'impact de prescription de deux PCR différentes réalisées sur une même période et au sein d'une population uniquement pédiatrique.

En effet, en 2009, Archimbaud *et al.*⁵³, étudiaient le bénéfice d'un résultat de PCR EV rendu rapidement mais il ne s'appuyait que sur un seul type de PCR, les variations économiques engendrées par les différences de coût des analyses biologiques n'étaient donc pas prises en compte. D'autres études comparaient l'utilité de la PCR Cepheid-EV par rapport à des techniques plus conventionnelles mais se déroulaient sur deux périodes de recueil différentes (Alonso Pérez *et al.*⁵⁴) ou différaient de notre étude par le délai de rendu de résultats des PCR « maisons » (Huizing *et al.*⁵⁵).

D'après nos résultats, on constate tout d'abord que la suspicion de méningite à EV est fréquente en pédiatrie puisque près de 600 PCR ont été réalisées en 2016 et un nombre sensiblement équivalent a été retrouvé en 2017.

La majorité des prélèvements positifs à EV dans le LCR concernait des enfants de moins de 3 mois, et 43,6% des résultats se rapportaient à des enfants de plus d'un an. Ces données sont concordantes avec le rapport du CNREV de 2016²⁵ montrant une légère prédominance des LCR positifs à EV chez les enfants de moins d'un an par rapport à ceux âgés de 1 à 14 ans.

Sur notre période d'étude, les enfants de plus d'un an étaient davantage associés à une demande de PCR Cepheid-EV, cependant l'analyse multivariée n'a pas permis de mettre en évidence de relation significative entre l'âge des patients et ce type de prescription de PCR.

Dans notre étude, le sexe ratio H/F était de 1,89. Ceci reste en accord avec la littérature décrivant le sexe masculin comme le genre préférentiellement exposé aux infections à entérovirus⁶.

Les méningites à EV étaient prédominantes en période estivale avec 71,8% des LCR positifs entre mai et octobre. La répartition des méningites à EV suivait donc celle décrite au niveau national par Santé Publique France²⁴. En effet, un premier pic était observé en été, avec un maximum de 23 PCR EV positives en juillet, et un deuxième pic se démarquait en octobre avec 9 PCR EV positives (Figure 18).

Nous avons ici montré qu'il existait une relation significative entre la date de la prescription et le type de PCR EV demandé. En effet, en période épidémique, nos résultats mettent en avant une plus forte prescription de PCR Cepheid-EV comparée à la PCR LDT-EV. Cette observation paraît cohérente et favorable à une prise en charge optimale des patients au CHU de Toulouse, puisqu'un résultat rapide permettrait de conforter ou d'exclure rapidement le diagnostic de méningite à entérovirus au moment d'une période à risque. Outre la mise en place d'une meilleure thérapeutique, cela favoriserait des séjours hospitaliers plus courts et par conséquent une meilleure rotation des lits lors des pics épidémiques.

D'un point de vue clinique, la majorité des sujets présentait une fièvre supérieure à 38°C (59%), ce qui est décrit, bien que dans des proportions différentes, dans d'autres études (91,7% pour Vareil *et al.*⁵⁶, 71,25% pour Alonso Pérez *et al.*⁵⁴ et 80% pour Archimbaud *et al.*⁵³).

De plus, l'hyperthermie durait en moyenne 17,6h avant la réalisation d'une ponction lombaire et était globalement bien tolérée. En revanche, la durée moyenne de l'ensemble des symptômes amenant à consulter était plus longue, de 32,4h en moyenne, ce qui est comparable avec les données de l'étude de Vareil *et al.*⁵⁶

Dans 96% des cas, les manifestations cliniques étaient compatibles avec le diagnostic de méningite à entérovirus puisque les motifs d'admission aux urgences correspondaient soit à la présence d'une hyperthermie soit à la survenue de signes évocateurs de méningite.

Chez les tous petits, au risque d'infection méningée se rajoutait le risque d'infection materno-fœtale. D'après notre recueil, environ un tiers des enfants de moins de 3 mois avaient des risques d'IMF mais la plupart étaient des risques mineurs et les traitements antibiotiques prescrits ne découlaient pas de ces observations. Il n'y avait *a priori* pas plus de prescriptions de PCR Cepheid-EV en cas de présence de ces risques que de PCR LDT-EV (4 PCR vs 10 respectivement).

Au vu de l'ensemble de ces données, les paramètres cliniques, et notamment la gravité clinique, n'étaient pas reliés de manière significative à la prescription d'un type de PCR.

En ce qui concerne les propriétés biochimiques et cytologiques du LCR, on remarque qu'elles ne respectent pas toujours la règle des méningites virales à liquide clair, à prédominance lympho-monocytaire, normo-glycorachiques et normo-protéinorachiques.

En effet, près d'un tiers des enfants ne présentait pas de pléiocytose. Ces résultats sont similaires à ceux retrouvés dans les études de Vareil *et al.*⁵⁶ (55%) ou d'Archimbaud *et al.*⁵³ (13%). Comme nous l'avons vu dans la première partie, cette absence de pléiocytose a été rapportée de nombreuses fois dans la littérature⁶ et s'explique généralement par le très jeune âge de l'enfant ou la précocité de la ponction lombaire. Ici l'âge des patients concernés était très variable allant de 0 à 109 mois, les deux hypothèses peuvent alors s'appliquer.

De plus, parmi les LCR où la cellularité était augmentée, si la majorité des échantillons était de type lympho-monocytaire, près de 39% des LCR étaient granulocytaires. Des proportions comparables de LCR à prédominance de polynucléaires neutrophiles sont décrites dans différentes études^{54,56}. Par conséquent, nos résultats confirment que la cellularité du LCR ne peut à elle seule être prédictive d'une affection virale ou bactérienne.

En revanche, le taux moyen d'éléments nucléés restait relativement bas (150 éléments/mm³) contrairement à celui décrit dans les méningites bactériennes, pouvant ainsi orienter le diagnostic étiologique.

Dans notre étude, la moyenne du nombre d'éléments nucléés du LCR était plus élevée dans le groupe PCR Cepheid-EV que dans celui de la PCR LDT-EV, de même que les LCR

anormaux (toute catégorie confondue) semblaient davantage être reliés à une PCR rapide. Cependant, aucune association significative n'a pu être établie entre ces paramètres, peut-être du fait de l'effectif limité de nos échantillons.

Par ailleurs, près de 20% de nos patients présentaient une hypoglycorachie et/ou une hyperprotéinorachie mais seulement 6 (8%) enfants avaient les deux critères à la fois. Ces paramètres restent ainsi plutôt en faveur d'une étiologie bactérienne et leur présence ne peut s'interpréter qu'en fonction de l'ensemble du tableau clinique et biologique. En effet, sur ces 6 patients, un seul avait un LCR de type granulocytaire à plus de 1000 éléments nucléés pouvant faire évoquer une méningite bactérienne, mais la CRP <5mg/L et la PCT <0,2ng/mL étaient peu en faveur.

Nous avons pensé que les LCR évocateurs de méningites bactériennes étaient davantage associés à la prescription d'une PCR Cepheid-EV afin de discriminer rapidement une étiologie virale. Néanmoins ces propos ne se vérifient pas dans notre étude puisqu'aucun lien significatif n'a été montré entre les paramètres biochimiques ou cytologiques du LCR et la prescription d'une PCR rapide. Les mêmes observations sont rapportées dans la littérature^{53,54}.

Au niveau des prescriptions d'autres analyses de virologie moléculaire, on constate que d'autres viroses sont souvent recherchées conjointement aux entérovirus dans le LCR. Les herpès simplex sont les premiers recherchés (dans 97.4% de nos échantillons), probablement dans le but d'éliminer le diagnostic gravissime d'encéphalite herpétique.

Une part importante de notre population s'est également vue prescrire la recherche de CMV (59%) et de VZV (15.4%) et des demandes plus exceptionnelles d'EBV ou d'arboviroses ont été notifiées.

A la différence de l'herpès simplex, compte tenu de la présentation clinique et de la gravité de l'atteinte et des arboviroses, dont la recherche est dictée par des facteurs de risques identifiés, la prescription de détection de CMV et de VZV ne reposait sur aucun critère clinique ou épidémiologique objectif. Le bon de demande d'analyses de virologie offrant la possibilité de prescrire la recherche d'un large panel de virus dans le LCR, ces dernières analyses s'expliquent probablement par une facilité de prescription.

Si la recherche d'autres viroses est à relier au contexte clinique du patient, on peut également souligner que sur l'ensemble de la population, seuls 7 enfants avaient bénéficié d'une imagerie cérébrale et 9 d'un traitement par Aciclovir, arguments potentiellement en faveur d'une encéphalite.

La réalisation d'hémocultures est également fréquente puisqu'elle concerne plus de 87% des patients. Sa prescription se justifie dans les contextes d'hyperthermie et de recherche d'infection bactérienne systémique. Nous avons supposé que la prescription d'hémocultures pouvait préjuger d'un tableau clinique plus grave contrairement aux patients n'ayant pas eu ce prélèvement. Une PCR Cepheid-EV pouvait alors être plus aisément prescrite dans ce contexte, mais nos résultats ne vérifient pas cette hypothèse. Au contraire, le nombre de patients ayant eu une hémoculture était sensiblement équivalent dans les deux bras de notre étude.

Pour ce qui concerne les autres paramètres biologiques, on constate que la CRP est quasiment toujours prescrite et la PCT dans plus de la moitié des cas (68%). D'après nos résultats, la CRP maximale au cours du séjour du patient était en moyenne de 13,9mg/L, données conformes à celles de la littérature^{54,56}.

Les valeurs de PCT étaient majoritairement inférieures à 0,2ng/mL ce qui était concordant avec une méningite virale. Par contre la valeur moyenne était élevée, de l'ordre de 0,3ng/mL contrairement à d'autres études objectivant des valeurs plus basses^{54,56}. La médiane retrouvée étant de 0,15ng/mL, la valeur moyenne élevée de la PCT pouvait probablement s'expliquer par l'un des patients présentant une valeur à 6,79ng/mL.

D'après les résultats de notre étude, aucun de ces paramètres biologiques n'était préférentiellement associé à un type de prescription de PCR, ce qui est semblable aux résultats retrouvés par Alonso Pérez *et al*⁵⁴.

Enfin, nous avons relevé que de nombreuses recherches d'EV dans le LCR s'accompagnaient de prélèvements périphériques tels que des ECBU et pour certains de la recherche d'entérovirus au niveau des sites de réplication et d'excrétion virales. Ces derniers étaient fréquemment retrouvés positifs notamment dans les selles et dans les prélèvements de gorge. Ceci confirme ainsi leur utilité diagnostique et la nécessité de les réaliser, *a fortiori* en cas de forte suspicion clinique de méningite à EV devant un LCR EV négatif.

Aucune association significative n'a été mise en évidence entre les dates et horaires des prélèvements et la prescription d'une PCR Cepheid-EV. Par contre, la proportion d'analyses réalisées par cette technique semblait plus importante pour des prélèvements faits le week-end. Ceci est en accord avec l'organisation du laboratoire de Virologie puisque tous les LCR

des urgences pédiatriques où une demande est notifiée sont traités le week-end par la technique Cepheid-EV.

On constate également que les proportions de PCR EV effectuées sur des prélèvements réalisés la nuit sont presque équivalentes entre les deux techniques. La PCR Cepheid-EV étant faite à la demande du clinicien et lors des horaires de garde, on pourrait s'attendre à une proportion de PCR Cepheid-EV largement majoritaire à celle de la technique « maison » lors de ces créneaux horaires, ce qui n'est pas le cas.

Cette observation témoigne sûrement d'une prescription raisonnée de la PCR Cepheid-EV dans les services d'urgences pédiatriques.

Par ailleurs, l'analyse multivariée montre qu'il existe un lien significatif entre un type de PCR et la communication des résultats positifs. En effet, la PCR LDT-EV est moins associée à la communication des résultats que la PCR Cepheid-EV. L'appel plus fréquent des résultats de PCR Cepheid-EV peut s'expliquer par le fait que ces analyses sont considérées comme urgentes, et sont généralement appuyées par un appel du clinicien, soucieux de connaître le résultat.

Ces données mettent l'accent sur la nécessité d'améliorer la communication des résultats de PCR notamment ceux réalisés par la PCR LDT-EV, des défauts de communication pouvant avoir des répercussions non négligeables sur la poursuite de la prise en charge des patients.

Il convient néanmoins de souligner que le relevé de ces données étant purement informatique et basé sur la traçabilité des appels, cette observation pourra s'appliquer sous réserve que tous les appels aient bien été notifiés. De plus, il semblerait pertinent dans une étude future de prendre en compte le temps de traitement de l'échantillon, c'est à dire le temps écoulé entre l'enregistrement du prélèvement et la validation de son résultat sur le serveur (ou sa communication auprès du service). En effet, même si les résultats ne sont pas toujours communiqués, ils sont le plus souvent validés rapidement et disponibles sur le serveur, et ce d'autant plus en cas de résultats positifs.

D'après nos résultats, 65 enfants sur 78 ont nécessité une hospitalisation après leur passage aux urgences. Pour chaque patient, la durée moyenne de séjour était de 46,56h ce qui était similaire aux résultats de Ramers *et al*⁵⁷. Si une association significative entre la PCR Cepheid-EV et une diminution de la durée d'hospitalisation totale se démarquait dans notre analyse univariée, notre modèle multivarié n'a pas fait ressortir de lien significatif par la suite.

Ces résultats sont concordants avec ceux d'Archimbaud *et al.*⁵³, mais différent de ceux d'autres études^{54,55,57}. Dans ces études, cette discordance peut s'expliquer d'une part par la comparaison de la PCR Cepheid-EV avec une seconde méthode qui différait de la nôtre. D'autre part, dans notre recueil de données, les durées de séjour ont été établies à partir des heures enregistrées informatiquement qui peuvent être légèrement différentes des horaires réelles de sortie des patients. Enfin, un effectif plus important pourrait probablement renforcer l'association entre la réalisation d'une PCR rapide et la réduction de la durée d'hospitalisation.

On notera toutefois que la durée d'hospitalisation était majorée pour les enfants de moins de 3 mois et une légère réduction de cette durée s'observait avec la PCR rapide.

Concernant les moyens thérapeutiques, seuls 6,4% des enfants avaient reçu un remplissage vasculaire. On peut penser qu'il s'agissait d'enfants présentant des manifestations cliniques graves puisque pour 4/5 d'entre eux était notée la présence de critères de mauvaise tolérance de la fièvre. Cependant, la prescription d'une PCR Cepheid-EV ne semble pas davantage associée à ces variables que celle d'une PCR LDT-EV, renforçant l'idée que la gravité clinique n'est pas reliée à une demande de PCR rapide.

Le recours à un scanner cérébral concernait 9% de notre population. Pour la totalité des patients, les résultats retrouvés étaient normaux. Des chiffres proches sont décrits dans la littérature^{53,57}.

Un peu moins de la moitié des enfants avait reçu au cours de leur hospitalisation une thérapeutique du type antibiothérapie et/ou antiviral.

La durée moyenne du traitement anti-infectieux était de 25,9h (1,07jours), ce qui était légèrement inférieur aux durées décrites dans la littérature^{53,56} mais ces variations s'expliquent probablement par des différences de pratique entre hôpitaux.

Si dans notre étude, la PCR Cepheid-EV n'est pas corrélée à la prescription d'une catégorie de traitement (antibiotique, antiviral ou association des deux), elle est en revanche reliée de manière faible mais significative à une durée plus courte de traitement. La même observation était retrouvée dans l'étude de Huizing *et al.*⁵⁵

On retrouvait ainsi une durée moyenne de traitement de 6,38h dans le groupe PCR Cepheid-EV et de 12,45h dans le groupe PCR LDT-EV.

Cette association serait probablement renforcée si l'on prenait en compte la durée exacte entre la mise sous traitement et la décision de son arrêt, et non la fin de l'effet thérapeutique.

L'intérêt de la PCR Cepheid-EV reste ainsi majeur à l'heure où la résistance bactérienne aux antibiotiques constitue un problème de santé publique. Des antibiotiques à large spectre étant utilisés dans le traitement des méningites bactériennes, une diminution de leur durée d'administration permettrait un moindre impact sur le microbiote et une réduction du risque de survenue d'effets indésirables.

Au cours de cette étude, seuls 71% des patients ont eu un diagnostic de méningite virale retenu pour motif de séjour, et ce malgré la présence d'une PCR EV positive dans le LCR.

Aucune association n'était retrouvée entre le libellé du séjour et le type de PCR prescrit, ce qui paraît cohérent étant donné que les deux PCR mettent toutes deux en évidence les entérovirus.

Enfin, aucun lien n'a été retrouvé concernant les durées de séjour en jours facturés.

Il en est de même pour la valorisation du séjour qui n'était pas significativement différente entre les deux types de PCR malgré des valeurs qui semblaient indiquer le contraire. Cela reste cohérent avec notre précédente observation : les coûts de séjour étant principalement dépendants de la durée d'hospitalisation qui n'était pas significativement différente entre les deux techniques. Là encore, il serait intéressant d'approfondir cette analyse en utilisant un effectif de population plus important.

CONCLUSION

Les méningites à entérovirus représentent une part importante de motifs de consultations aux urgences pédiatriques au Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse, notamment en période estivale.

Leur présentation clinique et biologique peu spécifiques nécessite souvent le recours à un panel important d'analyses biologiques et la mise en place d'une antibiothérapie probabiliste afin d'écartier tout risque de méningite bactérienne. Les enfants sont très souvent hospitalisés le temps d'obtenir les résultats des examens de biologie, générant alors un coût de prise en charge important.

Dans ce contexte, l'utilisation d'un système de détection moléculaire rapide des entérovirus a montré son rôle dans l'amélioration de la prise en charge des patients et une réduction des montants engendrés.

Au laboratoire de virologie, la PCR Cepheid-EV est utilisée pour la recherche urgente d'entérovirus dans les LCR des services pédiatriques. Notre étude a permis de montrer que la prescription de cette PCR est reliée de manière significative à la période épidémique et ses résultats sont davantage communiqués aux services. Elle semble également bénéfique puisqu'il existe un lien significatif entre sa réalisation et une réduction de la durée des traitements anti-infectieux. Cependant, contrairement à ce que l'on pourrait attendre, ni la gravité clinique, ni l'âge du patient, ne sont associés à sa prescription.

Cette technique étant plus onéreuse et ne pouvant se faire qu'à partir d'échantillons de LCR, la deuxième PCR EV utilisée en routine au laboratoire et sur de nombreux échantillons (selles, prélèvements de gorge, etc.) apparaît alors indispensable.

Les dernières recommandations suggèrent effectivement la réalisation de prélèvements périphériques qui, en cas de positivité et au vu de l'ensemble du tableau clinique, biologique et épidémique, conforteront le diagnostic de méningite à entérovirus, en l'absence même de détection au niveau du LCR⁴².

De plus, à l'heure où l'hôpital doit faire face à des restrictions budgétaires, une méthode de détection coûteuse ne peut s'appliquer pour tous les patients.

Les conditions de réalisation de nos PCR entérovirus doivent ainsi être maintenues au CHU de Toulouse.

Ces conditions seront certainement à revoir avec l'évolution constante des automates de biologie moléculaire vers des techniques de plus en plus performantes. Les méthodes diagnostiques évoluant vers une approche syndromique, il est probable qu'à l'avenir des techniques rapides soient réalisables conjointement sur une large variété d'échantillons (prélèvements de LCR et périphériques) ou bien détectent l'ensemble des agents viraux responsables de méningite aseptique, incluant alors le Paréchovirus qui fait défaut dans les techniques actuelles dites rapides.

BIBLIOGRAPHIE

1. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Disponible sur : <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>. (Consulté le: 3 Septembre 2018)
2. Andréoletti, L. Entérovirus. *EMC - Mal. Infect.* 1–15 (2010).
3. Pallansch, M. A., Oberste, M. S. & Lindsay Whitton, J. Enteroviruses: Polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. *Fields Virol.* 490–530 (2013).
4. Lim, K. A. & Benyesh-Melnick, M. Typing of Viruses by Combinations of Antiserum Pools. Application to Typing of Enteroviruses (Coxsackie and Echo). *J. Immunol.* **84**, 309–317 (1960).
5. Stanway, G. *et al.* Family Picornaviridae. in *Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* (eds. Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U. & Ball, L. A.) 757–778 (Elsevier/Academic Press, London, 2005).
6. Peigue-Lafeuille, H. & Mirand, A. Épidémiologie et diagnostic des méningites à entérovirus. *Feuill. Biol.* 17–26 (2016).
7. Jubelt, B. & Lipton, H. L. Chapter 18 - Enterovirus/Picornavirus infections. in *Handbook of Clinical Neurology* (eds. Tselis, A. C. & Booss, J.) **123**, 379–416 (Elsevier, 2014).
8. Baggen, J., Thibaut, H. J., Strating, J. R. P. M. & van Kuppeveld, F. J. M. The life cycle of non-polio enteroviruses and how to target it. *Nat. Rev. Microbiol.* **16**, 368–381 (2018).
9. Yi, E.-J., Shin, Y.-J., Kim, J.-H., Kim, T.-G. & Chang, S.-Y. Enterovirus 71 infection and vaccines. *Clin. Exp. Vaccine Res.* **6**, 4–14 (2017).
10. Zell, R. *et al.* ICTV Virus Taxonomy Profile: Picornaviridae. *J. Gen. Virol.* **98**, 2421–2422 (2017).
11. Renois, F., Bouin, A., Wehbe, M., Leveque, N. & Andreoletti, L. Infections persistantes à entérovirus et pathologies humaines. *Virologie* **18**, 306–324 (2014).
12. Vogt, D. A. & Andino, R. An RNA Element at the 5'-End of the Poliovirus Genome Functions as a General Promoter for RNA Synthesis. *PLOS Pathog.* **6**, 1–14 (2010).
13. Muehlenbachs, A., Bhatnagar, J. & Zaki, S. R. Tissue tropism, pathology and pathogenesis of enterovirus infection. *J. Pathol.* **235**, 217–228 (2015).
14. Rhoades, R. E., Tabor-Godwin, J. M., Tsueng, G. & Feuer, R. Enterovirus infections of the central nervous system. *Virology* **411**, 288–305 (2011).
15. Ooi, M. H., Wong, S. C., Lewthwaite, P., Cardosa, M. J. & Solomon, T. Clinical features, diagnosis, and management of enterovirus 71. *Lancet Neurol.* **9**, 1097–1105 (2010).
16. Bailly, J.-L., Chambon, M. & Peigue-Lafeuille, H. Diversité et variabilité des entérovirus. *Virologie* **3**, 281–295 (1999).
17. Poliomyélite. Disponible sur : <http://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/poliomyelitis>. (Consulté le : 3 Octobre 2018)

18. Abzug, M. J. The enteroviruses: problems in need of treatments. *J. Infect.* **68 Suppl 1**, S108-114 (2014).
19. Roden, V. J., Cantor, H. E., O'Connor, D. M., Schmidt, R. R. & Cherry, J. D. Acute hemiplegia of childhood associated with Coxsackie A9 viral infection. *J. Pediatr.* **86**, 56–58 (1975).
20. Esposito, S. & Principi, N. Hand, foot and mouth disease: current knowledge on clinical manifestations, epidemiology, aetiology and prevention. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **37**, 391–398 (2018).
21. Corsino, C. B. & Linklater, D. R. Herpangina. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, 2018).
22. Sawyer, M. H. Enterovirus infections: Diagnosis and treatment. *Semin. Pediatr. Infect. Dis.* **13**, 40–47 (2002).
23. Abedi, G. R. Enterovirus and Parechovirus Surveillance — United States, 2014–2016. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **67**, 515–518 (2018).
24. InVS. Point sur les infections à entérovirus au 20 juin 2018. Disponible sur : <http://invs.santepubliquefrance.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Maladies-a-prevention-vaccinale/Poliomyelite/Points-de-situation/Point-sur-les-infections-a-enterovirus-au-20-juin-2018>. (Consulté le : 5 Octobre 2018)
25. Schuffenecker, I. *et al.* *Rapport activité CNREV 2016*. 1–89 (Centre National de Référence des Enterovirus et Parechovirus, 2016).
26. Robertson, S. La poliomyélite. in *Les bases immunologiques de la vaccination* **6**, 1–22 (Organisation mondiale de la santé Genève, 1993).
27. National Enterovirus Surveillance System. (2018). Disponible sur : <https://www.cdc.gov/surveillance/ness/index.html>. (Consulté le : 3 Octobre 2018)
28. European Centre for Disease Prevention and Control. Disponible sur : <http://ecdc.europa.eu/en/about-us>. (Consulté le : 3 Octobre 2018)
29. InVS. Point sur les infections à entérovirus au 9 décembre 2016. (2016). Disponible sur : <http://invs.santepubliquefrance.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Maladies-a-prevention-vaccinale/Poliomyelite/Points-de-situation/Point-sur-les-infections-a-enterovirus-au-9-decembre-2016>. (Consulté le : 2 Octobre 2018)
30. Aliabadi, N. *et al.* Enterovirus D68 Infection in Children with Acute Flaccid Myelitis, Colorado, USA, 2014. *Emerg. Infect. Dis. J.* **22**, 1387–1394 (2016).
31. InVS. Point sur les infections à entérovirus au 20 juin 2016. (2016). Disponible sur : <http://invs.santepubliquefrance.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Maladies-a-prevention-vaccinale/Poliomyelite/Points-de-situation/Point-sur-les-infections-a-enterovirus-au-20-juin-2016>. (Consulté le : 3 Septembre 2018)
32. InVS. Point sur les infections à entérovirus au 20 juin 2017. (2017). Disponible sur : <http://invs.santepubliquefrance.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Maladies-a->

- prevention-vaccinale/Poliomyelite/Points-de-situation/Point-sur-les-infections-a-enterovirus-au-20-juin-2017. (Consulté le : 3 Septembre 2018)
33. Lafarge, J.-C. *Détection du génome des entérovirus dans le liquide céphalorachidien par amplification génique dans les méningites*. 5–70 (Haute Autorité de santé, 2014).
 34. Abzug, M. J. Presentation, diagnosis, and management of enterovirus infections in neonates. *Paediatr. Drugs* **6**, 1–10 (2004).
 35. Ahlbrecht, J. *et al.* Cerebrospinal fluid features in adults with enteroviral nervous system infection. *Int. J. Infect. Dis.* **68**, 94–101 (2018).
 36. Hysinger, E. B., Mainthia, R. & Fleming, A. Enterovirus meningitis with marked pleocytosis. *Hosp. Pediatr.* **2**, 173–176 (2012).
 37. Song, J. *et al.* Cerebrospinal fluid non-pleocytosis in pediatric enteroviral meningitis: Large-scale review. *Pediatr Int* **60**, 855–861 (2018).
 38. Guery, B., Bru, J.-P., Piroth, L., Strady, C. & Schmit, J.-L. *17ème conférence de consensus en thérapeutique anti-infectieuse. Prise en charge des méningites bactériennes communautaires (à l'exclusion du nouveau-né)*. 1–65 (SPILF, 2008).
 39. Nazir, M. *et al.* Cerebrospinal fluid lactate : a differential biomarker for bacterial and viral meningitis in children. *J. Pediatr. (Rio J.)* **94**, 88–92 (2018).
 40. Giulieri, S. *et al.* CSF lactate for accurate diagnosis of community-acquired bacterial meningitis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **34**, 2049–2055 (2015).
 41. De Crom, S. C. M. *et al.* Prospective comparison of the detection rates of human enterovirus and parechovirus RT-qPCR and viral culture in different pediatric specimens. *J. Clin. Virol.* **58**, 449–454 (2013).
 42. Harvala, H. *et al.* Recommendations for enterovirus diagnostics and characterisation within and beyond Europe. *J. Clin. Virol.* **101**, 11–17 (2018).
 43. World Health Organization Regional Office for Europe & Centers for Disease Control and Prevention. Enterovirus surveillance guidelines. (2015).
 44. Verstrepen, W. A., Bruynseels, P. & Mertens, A. H. Evaluation of a rapid real-time RT-PCR assay for detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid specimens. *J. Clin. Virol.* **25 Suppl 1**, S39-43 (2002).
 45. Craig, M. E., Robertson, P., Howard, N. J., Silink, M. & Rawlinson, W. D. Diagnosis of enterovirus infection by genus-specific PCR and enzyme-linked immunosorbent assays. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 841–844 (2003).
 46. Desmond, R. A. *et al.* Enteroviral meningitis: natural history and outcome of pleconaril therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 2409–2414 (2006).
 47. Abzug, M. J. *et al.* A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of Pleconaril for the Treatment of Neonates With Enterovirus Sepsis. *J. Pediatr. Infect. Dis. Soc.* **5**, 53–62 (2016).

48. Lin, T.-Y. *et al.* The 1998 Enterovirus 71 Outbreak in Taiwan: Pathogenesis and Management. *Clin. Infect. Dis.* **34**, S52–S57 (2002).
49. CDC. Non-Polio Enterovirus. (2017). Disponible sur : <https://www.cdc.gov/non-polio-enterovirus/about/prevention-treatment.html>. (Consulté le : 3 Septembre 2018)
50. Martinez, M. *et al.* Progress Toward Poliomyelitis Eradication - Afghanistan, January 2017–May 2018. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **67**, 833–837 (2018).
51. Khan, F. *et al.* Progress Toward Polio Eradication — Worldwide, January 2016–March 2018. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **67**, 524–528 (2018).
52. GPEI-Polio Today. Disponible sur: <http://polioeradication.org/polio-today/>. (Consulté le : 6 Octobre 2018)
53. Archimbaud, C. *et al.* Impact of rapid enterovirus molecular diagnosis on the management of infants, children, and adults with aseptic meningitis. *J. Med. Virol.* **81**, 42–48 (2009).
54. Alonso Pérez, N. *et al.* Evaluation of an Xpert EV (Cepheid®) molecular diagnostic technique for enteroviral meningitis. *An. Pediatr. Barc. Spain 2003* **87**, 201–205 (2017).
55. Huizing, K. M. N., Swanink, C. M. A., Landstra, A. M., van Zwet, A. A. & van Setten, P. A. Rapid enterovirus molecular testing in cerebrospinal fluid reduces length of hospitalization and duration of antibiotic therapy in children with aseptic meningitis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **30**, 1107–1109 (2011).
56. Vareil, M. *et al.* Clinical and biological features of enteroviral meningitis among adults and children and factors associated with severity and length of stay. *J. Clin. Virol.* **104**, 56–60 (2018).
57. Ramers, C., Billman, G., Hartin, M., Ho, S. & Sawyer, M. H. Impact of a diagnostic cerebrospinal fluid enterovirus polymerase chain reaction test on patient management. *JAMA* **283**, 2680–2685 (2000).

RAPID MOLECULAR DIAGNOSIS OF ENTEROVIRUSES IN PEDIATRIC MENINGITIS: ANALYSIS OF CRITERIA FOR ORDERING PROCEDURES AND ANALYSIS OF CONSEQUENCES ON MEDICAL AND ECONOMIC PATIENTS' MANAGEMENT

Retrospective study on data collected during 2016 among children attending the pediatric emergency department of the Toulouse University Hospital

Enteroviruses are the most common pathogens responsible for aseptic meningitis. Molecular diagnosis is the method of choice for their detection. The Cepheid-EV PCR (GeneXpert® system) and an in-house PCR may be used interchangeably in the Virological Department of CH Toulouse according to the pediatricians' prescription.

The aim of the study was to evaluate the criteria for ordering PCR procedures and to analyze the potential impact on the pediatric patients' management.

In 2016, 78 CSF samples collected among children aged between 0-15 years were positive for enterovirus. The prescription for Cepheid-EV PCR was significantly associated with the higher endemic period ($p = 0.01$), a better availability of the results ($p = 0.01$) and the reduction of antibiotic use ($p = 0.04$). Conversely, neither the length of hospitalization nor the cost of hospitalization were modified significantly. Therefore, molecular diagnosis of enterovirus remains appropriate in Toulouse University Hospital.

CRITERES DE PRESCRIPTION ET INTERET MEDICO-ECONOMIQUE DE LA DETECTION MOLECULAIRE RAPIDE DES ENTEROVIRUS DANS LE LCR

Etude rétrospective menée sur l'année 2016 auprès des enfants admis aux urgences pédiatriques du Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse

Les entérovirus sont les principaux agents infectieux responsables de méningites aseptiques et leur détection est réalisée par PCR. Deux techniques sont disponibles au Laboratoire de Virologie du CHU de Toulouse : la PCR Cepheid-EV (système GeneXpert®) et une PCR développée en interne.

Le but de cette étude a été d'évaluer les critères de prescription en faveur de l'une ou l'autre technique et les conséquences éventuelles sur la prise en charge des enfants admis aux urgences.

En 2016, 78 PCR étaient positives à entérovirus dans des échantillons de LCR d'enfants âgés de 0 à 15ans. La prescription de la PCR Cepheid-EV a été significativement plus élevée en période épidémique ($p=0,01$). De même, les résultats ont été communiqués plus rapidement ($p=0,01$) et la durée de traitement a été réduite ($p=0,04$). Ni la durée ni le coût de séjour des patients n'ont été impactés de manière significative. Les modalités de détection des entérovirus dans le LCR peuvent être maintenues au CHU de Toulouse.

DISCIPLINE administrative : Pharmacie – Biologie médicale

MOTS-CLES : Entérovirus / Pédiatrie / PCR rapide / LCR / Méningite

Université Toulouse III - Paul Sabatier - Faculté des Sciences Pharmaceutiques
35 chemin des maraîchers
31062 Toulouse Cedex 4

Directeurs de thèse : MANSUY Jean Michel et MENGELLE Catherine