

## Nouvelle méthode de typage moléculaire des *Entérovirus* humains : caractérisation des souches malgaches “non sérotypables”

Rakoto-Andrianarivelo M<sup>1</sup>, Rousset D<sup>1</sup>, Razafindratsimandresy R<sup>1</sup>, Delpeyroux D<sup>2</sup>

**RESUME** : Les Entérovirus membres de la famille des Picornaviridae, sont à l'origine de pathologies très variées et occupent une place importante en santé publique. La méthode conventionnelle d'identification des Entérovirus non polio (ENPV) consiste en une réaction de séroneutralisation avec des antisérums spécifiques, une technique longue, lourde, coûteuse et limitée par sa capacité à identifier correctement entre autres les variants antigéniques. Une nouvelle méthodologie de typage moléculaire par séquençage partiel du génome a été récemment développée. Dans cette étude, 46 souches d'ENPV dont 37 virus antigéniquement “non sérotypables” avec les pools d'antisérums usuels ont été analysées. Le séquençage partiel du génome à l'extrémité C-terminale de la protéine VP1 et la comparaison des séquences avec les souches prototypes ont permis de déterminer l'identité des souches “non sérotypables”. Les résultats ont montré une proportion élevée et variée de Cocksackievirus A appartenant à l'espèce HEV-C, ainsi que des Echovirus et Cocksackievirus B de l'espèce HEV-B. Cette nouvelle démarche diagnostique devra permettre de mieux préciser les sérotypes d'ENPV en circulation à Madagascar et évaluer leur impact à la phase de pré-éradication de la poliomyélite.

**Mots-clés** : Entérovirus - Souches “non sérotypables” - Typage moléculaire - Séquençage - Madagascar.

**ABSTRACT** : “New method for molecular typing of human enteroviruses: characterization of “untypeable” strains isolated in Madagascar” : Enteroviruses, members of the family Picornaviridae, are responsible for a wide variety of diseases and represent a major public health hazard. Typing of non polio enterovirus (NPEV) infection is traditionally based on a serum neutralization assay. However, this method is time-consuming, labor-intensive, expensive, and may fail to identify antigenic variation. A new molecular typing involving partial sequencing of the genome has been recently developed. In this study, 46 NPEV strains were analyzed, including 37 antigenically “untypeable” viruses. Partial sequencing of the C-end of the viral capsid protein VP1 and pairwise identity with the prototype strains allow us to assign a serotype for all “untypeable” viruses. The result show a large number and wide variety of Cocksackieviruses A which belong to the HEV-C species and also Echoviruses and Cocksackieviruses B of the HEV-B species. This method may be useful to identify all NPEV serotypes in Madagascar and to assess the possible impact of circulating NPEV populations, as we enter the final stage of poliomyelitis eradication.

**Key-words** : Enteroviruses - “Untypeable” strains - Molecular typing - Sequencing - Madagascar.

### INTRODUCTION

Le genre *Entérovirus*, appartenant à la famille des *Picornaviridae*, comprend 64 sérotypes distincts selon leurs caractères antigéniques. Récemment, une nouvelle classification en 5 espèces basée sur leurs caractéristiques moléculaires et biologiques a été définie [1] : poliovirus (types 1, 2, et 3); *Human Enteroviruses-A* (HEV-A) (11 *Cocksackievirus A* et *Entérovirus 71*); HEV-B (*Cocksackievirus B*, *Echovirus*, *Cocksackievirus A9*, et *Entérovirus 69*); HEV-C (11 autres *Cocksackievirus A*); et, HEV-D (*Entérovirus 68* et *70*). Les *Entérovirus* sont à l'origine de nombreuses pathologies de gravité variable : méningites aseptiques, encéphalites,

syndromes “pieds-mains-bouche”, maladies paralytiques et infection généralisée mortelle du nouveau-né [2]. Néanmoins, la majorité des infections à *Entérovirus* passe inaperçue.

Classiquement, l'identification des *Entérovirus* non polio (ENPV) repose sur la neutralisation du pouvoir infectieux du virus avec des pools d'antisérums spécifiques. Cette méthode de typage antigénique, longue, lourde, et onéreuse, est, en plus, limitée par l'existence de souches “non sérotypables” pour lesquelles les résultats de séroneutralisation n'apportent pas de réponse clairement interprétable en ce qui concerne l'identité du sérotype. Le caractère “non sérotypable” de ces ENPV peut être dû : **i**) soit à l'absence de l'antisérum correspondant dans le kit de diagnostic; **ii**) soit à l'apparition de variants antigéniques d'un ENPV connu mais non identifiable par l'antisérum; **iii**) soit

<sup>1</sup> Institut Pasteur de Madagascar, BP 1274 - 101 Antananarivo - Madagascar.

<sup>2</sup> Laboratoire d'Epidémiologie Moléculaire des Entérovirus, Institut Pasteur - 25, rue du Dr Roux, 75724 Paris cedex 15.

à la présence de nouveaux sérotypes d'ENPV [3,4]. Afin de contourner ces différents inconvénients, des méthodes de typage moléculaire sensibles faisant intervenir le séquençage partiel du génome ont été récemment mises au point [5,6].

Dans cette étude nous rapportons les résultats du typage moléculaire de souches d'ENPV "non sérotypables" isolées à Madagascar. L'importance de la connaissance des sérotypes en circulation, notamment à la phase de pré-éradication de la poliomyélite, sera discutée.

## MATERIEL ET METHODES

Au total, 46 souches d'ENPV isolées sur cellules Hep-2 et RD entre 1994 et 2001 ont été étudiées (1994,  $n=13$ ; 1997,  $n=31$ , 2000,  $n=1$ , 2001,  $n=1$ ). Les souches comprennent 9 ENPV de sérotype connu incluant des *Coxsackievirus* B6 (CB6), des *Echovirus* 11, 13, 20 et 33 (E11, E13, E20, E33). Trente sept ENPV "non sérotypables" avec des antisérums spécifiques du Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiene (RIVM, Bilthoven, Pays-bas) ont été également considérés. Sur les 46 souches, 2 proviennent de cas de paralysie flasque aiguë (E11-005/97, NT-RD-01/00), 1 cas d'encéphalite (NT-D05/01), et 43 cas de porteurs asymptomatiques.

Après extraction de l'ARN viral au Trizol LS<sup>®</sup>, le génome a été amplifié par PCR après une étape de Transcription Réverse (RT-PCR) selon la technique développée par *Caro V et al.* [6]. La région amplifiée inclue la partie C-terminale de la VPI, les protéines 2A, 2B, et la moitié N-terminale de la 2C sur une longueur de 1452 pb. L'amplification a été réalisée dans un seul tube avec les amorces génériques antisens EUC2 (5'-TTTGACTTGAAGTGTATGTA -3'), EUC2a (5'-GGTTCAATACGGCATTGGA -3'), EUC2b (5'-GGTTCAATACGGTGTGTTGCT -3') et les amorces sens EUG3a (5'-TGGCAAACCTCCWCAACCC -3'), EUG3b (5'-TGGCAAACATCTTCMAATCC -3'), et EUG3c (5'-TGGCAGACTTCAACHAACCC -3').

Le séquençage du génome a été effectué sur les produits d'amplification après migration et découpage sur gel d'agarose et purification sur colonnes (QIAquick Gel Extraction kit<sup>®</sup>, Qiagen). La réaction de séquence a été réalisée dans un seul sens avec les amorces génomiques et le kit de séquence ADN cycliques AmpliTaq<sup>®</sup> FS Big Dye (Applied Biosystems). Le séquençage nucléotidique a été effectué sur le séquenceur automatique ABI PRISM 377 (Applied Biosystems). Les séquences

obtenues ont été comparées avec les séquences disponibles dans la banque de données (GenBank) avec le programme *Fasta* [7]. Les virus ainsi identifiés ont été alignés avec la souche prototype sur un fragment de 318 à 326 nt codant pour le tiers C-terminal de la VP1 à l'aide du programme *ClustalW* du logiciel PHYLIP [8]. D'après les résultats obtenus par *Caro V et al.* [6], un pourcentage d'identité nucléotidique  $\geq 75\%$  avec un virus prototype homotypique indique que l'isolat fait partie du même sérotype. Si le pourcentage est compris entre 70 et 75% avec un virus prototype, l'isolat fait partie probablement du même sérotype ou du sérotype immédiatement le plus proche en termes d'homologie de séquences (dans ce dernier cas seule une différence entre les deux valeurs de plus de 5% paraît déterminante). Si le pourcentage d'identité nucléotidique de la souche à caractériser avec tout autre sérotype est  $< 70\%$ , alors l'identité de cette souche est indéterminée.

## RESULTATS

Les résultats de l'analyse antigénique et du typage moléculaire des 46 souches d'ENPV a permis de mettre en évidence qu'elles appartenaient à deux espèces d'*Entérovirus* différentes : HEV-B (21 souches) et HEV-C (25 souches). Les résultats sont présentés tableaux I et II, respectivement.

Tableau I : Identification antigénique et moléculaire des 21 souches de l'espèce HEV-B

Isolat	Typage antigénique	Séquençage partiel de la VP1				$\Delta$ score
		1 <sup>er</sup> score d'id. nt.	Virus prototype	2 <sup>nd</sup> score d'id. nt.	Virus prototype	
CB6-374/94	CB6	74.8	CB6 Schmitt	69.3	E30 PR-17	5.5
CB6-001/97	CB6	74.5	CB6 Schmitt	69.3	EV69 Toluca-1	5.2
CB6-003/97	CB6	74.8	CB6 Schmitt	69.1	E30 PR-17	5.7
CB6-004/97	CB6	73.6	CB6 Schmitt	68.9	E11 Silva	4.7
NT-451/94	NT	77.9	CB6 Schmitt	70.6	EV69 Toluca-1	7.3
E11-005/97	E11	79.1	E11 Silva	72.8	E33 Toluca-3	6.3
E13-006/97	E13	79.1	E13 Del Carmen	72.4	EV69 Toluca-1	6.7
E20-007/97	E20	81.9	E20 JV-1	69.0	E33 Toluca-3	12.9
NT-008/97	NT	81.9	E20 JV-1	69.1	E33 Toluca-3	12.8
NT-009/97	NT	81.6	E20 JV-1	69.0	E33 Toluca-3	12.6
NT-010/97	NT	80.7	E20 JV-1	67.8	E33 Toluca-3	12.9
NT-011/97	NT	81.3	E20 JV-1	68.7	E33 Toluca-3	12.6
NT-012/97	NT	82.2	E20 JV-1	68.4	E33 Toluca-3	13.8
NT-013/97	NT	82.5	E20 JV-1	68.7	E33 Toluca-3	13.8
NT-020/97	NT	81.0	E20 JV-1	69.0	E33 Toluca-3	13.0
NT-021/97	NT	82.5	E20 JV-1	68.7	E33 Toluca-3	13.8
E33-014/97	E33	77.0	E33 Toluca-3	69.0	E19 Burke	8.0
E33-015/97	E33	77.0	E33 Toluca-3	69.0	E19 Burke	8.0
NT-017/97	NT	76.1	E33 Toluca-3	68.4	E19 Burke	7.7
NT-019/97	NT	76.0	E33 Toluca-3	68.3	E19 Burke	7.7
NT-RD-1/00	NT	75.1	E27 Bacon	72.9	E6 d'Amori	2.2

NT : souche antigéniquement "non sérotypable"

id. nt. : 1<sup>er</sup> et 2<sup>nd</sup> score d'identité nucléotidique avec les souches prototypes

$\Delta$  score : différence entre les 2 scores d'identité nucléotidique.

Tableau II : Identification antigénique et moléculaire des 25 souches de l'espèce HEV-C

Isolat	Typage antigénique	Séquençage partiel de la VP1				$\Delta$ score
		1 <sup>er</sup> score d'id. nt.	Virus prototype	2 <sup>nd</sup> score d'id. nt.	Virus prototype	
NT-024/97	NT	75.2	CA13 Flores	72.8	CA18 G-13	2.4
NT-456/94	NT	77.6	CA13 Flores	75.9	CA18 G-13	1.7
NT-025/97	NT	77.9	CA18 G-13	73.5	CA13 Flores	4.4
NT-026/97	NT	76.6	CA18 G-13	72.9	CA13 Flores	3.7
NT-029/97	NT	76.3	CA18 G-13	72.6	CA17-G-12	3.7
NT-034/97	NT	76.1	CA18 G-13	74.1	CA13 Flores	2.0
NT-035/97	NT	76.0	CA18 G-13	74.8	CA13 Flores	1.2
NT-439/94	NT	77.9	CA18 G-13	76.1	CA13 Flores	1.8
NT-444/94	NT	76.9	CA13 Flores	76.0	CA18 G-13	0.9
NT-445/94	NT	76.9	CA13 Flores	76.0	CA18 G-13	0.9
NT-446/94	NT	76.9	CA13 Flores	76.0	CA18 G-13	0.9
NT-354/94	NT	77.9	CA13 Flores	76.3	CA18 G-13	1.6
NT-356/94	NT	77.4	CA13 Flores	75.4	CA18 G-13	2.0
NT-404/94	NT	80.2	CA13 Flores	78.0	CA18 G-13	2.2
NT-498/94	NT	78.7	CA13 Flores	77.3	CA18 G-13	1.4
NT-D05/01	NT	100	isolat CA21*	67.5	CA24 Joseph	32.5
NT-018/97	NT	83.5	CA15 G-9	78.5	CA11 Belgium	5.0
NT-031/97	NT	83.2	CA15 G-9	78.2	CA11 Belgium	5.0
NT-027/97	NT	77.0	CA18 G-13	72.9	CA13 Flores	4.1
NT-032/97	NT	77.0	CA17-G-12	72.3	CA13 Flores	4.7
NT-033/97	NT	76.6	CA17 G-12	71.9	CA13 Flores	4.7
NT-448/94	NT	74.8	CA20 IH-35	71.9	CA17G-12	2.9
NT-423/94	NT	75.0	CA20 IH-35	72.3	CA13 Flores	2.7
NT-022/97	NT	80.1	CA24 Joseph	71.3	CA17 G-12	8.8
NT-023/97	NT	80.1	CA24 Joseph	71.3	CA17 G-12	8.8

\* : isolat CA21 de terrain présent dans "GenBank"

NT : souche antigéniquement "non sérotypable"

id. nt. : 1<sup>er</sup> et 2<sup>nd</sup> score d'identité nucléotidique avec les souches prototypes

$\Delta$  score : différence entre les 2 scores d'identité nucléotidique.

### Souches appartenant à l'espèce HEV-B

L'espèce HEV-B comprend les *Echovirus* (E1 à E33), le *Coxsackievirus A9* (CA9), les *Coxsackievirus B* (B1 à B6), et l'*Entérovirus 69* (EV69). Les 21 séquences analysées correspondant à des souches faisant partie de cette espèce comportent les séquences de un E11, deux E13, un E20, deux E33, et quatre CB6, préalablement identifiés par sérotypage. Les séquences de 12 virus "non sérotypables" apparaissent également dans ce groupe (tableau I). Les pourcentages d'identité nucléotidique les plus élevés avec les souches prototypes homotypiques varient de 73,6 à 82,5%. Les seconds scores d'identité nucléotidique (67,8 à 72,8%) l'ont été avec d'autres sérotypes de la même espèce.

Parmi les 9 souches dont le sérotype a été préalablement identifié par l'analyse antigénique, une bonne corrélation a été observée avec les résultats du séquençage partiel de la VP1. Parmi les 12 virus "non sérotypables", 8 ont été identifiés comme étant E20 par typage moléculaire. Le caractère "non sérotypable" des souches E20 était lié à une double neutralisation par les antisérums E20 et CB pool, Les 4 autres virus "non sérotypables" correspondent à un CB6, deux E33,

et un E27, Dans l'ensemble, la différence entre les 2 scores d'identité nucléotidique ( $\Delta$  score) permettant de distinguer les souches sérologiquement voisines entre un virus homotypique et le virus hétérotypique le plus proche est en moyenne de 9,2% (tableau I).

### Souches appartenant à l'espèce HEV-C

L'espèce HEV-C comprend 11 sérotypes de *Coxsackievirus A* (CA1, 11, 13, 15, 17 à 22, et 24). Les 25 séquences analysées faisant partie de ce groupe ne comprennent que des souches "non sérotypables" (tableau II).

Toutes les souches séquencées possèdent un pourcentage d'identité nucléotidique  $\geq 75\%$  avec les souches prototypes CA13 (9 souches), CA15 (2 souches), CA17 (2 souches), CA18 (7 souches), CA20 (2 souches), CA24 (2 souches), et un isolat de terrain CA21 (1 souche). Parmi les virus de l'espèce HEV-C analysées, on distingue 2 catégories : la première comprend 2 CA15, 1 CA21, et 2 CA24 qui se distinguent nettement du 2<sup>nd</sup> virus prototype hétérotypique identifié et de l'isolat de terrain CA21 avec un  $\Delta$  score  $> 5\%$ ; la seconde est composée des virus CA13, CA17, CA18, et CA20 dont les  $\Delta$  scores sont plus faibles  $< 5\%$  avec les virus prototypes hétérotypiques (tableau II).

## DISCUSSION

Cette étude a permis de mettre en valeur les avantages du typage moléculaire appliqué à l'identification des souches d'ENPV "non sérotypables" par rapport à la technique conventionnelle. Parmi les 46 souches d'ENPV analysées, 37 n'ont pu être identifiées avec les outils sérologiques classiques. Le séquençage partiel du génome à l'extrémité C-terminale de la protéine VP1 et la comparaison des séquences avec les souches prototypes de chaque espèce ont permis de déterminer sans ambiguïté l'identité de la plupart des souches "non sérotypables".

Deux espèces virales ont été identifiées : HEV-B et HEV-C. Parmi les virus de l'espèce HEV-B, le typage moléculaire a permis de confirmer d'une part les sérotypes de 8 virus préalablement identifiés par l'analyse antigénique et d'autre part d'identifier sans ambiguïté 12 souches "non sérotypables" comme étant des *Echovirus* et *Coxsackievirus B6*. Le fait que la grande majorité des sérotypes d'*Echovirus* et de *Coxsackievirus B* font partie du même groupe phylogénétique suggère qu'ils auraient divergé relativement tard durant leur évolution [11].

Parmi les virus de l'espèce HEV-C, les résultats ont montré une proportion non négligeable (25/46 : 54,3%) et variée de *Coxsackievirus A* (types 13, 15, 17, 18, 20, 21, 24). Les souches analysées faisant partie de l'espèce HEV-C étaient toutes antigéniquement "non sérotypables". De faibles différences entre le 1<sup>er</sup> et le 2<sup>nd</sup> score d'identité nucléotidique avec les virus prototypes ont été observées pour la majorité des souches *Coxsackievirus A*. Ces faibles différences nucléotidiques peuvent s'expliquer par une identité nucléotidique élevée, de l'ordre de 76% entre CA13 et CA18 et 81% entre CA15 et CA11. Par ailleurs, on note également des réactions croisées hétérotypiques entre les virus prototypes CA13-CA18, et CA15-CA11 (Committee on Enteroviruses 1962). Des observations similaires ont été rapportées par *Oberste et al.* [5] suggérant que CA13 et CA18 d'une part, et CA15 et CA11 d'autre part pourraient être classés au sein d'un même sérotype. Dans d'autres études, l'emploi d'antisérums monovalents a cependant permis de confirmer les résultats du typage moléculaire [6,9]. Cette technique n'a pas été utilisée au cours de ce travail. Cependant, seule une analyse comparative grâce à des sérums monovalents pourrait permettre de différencier la plupart des souches de cette étude apparaissant comme CA13 et CA18 et de lever ainsi l'ambiguïté que laisse subsister l'analyse moléculaire entre ces deux sérotypes.

A l'approche du stade final d'éradication de la poliomyélite, il est important de mieux documenter le rôle que peuvent jouer les ENPV dans l'apparition des diverses pathologies neurologiques, notamment les virus de l'espèce HEV-C qui sont phylogénétiquement proches des *Poliovirus*. En effet, de récentes épidémies de poliomyélite associées à des Virus Dérivés de Souches Vaccinales (VDSV) impliquant des virus recombinants entre souches vaccinales et souches d'*Entérovirus* non identifiées, probablement de l'espèce HEV-C, ont été rapportées dans différents pays [12-14]. L'apparition de ces épidémies souligne l'importance d'une meilleure connaissance de la circulation des ENPV. Cette étude montre entre autres qu'un nombre non négligeable d'*Entérovirus* de l'espèce HEV-C circulent à Madagascar.

En conclusion, les résultats obtenus ici confirment l'intérêt de la technique de typage moléculaire des ENPV. Cette technique a permis

d'identifier les souches "non sérotypables" et devra contribuer à compléter les connaissances sur la circulation des différents sérotypes et évaluer leur impact à la phase de pré-éradication de la poliomyélite.

## REFERENCES

- 1- **Pringle CR.** Virus taxonomy at the XI<sup>th</sup> International Congress of Virology, Sydney, Australia. *Arch Virol* 1999; **144** : 2065-2070.
- 2- **Melnick JL.** Enterovirus : polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses, In : Fields BN, Knippe DM, Howley PM, Channock RM, Melnick JL, Monath TP, *et al.*, editors. *Fields virology*, 3<sup>rd</sup> ed, Philadelphia : Lippincott-Raven Publishers, 1996; 655-712.
- 3- **Muir P, Kämmerer U, Korn K, Mulders MN, Pöyry T, Weissbrich B, Kndolf R, Cleator GM, van Loon AM.** Molecular typing of enteroviruses : current status and future requirements. The European Union Concerted Action on Virus Meningitis and Encephalitis, *Clin Microbiol Rev* 1998; **11** : 202-227.
- 4- **Oberste MS, Schnurr D, Maher K, al-Busaidy S, Pallansch MA.** Molecular identification of new picornaviruses and characterization of a proposed enterovirus 73 serotype. *J Gen Virol* 2001; **82** : 409-416.
- 5- **Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Pallansch MA.** Molecular evolution of the human enteroviruses : correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification. *J Virol* 1999; **73** : 1941-1948.
- 6- **Caro V, Guillot S, Delpeyroux F, Crainic R.** Molecular strategy for "serotyping" of human enteroviruses. *J Gen Virol* 2001; **82** : 79-91.
- 7- **Pearson WR, Lipman DJ.** Improved tools for biological sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85** : 2444-2448.
- 8- **Felsenstein J.** PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c. Distributed by the author, Seattle : Department of Genetics, University of Washington, 1993.
- 9- **Oberste MS, Maher K, Flemister MR, Marchetti G, Kilpatrick DR, Pallansch MA.** Comparison of classic and molecular approaches for the identification of untypeable enteroviruses. *J Clin Microbiol* 2000; **38** : 1170-1174.
- 10- **Manayani DJ, Shaji RV, Fletcher GJ, Cherian T, Murali N, Sathish N, Solomon T, Gnanamuthu C, Sridharan G.** Comparison of molecular and conventional methods for typing of enteroviral isolates. *J Clin Microbiol* 2002; **40** : 1069-1070.
- 11- **Huttunen P, Santti J, Pulli T, Hyypiä T.** The major echovirus group is genetically coherent and related to coxsackie B viruses. *J Gen Virol* 1996; **77** : 715-725.
- 12- **CDC.** Outbreak of poliomyelitis - Dominican Republic and Haïti, 2000-2001. *MMWR* 2001; **50** : 855-856.
- 13- **CDC.** Circulation of a type 2 vaccine-derived poliovirus - Egypt, 1982-1993. *MMWR* 2001; **50** : 41-42, 51.
- 14- **CDC.** Acute flaccid paralysis associated with circulating vaccine-derived poliovirus - Philippines, 2001. *MMWR* 2001; **50** : 874-875.