



Mise au point et évaluation d'une technique de PCR permettant la détection et le typage des entérovirus directement à partir de produits pathologiques ou d'échantillons environnementaux

Wafa Ibrahim

► **To cite this version:**

Wafa Ibrahim. Mise au point et évaluation d'une technique de PCR permettant la détection et le typage des entérovirus directement à partir de produits pathologiques ou d'échantillons environnementaux. Virologie. Université Jean Monnet - Saint-Etienne, 2014. Français. <NNT : 2014STET002T>. <tel-01164732>

HAL Id: tel-01164732

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01164732>

Submitted on 17 Jun 2015

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

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

Mémoire de Thèse

présenté pour obtenir
le grade de Docteur en Sciences,

Mention Virologie,

par

Madame Wafa Ibrahim

Mise au point et évaluation d'une technique de PCR permettant
la détection et le typage des entérovirus directement à partir de produits
pathologiques ou d'échantillons environnementaux

le 11 Avril 2014.

Composition du jury :

Mme Cécile HENQUELL, Docteur, Université d'Auvergne de Clermont-Ferrand, rapporteur

M. Didier HOBBER, Professeur, Université de Lille II, rapporteur

M. Francis DELPEYROUX, Professeur, Institut Pasteur de Paris, examinateur

M. Olivier GARRAUD, Professeur, Université Jean Monnet de Saint-Etienne, examinateur

Mme Sylvie PILLET, Docteur, Université Jean Monnet de Saint-Etienne, co-directrice de thèse

M. Bruno POZZETTO, Professeur, Université Jean Monnet de Saint-Etienne, directeur de thèse

Doctorat préparé au sein de Laboratoire GIMAP (EA3064), Groupe Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes (GIMAP), Faculté de Médecine Jacques Lisfranc, Université Jean Monnet de Saint-Etienne, et financé par la région Rhône-Alpes, l'Institut Pasteur de Paris et le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique.



JE DEDIE CE TRAVAIL

*A ma très chère maman **CHADLIA***

Qui m'a toujours poussé et encouragé à finir mes études malgré toute contrainte. Merci beaucoup maman pour avoir été présente chaque fois que j'ai eu besoin de toi et d'avoir été aux «petits soins» à tout moment. Grâce à tes sacrifices, j'ai pu arriver là où je suis. Je te dois beaucoup et vous aurez toujours une place importante dans mon coeur. Alors merci encore une fois.

*A ma tante **SGHAIRA***

Qui ne laisse aucune occasion sans me soutenir.

*A mon cher **FOUED***

Pour son soutien et sa patience tout au long de la thèse et pour son aide présente chaque fois où j'en ai besoin.

*A mon adorable sœur et chère petite sœur **CHIRAZ***

Pour ces encouragements continus.

*A mes chers frères **AMER** et **KHALED***

Qui ont été toujours à mes côtés pour me soutenir.

*A mes neveux **YOUSSEF**, **AHMAD**, **RADI** et ma chère nièce **MALAK***

Pour leur amour qu'ils les portent pour moi.

*A mes sœurs **SALWA** et **DALINDA**, mes beaux frères **NOUREDDINE**, **SAID**, **TARAK** et ma belle sœur **HANEN***

Qui m'ont toujours soutenu et encouragé dans ma volonté de faire une thèse. Ils ont toute ma reconnaissance et ma gratitude.

*A mon petit ange **ADAM**
Qui me donne le sourire quand je suis fatiguée.*

Mes remerciements vont aussi à toute ma famille et mes amis qui, avec cette question récurrente, « quand est-ce que tu la soutiens cette thèse ? », bien qu'angoissante en période fréquente de doutes, m'ont permis de ne jamais dévier de mon objectif final.

*Ces remerciements ne seraient pas complets sans une pensée pour mon amie, **NABILA**
Merci de m'avoir aidé et encouragé, et pour m'avoir changé les idées quand j'en avais besoin.
A ma chère **DORSAF***

Qui m'a encouragé pour commencer la thèse.

*A toute les étudiants, internes et satgiaires qui se réunissent dans la salle des internes et m'encouragent pour finir ma thèse, merci **PIERRE** pour ton aide.*

Ce travail n'aurait pu aboutir sans l'aide de nombreuses personnes. Que me pardonnent celles que j'oublie ici,

Atous ce qui ont contribué de loin ou de près à la réalisation de ce travail

*A la mémoire de mon père **HAMED**...*

Ton absence a laissé une grande vide qui m'a tué mais grâce aux souvenirs j'ai pu résister pour finir et te rendre heureux d'avoir ma

, car je sais que tu es proche de moi et que tu m'observe, j'ai bien aimé que tu sois présent ce jour là...

Je t'aime papa, tu es dans mon cœur pour toujours.

Voilà, Une étape du voyage se termine ici et une autre commence...

REMERCIEMENTS

Je souhaite remercier en premier lieu mon directeur de thèse, M. Bruno POZZETTO, Professeur des Universités et Directeur du laboratoire GIMAP, pour m'avoir accueillie au sein de son équipe. Je lui suis également reconnaissante pour le temps conséquent qu'il m'a accordé, ses qualités pédagogiques et scientifiques, sa franchise et sa sympathie. J'ai beaucoup appris à ses côtés et je lui adresse ma gratitude pour tout cela.

J'adresse de chaleureux remerciements à mon co-encadrant de thèse, Mme Sylvie PILLET, Maître de Conférences et Praticien Hospitalier à l'Université et au CHU de Saint-Etienne, pour son attention de tous les instants sur mes travaux, pour ses conseils avisés et son écoute qui ont été prépondérants pour la bonne réussite de cette thèse. Son énergie et sa confiance ont été des éléments moteurs pour moi. J'ai pris un grand plaisir à travailler avec elle.

Je voudrais remercier les rapporteurs de cette thèse Mme Cécile HENQUELL, de l'Université Blaise Pascal de Clermont-Ferrand, et M. Didier HOBBER, Professeur de Virologie de l'Université de Lille II, pour l'intérêt critique qu'ils ont porté sur mon travail.

J'adresse également mes très sincères remerciements au Professeur Francis DELPEYROUX qui m'a offert l'hospitalité de son laboratoire à l'Institut Pasteur de Paris. Je le remercie pour le soutien et la confiance qu'il m'a témoignés ainsi que pour ses encouragements et ses conseils scientifiques avec toute l'équipe du laboratoire. Je lui dis ma sincère gratitude et ma profonde reconnaissance pour avoir accepté d'examiner mon travail.

J'adresse de sincères remerciements à M. Olivier GARRAUD, Professeur en Immunologie à la Faculté de Médecine Jacques Liffranc de Saint-Etienne et animateur de l'axe « Inflammation des épithéliums et des endothéliums » au sein du GIMAP, pour m'avoir fait l'honneur de juger mon travail.

Mes remerciements vont également à M. Philippe Berthelot, Professeur en hygiène hospitalière au CHU de Saint-Etienne pour son aide dans la partie statistique de ce travail.

Mes remerciements s'adressent également à toutes les techniciennes de laboratoire de Virologie du CHU de Saint-Etienne pour leur accueil chaleureux, leur aide précieuse ainsi que pour la bonne ambiance dans laquelle ce travail a été accompli.

Je tiens à remercier également tous les membres du laboratoire des Agents Infectieux et d'Hygiène du CHU de Saint-Etienne, biologistes, techniciens, secrétaires, et en particulier Marie-Claude, et ASH pour leur aide, gentillesse et humanité, permettant à ma thèse de se dérouler dans de très bonnes conditions.

Je remercie chaleureusement tous les enseignants-chercheurs, chercheurs, techniciens et étudiants du laboratoire GIMAP (EA 3064) de la Faculté de Médecine Jacques Lisfranc de Saint-Etienne qui m'ont soutenue au cours de ces années de thèse et en particulier Hind et Fabrice COGNASSE.

Je désire grandement remercier M. le Professeur Aouni Mahjoub, Faculté de Pharmacie de Monastir, Tunisie, pour m'avoir accueillie en stage sur ce projet et pour m'avoir fait confiance. Je le remercie pour cela.

Je désire en outre remercier tous les membres du Laboratoire des Maladies Transmissibles et Substances Biologiquement Actives, Faculté de Pharmacie de Monastir, Tunisie, et surtout Rafik Harrath, pour leur sympathie et leur amitié pendant mon stage en Tunisie.

Enfin, atteindre ces objectifs n'aurait pas été possible sans l'aide de la Région Rhône Alpes, de l'Institut Pasteur de Paris et le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique qui ont participé au projet.

RESUME

Les entérovirus (EV) humains, membres de la famille des *Picornaviridae*, comprennent plus de 100 génotypes appartenant à 4 espèces : *Enterovirus A, B, C* et *D*. Ces virus sont à l'origine de pathologies très variées et occupent une place importante en santé publique. La méthode conventionnelle de typage des EV consiste en une réaction de séroneutralisation avec des antisérums spécifiques à partir de souches isolées en culture cellulaire ; cette technique est longue, coûteuse et limitée par sa capacité à identifier correctement les variants antigéniques et les nouveaux génotypes. De plus, elle est limitée aux génotypes cultivables. De nouvelles méthodologies de typage moléculaire par séquençage partiel du génome ont été récemment développées ; elles consistent à analyser une partie variable de la région codant une des protéines de capsid (VP1 ou alternativement VP2 ou VP4). Cependant ces techniques sont le plus souvent réalisées à partir de souches isolées en culture cellulaire. Le but de ce travail a été de développer une technique de typage des EV directement sur des prélèvements cliniques en se basant sur le séquençage partiel de la région VP2 dont le laboratoire avait montré précédemment l'intérêt (Nasri *et al.*, 2007). Pour le dessin des amorces, nous avons utilisé la stratégie CODEHOP (*C*onsensus *D*Egenerate *H*ybrid *O*ligonucleotide *P*rimers) de manière à améliorer à la fois la spécificité et la sensibilité de la méthode d'amplification. Nous présentons ici un premier article décrivant la nouvelle technique de typage VP2 et rapportons son application au typage d'échantillons cliniques trouvés positifs par une PCR ciblant la région 5' non codante du génome des EV sur une période de trois ans. Le deuxième article présente pour la première fois l'application d'une technique de typage direct à des échantillons environnementaux d'eaux usées. Le troisième article montre l'intérêt de coupler deux techniques de typage ciblant des régions différentes (VP1 et VP2) pour l'identification de souches d'EV isolées par culture cellulaire en Centre-Afrique. Malgré des problèmes de sensibilité, cette nouvelle technique de typage directement à partir d'échantillons peut rendre de grands services tant en clinique humaine que pour la surveillance environnementale.

Mots clés : Entérovirus, typage moléculaire, VP1, VP2, technique CODEHOP, épidémie virale.

ABSTRACT

Human enteroviruses (EV), members of the *Picornaviridae* family, comprise more than 100 genotypes belonging to four species: *Enterovirus A, B, C* and *D*. These viruses are responsible for a wide range of pathologies and play an important role in Public Health. The classic method for typing EVs consists in a seroneutralisation assay with specific antisera using strains isolated by cell culture; this technique is cumbersome, expensive and unable to type currently antigenic variants and new serotypes. In addition, it is limited to culturable serotypes. New methods of molecular typing by partial sequencing of the genome have been recently developed; they consist in analysing a variable part of the region coding for capsid protein (VP1 or alternatively VP2 or VP4). However, these techniques are usually performed on strains isolated by cell culture. The aim of this work was to develop a typing method able to work from clinical specimens by partial sequencing of the VP2 region, which had been shown to exhibit a good typing performance (Nasri et al., 2007). For the design of primers, we used the CODEHOP (*C*onsensus *D*Egenerate *H*ybrid *O*ligonucleotide *P*rimers) strategy in order to improve the sensitivity and the specificity of the amplification assay. We present herein a first article that describes in details the new VP2 typing method and requests its use for typing clinical specimens found positive by a PCR assay targeting the 5' non coding region of EVs over a period of three years. The second paper describes for the first time the direct use of a typing method on environmental wastewater samples. The third article shows the interest of coupling 2 typing techniques targeting different regions (VP1 and VP2) of the EV genome for the identification of strains isolated by cell culture in Republic of Central Africa. Despite a loss of sensitivity, the new VP2 typing method used directly on specimens was found to be of great help both for human diagnosis and environmental surveillance.

Keywords: Enterovirus, molecular typing, VP1, VP2, CODEHOP method, viral outbreak.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	4
RESUME	6
ABSTRACT	7
TABLE DES MATIERES	8
TABLE DE FIGURES	13
LISTE DES TABLEAUX	15
ABREVIATIONS	16
INTRODUCTION	18
1 HISTORIQUE	23
2 CARACTERES DES ENTEROVIRUS	24
2.1 <i>Morphologie et propriétés physicochimiques</i>	24
2.2 <i>Génome viral</i>	25
2.2.1 <i>Région 5' non codante (5'NC)</i>	27
2.2.2 <i>Région 3' non codante (3'NC)</i>	29
2.2.3 <i>Région codante</i>	30
2.3 <i>Protéines virales</i>	30
2.3.1 <i>Protéines structurales</i>	32
2.3.2 <i>Protéines non structurales</i>	32
2.3.2.1 <i>Le polypeptide P2</i>	32
2.3.2.2 <i>Le polypeptide P3</i>	34
2.4 <i>Structure de la capside</i>	36
2.5 <i>Sites antigéniques de neutralisation</i>	38
3 RELATIONS DES ENTEROVIRUS HUMAINS AVEC LEUR HOTE	40

3.1 Cycle viral.....	40
3.1.1 Récepteurs cellulaires.....	41
3.1.1.1 Les récepteurs principaux des EVs.....	41
3.1.1.2 Récepteurs alternatifs.....	48
3.1.1.3 Les co-récepteurs.....	48
3.1.2 Etapes du cycle viral.....	49
3.1.2.1 Adsorption, pénétration et décapsidation.....	49
3.1.2.2 Synthèses virales : traduction et réplication du génome viral.....	51
3.1.2.2.1 Traduction.....	51
3.1.2.2.2 Passage de la traduction à la réplication.....	51
3.1.2.2.3 Réplication.....	52
3.1.2.2.4 Discrimination entre l'ARN viral et cellulaire.....	53
3.1.2.3 Etapes tardives : morphogénèse et libération des virions.....	53
3.1.3 Effets de la multiplication virale sur la cellule hôte.....	54
3.1.3.1 Inhibition de la synthèse des protéines cellulaires.....	54
3.1.3.2 Inhibition de la synthèse de l'ARN cellulaire.....	54
3.1.3.3 Inhibition de l'importation des protéines nucléaires.....	55
3.1.3.4 Inhibition de la sécrétion des protéines.....	55
3.1.3.5 Effet cytopathique.....	55
3.1.3.6 Apoptose.....	56
3.2 Pathogénèse.....	56
3.3 Spectre d'hôte et tropisme tissulaire.....	57
3.4 Réponse immunitaire.....	59
3.4.1 Immunité innée ou naturelle.....	59

3.4.2	<i>Immunité adaptative ou acquise</i>	59
3.4.3	<i>Immunopathologie</i>	60
3.5	<i>Pathologies humaines liées aux entérovirus</i>	60
3.5.1	<i>Infections aiguës</i>	63
3.5.1.1	<i>Atteintes neurologiques</i>	63
3.5.1.2	<i>Atteintes cutanéomuqueuses</i>	64
3.5.1.3	<i>Affections respiratoires</i>	64
3.5.1.4	<i>Affections cardiaques</i>	65
3.5.1.5	<i>Autres affections</i>	65
4	EPIDEMIOLOGIE	66
4.1	<i>Modes de transmission</i>	66
4.1.1	<i>Circulation des entérovirus dans l'environnement</i>	68
4.1.2	<i>Facteurs influençant la circulation des entérovirus</i>	69
4.1.3	<i>Epidémiologie moléculaire</i>	71
4.1.4	<i>Circulation des entérovirus non polio</i>	71
4.1.5	<i>Eradication de la poliomyélite</i>	72
4.1.6	<i>Prophylaxie et thérapie</i>	74
5	CLASSIFICATION DES ENTEROVIRUS HUMAINS	75
5.1	<i>Classification initiale</i>	76
5.2	<i>Relations phylogénétiques entre les entérovirus humains</i>	79
6	CIRCULATION DES SEROTYPES D'ENTEROVIRUS	81
6.1	<i>Génotypes les plus courants</i>	81
6.2	<i>Nouveaux génotypes</i>	85
7	VARIABILITE GENETIQUE DES ENTEROVIRUS	86

7.1	<i>Les mutations ponctuelles</i>	87
7.2	<i>Les recombinaisons génétiques</i>	88
7.2.1	<i>Recombinaison chez les poliovirus</i>	89
7.2.2	<i>Recombinaison chez les entérovirus non polio</i>	90
7.2.3	<i>Bases épidémiologiques de la variabilité des entérovirus</i>	92
8	DIAGNOSTIC VIROLOGIQUE D'UNE INFECTION A ENTEROVIRUS	93
8.1	<i>Prélèvements et conservation des échantillons</i>	94
8.2	<i>Diagnostic virologique direct</i>	94
8.2.1	<i>Isolement par culture cellulaire</i>	94
8.2.2	<i>Hybridation moléculaire</i>	95
8.2.3	<i>Techniques d'amplification du génome des entérovirus</i>	96
8.3	<i>Diagnostic virologique indirect : diagnostic sérologique</i>	97
9	IDENTIFICATION DES ENTEROVIRUS HUMAINS	97
9.1	<i>Rationnel pour le typage des entérovirus</i>	97
9.2	<i>Méthode d'identification classique par séroneutralisation</i>	99
9.3	<i>Techniques d'identification moléculaires des entérovirus</i>	101
9.3.1	<i>Techniques basées sur le séquençage de la région codant VP1</i>	102
9.3.1.1	<i>Typage à partir des souches isolées par culture cellulaire</i>	103
9.3.1.1.1	<i>Techniques visant le typage de tous les entérovirus</i>	103
9.3.1.1.2	<i>Techniques visant le typage d'un sous-ensemble d'entérovirus</i> . 104	
9.3.1.2	<i>Typage direct à partir d'échantillons cliniques</i>	104
9.3.2	<i>Technique basée sur le séquençage d'une région codant VP2</i>	106
9.3.3	<i>Technique basée sur le séquençage d'une région codant VP4</i>	106
ARTICLE 1	110

1 DESCRIPTION DE LA METHODE ET APPLICATION AUX PRELEVEMENTS HUMAINS	111
1.1 <i>Introduction à l'article 1.....</i>	<i>111</i>
1.2 <i>Article 1 publié dans Clinical Microbiology and Infection (CMI) en 2013.</i>	<i>112</i>
1.3 <i>Données complémentaires</i>	<i>121</i>
1.3.1 <i>Comparaison VP1/VP2 sur les prélèvements de 2010</i>	<i>121</i>
1.3.2 <i>Problème des E-11 non détectés par la méthode VP2.....</i>	<i>122</i>
1.3.3 <i>Identification d'un nouveau variant d'E-6.....</i>	<i>122</i>
ARTICLE 2.....	128
1 RESUME DE L'ARTICLE 2	129
2 PRESENTATION DE L'ARTICLE 2	129
ARTICLE 3.....	147
1 RESUME DE L'ARTICLE 3	148
2 PUBLICATION DE L'ARTICLE 3 DANS J. CLIN. MICROBIOL.....	149
3 DONNEES COMPLEMENTAIRES.....	159
3.1 <i>Clonage.....</i>	<i>159</i>
3.2 <i>Résultats.....</i>	<i>160</i>
DISCUSSION GENERALE	161
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	169
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	170

TABLE DE FIGURES

Figure 1 : Organisation génomique des entérovirus.	26
Figure 2 : Illustration schématique de l'organisation génomique des entérovirus et des clivages successifs de la polyprotéine	26
Figure 3 : Représentation schématique des protéines structurales VP1, VP2 et VP3 et de leur répartition autour des axes de symétrie d'ordre 5 et 3. A.	27
Figure 4 : Représentation schématique de la structure secondaire de la région 5'NC du génome du poliovirus de type 1.	28
Figure 5 : Arbre phylogénétique basée sur la comparaison des séquences nucléotidiques de la région 3'NC	30
Figure 6 : Organisation du génome et mécanisme de maturation de la polyprotéine des entérovirus.	31
Figure 7 : Représentation schématique du génome des picornavirus et des produits de la polyprotéine virale.	36
Figure 8 : Structure de la capsid des entérovirus.....	37
Figure 9 : Cycle de multiplication du poliovirus.....	40
Figure 10 : Représentation des différents récepteurs des picornavirus.....	43
Figure 11 : Structure de 3 récepteurs des entérovirus appartenant à la superfamille des immunoglobulines.....	44
Figure 12 : Interaction du domaine D1 du récepteur des poliovirus (PVR-D1) avec le « canyon »	44
Figure 13 : Image reconstituée montrant les complexes virus-molécules de récepteurs.....	47
Figure 14 : Représentation schématique du modèle d'entrée d'un entérovirus et de sa décapsidation.....	50
Figure 15 : Physiopathologie simplifiée des infections à entérovirus.....	58
Figure 16 : Vésicules typiques au cours du syndrome pied-main-bouche	61
Figure 17 : Modes de transmission des entérovirus humains.....	67

Figure 18 : Représentation du nombre de patients avec au moins un prélèvement positif d'entérovirus en fonction de la distribution des cas par semaine, année 2007 en France	70
Figure 19 : Modèle saisonnier de circulation des EV, France, 2000-2004.....	70
Figure 20 : Etat des lieux des cas de poliomyélite antérieure aigue déclarés dans le monde entre juin et Décembre 2012.	73
Figure 21 : Phylogénie et classification de la famille des <i>Picornaviridae</i>	77
Figure 22 : Arbres phylogénétiques représentant la distribution des souches prototypes appartenant aux 39 principaux sérotypes d'entérovirus humains en utilisant l'alignement de Clustal W et la méthode de « neighbour-joining » dans le logiciel Mega 3.....	80
Figure 23 : Variabilité génétique au sein de l'espèce HEV-B par des études de similarité de leurs polyprotéines	88
Figure 24 : Représentation schématique des évènements possibles de recombinaison entre la région 5'NC et le reste du génome durant l'évolution des entérovirus qui pourraient expliquer l'existence seulement de deux groupes phylogénétiques, par analyse de la région 5'NC....	91
Figure 25 : Représentation schématique d'un test de typage par séroneutralisation	100
Figure 26 : Représentation schématique de la région génomique des entérovirus codant les protéines structurales.....	101
Figure 27 : Amplification avec des amorces CODEHOP.....	105
Figure 28 : Analyse phylogénétique de VP1 et VP2 des séquences de souches d'entérovirus de sérotype E-11.	126
Figure 29 : Electrophorégrammes montrant les amplicons obtenus pour une souche de référence et 4 échantillons cliniques séquencés comme E-11 par le test VP1 et non typés par le test VP2.....	123
Figure 30 : Analyse phylogénétique de VP1 et VP2 des séquences d'entérovirus de sérotype E6.....	127
Figure 31 : Illustration pour du clone cl1.1 P1/RD du 17/02/12.	160

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Molécules de surface utilisées comme récepteurs ou co-récepteurs par les membres des genres <i>Enterovirus</i> et <i>Parechovirus</i>	42
Tableau 2 : Spectre d'hôte et tropisme cellulaire des entérovirus humains.....	58
Tableau 3 : Principales pathologies en relation avec les Picornavirus.....	62
Tableau 4 : Picornaviridae isolés dans l'espèce humaine.....	78
Tableau 5 : Comparaison des résultats de typage par VP1 et VP2 sur 98 prélèvements Cliniques dans lesquels du génome entéroviral a été détecté.....	124
Tableau 6 : La sensibilité analytique de la nouvelle méthode de génotypage VP2 en comparaison avec celle du kit R-gène entérovirus et de la méthode de génotypage VP1.....	121
Tableau 7 : Liste des échantillons montrant des discordances de typage. Les scores d'identité ont été calculés par référence à la souche prototype et à la souche présentant la plus forte homologie avec le logiciel BLAST.....	125
Tableau 8 : Clonage de 4 souches d'EV isolées à l'institut Pasteur de Bangui. Trois clones ont été produits par chaque virus.....	159
Tableau 9 : Genotyping efficiency by direct analysis in various clinical specimens.....	162

ABREVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

ARN : acide ribonucléique

CV-A: coxsackievirus A

CV-B: coxsackievirus B

Da: Daltons

DTCS : *dye terminator cycle sequencing*

dNTP : désoxyribonucléotides triphosphates

DTT : dithiothréitol

E : Echovirus

ECP : effet cytopathique

EV : entérovirus

EV-A : *Enterovirus A*

EV-B : *Enterovirus B*

EV-C : *Enterovirus C*

EV-D : *Enterovirus D*

IRES : *Internal Ribosomal Entry Site*

RLP: *Ribosome Landing Pad*

ORF: *Open Reading Frame*

PTB: *Polypyrimidine-Tract-Binding Protein*

PCBP2: *Polyr (C)-Binding Protein 2*

VPg : *virion protein genome*

LCR : liquide céphalo-rachidien

M : molaire

min : minute

NC : non codante

OMS : Organisation mondiale de la santé

pb : paire de bases

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

Pol : polymérase

PV: poliovirus

PVR: *Poliovirus receptor*

EIF4-G: *Eucaryotique Initiation Factor 4G*

NCVP: *NonCapsidic Viral Protein*

RIVM: *National Institute of Public Health and the Environment Protection*

CODEHOP : (*C*onsensus *D*egenerate *H*ybrid *O*ligonucleotide *P*rimer)

RT : Transcription inverse

NK : *Cellules Natural Killer*

Sec : seconde

Ig : Immunoglobulines

PAA: Poliomyélite paralytique aigue

Cryo-ME: Cryo-microscopie électronique

OriL: *Cloverleaf*

LFA-1: Lymphocyte Function-associated Antigen1

CAR: Coxsackievirus and Adenovirus Receptor

SCR1-4: Short Consensus Repeat

Echovirus: Enteric Cytopathic Humain Orphan

Taq : *Thermophilus aquaticus*

Tp: Tampon

HFMD: syndrome pied-main-bouche

INTRODUCTION

Les entérovirus (EV) sont de petits virus appartenant à la famille des *Picornaviridae*. Il s'agit de virus non enveloppés, à symétrie icosaédrique et d'un diamètre de 27 à 30 nm, très résistants dans le milieu extérieur. Ubiquitaires, ils circulent abondamment dans les collectivités humaines et animales. Ils se multiplient principalement au niveau pharyngé et digestif et se retrouvent dans les selles. Leur transmission se fait essentiellement par voie féco-orale, plus accessoirement par voie respiratoire (Racaniello & Howley, 2007).

Ces virus à ARN positif évoluent par mutations ponctuelles et par recombinaison génétique au cours du cycle infectieux dans des cellules cibles permissives (Bailly *et al.*, 1999, Bouslama *et al.*, 2007). Les EV humains hors les rhinovirus sont actuellement classés en 4 espèces (EV- A à D), l'espèce C comprenant les 3 sérotypes de poliovirus (PV) (Adams *et al.*, 2013, Knowles NJ, 2012). Plus de 100 génotypes ont été signalés à ce jour et de nouveaux génotypes sont régulièrement décrits (<http://www.picornaviridae.com>).

Les EV sont considérés comme l'une des principales causes d'infections virales chez l'enfant et l'adulte. La plupart de ces infections sont banales, voire asymptomatiques. Cependant, d'autres peuvent être plus graves comme par exemple les méningites aiguës à l'origine de véritables épidémies (Pallansch & Roos, 2007). Les EV sont également responsables de paralysies -dont la poliomyélite est l'exemple historique-, d'atteintes cardiaques et d'infections néonatales graves. Certaines infections à EV sont considérées comme émergentes, comme en témoignent les épidémies à EV-A71 en Asie comportant une proportion importante d'encéphalites graves (Ooi *et al.*, 2010).

Le typage des EV est indispensable pour identifier les souches responsables de ces infections afin de déterminer le mode de circulation et de transmission propre à chaque génotype et de repérer les nouveaux variants à l'origine d'épidémies. L'identification des EV est également nécessaire afin de rechercher et de différencier les souches polio des autres EV. Par ailleurs, l'identification précise d'un EV non poliomyélitique est intéressante afin de progresser dans les études de relations entre les différents sérotypes et les pathologies engendrées.

Historiquement, l'identification des EV repose sur la culture cellulaire et la séroneutralisation de l'effet cytopathique à l'aide d'antisérums polyclonaux (Racaniello & Howley, 2007). Or, aucune lignée cellulaire ne permet d'isoler tous les types d'EV. De plus, la culture cellulaire est une technique lourde, coûteuse et manque de sensibilité. Pour remédier à ces problèmes, des solutions

alternatives reposant sur la biologie moléculaire ont été proposées permettant d'effectuer rapidement un typage des infections à EV (Nasri *et al.*, 2007a). Ces méthodes reposent sur l'amplification de séquences ciblant une partie variable de la région codant une protéine de capsid (VP1) (Nix *et al.*, 2006) et, alternativement, VP2 ou VP4 (Nasri *et al.*, 2007a). Quelle que soit la région testée, elles donnent dans l'ensemble des résultats équivalents en termes de sérotypes identifiés (Oberste *et al.*, 2000; Nasri *et al.*, 2007a; Nasri *et al.*, 2007b; She *et al.*, 2010).

Le principal écueil de la plupart des techniques de typage moléculaire est la nécessité de travailler à partir de souches isolées en culture cellulaire, avec les inconvénients mentionnés plus haut. Plus récemment, des auteurs ont proposé l'amplification directe à partir d'échantillons cliniques ou environnementaux. La technique décrite par Nix et coll. (Nix *et al.*, 2006) est celle qui est la plus utilisée ; elle cible la région capsidale VP1. Les auteurs ont remplacé les amorces dégénérées 222-292 utilisées précédemment (Oberste *et al.*, 2000) par un nouveau couple d'amorce AN89-AN88 dessinées selon la technologie CODEHOP (*CO*nsensus *DE*generate *Hybrid Oligonucleotide Primer*) (Rose, 2005). Ces amorces ciblent, par une PCR semi-nichée, la partie initiale de la région codant la protéine VP1 correspondant à 375 pb. Grâce à cette technique, toutes les souches prototypes et 87 isolats cliniques représentant 29 sérotypes ont été identifiés par typage direct (Nix *et al.*, 2006). Cette technique peut être appliquée avec succès pour le typage des EV directement à partir de prélèvements cliniques (Tavakoli *et al.*, 2008).

Une nouvelle technique de typage des EV a été proposée par notre laboratoire en collaboration avec des chercheurs tunisiens. Elle cible la partie centrale de la région codant la protéine capsidale VP2. Grâce à cette technique, 116 isolats cliniques et environnementaux ont été typés, représentant 36 sérotypes (Nasri *et al.*, 2007b). Cependant cette technique nécessite le passage par la culture cellulaire. Ainsi, l'objectif principal de ce travail de thèse a été d'améliorer cette technique de typage moléculaire ciblant la région codant la protéine VP2 afin de typer les souches d'EV directement à partir de prélèvements cliniques ou environnementaux.

Pour réaliser cet objectif, nous avons modifié les amorces selon la stratégie CODEHOP de manière à augmenter la sensibilité et la spécificité des réactions d'amplification et par conséquent à pouvoir typer les amplicons exprimés plus faiblement (Rose *et al.*, 1998, 2003). La particularité de cette méthode tient à la détermination des amorces. Celles-ci sont définies dans les régions conservées codant une protéine. Les 3 ou 4 codons en 3' de l'amorce, appelés « core », sont

dégénérés tandis que la suite des nucléotides en 5' (« clamp ») correspond à la séquence nucléotidique la plus consensuelle. La partie 5' non dégénérée permet d'avoir des amorces plus longues, ce qui autorise des températures d'hybridation plus hautes et permet donc des hybridations plus spécifiques.

Les premiers cycles de PCR associée aux amorces CODEHOP permettent d'amplifier les séquences présentant la plus forte spécificité avec la partie 3' de l'amorce. Après quelques cycles d'amplification, la séquence conservée en 5' permet une hybridation maximale entre les amplifiats et les amorces encore présentes dans le mélange réactionnel. Il en résulte une amplification plus spécifique et plus importante des séquences faiblement exprimées.

La mise au point de cette nouvelle méthode et son application pour le génotypage direct à partir de prélèvements cliniques d'origine diverse, a fait l'objet de la première partie de ce travail. Dans une deuxième partie, nous avons utilisé cette technique pour le typage direct des EV à partir de prélèvements environnementaux en collaboration avec le laboratoire des substances biologiquement actives de la faculté de pharmacie de Monastir. Dans une 3ème partie, nous montrerons l'intérêt du typage des EV dans deux régions différentes, VP1 et VP2, pour la caractérisation de souches isolées en République Centrafricaine, et ce en collaboration avec l'institut Pasteur de Paris.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1 Historique

L'histoire des EV commence avec celle de la poliomyélite. Cette maladie est connue en Egypte depuis environ 4000 ans : des sujets présentant une amyotrophie des membres inférieurs sont représentés sur des stèles ou des bas-reliefs. Les premiers signes cliniques de la poliomyélite ont été décrits en 1800, chez des patients souffrants de paralysie avec fièvre. En 1840, d'autres études ont montré que les douleurs spécifiques de la maladie étaient dues à une atteinte des neurones moteurs de la corne antérieure de la moelle épinière. En 1908, Landsteiner et al. démontraient la nature virale de la poliomyélite et reproduisaient la maladie chez le singe par inoculation d'extrait de moelle épinière d'un enfant décédé de poliomyélite (Pallansch & Roos, 2007). En 1909, Landsteiner et Popper découvraient que l'agent étiologique de la poliomyélite (en grec, *polios* : gris et *myelos* : moelle) paralytique aiguë était le PV (Kristensson, 1999).

Dès 1910, des virologues essayèrent de répliquer le PV dans des cultures de tissus et même dans des milieux acellulaires (Flexner & Noguchi, 1913). En 1936, Sabin et Olitsky parvinrent à cultiver le PV sur des tissus embryonnaires humains d'origine nerveuse (Lashkevich, 2008). Treize ans plus tard, l'équipe d'Enders montra que les PV sont capables de se multiplier sur des cellules non nerveuses d'origine humaine et que ces virus entraînent l'apparition d'un effet cytopathique spécifique (Enders, 1972). Cette découverte révolutionnaire, qui a permis de distinguer les trois sérotypes de PV, a valu le Prix Nobel de Médecine à ses auteurs en 1954. Elle allait permettre le développement des deux vaccins antipoliomyélitiques de Jonas Salk (Salk, 1956 ; Salk, 1959) et d'Albert Sabin (Sabin, 1959 ; Sabin, 1985).

En 1950, le pic d'incidence de la poliomyélite aux États-Unis se déplace de la petite enfance vers les enfants âgés de 5 à 9 ans ; environ un tiers des cas surviennent chez les plus de 15 ans (Melnick, 1996a). Les taux de paralysie et de mortalité due à l'infection par le PV augmentent également durant cette période. L'épidémie de 1952 aux États-Unis a été la plus importante dans l'histoire de cette nation et a permis de faire prendre conscience à l'opinion publique de la nécessité d'un vaccin. Sur les 57 628 cas enregistrés cette année-là, 3 145 furent mortels et 21 269 furent à l'origine de séquelles paralytiques plus au moins invalidantes (Melnick, 1996a).

En 1988, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a mis en place un programme d'éradication de la poliomyélite reposant sur des campagnes de vaccination massive. Après 19 ans de vaccination intensive, l'incidence de la poliomyélite a diminué de 99% dans le monde. Cependant, du fait de la propagation rapide du PV dans des populations insuffisamment

immunisées et de l'émergence de souches neuropathogènes dérivées des souches vaccinales, la poliomyélite reste un problème de santé publique dans quelques pays en développement d'Afrique et d'Asie.

Des nombreux EV ont été découverts dans les années 1960 à partir de patients, de porteurs asymptomatiques ou dans l'environnement : coxsackievirus (CV) A et B, echovirus (E) (pour *Enteric Cytopathic Human Orphan*), EV-68 (bronchiolites), EV-70 (conjonctivite), EV-A71 (paralysies) ... Dans les années 1980, avec le développement des techniques de biologie moléculaire, le premier génome à ARN d'un virus humain à être rétro-transcrit en ADN est celui du PV. Le clonage et le séquençage du PV et des autres EV ont permis de réactualiser la classification et de développer l'approche diagnostique mettant en évidence le génome par amplification génomique.

2 Caractères des Entérovirus

2.1 Morphologie et propriétés physicochimiques

Le PV est le prototype du genre *Enterovirus* dans la famille des *Picornaviridae*. La structure tridimensionnelle de la capsid e a été élucidée par cristallographie aux rayons X ou cryo-microscopie électronique (cryo-ME) pour les trois sérotypes de PV et pour le CV-A21 (Hogle *et al.*, 1985 ; Filman *et al.*, 1989 ; Lentz *et al.*, 1997 ; Xiao *et al.*, 2005). Il s'agit d'un virion d'environ 25 à 30 nm de diamètre constitué d'une capsid e icosaédrique de nature protéique et dépourvue d'enveloppe lipoprotéique. Ces virions ont une densité en chlorure de césium de 1,34 g/ml, un coefficient de sédimentation de 156S en gradient de saccharose et une masse moléculaire variant de 8 à 9 10⁶ Daltons. Comme tous les virus nus, ils résistent dans le milieu extérieur, à l'alcool à 70°, à l'éther, au déoxycholate de sodium et aux détergents. Ils se conservent plusieurs années à -20°C.

Leur comportement vis-à-vis des pH acides permet de les différencier des rhinovirus, qui sont rapidement inactivés à pH 6 (propriété utilisée pour leur identification en pratique). Cette résistance leur permet de franchir la barrière stomacale, de se multiplier dans le tube digestif et d'être excrétés en grande quantité dans les matières fécales pendant plusieurs semaines après l'infection.

L'absence d'enveloppe chez les EV les rend relativement résistants à l'action des agents physico-chimiques. Ils sont détruits par les oxydants (hypochlorite de soude), le formol 0,3 %, la beta-propionalactone et les ultraviolets (Pallansch & Roos, 2007). Leur transmission se fait principalement selon le mode fécal-oral, mais des contaminations respiratoires, cutanéomuqueuse ou manuportées sont également possibles (Pallansch & Roos, 2007).

Ces virus non enveloppés possèdent une capsidre icosaédrique renfermant un génome constitué d'une molécule d'ARN monocaténaire de polarité positive. Ils appartiennent à la famille des *Picornaviridae* et à l'ordre des *Picornavirales* (Fauquet & Mayo, 2005). A l'origine, la classification des picornavirus était basée sur leur pouvoir pathogène chez l'homme et l'animal (signes cliniques de l'hôte infecté) et sur leurs propriétés biophysiques (densité des virions en chlorure de césium, sensibilité aux pH acides) (Cooper, 1978). Cependant les informations disponibles sur ces virus se sont accrues, notamment au niveau des séquences génétiques, mais aussi en ce que concernent l'analyse structurale, l'identification des récepteurs cellulaires et leurs propriétés antigéniques. Cette classification a donc évolué en fonction des propriétés biologiques et génétiques des picornavirus. Elle est maintenant établie sur les données phylogénétiques qui reflètent mieux l'histoire évolutive et les mécanismes de la réplication virale (Fauquet & Mayo, 2005).

2.2 Génome viral

Le génome des EV consiste en une molécule d'ARN monocaténaire, linéaire, de polarité positive, d'environ $2,5 \times 10^6$ Daltons qui comporte 7500 nucléotides codant une polyprotéine qui est clivée ultérieurement. Le génome viral est polyadénylé à son extrémité 3' et son extrémité 5' est liée de façon covalente à une petite protéine virale basique VPg (*virion protein genome*) (**Figure 1**). L'ARN est dit de polarité positive et donc infectieux parce qu'il peut être directement traduit en protéines virales nécessaires à la réplication dès sa libération dans la cellule.

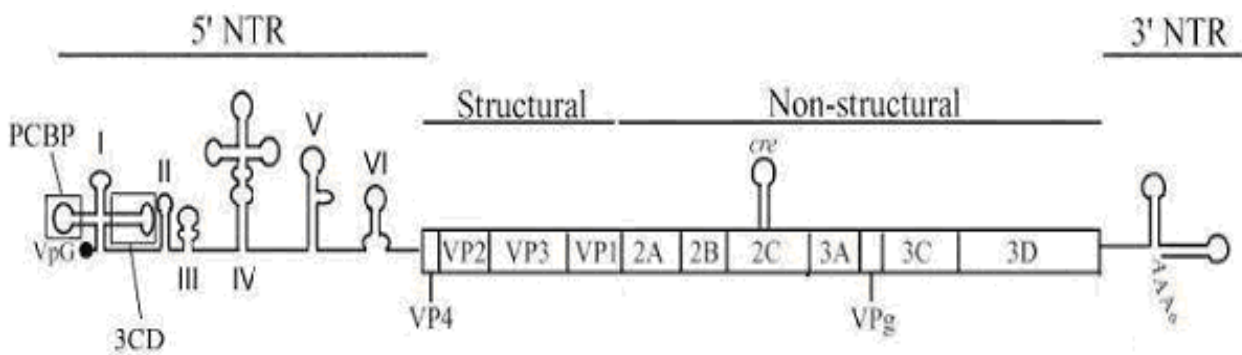


Figure 1 : Organisation génomique des entérovirus. La région codante est entourée de 2 régions non codantes en 5' et 3' impliquées dans la régulation de la réplication et de la traduction. Elle code, elle-même, des protéines structurales (les 4 protéines de capside) et des protéines non structurales (protéases et polymérase) (Racaniello & Howley, 2007).

Cet ARN comprend un seul cadre de lecture fonctionnel flanqué de deux régions non codantes impliquées dans la régulation de la traduction et de la réplication du génome. La traduction du cadre de lecture aboutit à une seule polyprotéine qui subit une série de clivages par protéolyse en trois précurseurs : P1, P2 et P3 (**Figure 2**). P1 est le précurseur des quatre protéines structurales VP4, VP2, VP3 et VP1 qui forment la capside virale (**Figure 3**).

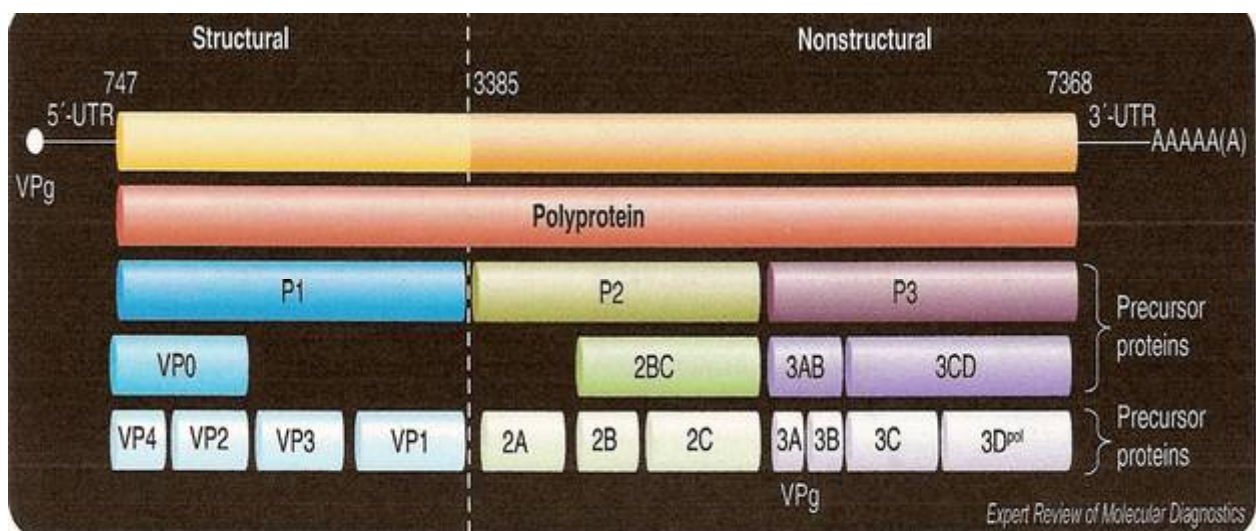


Figure 2 : Illustration schématique de l'organisation génomique des entérovirus et des clivages successifs de la polyprotéine (Nasri *et al.*, 2007b).

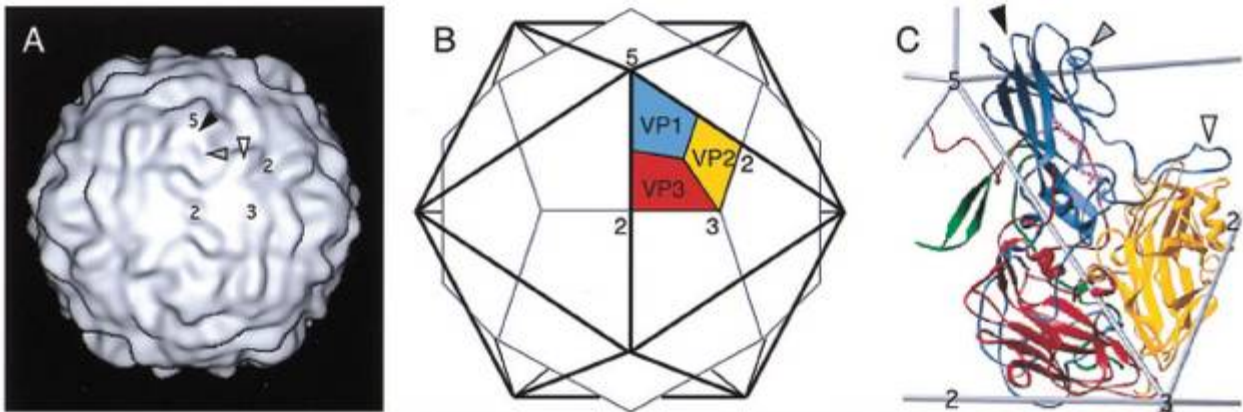


Figure 3: Représentation schématique des protéines structurales VP1, VP2 et VP3 et de leur répartition autour des axes de symétrie d'ordre 5 et 3. A. Représentation de la structure de la capside visualisée par cristallographie aux rayons X ; les axes de symétrie 5, 3 et 2 sont figurés. B. Localisation d'un protomère composé d'une copie de VP1 (bleu), VP2 (jaune), VP3 (Rouge), et VP4 (vert ; montré seulement en C). C. Topologie en forme de feuillets β des trois protéines de capside, contenant chacune deux hélices α (indiquées par des cylindres) et huit feuillets β plissés anti-parallèles (indiqués par des flèches), liés entre eux par des boucles de connexion (Belnap *et al.*, 2000).

La protéine VP4 n'est pas exposée à la surface de la particule virale. Cette capside virale comporte une dépression, appelée « canyon », qui contient le site d'attachement aux récepteurs cellulaires. P2 et P3 sont les précurseurs des sept protéines non structurales dont la plupart sont des enzymes. Le premier génome de picornavirus qui a été cloné et séquencé a été celui du PV-1 (Kitamura *et al.*, 1981). L'organisation génomique alors décrite s'est avérée par la suite extrêmement conservée au sein de cette famille virale, avec cependant une grande variabilité dans la taille du génome et les séquences nucléotidiques (Racaniello & Howley, 2007).

2.2.1 Région 5' non codante (5'NC)

La région 5'NC des EV est particulièrement longue par comparaison aux autres picornavirus (Wimmer *et al.*, 1993). Cette région a une longueur d'environ 740 nucléotides. Elle présente une forte homologie de séquence au sein des EV (**Figure 4**) ; elle est extrêmement conservée entre les virus d'une même espèce et est impliquée dans des processus de régulation de la réplication de

l'ARN et de sa traduction en protéines (Skinner *et al.*, 1989 ; Rohll *et al.*, 1994). Cette région du génome présente une structure secondaire très complexe composée de structures en doubles hélices et en boucles. Les 88 premiers nucléotides ont une structure en forme de trèfle appelée « cloverleaf » (OriL) qui joue un rôle dans l'initiation de la réplication des brins de polarité positive et qui pourrait contrôler le passage de la traduction à la réplication du génome viral (Gamarnik & Andino, 1998).

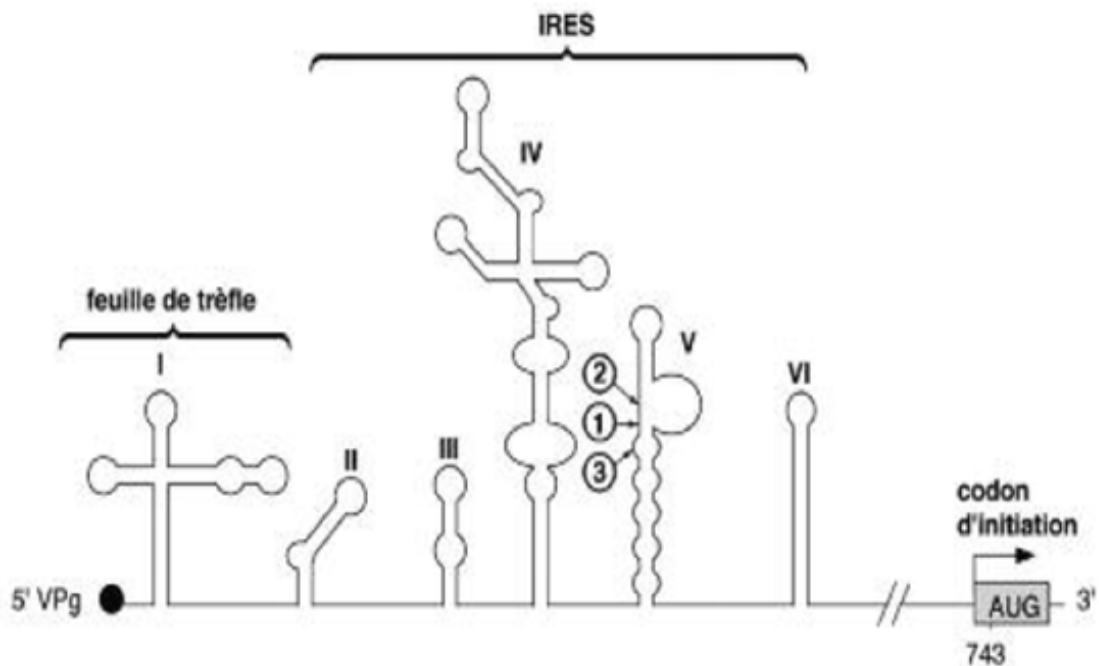


Figure 4 : Représentation schématique de la structure secondaire de la région 5'NC du génome du PV-1. Les six structures en tige-boucle de la région 5'NC sont notées I à VI. La structure I constitue le site d'initiation de la réplication du génome (structure en feuille de trèfle) et les structures II à IV comprennent le site d'initiation interne de la traduction (IRES) en amont du codon initiateur de la traduction (AUG). Les positions des mutations d'atténuation dans la région 5'NC des souches Sabin de type 1 (nucléotide 480, A vers G), 2 (nucléotide 481, A vers G) et 3 (nucléotide 472, C vers U) sont indiqués par les flèches 1, 2 et 3 respectivement (Blondel *et al.*, 2008).

Du fait de l'absence de coiffe en 5' de l'ARN viral, la traduction du génome en une polyprotéine est sous le contrôle d'une structure appelée RLP (*Ribosome Landing Pad*) ou IRES (*Internal Ribosome Entry Site*) (Pelletier & Sonenberg, 1988 ; Rohll *et al.*, 1994). Il a été montré que l'IRES était bifonctionnel et contenait également des séquences, agissant en cis, nécessaires pour la réplication du génome viral (Borman *et al.*, 1994 ; Shiroki *et al.*, 1995 ; Ishii *et al.*, 1999). De

plus, il a été montré qu'une séquence d'environ 35 nucléotides chez le PV (nucléotides 89 à 123) séparant la structure en feuille de trèfle de l'IRES semblait jouer un rôle dans la multiplication virale (Toyoda *et al.*, 2007).

La structure primaire des premiers 650 nucléotides de la région 5'NC est très conservée dans le genre *Enterovirus*, conférant à cette région une importance capitale dans le diagnostic moléculaire (Zoll *et al.*, 1992). Cet IRES serait également impliquée dans la réplication du génome viral (Borman *et al.*, 1994). Il s'avère donc que cette structure, bien que non traduite, revêt une importance capitale dans la biologie des EV (Skinner *et al.*, 1989), comme dans celle du virus de l'hépatite C qui possède lui aussi une structure de type IRES (Tsukiyama-Kohara *et al.*, 1992).

Enfin, l'IRES, et particulièrement le domaine V de cette structure, porte la mutation impliquée dans l'atténuation des souches vaccinales Sabin de PV (**Figure 4**). Cette mutation (en position 480, 481 et 472 dans le génome Sabin de types 1, 2, et 3, respectivement), initialement suspectée d'atténuer le pouvoir réplcatif des virus vaccinaux (Svitkin *et al.*, 1985), a été confirmée comme ayant un rôle majeur de contrôle de la neurovirulence du PV (Gromeier *et al.*, 1999)

2.2.2 Région 3' non codante (3'NC)

La région 3'NC est courte et de taille variable selon les EV, de 60 nt pour le PV à 100 nt pour les CV-B. Elle a une structure secondaire complexe (3 domaines en « épingle à cheveux »). Elle est également impliquée dans l'initiation de la réplication de l'ARN viral (Jacobson *et al.*, 1993 ; Pierangeli *et al.*, 1995 ; Pilipenko *et al.*, 1996). Son extrémité 3' terminale porte une séquence polyadénylée d'environ 75 nt nécessaire à l'infectivité du génome viral. La fonction exacte de cette séquence homopolymérique est encore incertaine mais elle semble néanmoins impliquée dans le processus de réplication du génome et dans l'infectivité de l'ARN génomique (Sarnow, 1989).

La région 3'NC constitue un élément hautement conservé au sein d'une même espèce d'EV, agissant en cis et qui contrôle la polyadénylation des brins (+) néo-synthétisés et l'initiation de la synthèse du brin (-) (**Figure 5**).

Elle intervient également lors de l'initiation de la synthèse du brin de polarité négative de l'ARN viral, via une structure tertiaire en pseudo-nœud (Jacobson *et al.*, 1993) ou via une interaction intramoléculaire de type "kissing" entre deux boucles en épingle à cheveux.

2.2.3 Région codante

La région codante est constituée d'une longue phase de lecture ouverte codant une polyprotéine d'environ 250 kDa de taille relativement constante chez les EV.

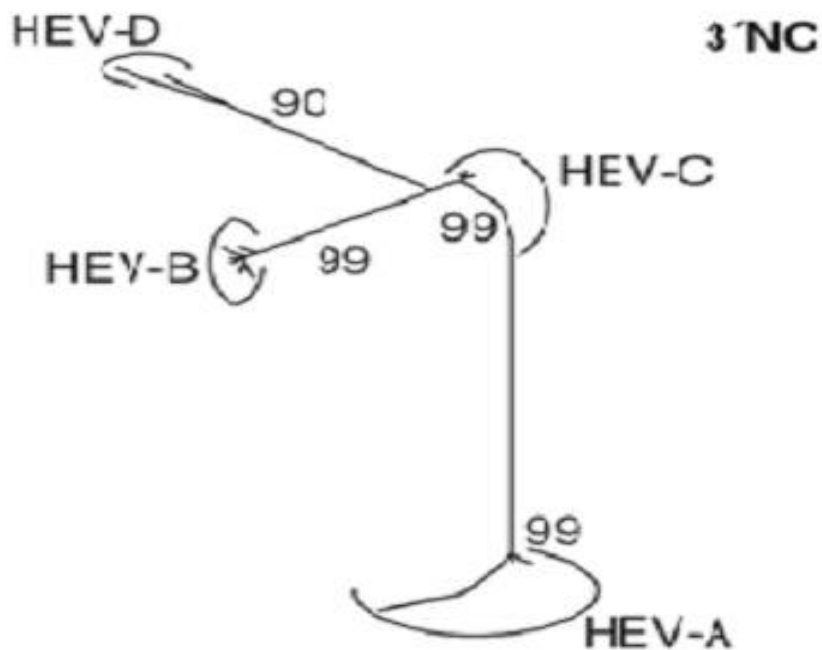


Figure 5 : Arbre phylogénétique basée sur la comparaison des séquences nucléotidiques de la région 3'NC (Nasri *et al.*, 2007b).

2.3 Protéines virales

La région codante de l'ARN viral est traduite en une seule polyprotéine qui n'a jamais été détectée dans les cellules infectées car elle est clivée au fur et à mesure de sa synthèse. Cette polyprotéine est scindée par clivages protéolytiques successifs en trois régions P1, P2 et P3, correspondant aux trois précurseurs des protéines virales (**Figure 6**). Ces clivages sont assurés

par les protéases virales 2A^{pro}, 3CD^{pro} et 3C^{pro} et génèrent alors 11 protéines virales (Kitamura *et al.*, 1981 ; Hellen *et al.*, 1989 ; Wimmer *et al.*, 1993). Le polypeptide P1 est le précurseur des protéines structurales VP1, VP2, VP3 et VP4 qui forment la capsid virale. Les polypeptides P2 et P3 sont les précurseurs des protéines non structurales 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C et 3D qui sont pour la plupart des enzymes sauf 3B qui correspond à la protéine VPg associée au génome VIRAL.

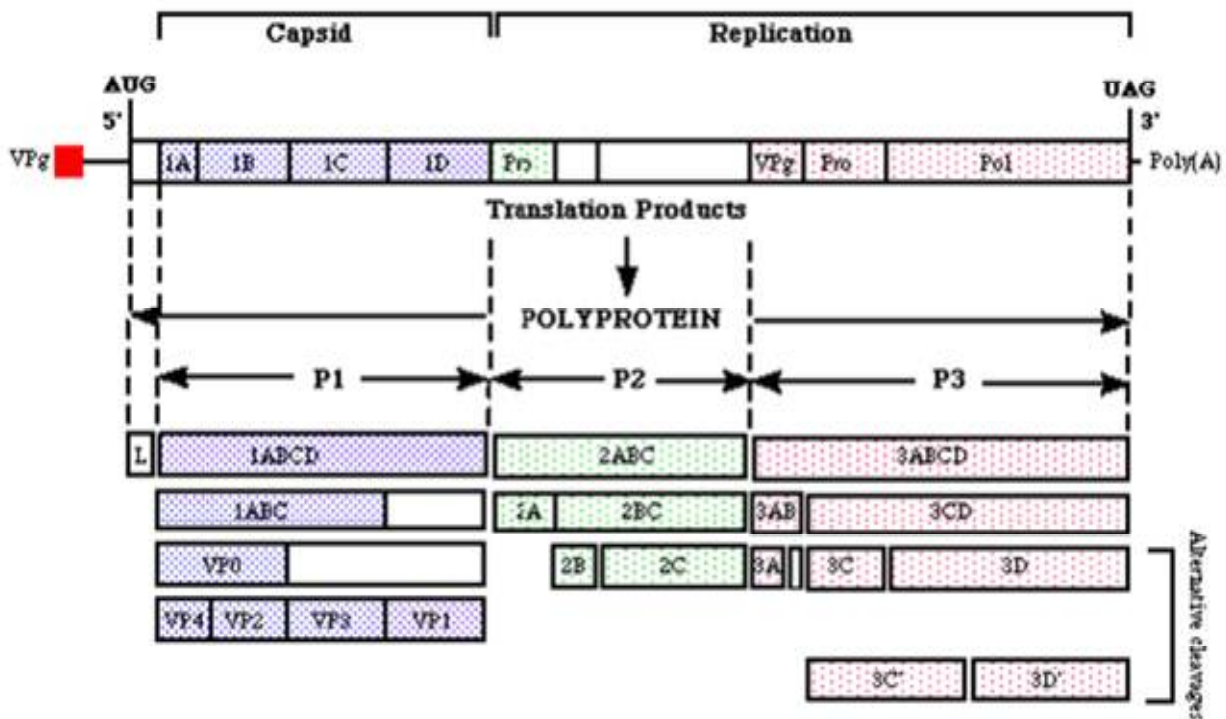


Figure 6 : Organisation du génome et mécanisme de maturation de la polyprotéine des entérovirus. La région codante est divisée en trois régions, P1, P2 et P3 qui seront secondairement clivées par les 2 protéases virales, 2A et 3C. Les produits des clivages intermédiaires et finaux sont indiqués (Racaniello & Howley, 2007).

2.3.1 Protéines structurales

La région P1 code la polyprotéine P1, précurseur des protéines structurales VP4, VP2, VP3, et VP1 de la capsid de symétrie icosaédrique (dans cet ordre sur le précurseur). Dès que P1 est libéré du reste de la polyprotéine par la protéase 2A, elle est à son tour clivée en VP0, VP3 et VP1 par la protéase 3D, VP0 donnant ultérieurement VP4 et VP2 lors de l'assemblage du virion (Arnold *et al.*, 1987). La capsid est formée de 12 pentamères résultant chacun de l'association de 5 protomères. Ainsi, chaque protomère comprend quatre protéines structurales : VP1, VP2 et VP3 qui sont exposées à la surface de la capsid alors que la protéine VP4, plus petite, est entièrement interne dans le virion mature. Cette protéine est liée de manière covalente à l'acide myristique (acide n-tétradécanoïque) au niveau d'un résidu de glycine de l'extrémité aminée. Les groupes myristyle interagissent avec les chaînes latérales d'acides aminés de VP4 et VP3 et jouent un rôle dans l'assemblage du virus et dans la stabilité de la capsid (Kräusslich *et al.*, 1990).

Contrairement à la région 5'NC, la région codant les protéines structurales, particulièrement au niveau des sites antigéniques, montre une variation intratypique très importante. La pression de sélection exercée par le système de défense de l'hôte explique l'hétérogénéité de la séquence des régions situées à la face externe de la capsid et impliquées dans la structure des sites antigéniques neutralisants.

2.3.2 Protéines non structurales

Les régions P2 et P3 codent les polyprotéines P2 et P3, qui sont les précurseurs des protéines non structurales impliquées dans le clivage de la polyprotéine, la réplication du génome viral et l'inhibition des fonctions cellulaires (Porter, 1993 ; Pallansch & Roos, 2007). Les fonctions de ces différentes protéines sont représentées sur la Figure 7.

2.3.2.1 Le polypeptide P2

Le second clivage protéolytique, assuré par la protéase virale 3C, a lieu entre les précurseurs P1 et P2. Le polypeptide P2 libre est à son tour clivé pour donner naissance aux protéines matures 2A, 2B et 2C (**Figure 6**). Le précurseur 2BC est stable et serait impliqué dans la synthèse de l'ARN viral.

La protéine 2A est une protéase libérée de manière autocatalytique de la polyprotéine virale (Hellen *et al.*, 1992). Par un clivage autocatalytique en *cis*, elle permet la libération précoce du polypeptide P1 du reste de la polyprotéine (Toyoda *et al.*, 1986a ; Hellen *et al.*, 1992). Elle est ensuite impliquée dans le clivage protéolytique du précurseur 3CD et participe également à la réplication de l'ARN viral (Lee & Wimmer, 1988 ; Molla *et al.*, 1993). Au niveau cellulaire, 2A est responsable de l'extinction (*shut-off*) de la synthèse des protéines cellulaires par clivage protéolytique de la protéine p220 constituant le facteur d'initiation de traduction eucaryotique 4G (eIF4-G, pour eucaryotique initiation factor 4G) (Hellen *et al.*, 1992). En revanche, la traduction de l'ARN viral non coiffé contrôlée par l'IRES serait stimulée (Hambidge & Sarnow, 1992 ; Borman *et al.*, 1997 ; Gradi *et al.*, 1998). Ce phénomène a bien été démontré chez les PV, les CV et plus récemment l'EV-A71 (Thompson & Sarnow, 2003). D'autre part, la protéine 2A pourrait jouer un rôle dans la pathogénicité de certaines formes de cardiomyopathies liées aux EV (Badorff *et al.*, 2000).

La protéine 2BC, précurseur des protéines 2B et 2C, serait impliquée également dans la réplication virale. Elle induirait une prolifération membranaire aboutissant à une accumulation de vésicules viro-induites sur lesquelles sont ancrés les complexes de réplication (Cho *et al.*, 1994 ; Aldabe & Carrasco, 1995). Dans ces complexes de réplication, les protéines 2BC et 2C sont liées spécifiquement à l'ARN grâce à une séquence conservée située au niveau de la structure en forme de trèfle à l'extrémité 3' terminale du brin d'ARN de polarité négative (Banerjee *et al.*, 1997, 2001). Par ailleurs, la protéine 2BC bloquerait le transport des protéines cellulaires du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi et augmenterait la perméabilité de la membrane cellulaire (Aldabe *et al.*, 1996). Plus récemment, il a été démontré que la protéine 2BC des CV-B4 jouerait également un rôle anti-apoptotique en bloquant l'activité de la caspase-3 (Salako *et al.*, 2006).

La protéine 2B semble jouer un rôle structural dans les complexes de réplication virale (Johnson & Sarnow, 1991), dans le blocage des processus de sécrétion des protéines cellulaires au niveau du réticulum endoplasmique (Doedens & Kirkegaard, 1995) et dans la perturbation de l'intégrité membranaire de l'appareil de Golgi (Sandoval & Carrasco, 1997).

La protéine 2C interviendrait surtout au cours de l'initiation de la synthèse de l'ARN de polarité négative (Barton & Flanagan, 1997). Elle contient le site de résistance à la guanidine, une drogue inhibant la réplication entérovirale (Baltera & Tershak, 1992). Cette caractéristique a été bien exploitée pour une meilleure compréhension du rôle de cette protéine dans la réplication du génome viral. En effet, la protéine 2C interviendrait surtout dans l'initiation de la synthèse du

brin d'ARN de polarité négative (Barton & Flanagan, 1997). La protéine 2C semble jouer aussi un rôle dans la formation des complexes de réplication. Comme son précurseur 2BC, elle induirait la prolifération membranaire avec formation des vacuoles cytoplasmiques et des vésicules membranaires permettant l'ancrage des complexes de réplication qui sont étroitement associés aux membranes vésiculaires du réticulum endoplasmique (Bienz *et al.*, 1990 ; Aldabe & Carrasco, 1995). La capacité de cette protéine à se fixer sur les membranes cellulaires est portée par sa partie N terminale (Echeverri *et al.*, 1998). En outre, la protéine 2C pourrait également être impliquée dans la libération de l'ARN viral du complexe de réplication (Bienz *et al.*, 1990) ainsi que dans l'encapsidation du génome viral (Vance *et al.*, 1997) et l'assemblage des virions matures (Li & Baltimore, 1990). D'autre part, la protéine 2C possède une activité ATPase et GTPase (Rodríguez & Carrasco, 1993 ; Mirzayan & Wimmer, 1994).

2.3.2.2 Le polypeptide P3

Le polypeptide P3 est le précurseur des protéines 3A, 3B, 3C et 3D. Ces dernières possèdent des fonctions distinctes de leurs précurseurs intermédiaires stables 3AB et 3CD (Xiang, 1998).

La protéine 3AB, précurseur direct des protéines 3B (VPg) et 3A, s'associe aux membranes grâce à la région hydrophobe que contient la protéine 3A, permettant ainsi l'ancrage des complexes de réplication en leur fournissant en même temps la protéine VPg nécessaire à l'initiation de la synthèse de l'ARN viral (Towner *et al.*, 1996). Cette protéine participe à la réplication du génome viral (Xiang *et al.*, 1995). L'interaction de la protéine 3AB avec la protéine 3D semble essentielle à la reconnaissance de la matrice par la polymérase (Hope *et al.*, 1997) ainsi qu'à la stimulation de l'activité enzymatique de cette dernière (Plotch & Palant, 1995). De plus l'association de la protéine 3AB avec la protéine 3CD favoriserait l'autoclivage des précurseurs 3CD en protéines matures 3C et 3D (Molla *et al.*, 1994).

La protéine 3A pourrait intervenir dans l'inhibition de la communication réticulum-Golgi (Doedens *et al.*, 1997). La présence d'une région riche en proline, située à l'extrémité N terminale de la protéine 3A des CV-B3, serait responsable de cette inhibition (Wessels *et al.*, 2005). De plus, la protéine 3A contient une séquence de 22 acides aminés hydrophobes qui lui permet d'interagir avec les membranes cellulaires et de modifier ainsi la perméabilité membranaire (Lama & Carrasco, 1995). Ainsi cette protéine jouerait un rôle dans l'induction de l'effet cytopathogène (Lama *et al.*, 1998).

La protéine 3B (VPg) est uridyliée en VPg-pU(pU). Sous cette forme, elle participe directement à la réplication du génome viral en servant d'amorce à l'ARN polymérase-ARN dépendante (Paul *et al.*, 1998).

La protéine 3CD, précurseur direct des protéines 3Cpro et 3Dpol, est une protéase qui agit au niveau d'un dipeptide Gln/Gly au sein du précurseur P1 des protéines structurales ainsi que du précurseur 3AB (Ypma-Wong *et al.*, 1988). Cette protéine est impliquée dans les processus protéolytiques permettant la maturation des protéines structurales (Ypma-Wong *et al.*, 1988), ainsi que dans la réplication virale (Andino *et al.*, 1993).

La protéine 3Cpro est la protéase majeure responsable des clivages protéolytiques au sein des précurseurs P2 et P3 (Hanecak *et al.*, 1982). Elle serait également responsable du clivage d'un certain nombre de protéines cellulaires telles que le facteur de transcription TFIIC, la *TATA-binding protein* TBP, le facteur de transcription CREB et le facteur oct-1, ce qui a pour conséquence directe l'inhibition de la transcription cellulaire assurée par les ARN polymérases I, II et III (Rubinstein *et al.*, 1992).

La protéine 3D (3D pol) est l'ARN polymérase-ARN dépendante, responsable de la synthèse des ARN positifs et négatifs (Neufeld *et al.*, 1991). Son activité dépend de la présence à la fois d'une amorce oligoU et d'une matrice polyA. La protéine 3D interviendrait dans la formation des complexes de réplication en s'associant aux protéines virales telles que les protéines 3B (VPg) (Hope *et al.*, 1997 ; Xiang *et al.*, 1998) et probablement aux protéines d'origine cellulaire (McBride *et al.*, 1996). La protéine 3D est impliquée dans la réaction d'uridylation de la protéine VPg qui, sous cette forme, lui sert d'amorce pour la réplication de l'ARN (Paul *et al.*, 1998 ; Richards *et al.*, 2006). La protéine 3D semble également présenter une activité d'hélicase (Cho *et al.*, 1993) et une activité terminal adénylyl transférase, dont le rôle dans la réplication reste hypothétique (Neufeld *et al.*, 1994). La protéine 3D n'a pas d'activité *proof-reading* ce qui entraîne l'accumulation régulière de mutations sur le génome viral.

Les protéases 2A et 3C (2A pro et 3C pro) sont des protéinases virales jouant un rôle majeur dans le clivage de la polyprotéine virale (Svitkin *et al.*, 1979 ; Strebel & Beck, 1986 ; Toyoda *et al.*, 1986b). Ces protéases virales vont pouvoir également cliver des polypeptides cellulaires et par conséquent inhiber la machinerie cellulaire de l'hôte en particulier au niveau de la synthèse protéique et des ARN cellulaires (**Figure 7**).

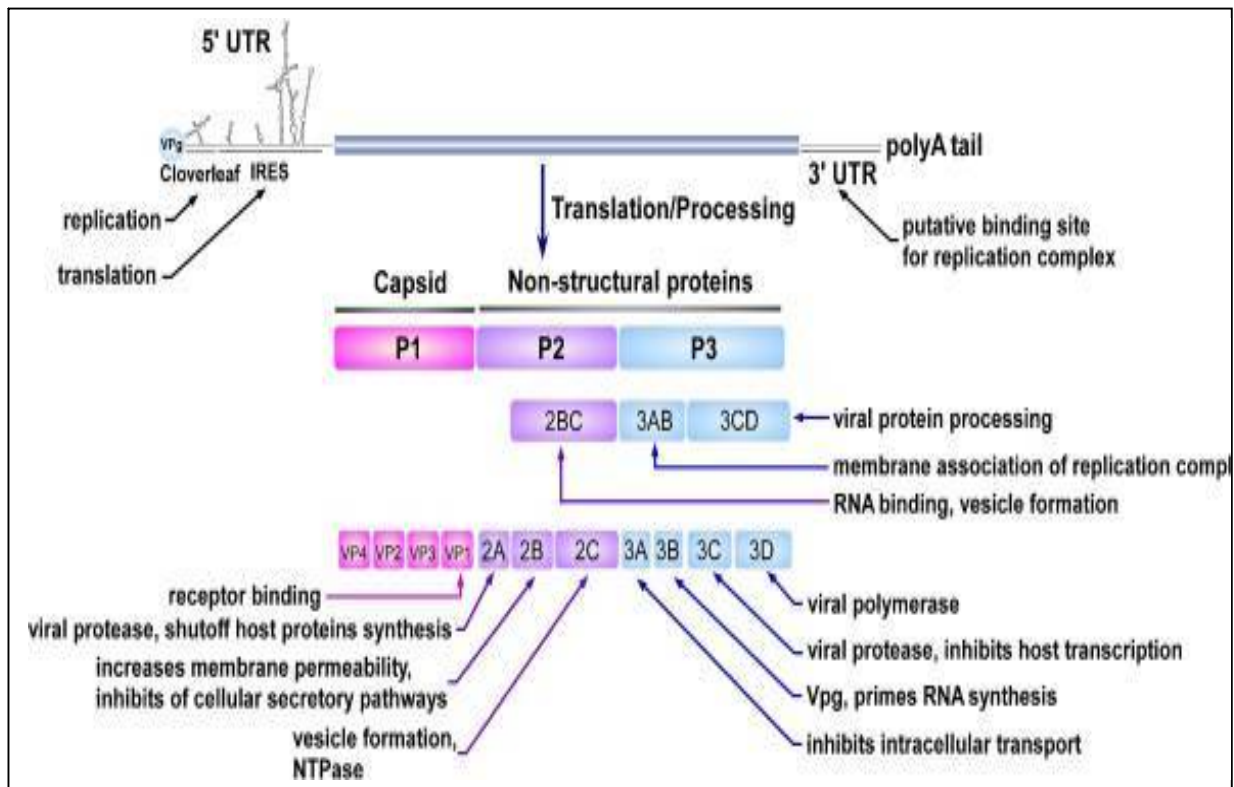


Figure 7 : Représentation schématique du génome des picornavirus et des produits de la polyprotéine virale. Les 11 protéines majeures sont représentées, avec les clivages protéolytiques successifs. Les principales fonctions biologiques sont décrites pour chaque protéine. NC : non codante ; IRES : *Internal Ribosome Entry Site* ; VPg : *Viral Protein genome linked* (Lin *et al.*, 2009).

2.4 Structure de la capside

La capside des EV est composée de 60 protomères identiques ou capsomères. Chacun est formé de 4 protéines structurales : VP1 (34 kDa), VP2 (30 kDa), VP3 (26 kDa) et VP4 (7 kDa) (Racaniello & Howley, 2007) (**Figure 3**). VP1, VP2 et VP3 présentent une structure tridimensionnelle relativement proche, alors que celle de VP4 diffère et apparaît comme une extension de VP2. VP1, VP2 et VP3 forment entre elles une dépression, appelée canyon, décrite comme le site d'attachement au récepteur cellulaire humain du PV (**Figure 8**) (Colston & Racaniello, 1995 ; He *et al.*, 2002a). La résolution de la structure tridimensionnelle de la capside

a permis de comprendre les différents rôles de cette structure qui sont les suivants : protéger le génome viral des nucléases de l'environnement, reconnaître un récepteur cellulaire spécifique, porter à sa surface les déterminants antigéniques, contenir les informations pour l'encapsidation du génome viral et la maturation des virions, et enfin libérer le génome viral dans les cellules hôtes infectées (Racaniello & Howley, 2007).

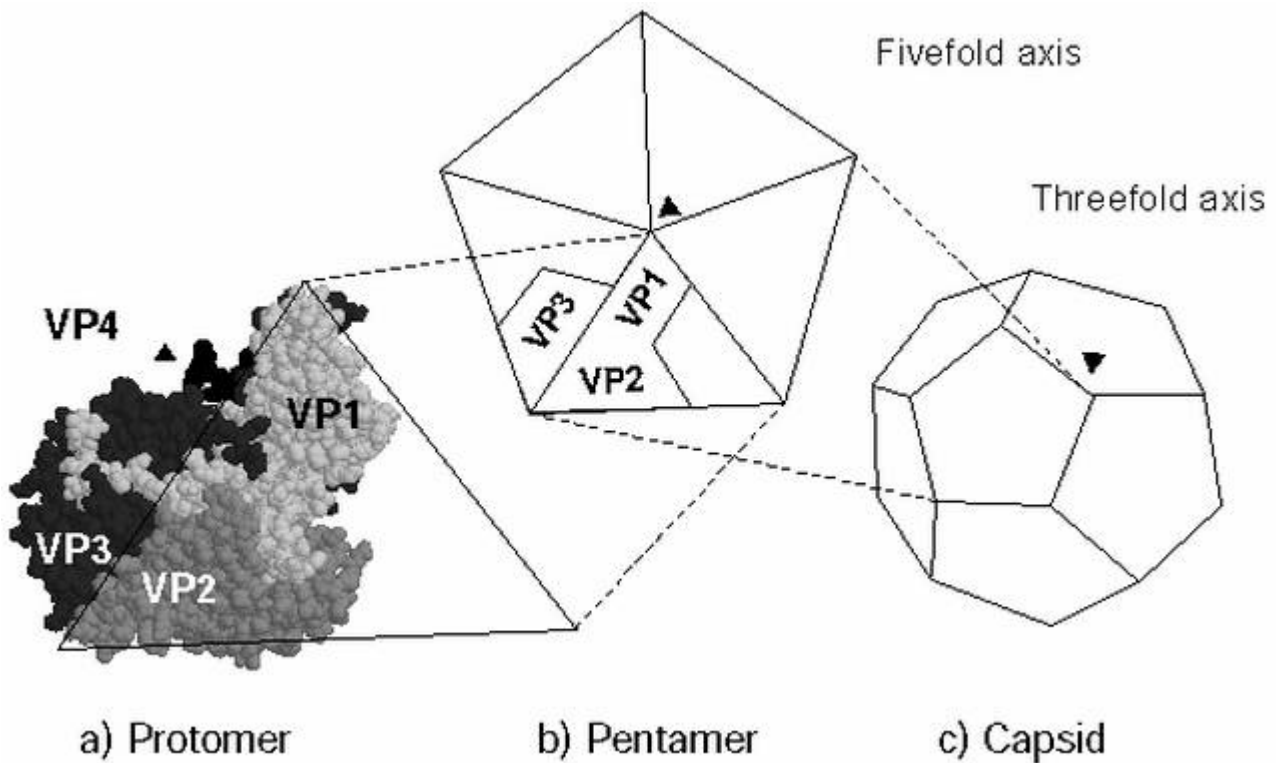


Figure 8 : Structure de la capsid des entérovirus. Les protéines VP1, VP2 et VP3 constituent la surface du virus tandis que VP4 est interne. Le canyon sur l'axe de symétrie 5 est bordé au nord par VP1 et au sud par VP3 et VP2 (Racaniello & Howley, 2007).

Bien que la structure primaire des 3 protéines VP1, VP2 et VP3 soit différente, leur structure tridimensionnelle est relativement homogène (Hogle *et al.*, 1985 ; Filman *et al.*, 1989). Cette structure, en feuillet β , est constituée de 2 hélices α et de 8 brins β antiparallèles reliés entre eux par 4 petites boucles de connexion (B-C, H-I, D-E et G-F) (**Figure 3**). Les brins β forment le squelette de la capsid, tandis que la majorité des boucles de connexion et des extrémités C-terminales constituent les régions exposées à la surface de la capsid. Les extrémités N-

terminales des protéines VP1, VP2 et VP3 forment un réseau à la surface interne de la capsidie en association avec la protéine VP4, de localisation interne, contribuant ainsi à la stabilité du virion. Les boucles de connexion des protéines VP1 (principalement la boucle B-C) forment des plateaux autour des axes de symétrie d'ordre 5 à la surface de la capsidie. Ces plateaux sont entourés par une dépression particulièrement profonde appelée "canyon" qui représente le site d'attachement du PV à son récepteur cellulaire humain (Rossmann *et al.*, 2002) (**Figure 8**). Au-dessous du plancher du "canyon" se situe une poche hydrophobe occupée par un ligand lipidique (la sphingosine) qui jouerait un rôle dans la stabilité de la capsidie (Filman *et al.*, 1989).

La structure tridimensionnelle de la protéine VP4 diffère de manière significative des autres protéines structurales à cause de sa conformation allongée. Elle n'est constituée que de 2 courts feuilletts β antiparallèles à son extrémité N-terminale. D'ailleurs, elle apparaît davantage comme une extension N-terminale de la protéine VP2 que comme une protéine de capsidie indépendante. De plus, la protéine VP4 est myristylée : sa glycine N-terminale est liée de façon covalente à un acide gras tétradécanoïque (Chow *et al.*, 1987). Des expériences de mutagenèse au niveau de la protéine VP4 ont montré que cette myristylation serait indispensable à l'assemblage des pentamères ainsi qu'à la stabilité de la capsidie et interviendrait également dans l'infectivité virale et lors des étapes précoces de l'infection (Marc *et al.*, 1989 ; Moscufo *et al.*, 1991 ; Moscufo & Chow, 1992).

2.5 Sites antigéniques de neutralisation

Les sites antigéniques de neutralisation correspondent aux séquences des protéines structurales reconnues par le système immunitaire de l'animal et capable d'induire des anticorps neutralisant l'infectivité virale. Ces caractères antigéniques constituent la base principale de l'identification classique des différents membres du genre *Enterovirus* appelés "sérotypes". La localisation des sites antigéniques de neutralisation permet de mieux comprendre les mécanismes de la neutralisation virale, de déterminer les bases moléculaires de la diversité sérotypique, caractéristique du genre *Enterovirus* et d'étudier les différentes possibilités pour la réalisation des vaccins. La structure tridimensionnelle de la capsidie et la caractérisation de mutants de PV échappant à la neutralisation par les anticorps monoclonaux ont permis de localiser les sites antigéniques de neutralisation sur les 3 protéines capsidiales VP1, VP2 et VP3 au niveau des boucles hydrophiles de connexion exposées à la surface du virion (Wien *et al.*, 1996). Les séquences d'acides aminés impliquées dans l'expression des épitopes de neutralisation sont

regroupées en 3 sites antigéniques de neutralisation différents : les sites 1, 2 et le site 3 qui est divisé en 3 domaines : 3a, 3b et 3c (Emini *et al.*, 1982 ; Page *et al.*, 1988 ; Hogle & Filman, 1989 ; Minor, 1990 ; Mateu, 1995). L'analyse des structures fines des capsides du PV a montré que ces épitopes de neutralisation, bien que distants les uns des autres sur la base de la séquence primaire, sont proches dans le contexte de la conformation spatiale de la capside. Trois configurations totalement différentes de ces sites caractérisent les 3 sérotypes du PV et il n'existe aucune immunité croisée entre ces 3 sérotypes. Les différences de conformation les plus significatives entre les sérotypes de PV ont été localisées au niveau des boucles de connexion.

L'analyse de la séquence primaire des boucles externes impliquées dans la structure des sites antigéniques chez les PV montre des différences importantes. La pression de sélection exercée par le système de défense de l'hôte explique cette hétérogénéité. Des modifications de taille des boucles, par insertions ou par délétions, ont été également observées entre les différents sérotypes d'EV. La boucle BC de la protéine VP1 est soumise à ce processus de variabilité. En revanche, les autres boucles de la protéine VP1 ne présentent pas de polymorphisme de taille bien qu'elles participent à la composition des sites antigéniques de neutralisation chez les PV. Dans la protéine VP2, l'hétérogénéité la plus forte est observée dans la boucle EF qui constitue également un site de neutralisation chez les PV. La séquence primaire de cette boucle varie considérablement entre les membres de différentes espèces d'EV ainsi qu'à l'intérieur d'une même espèce. De même, des différences de taille sont également observées au niveau de cette boucle. Ces résultats montrent que les boucles BC de VP1 et EF de VP2 constituent les régions les plus variables des protéines constitutives des EV.

Alors que les sites antigéniques des PV ont été bien identifiés, ceux des autres EV sont encore très mal connus. Par ailleurs, l'analyse antigénique du CV-A9 a révélé la présence de sites antigéniques situés à l'extrémité C-terminale de VP1 (Pulli *et al.*, 1998a, b), correspondant aux sites 2 et 3 des PV. La présence d'un site antigénique au niveau de la boucle BC de VP1 a été démontrée chez le CV-B4 (Reimann *et al.*, 1991). D'autres équipes ont identifié, par l'utilisation de peptides synthétiques, des épitopes de neutralisation situés au niveau des 3 protéines structurales VP1, VP2 et VP3 du CV-B3 ; ces épitopes coïncident avec les sites antigéniques 1, 2 et 3 des PV (Auvinen *et al.*, 1993). De plus, Beatrice *et al.* (1980) ont démontré la présence chez ce même sérotype d'un site antigénique immunodominant localisé au niveau de VP2. Plus récemment, des épitopes de neutralisation au niveau de l'extrémité C-terminale de VP1 ont été révélés chez l'EV-A71 (Foo *et al.*, 2007).

3 Relations des entérovirus humains avec leur hôte

3.1 Cycle viral

Le cycle de multiplication se déroule totalement dans le cytoplasme. La durée de ce cycle varie entre 5 et 10 heures. Elle dépend de plusieurs paramètres comme la température, le pH, les cellules hôtes et la multiplicité d'infection (Racaniello & Howley, 2007). Les virus se fixent sur des récepteurs cellulaires puis sont adsorbés à l'intérieur de la cellule et décapsidés (**Figure 9**).

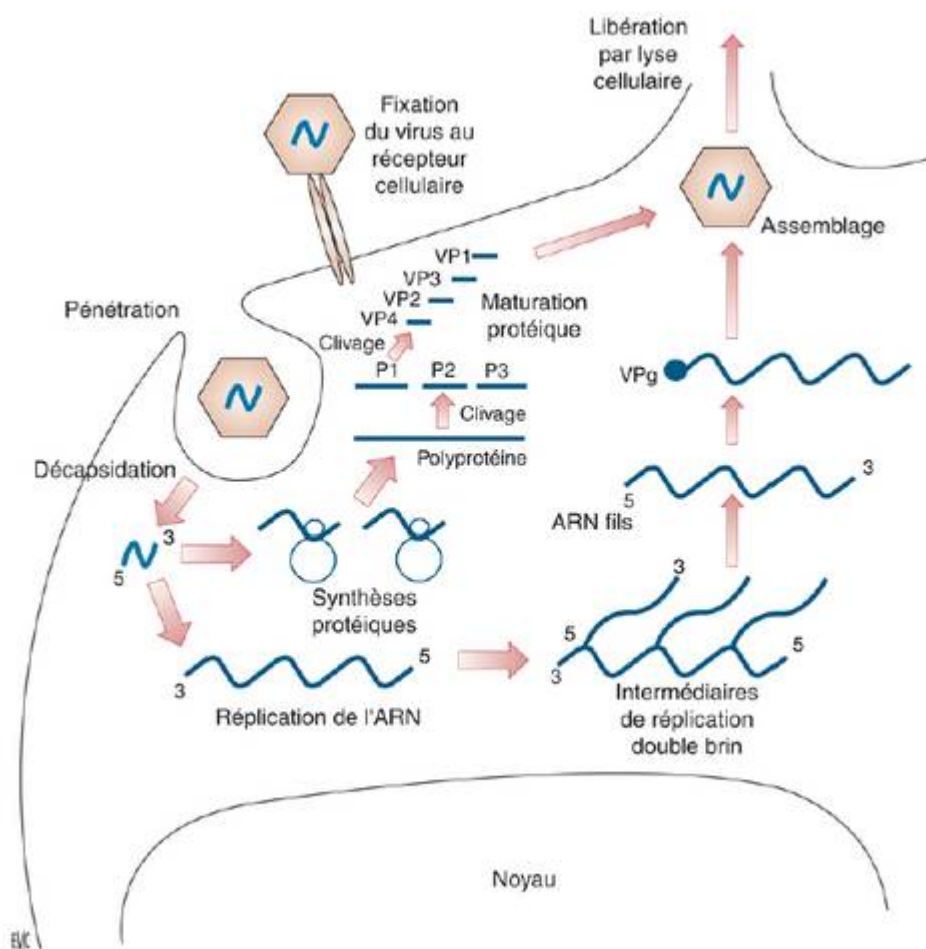


Figure 9 : Cycle de multiplication du poliovirus (Pozzetto, 2009).

L'ARN viral se comporte alors comme un ARN messager monocistronique et est traduit en une protéine précurseur géante (NCVP pour « *non capsidic viral protein* »). Cette protéine géante est clivée par les protéases cellulaires d'abord puis par la protéase virale en protéines de capsid VP1,

VP2, VP3 et VP4, en protéine du génome (VPg) et en ARN polymérase virale ou réplicase. Cette réplicase synthétise des brins négatifs d'ARN complémentaire de l'ARN viral qui servent de matrice pour la synthèse de brins positifs. Certains de ces néo-ARN serviront d'ARN messager ; les autres, s'associant à VPg, constitueront le génome des nouveaux virus. Les protéines virales VP s'assemblent en procapside où s'insinuent les ARN viraux pour donner les nouvelles particules virales qui sont libérées par lyse cellulaire. Il existe, dans la cellule hôte, deux facteurs impliqués dans le déterminisme du tropisme viral et de la pathogenèse : les récepteurs et les molécules intracellulaires nécessaires à la réplication virale.

3.1.1 Récepteurs cellulaires

La phase initiale d'attachement pour un virus nu se produit entre des protéines de la capsid virale et leurs récepteurs à la surface cellulaire. La nature et la distribution des récepteurs cellulaires des EV déterminent quels hôtes, quels tissus et quels types de cellules ces virus sont susceptibles d'infecter (Knowlton, 2008 ; Nilsson *et al.*, 2008). On distingue deux catégories de facteurs d'attachement pour les EV : les récepteurs et les co-récepteurs (**Tableau 1**).

3.1.1.1 Les récepteurs principaux des EV

Le récepteur d'un EV se définit comme la molécule, à la surface de la cellule, capable non seulement de fixer la particule virale mais aussi de permettre son entrée dans la cellule et d'initier un cycle complet de réplication. La spécificité du récepteur et sa distribution cellulaire et tissulaire peuvent moduler le tropisme viral et les manifestations pathologiques. Compte tenu de leur diversité, les EV utilisent une grande variété de récepteurs cellulaires (**Tableau 1**) (**Figure 10**).

Tableau 1 : Molécules de surface utilisées comme récepteurs ou co-récepteurs par les membres des genres *Enterovirus* et *Parechovirus* (Pozzetto, 2009).

Dénomination	Classification	Virus cible		Mode d'utilisation
		Espèce	Sérotypes	
Récepteur des poliovirus (PVR) ou CD155	Superfamille des immunoglobulines	HEV-C	Poliovirus 1, 2, 3	Récepteur
<i>Intracellular adhesion molecule</i> (ICAM-1) ou CD54	Superfamille des immunoglobulines	HEV-C	CV-A13	Récepteur
		HEV-C	CV-A21	Récepteur ou corécepteur
		HRV	Groupe majeur des rhinovirus (91 sérotypes)	Récepteur
Récepteur des Coxsackievirus et des Adénovirus (CAR)	Superfamille des immunoglobulines	HEV-B	CV-B1, CV-B2, CV-B3, CV-B4, CV-B5 et CV-B6	Récepteur
<i>Decay accelerating factor</i> (DAF) ou CD55	Domaine de type <i>short consensus repeat</i>	HEV-B	CV-B1, CV-B3 et CV-B5	Récepteur
		HEV-B	Nombreux échovirus (3, 6, 7, 11-13, 20, 21, 24, 29 et 33)	
		HEV-C	CV-A21	
		HEV-D	EV-70	
Récepteur des lipoprotéines de faible densité (LDLR)	Famille des protéines LDLR	HRV	Groupe mineur des rhinovirus (10 sérotypes)	Récepteur
$\alpha_2\beta_1$ (VLA-2 ou récepteur de la vitronectine)	Superfamille des intégrines	HEV-B	Echovirus 1	Récepteur
$\alpha_v\beta_1$	Superfamille des intégrines	HPeV	HpeV-1	Récepteur
$\alpha_v\beta_3$	Superfamille des intégrines	HEV-B	CV-A9	Récepteur
		HPeV	HpeV-1	Récepteur
$\alpha_v\beta_6$	Superfamille des intégrines	HEV-B	CV-A9	Récepteur
		HEV-B	CV-B1, CV-B3 et CV-B5	Corécepteur
Acide sialique	Carbohydate	HEV-C	CV-A24	Récepteur
		HEV-D	EV-68	Récepteur
β_2 -microglobuline	Superfamille des immunoglobulines	HEV-B	Nombreux échovirus (1, 3, 6, 7, 11-13, 20, 21, 24, 29 et 33)	Corécepteur

HEV : *Human enterovirus* ; HRV : *Human rhinovirus* ; HPeV : *Human parechovirus* ; CV-A : coxsackievirus A ; CV-B : coxsackievirus B.

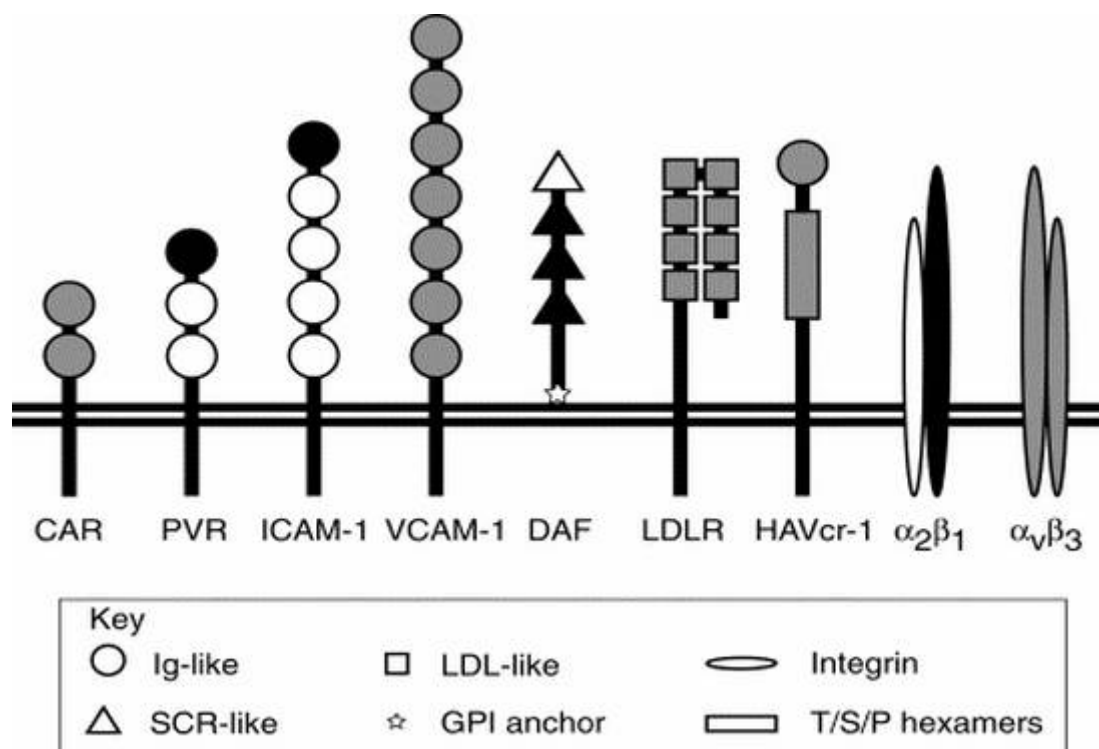


Figure 10 : Représentation des différents récepteurs des picornavirus. VCAM : Vascular Cell Adhesion Molecule ; DAF : Decay Accelerating Factor ; LDL-R : Low Density Lipoprotein Receptor ; HAVcr-1 : Hepatitis A Virus receptor ; $\alpha_2\beta_1$: Very Late antigen (super famille des intégrines) ; $\alpha_V\beta_3$: Vitronectin receptor (super famille des intégrines) ; Ig-like : Immunoglobuline-like ; SCR-like : Short Consensus Repeat-like ; LDL-like : Low Density Lipoprotein-like ; GPI : Glycosylphosphatidylinositol ; T/S/P : Threonine/Serine/Proline (Evans & Almond, 1998).

La majorité de ces récepteurs appartient à la superfamille des immunoglobulines (**Figure 11**). Ce sont des glycoprotéines transmembranaires constituées d'une répétition de 2 à 5 domaines de type immunoglobuline dont le domaine N-terminal libre, le plus éloigné de la cellule et donc le plus exposé (domaine D1), interagit avec l'EV en s'insérant dans le canyon (Rossmann *et al.*, 2002) (**Figure 12**). Leur extrémité C-terminale comprend un domaine transmembranaire et une courte région intracytoplasmique. Certaines de ces molécules sont communes à plusieurs EV, voire à des virus d'autres familles (Spear, 2004).

On peut distinguer trois principaux récepteurs pour les EV : *Poliovirus receptor (PVR)*, ICAM-1 et CAR (**Figure 11**).

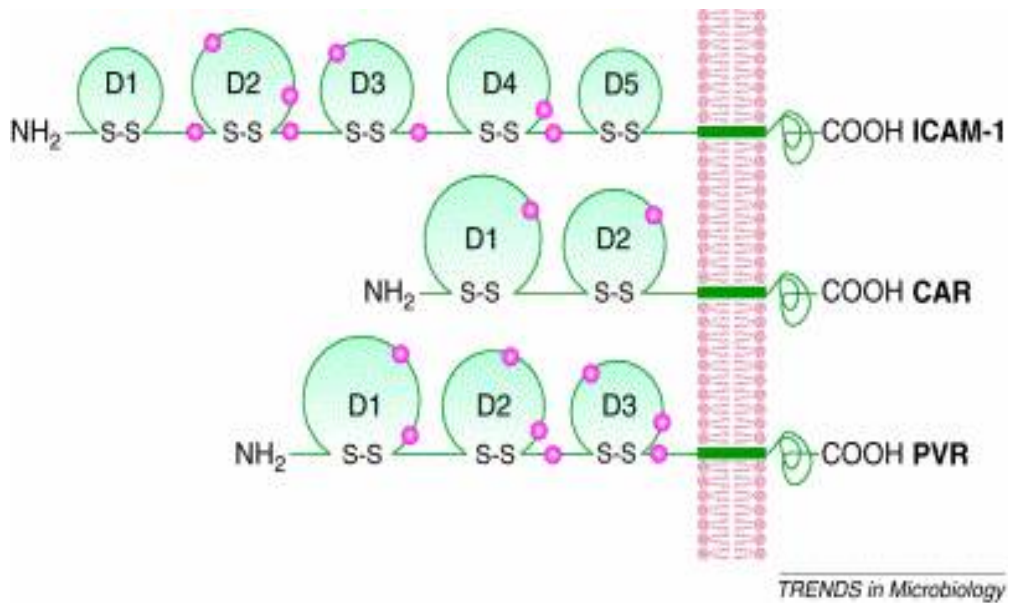


Figure 11 : Structure de 3 récepteurs des entérovirus appartenant à la superfamille des immunoglobulines : ICAM (*Intercellular Adhesion Molecule*) pour le CV-A21, CAR (*Coxsackie Adenovirus Receptor*) pour les CV-B et PVR (*Poliovirus Receptor*) pour les PV (Rossmann *et al.*, 2002).

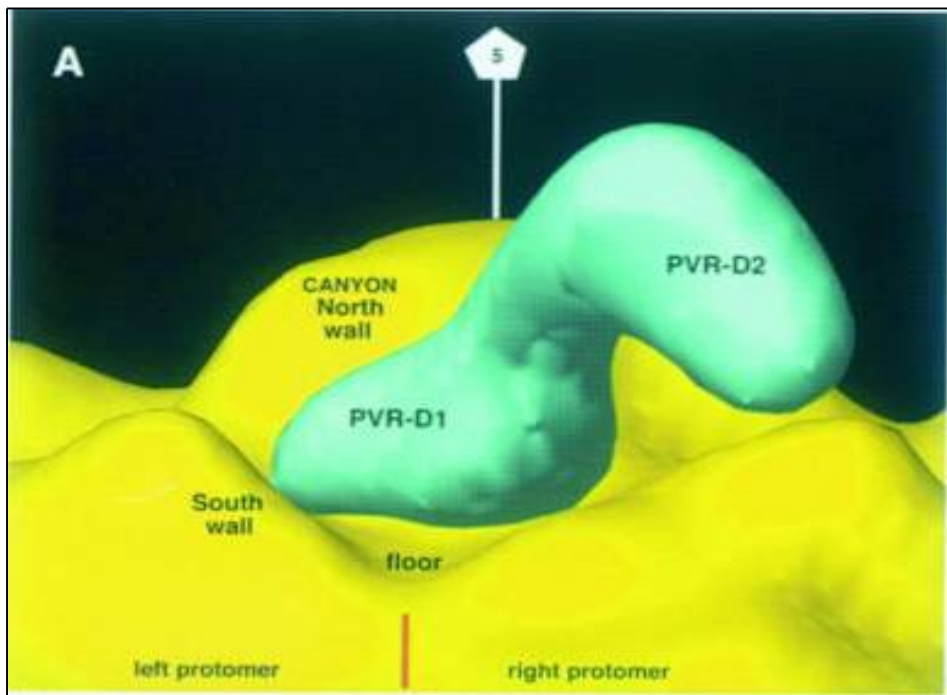


Figure 12 : Interaction du domaine D1 du récepteur des PV (PVR-D1) avec le « canyon » (Michael G. Rossmann, 2000).

PVR (Polio Virus Receptor) ou CD155 est le récepteur commun des PV. Il s'agit d'une glycoprotéine membranaire de la superfamille des immunoglobulines comportant trois domaines extracellulaires dont le premier (D1) contient le site de fixation du PV (Rossmann *et al.*, 2002). PVR comporte 3 domaines extracellulaires : un domaine de type C5 en position distale suivi de 2 domaines de type C2. Le domaine de type 5 comporte le site de liaison des PV (Mendelsohn *et al.*, 1989). Le récepteur des PV fut identifié en 1989 par transfection de cellules murines non permissives car dépourvues du récepteur *ad hoc* (Mendelsohn *et al.*, 1989). Des souris sensibles à l'infection par les PV furent ensuite obtenues après introduction d'ADN génomique humain codant *PVR* dans la cellule murine (Ren *et al.*, 1990).

L'expression du PVR humain dans des souris transgéniques leur confère une permissivité à l'infection par ce virus. PVR est exprimé dans de nombreux tissus chez la souris transgénique alors que les sites majeurs de réplication des PV sont le cerveau et la moelle épinière. Ce tropisme restreint est régulé par la réponse interféron alpha et beta, qui limite la réplication virale dans les tissus extra-neuronaux (Iida-Hosonuma *et al.*, 2005). Cet élément tempère la relation entre tropisme cellulaire et pouvoir pathogène qui n'est, de fait, pas simplement conditionné par l'expression tissulaire du récepteur.

L'expression de PVR par de nombreuses lignées cellulaires provenant de différents animaux suffit à les rendre permissives *in vitro* et caractérise donc la sensibilité aux PV. Il semble également évident que PVR est la seule molécule nécessaire à l'attachement et à l'entrée des PV. Une autre protéine membranaire, la vibronectine ou CD44, abondamment sécrétée par les cellules hépatiques et fortement exprimées à la surface des lymphocytes B et des cellules folliculaires dendritiques (Lange *et al.*, 2001), semble jouer un rôle dans l'interaction du PV avec son récepteur. L'utilisation d'anticorps dirigés contre cette protéine empêche la pénétration du PV à l'intérieur de la cellule hôte. Cependant, CD44 ne joue pas le rôle de corécepteur et sa présence n'est pas essentielle à l'infection par le PV des cellules exprimant PVR. Il semble, en effet, que CD44 et PVR sont associés à la surface de la cellule et que l'utilisation d'anticorps anti-CD44 bloquerait le site d'attachement du PV au PVR (Racaniello & Howley, 2007).

Le rôle physiologique du PVR reste hypothétique. Il est impliqué dans la détermination de la polarité centrale de la moelle épinière et dans la différenciation des motoneurones au cours du développement embryonnaire. Cette observation explique en grande partie le tropisme cellulaire restreint du PV au système nerveux central (Gromeier *et al.*, 2000). L'absence de PVR dans d'autres espèces animales explique aussi pourquoi l'infection est restreinte aux primates. PVR est une molécule d'adhésion qui

concourt à la formation de l'adhérence cellule/cellule à travers l'interaction avec la nectine de type 3, une molécule proche des immunoglobulines (Mueller & Wimmer, 2003). PVR est également reconnu à la surface des cellules HeLa par les cellules NK *in vitro* en interagissant avec CD226 et CD96, stimulant ainsi leur cytotoxicité (Fuchs *et al.*, 2004). La protéine UL141 du cytomegalovirus réduit l'expression de PVR, permettant aux cellules infectées d'échapper à la cytotoxicité médiée par les cellules NK (Tomasec *et al.*, 2005).

ICAM-1 ou **CD54** est le récepteur de CV-A21, CV-A18 et CV-A13. Il est également le récepteur cellulaire pour la majorité des sérotypes de rhinovirus (**Tableau 1**). C'est une protéine d'adhésion intercellulaire appartenant également à la superfamille des immunoglobulines et possédant cinq domaines extracellulaires. ICAM-1 est exprimé à la surface de nombreux tissus incluant l'épithélium nasal (Greve *et al.*, 1989). Les fonctions physiologiques d'ICAM-1 sont de se fixer à son ligand, l'antigène LFA-1 (*Lymphocyte Function-associated Antigen 1*) associé aux fonctions lymphocytaires et présent à la surface des lymphocytes, et ainsi de déclencher un grand nombre de fonctions physiologiques (Racaniello & Howley, 2007).

CAR (*Coxsackievirus and Adenovirus Receptor*) est le récepteur commun des CV-B et des adénovirus. Le gène *CAR* est localisé sur le chromosome 21 humain (Bowles *et al.*, 1999). Il s'agit d'une glycoprotéine membranaire composée de deux domaines extracellulaires de type immunoglobuline, un domaine transmembranaire et un long domaine cytoplasmique (Rossmann *et al.*, 2002). Les domaines extracellulaires semblent être suffisants pour permettre l'infection par CV-B3 dans des cellules en culture (Bowles *et al.*, 1999). Le rôle physiologique de CAR reste encore inconnu.

La comparaison de la structure du complexe virus/récepteur formé par 3 picornavirus différents révèle que, bien que les récepteurs se fixent tous à l'intérieur du canyon, leur orientation est à chaque fois différente. L'empreinte de PVR sur les PV est significativement plus grande que celle laissée par ICAM-1 à la surface des rhinovirus. La surface de contact entre CV-A21 et ICAM-1 est la plus petite des trois. Les parties exposées de la capsid des PV sont le « knob » de la protéine de capsid VP3, région particulièrement exposée et connue pour porter les épitopes de séroneutralisation, et l'extrémité C terminale de la protéine VP1 qui interagit avec PVR (Muckelbauer *et al.*, 1995). Ces différences structurales peuvent se traduire par des différences de cinétique et de constante d'affinité entre les différents virus et leurs récepteurs (**Figure 13**).

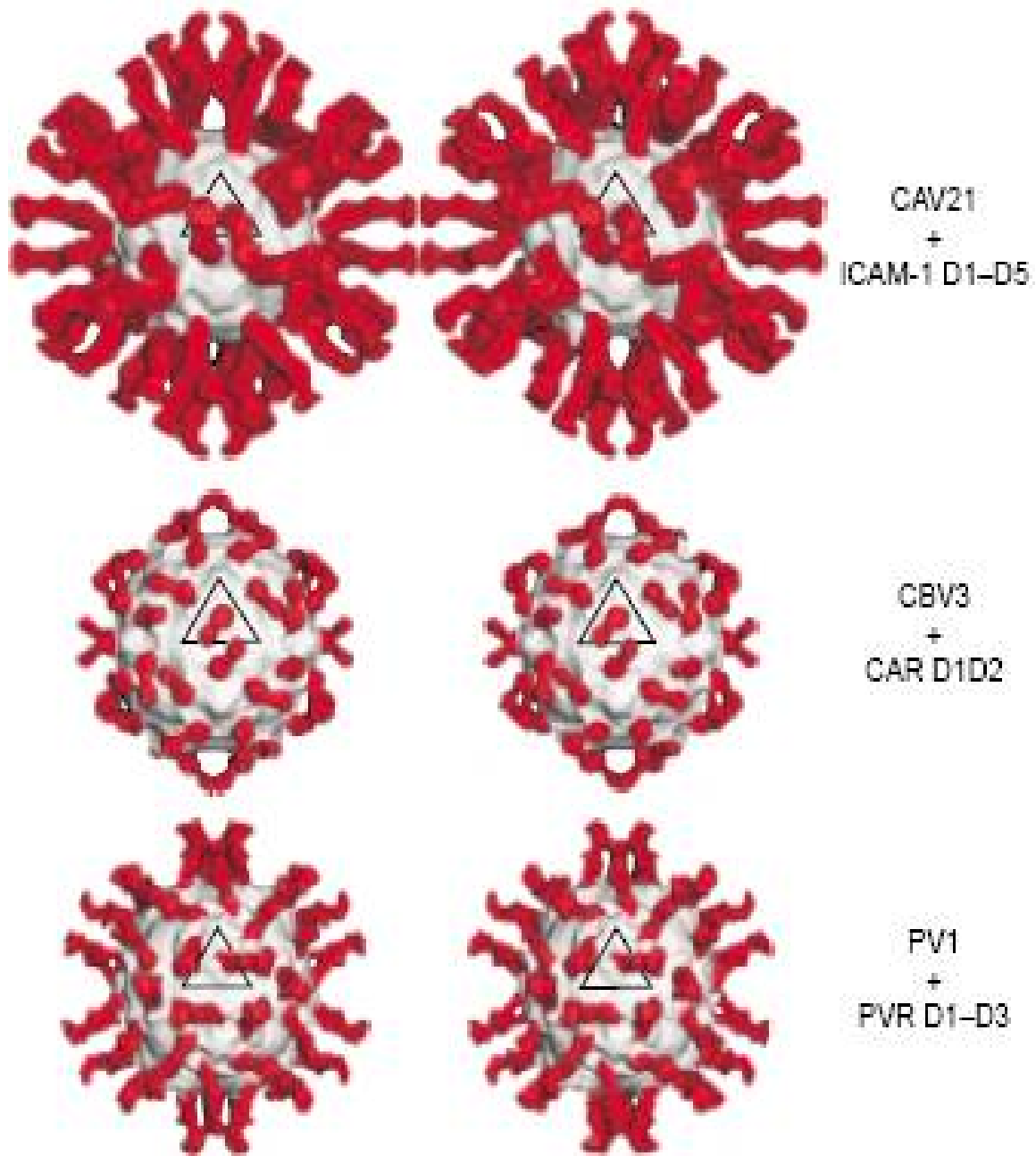


Figure 13 : Images reconstituées montrant les complexes virus-molécules de récepteurs pour les interactions CV-A21/ICAM-1, CV-B3/CAR et PV/PVR. Les molécules de récepteurs sont représentées en rouge ; le triangle noir représente les limites d'une unité icosaédrique (Rossmann *et al.*, 2002).

3.1.1.2 Récepteurs alternatifs

Certains virus peuvent se lier à différents récepteurs cellulaires en fonction de la souche virale et de la lignée cellulaire (**Tableau 1**). La souche A12 du virus de la fièvre aphteuse, un autre picornavirus, se fixe à la cellule par le récepteur $\alpha_v\beta_3$ (Neff *et al.*, 1998). La souche O qui a été sélectionnée par passages successifs sur cellules en culture ne peut en revanche se lier à l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ mais utilise les sulfates d'héparane comme récepteur cellulaire (Jackson *et al.*, 1996). La souche A12 ne peut infecter les cellules n'exprimant pas $\alpha_v\beta_3$ même si la cellule est couverte de sulfate d'héparane. On assiste ici à un mécanisme d'adaptation au laboratoire du virus de la fièvre aphteuse par culture sur lignées exprimant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ à un faible niveau entraînant la sélection d'une souche utilisant un récepteur alternatif. L'explication tiendrait aux charges négatives portées par les chaînes de glycosaminoglycanes (chaînes GAG) attachées à des protéines transmembranaires et chargées négativement. Habituellement, la chaîne GAG sert de récepteur d'attachement, permettant la concentration du virus à la surface cellulaire et facilitant le contact avec les récepteurs et corécepteurs. La liaison au virus implique des zones de protéines de surface chargées positivement. Ainsi, l'adaptation sur cellules en culture se traduit par la sélection de virus porteurs de protéines de surface exprimant davantage de groupements basiques. En revanche, les souches isolées de patients n'ont pas nécessairement recours aux sulfates d'héparane comme récepteurs d'attachement.

3.1.1.3 Les co-récepteurs

De nombreux EV se lient à *DAF*, *Decay Accelerating Factor* ou *CD55*, qui est le récepteur de nombreux EV hémagglutinants et qui intervient dans la cascade du complément. Il s'agit d'une glycoprotéine dont la région extracellulaire est formée de 6 domaines : 4 domaines extracellulaires représentés sous forme de courtes séquences répétées appelés SCR1-4 (*Short Consensus Repeat*), une région riche en sérine/thréonine et une région C-terminale membranaire fixée de façon covalente à un acide gras (Powell *et al.*, 1999 ; He *et al.*, 2002b). Pour beaucoup de ces virus, l'interaction avec DAF n'est pas suffisante pour permettre l'infection. Par exemple, CV-A21 se lie à DAF mais l'infection n'a lieu que si ICAM-1 est également présent (Shafren *et al.*, 1997). Certains CV-B qui utilisent DAF ont besoin de l'intégrine $\alpha_v\beta_6$ en complément de DAF tandis que les echovirus se fixent à l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ (Agrez *et al.*, 1997). La β_2 microglobuline constitue également un co-récepteur potentiel de DAF (Ward *et al.*, 1998).

Le rôle de DAF a été illustré par la pénétration de CV-B3 dans les cellules épithéliales polarisées (Coyne & Bergelson, 2006). En effet, CAR, récepteur des CV, n'est pas présent à la surface apicale des cellules épithéliales situées dans les régions intestinales et respiratoires. C'est en revanche un composant de la jonction serrée et il est, par conséquent, inaccessible au virus. CV-B3 se fixe alors à son second récepteur DAF qui, lui, est présent à la surface de ces cellules. Cette fixation provoque un réarrangement de l'actine qui entraîne le mouvement du virus jusqu'à la jonction serrée où il peut se fixer à son récepteur CAR et pénétrer ensuite au sein de la cellule

Ainsi, pour certains EV, un seul récepteur est suffisant pour assurer leur pénétration à l'intérieur de la cellule ; pour d'autres, la présence d'un corécepteur est essentielle. Le rôle précis de ces corécepteurs dans le processus de pénétration des EV n'est pas encore connu (Rossmann *et al.*, 2002).

3.1.2 Etapes du cycle viral

Le cycle complet de multiplication du PV se déroule exclusivement dans le cytoplasme des cellules infectées (Racaniello & Howley, 2007). C'est l'un des cycles viraux les plus courts : il dure environ 8 heures à 37 °C (**Figure 9**).

3.1.2.1 Adsorption, pénétration et décapsidation

L'événement initial du cycle viral de multiplication est l'attachement des particules virales à un récepteur membranaire spécifique. Les trois sérotypes de PV reconnaissent un récepteur commun (PVR) à la surface des cellules de primates. L'attachement du virus à son récepteur spécifique est assuré au niveau de la dépression située à la surface de la capsid, le "canyon". L'interaction du PV avec son récepteur s'accompagne d'importants changements de conformation de la particule virale produisant des particules considérablement plus hydrophobes que les particules natives. Ces changements de conformation semblent être indispensables à la décapsidation et sont principalement caractérisés par la perte de la protéine interne VP4, l'externalisation de l'extrémité N-terminale de la protéine VP1 ainsi que par une réduction du coefficient de sédimentation de 160S à 135S. Les virions adsorbés pénètrent dans la cellule, probablement par un mécanisme d'endocytose médié par le récepteur cellulaire et sont décapsidés. Les extrémités N-terminales de la protéine VP1 et les myristates liés à la protéine VP4 pourraient former un canal à travers les membranes plasmiques et/ou endosomales permettant à l'ARN viral de pénétrer dans le cytoplasme (Racaniello & Howley, 2007) (**Figure 14**).

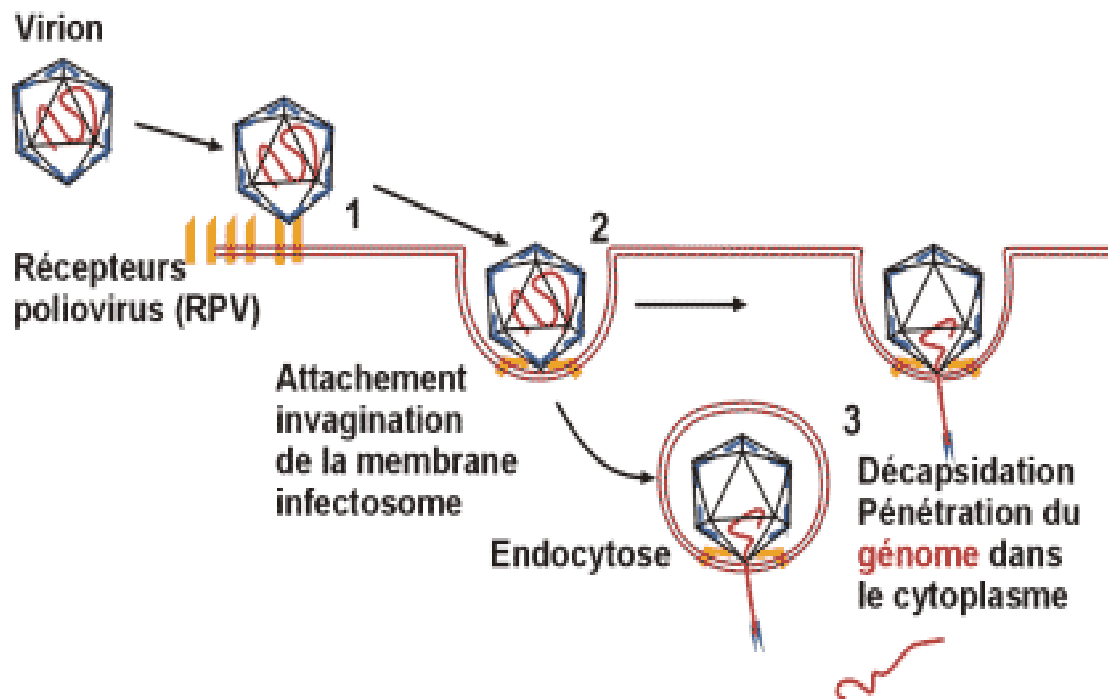


Figure 14 : Représentation schématique du modèle d'entrée d'un entérovirus et de sa décapsidation. Le virion mature (160S) s'adsorbe sur la cellule de manière réversible. A température physiologique, la particule virale subit des changements de conformation médiés par le récepteur (orange) entraînant la formation de la particule altérée A (135S) qui serait un intermédiaire présumé de décapsidation. L'ARN viral est alors libéré dans le cytoplasme, soit au niveau de la membrane cytoplasmique, soit au niveau de la membrane endosomique suite à l'endocytose (Lafeuille, HP *et al.*, 2002).

Un autre modèle de transfert de l'ARN viral par formation de pores transmembranaires a été également proposé. En effet, les extrémités N-terminales de VP1 des particules A sont ancrées dans la membrane cellulaire et formeraient des pores à travers lesquels l'ARN viral pourrait transiter dans le cytoplasme. Ce modèle est supporté par la détection d'un canal ionique lorsque les particules A sont mises en contact avec des membranes lipidiques. En 2000, Belnap *et al.* ont montré, dans un modèle de particules A produites par microscopie cryo-électronique, que les domaines de la capsid s'avancent de $9A^\circ$ selon un processus comparable à la tectonique des plaques. Ces mouvements produisent des ouvertures entre les sous-unités de la capsid (VP1, VP2, VP3) qui pourraient permettre l'émergence de VP4 et de l'extrémité N-terminale de VP1. Une fois le pore formé, VP3, qui forme un bouchon, se déplacerait pour permettre le passage de l'ARN vers le cytoplasme

(Racaniello & Howley, 2007). Il a été montré par des expériences de mutagenèse que la protéine VP4, bien que libérée dans la particule altérée, jouerait un rôle central dans la formation des pores membranaires (Danthi *et al.*, 2003).

3.1.2.2 Synthèses virales : traduction et réplication du génome viral

3.1.2.2.1 Traduction

Une fois libéré dans le cytoplasme, l'ARN entéroviral, de polarité positive, est directement traduit en protéines virales, après clivage de VPg par une protéase cellulaire. Par ailleurs, aucune protéine virale n'est importée dans la cellule via la capsid virale (Newman & Brown, 1997).

Les EV, comme tous les picornavirus, synthétisent leurs protéines par traduction d'une longue phase ouverte de lecture ou ORF (*Open Reading Frame*), suivie de clivages protéolytiques successifs de la polyprotéine virale ainsi produite. Cette polyprotéine est clivée immédiatement après la traduction des séquences codant les protéases. L'ARN viral n'étant pas coiffé à son extrémité 5', l'initiation de la traduction, dite « initiation interne », est médiée par la fixation de la sous-unité 40S du ribosome à la structure IRES du virus (Pelletier & Sonenberg, 1988). Afin de stabiliser l'interaction entre l'IRES et la machinerie traductionnelle (en particulier le facteur d'initiation eucaryotique eIF4-G), certaines molécules cellulaires telles que la polypyrimidine-tract-binding protein (PTB), ou encore eIF-2 α , et la poly r (C)-binding protein 2 (PCBP2) agissent comme protéines chaperonnes (Belsham & Sonenberg, 2000).

3.1.2.2.2 Passage de la traduction à la réplication

L'ARN génomique des EV sert non seulement d'ARNm pour la traduction virale mais également de matrice pour la synthèse de brins négatifs d'ARN lors de la réplication virale. Il est admis qu'il existe un mécanisme permettant d'éviter la production de ces deux phénomènes simultanément (Barton *et al.*, 1999). En 2000, Gammarnik et Andino ont proposé que la structure en forme de trèfle située dans la région 5'NC contienne des signaux contrôlant à la fois la traduction et la réplication virale. Dans ce modèle, à un stade précoce de l'infection, la liaison de la PCBP (Poly r (C) binding protein) à la structure en trèfle stimule la traduction. Une fois la protéine 3CD^{PTO} synthétisée, elle se lie à son tour à la structure en trèfle, réprime la traduction et stimule la synthèse du brin négatif de l'ARN viral

(Gamarnik & Andino, 1997). Bien que ce modèle ait une certaine pertinence expérimentale, il ne prend pas en compte le fait que la traduction virale continue dans les cellules infectées des heures après le début de la réplication virale. Un phénomène de collision entre les ribosomes et la polymérase virale pourrait donc exister (Racaniello & Howley, 2007).

3.1.2.2.3 Réplication

Lorsque suffisamment de protéines virales sont produites, une bascule de la traduction vers la réplication du génome viral aurait lieu, ces deux phénomènes ne pouvant a priori pas se produire simultanément. L'initiation de la réplication serait, elle aussi, sous le contrôle de la structure en feuille de trèfle présente à l'extrémité 5' du génome entéro viral. La boucle IV de la feuille de trèfle interagirait spécifiquement avec la PCBP cellulaire, sous régulation de la protéine virale 3CD (Gamarnik & Andino, 1998 ; Gamarnik & Andino, 2000). La réplication et la traduction ne peuvent avoir lieu simultanément sur le même brin (+). En effet, la polymérase 3D^{pol} est incapable de répliquer un ARN en cours de traduction.

De nombreux travaux ont permis le développement d'un modèle représentatif des mécanismes de réplication des EV (Xiang *et al.*, 1997). La synthèse du brin négatif (complémentaire de l'ARN génomique positif) serait contrôlée par la région 3'NC, en collaboration avec les protéines virales 3Dpol et 3AB. Par ailleurs, il est maintenant admis que l'uridylation de VPg est la première étape de cette réplication, VpgpU (pU) fournissant alors une amorce à la polymérase virale 3Dpol (Paul *et al.*, 1998). La synthèse du brin positif est initiée à partir de l'extrémité 3' du brin négatif néosynthétisé (Agol *et al.*, 1999). L'extrémité gauche de la forme répliquative servirait d'origine de réplication dont la structure en hétéroduplex serait reconnue par les protéines du complexe de réplication et stabilisée au niveau de la structure en feuille de trèfle de l'ARN positif par des protéines virales (2A, 3AB, 3CD) et cellulaires non identifiées. Un complexe ribonucléoprotéique se formerait alors à l'extrémité 5' du brin positif (Andino *et al.*, 1993). La libération de l'extrémité 3' du brin négatif surviendrait ensuite, suivie de l'uridylation de VPg par 3Dpol. Enfin, VPg nouvellement uridylée (VPg pU (pU)) et 3Dpol serait transférée vers l'extrémité 3' du brin négatif pour initier la synthèse du brin positif (Andino *et al.*, 1993). L'enzyme responsable de la réplication est 3Dpol, une ARN polymérase ARN-dépendante. Cette enzyme commet de nombreuses erreurs à chaque cycle de réplication, estimées à une tous les 10³ à 10⁴ nucléotides, qu'elle n'est ensuite pas capable de corriger. Ce taux élevé de

mauvais appariements au cours de l'étape de réplication a pour conséquence l'accumulation de mutations dans le génome des virus nouvellement synthétisés. Ainsi, chaque virus va différer des autres par au moins une mutation (Crotty *et al.*, 2000). Une souche d'EV n'est donc pas constituée d'un génotype unique mais plutôt d'une quasi-espèce virale.

3.1.2.2.4 Discrimination entre l'ARN viral et cellulaire

Les ARN polymérase ARN-dépendantes des EV sont des enzymes matrice-dépendantes. Dans les cellules infectées, la protéine virale 3D^{pol} copie exclusivement l'ARN viral et non les ARNm cellulaires. Cette spécificité de matrice réside probablement dans l'interaction des protéines de réplication avec des séquences d'ARN spécifiques localisées au niveau des régions 3' et 5' non codantes du génome viral. La région 3'NC du brin d'ARN positif contient un pseudo-nœud, de structure très conservée chez les EV, qui joue un rôle essentiel dans la spécificité de matrice. Il a été démontré que 3D^{pol} ou 3CD^{pro} ne sont pas capables de se lier à cette structure secondaire en l'absence de 3AB, ce qui suggère que l'interaction de ces deux protéines (3AB-3CD) pourrait déterminer la spécificité de la fixation au niveau du pseudo-nœud de l'extrémité 3' de l'ARN viral. Dans la région 5'NC, la structure en forme de trèfle joue également un rôle important dans la spécificité de matrice. En effet, 3CD^{pro} se lie spécifiquement à cette structure du brin positif, ainsi qu'à la protéine cellulaire PCBP, permettant ainsi la formation du complexe de réplication (Racaniello & Howley, 2007).

3.1.2.3 Etapes tardives : morphogénèse et libération des virions

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

exclusif, de telle sorte que ni l'ARN négatif, ni les ARNs cellulaires ne peuvent être encapsidés. L'assemblage effectué, les particules virales s'accumulent dans le cytoplasme, sous forme de vésicules cristallines, puis sont ensuite libérées par éclatement des vacuoles à la surface des cellules. La libération des nouveaux virions est concomitante de la lyse cellulaire, au cours de laquelle la protéine virale 2B serait impliquée (Van Kuppeveld *et al.*, 1997). Les EV sont le plus souvent responsables d'infections aiguës au cours desquelles l'aspect cellulaire est profondément modifié, traduisant l'effet cytopathogène du virus (condensation du noyau, accumulation de vésicules membranaires, ainsi que des réarrangements du cytosquelette). Ces modifications, donnant à la cellule un aspect arrondi, traduisent les changements métaboliques du fait du détournement de la machinerie cellulaire au profit du cycle viral (Racaniello & Howley, 2007). D'autres mécanismes tels que le « shut-off » de la synthèse des protéines cellulaires induit par la protéase 2A participent aux perturbations subies par la cellule infectée (Hellen *et al.*, 1992).

3.1.3 Effets de la multiplication virale sur la cellule hôte

3.1.3.1 Inhibition de la synthèse des protéines cellulaires

L'infection des cellules par les EV est accompagnée par l'inhibition de la synthèse des protéines cellulaires (mécanisme de "shut-off"). En effet, deux heures après l'infection, les polyribosomes sont désorganisés, ce qui inhibe la traduction des ARNm cellulaires. Comme précédemment décrit, cette inhibition est liée à l'inactivation du facteur d'initiation de la traduction cellulaire eIF4F par clivage de ses composants eIF4GI et II par la protéase virale 2A. Bien que ces deux facteurs soient clivés, l'étude de la cinétique du "shut-off" corrèle seulement avec le clivage du composant eIF4II. De plus, la déphosphorylation de la protéine cellulaire 4E-BP1 pourrait également contribuer à l'inhibition de la traduction des protéines cellulaires. En effet, dans les cellules infectées par le PV, le fait que 4E-BP1 déphosphorylée se fixe au facteur eIF4E empêche la fixation de ce dernier à eIF4G et par conséquent l'activation du facteur eIF4F actif qui est indispensable à la traduction des ARN cellulaires (Racaniello & Howley, 2007).

3.1.3.2 Inhibition de la synthèse de l'ARN cellulaire

L'infection des cellules par les EV conduit également à une inhibition de la transcription des ARN

cellulaires. Les trois classes d'ARN polymérase ADN-dépendantes (ARN polymérase I, II et III) qui catalysent cette réaction sont enzymatiquement actives dans les cellules infectées, ce qui suggère que les protéines accessoires pourraient constituer la cible de l'inhibition de la transcription cellulaire. Des études *in vitro* ont démontré que cette inhibition résulte du clivage, par la protéase 3C, des facteurs de transcription tels que TFIID et TFIIC (Kliewer & Dasgupta, 1988). Sachant que le cycle viral des EV est entièrement cytoplasmique et que la transcription cellulaire se réalise au l'intérieur du noyau, il a été montré que seul le précurseur 3CD pénètre à l'intérieur du noyau et libère ensuite, par un mécanisme autocatalytique, la protéase 3C qui inactive à son tour les différents facteurs de transcription (Sharma *et al.*, 2004).

3.1.3.3 Inhibition de l'importation des protéines nucléaires

L'infection par les EV entraîne le blocage de transport des protéines nucléaires et leur accumulation dans le cytoplasme des cellules infectées. Ce phénomène est la conséquence d'une protéolyse des deux protéines qui forment le complexe du pore nucléaire, Nup153 et p62 (Gustin & Sarnow, 2001).

3.1.3.4 Inhibition de la sécrétion des protéines

Dans les cellules infectées par les EV, le transport des protéines membranaires est bloqué. La protéine virale 2B et son précurseur 2BC inhibent la voie de sécrétion des protéines de l'appareil de Golgi et la protéine 3A bloque le trafic vésiculaire du réticulum endoplasmique (Barco & Carrasco, 1995 ; Sandoval & Carrasco, 1997).

3.1.3.5 Effet cytopathique

Les cellules infectées par les EV développent d'importants changements morphologiques caractéristiques appelés effets cytopathiques (ECP). Ces changements qui apparaissent dès les premières heures de l'infection incluent une condensation de la chromatine, une déformation du noyau, la prolifération des vésicules membranaires par accumulation des lipides dont la synthèse est stimulée, le changement de la perméabilité membranaire suite à l'augmentation de la concentration intracellulaire de Ca²⁺, la fuite des composants intracellulaires et le dessèchement de la cellule

entière. En microscopie optique, les changements morphologiques les plus notables sont l'arrondissement et le détachement des cellules adhérentes du récipient de culture cellulaire. Ces modifications pourraient favoriser la lyse cellulaire et faciliter la propagation virale (Doedens *et al.*, 1994). La cause de ces ECP demeure à ce jour inconnu. L'inhibition de la synthèse des ARN, des ADN et des protéines cellulaires à un stade précoce de l'infection ne contribue pas à l'apparition de ces effets (Racaniello & Howley, 2007).

3.1.3.6 Apoptose

Les infections à EV provoquent la mort cellulaire par apoptose. Bien que certaines manifestations de ce processus telles que la condensation de la chromatine et la déformation du noyau soient similaires à celles de l'ECP, l'induction de ces deux phénomènes implique deux voies différentes. L'apoptose est un phénomène d'autodestruction actif et régulé dont les inducteurs viraux sont les protéines 2A^{pro} et 3C^{pro} (Barco *et al.*, 2000 ; Goldstaub *et al.*, 2000). Elle est, en revanche, inhibée par les protéines 2B, 3A et 2BC (Neznanov *et al.*, 2001 ; Campanella *et al.*, 2004 ; Salako *et al.*, 2006). Par des études *in vitro*, il a été montré que le PV (Ammendolia *et al.*, 1999) et le CV-B3 (Carthy *et al.*, 1998) sont capables d'induire l'apoptose sur des lignées de cellules intestinales (Caco-2) et des cellules humaines (HeLa). De plus, en utilisant un modèle murin de poliomyélite paralytique, il a été montré que les motoneurons infectés mouraient par apoptose (Girard *et al.*, 1999).

3.2 Pathogénèse

Les EV pénètrent dans l'organisme surtout par voie fécale-orale. Les muqueuses pharyngée et du tube digestif constituent les premiers sites de réplication de ces virus (phase digestive). La colonisation du tractus gastro-intestinal est assurée par la résistance des EV aux pH acides, ce qui leur permet de franchir la barrière stomacale. La phase digestive est suivie d'une phase lymphatique où le virus atteint les plaques de Peyer, les amygdales et les ganglions lymphatiques (cervicaux et mésentériques). Il s'en suit une phase virémique dite initiale au cours de laquelle le virus passe des ganglions lymphatiques vers le canal thoracique et de là se déverse dans la circulation générale. Cette virémie primaire est cliniquement silencieuse mais elle peut s'accompagner de signes cliniques non spécifiques (fièvre, vomissements, maux de tête ...). Une fois dans le sang (virémie majeure ou

secondaire), le virus se multiplie dans les cellules du système réticulo-endothélial et atteint ensuite son organe cible (système nerveux central, cerveau, muscles, pancréas, cœur...). La période d'incubation recouvrant ces différentes phases est d'environ 5 à 14 jours, avec des extrêmes pouvant varier de 2 à 35 jours. Dans les infections conjonctivales qui se font par inoculation directe de la conjonctive, l'incubation est plus courte (12 à 72 heures). L'histoire naturelle de l'infection à EV se termine par l'excrétion fécale qui débute dès l'apparition des signes cliniques et elle peut durer plusieurs semaines. La plupart des individus infectés par les EV contrôlent l'infection avant le stade de virémie majeure aboutissant à une infection asymptomatique (Julien, 2003 ; Pallansch & Roos, 2007). La **Figure 15** récapitule ces données.

3.3 Spectre d'hôte et tropisme tissulaire

Bien que l'homme soit le seul hôte et réservoir naturel des EV humains, certains animaux sont sensibles à l'infection expérimentale par les EV humains. Ceux-ci incluent les primates non humains et les souris transgéniques pour le récepteur CD55 du PV, les souris et quelques singes pour les CV-A et B et les singes pour les echovirus. Les EV sont également capables d'induire *in vitro* un effet cytopathique dans diverses lignées de culture cellulaire d'origines simienne, primate ou humaine (**Tableau 2**). De plus, chez un sujet infecté par un EV, la multiplication de ces virus est spécifique du type de cellules. Cette restriction semble dépendre essentiellement de la présence du récepteur spécifique et de sa distribution à la surface des cellules. Cependant, bien que des tissus humains, comme le foie, les poumons ou le cœur, expriment fortement le récepteur du PV, ils ne sont pas habituellement infectés suite à la contamination par cet agent. Il existe donc des facteurs autres que les récepteurs qui jouent un rôle important dans le déterminisme du tropisme du virus et de la distribution de l'infectivité virale. Parmi ces facteurs, on peut citer la voie d'inoculation, des facteurs cellulaires spécifiques ainsi que certains éléments du génome viral comme les protéines structurales et la région 5' non codante. L'IRES semble en effet jouer un rôle important dans le tropisme et la virulence (Pallansch & Roos, 2007).

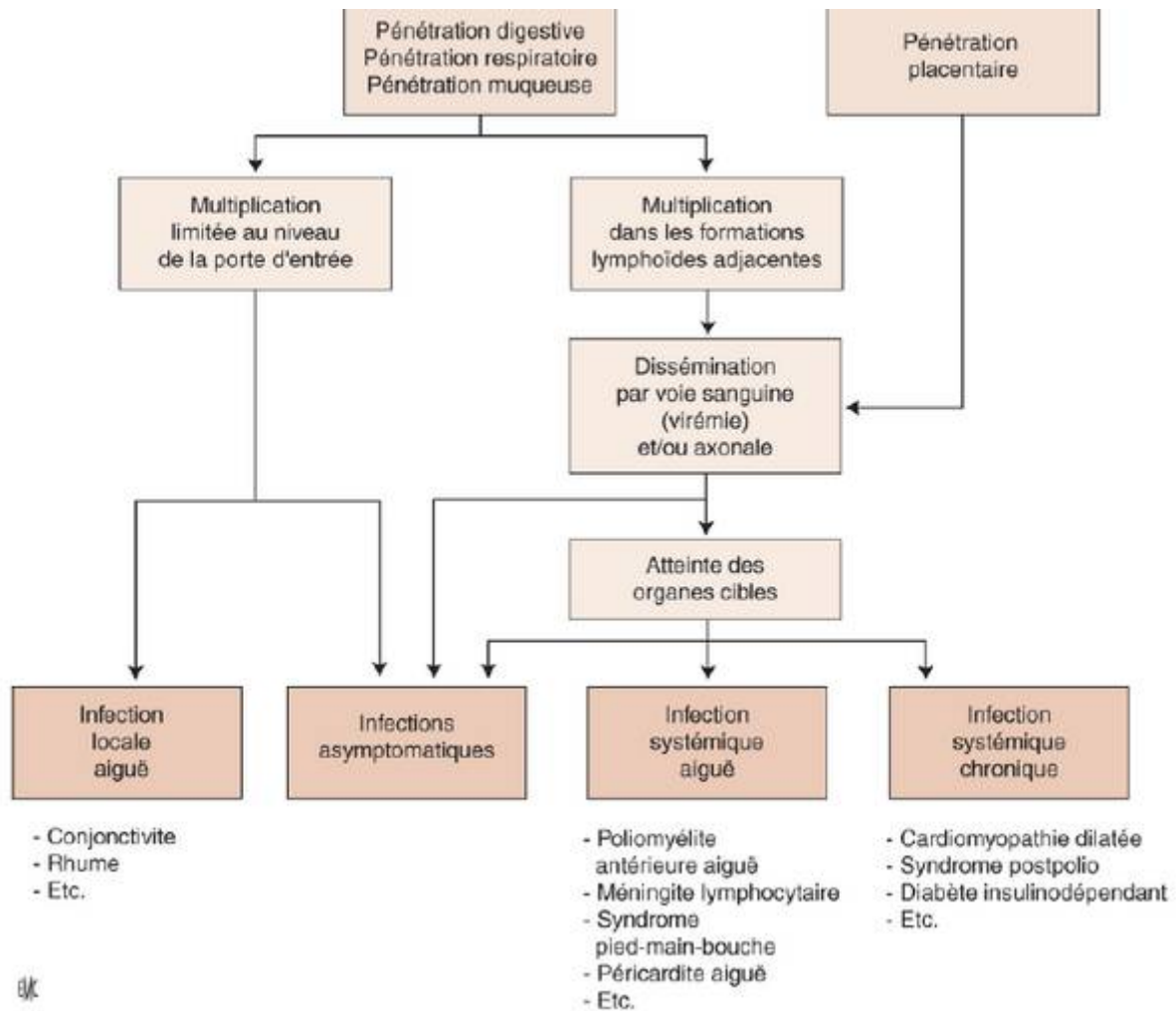


Figure 15 : Physiopathologie simplifiée des infections à EV (Pozzetto, 2009).

Tableau 2 : Spectre d'hôte et tropisme cellulaire des EV humains (Pallansch, 2007).

Virus	ECP sur lignée cellulaire		Pathologie chez l'animal	
	Cellules de rein de singe	Cellules humaines	Souriceau nouveau-né	Cellules humaines
Poliovirus 1-3	+	+	-	+
Coxsackievirus A-24	+/-	+/-	+	-
Coxsackievirus A-16	+	+	+	-
Echovirus 1-34	+	+/-	-	-
Entérovirus 68-71	+	+	-	-

3.4 Réponse immunitaire

3.4.1 Immunité innée ou naturelle

Bien que la réponse immunitaire innée ne soit pas toujours suffisante pour éradiquer les EV, elle est particulièrement importante parce qu'elle représente la première défense en attendant que l'immunité adaptative prenne le relais. De plus, elle permet de réguler la réponse acquise. Dans la réponse innée, les interférons activent plusieurs gènes conduisant à une protection antivirale. Dans le cas des cellules pancréatiques infectées par les CV-B4, l'interféron α induit les gènes codant la 2', 5'-oligoadénylate synthétase et la ribonucléase L (RNase) et l'interféron γ induit une protéine kinase (PKR) activée par les ARN viraux double brin conduisant à la protection des cellules contre l'infection (Flodström-Tullberg *et al.*, 2005). Le rôle des cellules Natural Killer (NK) dans cette réponse n'est pas bien exploré ; elles peuvent jouer un rôle non seulement dans la protection mais également dans la médiation de la maladie (Pallansch & Roos, 2007). Une étude suggère que le système immunitaire inné constitue un déterminant important du tropisme tissulaire ainsi que de la pathogénicité des PV (Ida-Hosonuma *et al.*, 2005).

3.4.2 Immunité adaptative ou acquise

Lors de l'infection par un EV, des réponses immunitaires plus tardives et très spécifiques sont également mises en jeu. La réponse immunitaire humorale joue, en particulier, un rôle très important, permettant une protection et une immunité sur une longue durée. Cette importance est démontrée par la gravité et la persistance des infections à EV chez les patients agammaglobulinémiques ainsi que par l'augmentation de la sensibilité à l'infection et de la sévérité de la maladie chez les nouveau-nés. Cette réponse humorale est basée sur la production rapide d'immunoglobulines (Ig) antivirales d'isotypes IgM, IgG et IgA. Les IgM persistent normalement durant 6 mois alors que les IgG et les IgA peuvent persister toute la vie. Les IgA sécrétoires présentes au niveau des muqueuses peuvent empêcher l'atteinte des tissus cibles en bloquant le virus au niveau de l'oropharynx et de l'intestin. Les anticorps neutralisants apparaissent dans le sérum 7 à 10 jours après l'infection. Ces anticorps reconnaissent les sites antigéniques localisés principalement sur les boucles des protéines structurales qui sont exposées à la surface de la capsid (voir ci-dessus). Les anticorps neutralisants peuvent bloquer la phase de virémie initiale qui précède la colonisation des tissus cibles. L'immunité

cellulaire médiée par les lymphocytes T joue également un rôle important dans les infections à EV. Les lymphocytes T CD4⁺ interviendraient dans la clairance des EV de l'organe infecté en fournissant une aide à la réponse humorale. Les cellules T CD8⁺ cytotoxiques peuvent éliminer le virus directement en provoquant la lyse des cellules infectées ou par la libération de cytokines (Pallansch & Roos, 2007).

Des épitopes antigéniques reconnus par les lymphocytes T humains (CD4⁺ et CD8⁺ cytotoxiques) ont été identifiés dans la protéine capsidale VP1 du PV ainsi que dans la protéine non structurale 2C des CV-B4 (Varela-Calvino *et al.*, 2004) et B3 (Beck *et al.*, 1992). Dans certains cas, l'élimination virale n'est que partielle, aboutissant à une infection chronique de type persistante caractérisée par la faible production de virus infectieux et la persistance de l'ARN viral et/ou des protéines virales dans les organes cibles (Reetoo *et al.*, 2000).

3.4.3 Immunopathologie

Bien que les réponses immunes médiées par les lymphocytes T et B jouent un rôle très important dans la clairance des EV, ces réponses peuvent également mener, dans certaines situations, à des pathologies auto-immunes. En effet, la réponse immune dirigée contre les EV peut conduire à une réactivité croisée avec les protéines cellulaires. De plus, la régulation accrue de la réponse immune non spécifique peut également être responsable des pathologies auto-immunes dont les dommages sont plus importants. L'activation des cellules T auto-réactives peut être induite par les cytokines ou par d'autres facteurs comme la libération d'antigènes du soi. La présence des cytokines pro-inflammatoires active ensuite les cellules de type Th1 ou les macrophages qui stimulent l'immunopathologie (Pallansch & Roos, 2007). Ce type de mécanisme immunopathologie est probablement impliqué dans la physiopathologie du diabète (Jaïdane *et al.*, 2012).

3.5 Pathologies humaines liées aux entérovirus

Les EV sont les virus les plus communément rencontrés chez l'Homme. On estime à 50 millions les infections à EV chaque année aux Etats-Unis et potentiellement à 1 milliard à travers le monde (Palacios & Oberste, 2005). La plupart de ces infections sont asymptomatiques. Néanmoins, les EV peuvent être responsables d'un large éventail de pathologies incluant des infections respiratoires, des éruptions cutanées, des méningites aseptiques, des encéphalites, des paralysies flasques, la

pleurodynie et des atteintes multiviscérales du nouveau-né. A côté de ces atteintes aiguës, les EV ont été également impliqués dans certaines pathologies chroniques sévères telles que les myocardites et les cardiomyopathies dilatées, le diabète de type 1 et les atteintes neuromusculaires (**Tableau 3**). Chez les EV, un même sérotype peut être associé à des manifestations cliniques différentes ; par exemple, l'EV-70 peut entraîner une conjonctivite hémorragique aiguë, une méningo-encéphalite ou une paralysie. De même plusieurs sérotypes différents peuvent être à l'origine du même désordre clinique : CV-A6, CV-A10, CV-A16 et EV-71 sont à l'origine du syndrome « pied-main-bouche » (**Figure 16**).



Figure 16 : Vésicules typiques au cours du syndrome pied-main-bouche (clichés Pr. F. Cambazard, Dermatologie, CHU de Saint-Étienne) (Pozzetto, 2009).

Tableau 3 : Principales pathologies en relation avec les *Picornavirus* (Pozzetto, 2009).

Principales pathologies en relation avec les picornavirus.

	Pathologies (sérotypes)	
	Aiguës	Chroniques
Infections inapparentes	Très fréquentes (tous les picornavirus)	
Infections généralisées	Syndromes fébriles (tous les picornavirus) Maladie de Bornholm (CV-B) Infections néonatales (CV-B, E, HPeV) Malformations et infections in utero (virus Ljungan) ? ^a	Syndrome de fatigue chronique postviral (CV-B) ? ^a
Infections du système nerveux central	Méningites lymphocytaires (tous les EV et HPeV) Méningoencéphalites et encéphalites (CV-A, CV-B, E, EV-70 et 71, HPeV, virus Vilyuisk) Paralysies (PV, CV-A, CV-B, E, EV-70 et 71, HPeV)	Syndrome postpolio (PV) ? ^a Méningo-encéphalites chez l'immunodéprimé (PV, CV-A, E)
Infections respiratoires	Rhumes, bronchiolites, pneumonies (HRV, CV-A, CV-B, E, EV-68, HPeV)	
Infections cutanéomuqueuses	Herpangine (CV-A) Syndrome pied-main-bouche (CV-A, CV-B, EV-70 et 71) Exanthèmes, <i>rash</i> éruptifs (tous les EV et HPeV)	
Infections du tractus digestif	Diarrhées (virus Aichi) Hépatites néonatales (CV-B, E)	Diabète insulino-dépendant (CV-B) ?
Infections musculaires et cardiaques	Péricardites (CV-B) Myocardites (CV-B, E) Myosites (CV-B)	Myocardites (CV-B) Cardiomyopathies dilatées (CV-B)
Infections oculaires	Conjonctivite hémorragique (CV-A24, EV-70)	

EV : Entérovirus ; HPeV : paréchévirus ; PV : poliovirus ; CV-A : coxsackievirus A ; CV-B : coxsackievirus B ; E : échovirus ; HRV : rhinovirus.

^a Relation de causalité encore sujette à discussion.

3.5.1 Infections aiguës

3.5.1.1 Atteintes neurologiques

La Poliomyélite paralytique aiguë (*PAA*) (paralysie infantile, maladie de Heine-Medin) est la plus ancienne des EV humaines connues. C'est une maladie infectieuse endémo-épidémique, contagieuse, à transmission digestive. Elle est due aux trois sérotypes de PV. La cible privilégiée du PV est le système nerveux central (SNC) et plus précisément les neurones moteurs situés dans les cornes antérieures de la moelle épinière. La destruction de ces cellules entraîne une paralysie flasque aiguë irréversible d'un ou de plusieurs membres suivie d'une atrophie musculaire. La destruction des neurones associés aux muscles respiratoires est responsable de paralysies respiratoires qui entraînent, dans bien des cas, la mort du patient (Blondel *et al.*, 2008). Cette maladie neurologique n'apparaît que dans environ 1% des infections lors d'une épidémie, et encore plus rarement en situation endémo-sporadique (environ un cas pour 1000 infections). Hormis les PV, d'autres EV ont été également associées à ce type de paralysie flasque, en particulier le CV-A7 (Blondel *et al.*, 2008), l'EV-D70 (Wadia *et al.*, 1983) et l'EV-A71 (Chumakov *et al.*, 1979; Shindarov *et al.*, 1979). L'analyse plus systématique des génotypes d'EV retrouvés dans les selles de patients atteints de paralysie flasque montre une diversité très importante des EV potentiellement responsables (Nix *et al.*, 2013).

Actuellement, grâce au programme d'éradication de la poliomyélite lancé par l'OMS en 1988, un recul spectaculaire de cette maladie a été obtenu dans le monde. En revanche, la poliomyélite pose encore des problèmes dans plusieurs pays africains et asiatiques (Pallansch & Roos, 2007), avec des alertes régulières d'importation de virus polio à partir de régions politiquement instables comme en témoigne la détection de PV en Chine et en Syrie.

La méningite lymphocytaire à liquide clair à EV est, en termes de fréquence relative, la plus importante des entéroviroses. Les EV constituent la principale étiologie des méningites aseptiques. Elle touche généralement les enfants et les adolescents et se traduit par un syndrome méningé, parfois accompagné de fièvre, de céphalées ou de raideur de la nuque. D'évolution rapidement favorable, cette infection se présente volontiers sous la forme d'épidémies estivales (Rotbart, 1995).

Les encéphalites correspondent à des cas sporadiques. Leur nombre serait vraisemblablement sous-évalué. Ces infections seraient bien souvent associées à des méningo-encéphalites. Contrairement aux méningites, elles peuvent être fatales ou laisser de graves séquelles neurologiques. D'autres infections

du SNC telles que des ataxies cérébelleuses, des syndromes de Guillain-Barré et des myélites transverses ont également été associées à des infections à EV (Chopra *et al.*, 1986).

3.5.1.2 Atteintes cutanéomuqueuses

L'herpangine est caractérisée par une pharyngite vésiculeuse fébrile (38,5-40°C), parfois associée à des douleurs abdominales. Sa durée est de cinq à sept jours. Elle atteint surtout l'enfant entre 1 et 7 ans, mais elle est également fréquente chez le nouveau-né et l'adulte. L'herpangine est causée par les CV-A et B, quelques echovirus (E-6, 9, 11, 16, 17, 22 et 25) et l'EV-A71 (Pallansch & Roos, 2007).

Le syndrome « pied-main-bouche » est une infection rapidement résolutive due à un CV entraînant des vésicules au niveau des pieds, des mains et de la bouche (**Figure 17**). Cette infection apparaît typiquement chez les enfants âgés de moins de 4 ans, mais les adultes peuvent également la développer. Ce syndrome est cliniquement caractérisé par une inflammation de l'épithélium pharyngé associée ou non à une fièvre modérée. L'infection survient par petites épidémies dues à un CV habituellement de type A-16 ou à l'EV-A71 (Pallansch & Roos, 2007). Plus récemment, l'émergence d'infections à CV-A6 et CV-A10, avec notamment des formes atypiques a été rapportée dans plusieurs pays (Montes *et al.*, 2013 ; Feder *et al.*, 2014).

La conjonctivite hémorragique est causée par l'EV-D70 ou le CV-A24. Les symptômes de cette maladie sont des douleurs oculaires, une photophobie, une tuméfaction de la paupière et une rougeur variable de la conjonctive. La maladie guérit en moins de 10 jours. Une atteinte cornéenne passagère est possible dans certains cas. La conjonctivite aiguë hémorragique peut être associée à d'autres symptômes tels que des dysfonctionnements neurologiques et des perturbations respiratoires ou gastro-intestinales. De plus, on a signalé des cas de paralysie de type polio chez des individus infectés par l'EV-D70. Des cas sporadiques de conjonctivite ont été également rapportés avec l'E-7 (Sandelin *et al.*, 1977).

3.5.1.3 Affections respiratoires

Des atteintes respiratoires hautes (rhinite, laryngite, pharyngite) et basses (bronchite, pneumonie, bronchiolite) ont été décrites impliquant divers sérotypes de CV et d'echovirus (McCarthy *et al.*, 2000). Plusieurs études de cohorte effectuées chez des nourrissons ou des jeunes enfants hospitalisés pour

bronchiolite ont permis de détecter par RT-PCR la présence du génome des EV dans 8 à 25 % des échantillons de sécrétions respiratoires, plaçant les EV au 3ème rang des étiologies virales derrière le virus respiratoire syncytial et les rhinovirus (Andréoletti *et al.*, 2000 ; Jartti *et al.*, 2004 ; Jacques *et al.*, 2006).

3.5.1.4 Affections cardiaques

Les myocardites aiguës et les *myopéricardites*, dont les CV-B représentent la principale étiologie virale chez l'enfant et l'adulte jeune, sont liées à la capacité de ces virus à infecter les myocytes et les fibroblastes endomyocardiques. Selon l'OMS, approximativement 3,2 % des infections symptomatiques à EV seraient associées à des signes de myocardites. Les symptômes cliniques associés à ce syndrome sont : fièvre, palpitations, dyspnée d'effort, tachycardie, trouble du rythme et élévation des enzymes cardiaques. L'étiologie entérovirale dans ces pathologies cardiaques a été mise en évidence par la détection des particules entérovirales (ARN et protéines de capsid) dans le tissu myocardique et le liquide péricardique après autopsies de patients décédés de myopéricardites (Andreoletti *et al.*, 2000). Le développement des techniques de biologie moléculaire, nettement plus sensibles que les cultures cellulaires, a permis une détection rapide et spécifique des EV à partir de prélèvements de liquide péricardique ou de biopsies endomyocardiques (Pallansch & Roos, 2007).

3.5.1.5 Autres affections

Les infections généralisées du nouveau-né sont souvent sévères, voire fatales du fait de complications méningo-encéphaliques, myocardiques ou hépatiques (el-Sageyer *et al.*, 1998).

La maladie de Bornholm est encore appelée pleurodynie ou myalgie épidémique ; cette infection généralement associée aux CV-A et B, voire aux echovirus, entraîne des douleurs abdominales et/ou thoraciques intenses, de la fièvre, et est souvent accompagnée de céphalées (Mbida *et al.*, 1991).

Des troubles gastro-intestinaux sont fréquemment rapportés lors d'infections à EV mais ces virus, malgré leur écosystème intestinal, ne sont pas considérés comme des agents de gastroentérites.

4 Epidémiologie

Les EV ont une distribution ubiquitaire et une répartition mondiale. L'homme est le seul réservoir des souches pathogènes pour notre espèce. La diffusion des EV peut être sporadique, endémique, épidémique, voire pandémique. Certains sérotypes sont plus épidémiogènes que d'autres. Plusieurs sérotypes peuvent co-circuler durant une même période et au sein d'une même population. Certains dominent quelques années, d'autres sont plutôt responsables de cas sporadiques. Certaines souches peuvent rester quiescentes durant une certaine période en fonction du degré d'immunisation de la population et peuvent ré-émerger quelques années plus tard après avoir subi des modifications génétiques.

4.1 Modes de transmission

La transmission hydrique ou d'origine alimentaire représente la voie fécale-orale classique, où l'eau contaminée par des selles constitue un réservoir intermédiaire. L'infection peut être transmise par consommation d'eau contaminée, par des aliments préparés avec de l'eau contaminée ou directement par des personnes contaminées. La transmission peut également se produire dans les eaux contaminées de centre de loisirs (**Figure 17**).

La transmission respiratoire peut se produire par des gouttelettes ou par contact direct de la main contaminée avec la bouche, le nez ou les yeux. C'est le principal mode de transmission des agents de conjonctivite hémorragique aiguë, d'EV-D70 et de variant de CV-A24 (Lévêque *et al.*, 2010). Des présentations graves d'infection à EV chez le nouveau-né ont été associées à la transmission par le sang de la mère au fœtus (Cheng *et al.*, 2006). D'autres formes de transmission par voie sanguine telles que les transfusions sanguines et les piqûres de moustiques ne semblent pas jouer un rôle dans la transmission des EV.

La transmission nosocomiale a également été rapportée, notamment pour les CV-B et les E-11, particulièrement redoutables chez les nouveau-nés (Mertens *et al.*, 1982).

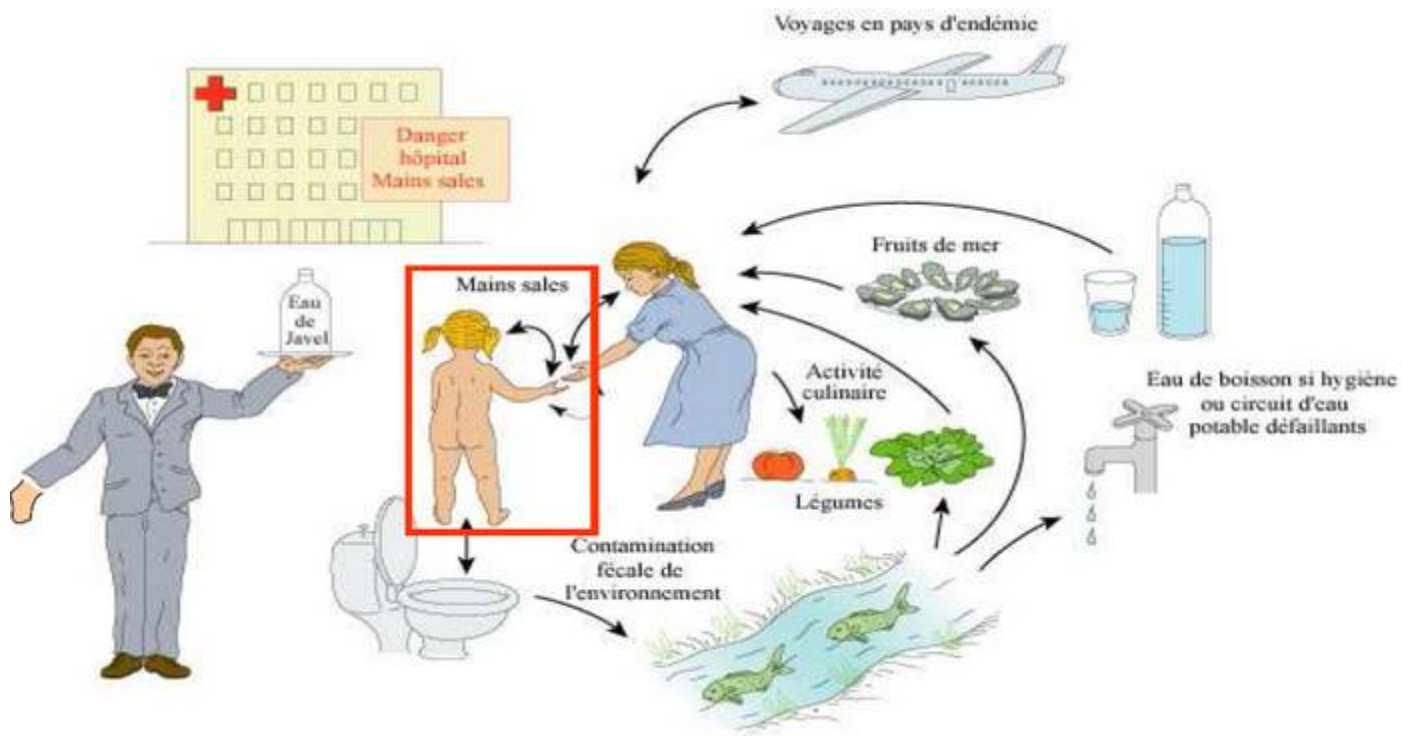


Figure 17 : Modes de transmission des entérovirus humains (Lafeuille *et al.*, 2002).

4.1.1 Circulation des entérovirus dans l'environnement

Des EV ont été isolés dans les piscines publiques et pataugeoires, en présence de taux de chlore réglementaires (résidu de chlore libre de 0,4 ppm) et en l'absence de bactéries coliformes (Keswick *et al.*, 1981). Des épidémies de méningite aseptique associées à des baignades dans des lieux de natation publique ont été rapportées, notamment en Italie et en Allemagne (Hauri *et al.*, 2005 ; Faustini *et al.*, 2006). Une épidémie mixte à E-30 et à CV-A1 a été décrite chez des voyageurs revenant du Mexique et ayant été exposés à de l'eau de mer (Begier *et al.*, 2008). Les EV sont éliminés dans les selles et contaminent de cette manière le milieu hydrique et les fruits de mer. Les maladies dues aux EV constituent un important problème de santé publique. Leur transmission se fait de manière directe ou de manière indirecte par des eaux souillées ou des aliments contaminés (Schwartzbrod, 1991). La transmission indirecte est certainement à la base de nombreuses épidémies dans les pays en développement.

Plusieurs épidémies dues aux EV ont été décrites suite à la consommation d'eau contaminée (Hejkal *et al.*, 1982; Lippy & Waltrip, 1984). Éliminés dans les selles, ces virus se retrouvent dans les eaux usées qui constituent le premier maillon d'un cycle au centre duquel se trouve l'homme en tant que contaminateur primaire mais aussi en tant que récepteur secondaire des agents pathogènes véhiculés par l'eau (Schwartzbrod, 1991). Dans les pays industrialisés, ces eaux usées sont traitées avant d'être rejetées dans le milieu naturel, ce qui n'est pas le cas pour les pays en développement. Les EV contenus dans ces eaux usées sont susceptibles de contaminer les nappes souterraines ainsi que les eaux de surface. Ils représentent un danger lorsque ces eaux sont utilisées pour la consommation ou pour irriguer des cultures vivrières ou pour les baignades. Chaque année 1,7 million de jeunes enfants meurent de diarrhées dont l'origine est une mauvaise qualité des eaux de boisson, un assainissement inexistant et une hygiène défectueuse (Sandy, 2003). Le risque est omniprésent bien que la concentration virale dans les eaux usées soit sujette à des variations géographiques, socio-économiques et saisonnières. En outre l'importante quantité d'EV retrouvée dans les eaux usées est associée à un faible niveau d'hygiène et à une grande proportion d'enfants dans la communauté (Dahling *et al.*, 1989). La détection des EV dans les eaux usées est un bon indicateur de contamination virale et permet de prévenir toute possibilité d'épidémie. L'amélioration des techniques d'analyse virologique par l'utilisation de méthodes de biologie moléculaire permet d'augmenter les chances de détection rapide, sensible et spécifique des virus, notamment ceux pour lesquels il n'existe pas de méthode rapide ou facile de culture.

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

4.1.2 Facteurs influençant la circulation des entérovirus

La circulation des EV est influencée par différents facteurs. En effet, la sensibilité à l'infection et le degré de sévérité varient en fonction de l'âge du sujet infecté.

L'âge est un facteur important dans la transmission des EV et la gravité de la maladie. La plupart des infections entérovirales surviennent chez l'enfant et le nourrisson. Par ailleurs, l'homme fait plus volontiers que la femme des infections sévères à EV avec un sex-ratio homme / femme égal à 1,5. Dans les pays moins développés, l'enfant peut être infecté dès le plus jeune âge alors que, dans les pays socio-économiquement plus avancés, la primo-infection ne survient parfois qu'à l'adolescence. Les jeunes enfants sont la principale source de transmission d'EV dans la famille (Hawkes & Vaudry, 2005). Les méningites aseptiques associées à des EV non polio sont plus fréquemment observées chez les enfants de 5 à 14 ans. Dans le cas particulier du PV, les directives de l'OMS pour la surveillance de la paralysie flasque aiguë ciblent les enfants de moins de 15 ans. La plupart des maladies associées à des EV ont tendance à être plus sévères chez les adultes que chez les enfants, ce qui conduit à une sur-représentation des maladies graves chez les adultes.

Les facteurs climatiques influencent également la transmission des EV. Dans les pays tempérés, les épidémies importantes apparaissent en période estivo-automnale (**Figure 18**), alors que dans les pays tropicaux, les EV peuvent circuler tout le long de l'année. Il y a une circulation mondiale des EV à l'exception du PV. En France, le nombre d'infections à EV commence à augmenter chaque année en été et au début d'automne, avec un pic en juillet, avant de s'estomper progressivement (**Figure 19**).

Lors de la surveillance pendant 35 ans des infections à EV aux Etats-Unis, Khetsuriani *et al.* ont rapporté que 77,9% de toutes les détections avaient lieu entre juin et octobre (Khetsuriani *et al.*, 2006a). Des pics estivaux similaires ont été décrits dans d'autres régions de monde comme la Tunisie et le Brésil (Bahri *et al.*, 2005 ; Dos Santos *et al.*, 2006).

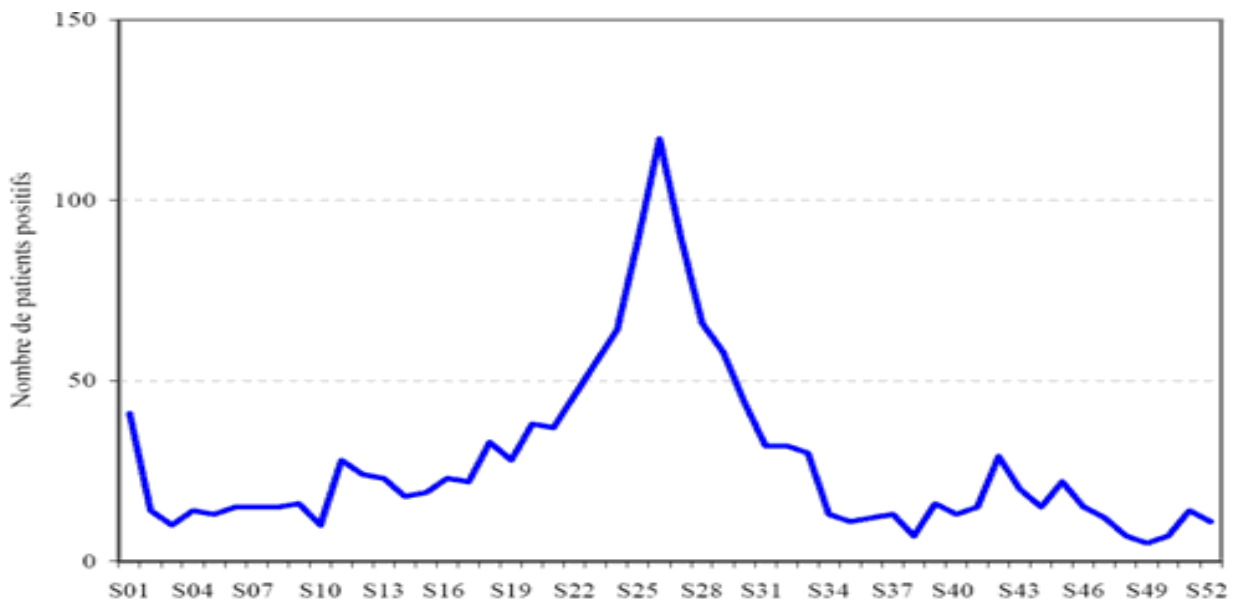


Figure 18 : Représentation du nombre de patients avec au moins un prélèvement d’EV positif en fonction de la distribution des cas par semaine, année 2007 (n = 1436) en France (source : Institut national de Veille Sanitaire, France).

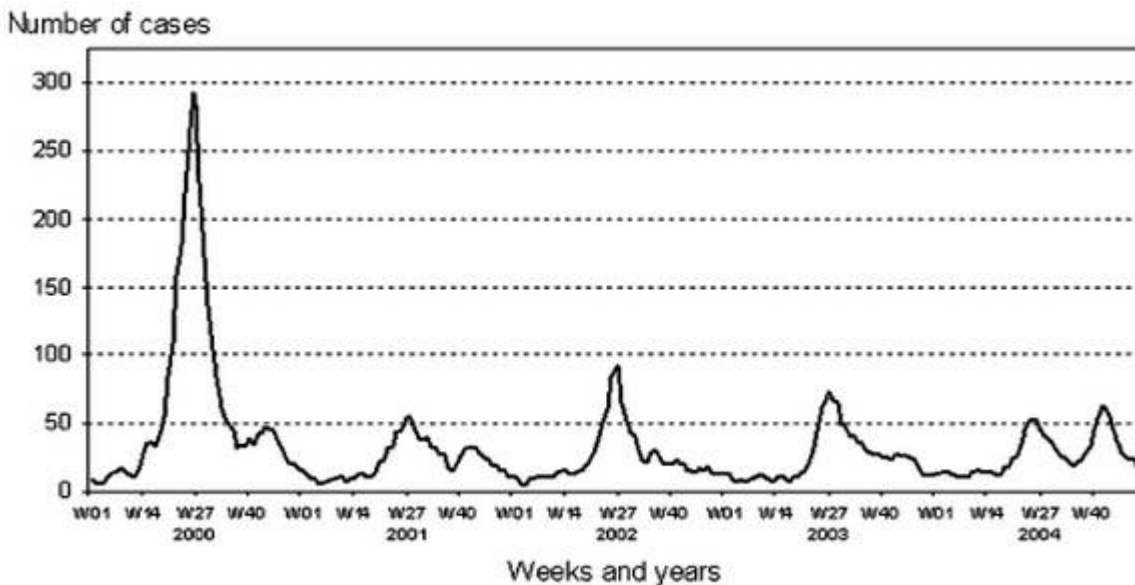


Figure 19 : Modèle saisonnier de circulation des EV, France, 2000-2004 (Antona *et al.*, 2007).

4.1.3 Epidémiologie moléculaire

Le développement des techniques moléculaires a été très bénéfique aussi bien pour le diagnostic que pour une meilleure connaissance de l'épidémiologie des EV. Les méthodes d'épidémiologie moléculaire (RFLP, fingerprinting, séquençage partiel du génome...) permettent d'envisager une analyse génétique des souches d'EV en circulation. Ainsi, l'analyse comparative des séquences nucléotidiques d'une région génomique bien déterminée (caractérisation des similitudes et des différences génétiques et antigéniques entre les souches circulantes) devient d'ores et déjà un outil précieux qui, associé à des données géographiques et temporelles, permet d'établir la cartographie des géotypes viraux en circulation, de suivre la disparition de certains d'entre eux et de mieux comprendre leur origine et leur évolution au cours du temps (Pallansch & Roos, 2007). L'épidémiologie moléculaire peut également avoir un intérêt dans la prévention de certaines maladies graves et contribue à restreindre la transmission nosocomiale et la contamination environnementale. Les études d'épidémiologie moléculaire des PV ont été d'une grande utilité dans la détermination de l'origine et de la nature des souches circulantes (polio ou non polio ; vaccinales ou sauvages ; importées ou autochtones) et ceci dans le cadre mondial de l'éradication de la poliomyélite (Rico-Hesse *et al.*, 1987). Pour les EV non polio, les principales études épidémiologiques ont été rapportées pour les CV B1 et B5, les E-30 et E-11, et l'EV-A71, agent responsable d'épidémies de grande ampleur. Ces études ont été basées sur l'interférence évolutionnaire dérivé de la comparaison au cours du temps des isolats d'un même sérotype, des isolats de sérotypes différents et également entre les différents membres des autres genres de la famille des *Picornaviridae* (Pallansch & Roos, 2007).

4.1.4 Circulation des entérovirus non polio

Dans le contexte du plan mondial d'éradication de la poliomyélite, la surveillance des EV a été renforcée depuis l'an 2000 afin de poursuivre leur caractérisation sur le plan moléculaire et de mieux comprendre l'association des différents sérotypes avec les manifestations cliniques engendrées. La symptomatologie chronique de l'infection entérovirale la plus fréquemment observée est représentée par les méningites à liquide clair. En France, les sérotypes le plus souvent impliqués ont été les suivants : CV-A7, -A9, -B1 à -B5, E-2 à 4, 6, 7, 9, 11, 14, 16, 19, 25, 30, 33 et EV-A71 (Antona *et al.*, 2005). En France métropolitaine, les dix principaux EV non-polio ayant circulé chez l'homme, de façon fluctuante de 2000 à 2004, sont, par ordre décroissant de fréquence : E-30, -13, -6, CV-B5, E-11, CV-B4, E-9, -7 et

CV-B2. Durant ces cinq ans, seule l'année 2000 a été épidémique avec identification d'E-30, -13 et -6 (84 % du total des EV caractérisés). E-6 a continué de circuler en 2001 et 2002 dans l'ensemble des régions françaises ; en revanche, E-30 et -13 ont peu ou pas circulé au cours des 4 années suivantes. En 2002, le sérotype qui a circulé en majorité était E-11. Aux Etats-Unis, de 1970 à 2005, un total de 52812 cas correspondant à 52 sérotypes d'EV non-polio ont été identifiés. Les 5 sérotypes les plus prévalents étaient E-9, -11, -30, -6 et CV-B5 (Khetsuriani *et al.*, 2006a). De 2002 à 2004, E-9 a été globalement le sérotype dominant (30,4%), suivi par E-30 (29,1 %), E-7 (5%) et CV-B1 (4,6 %) (Khetsuriani *et al.*, 2006). En Tunisie, sur 4700 échantillons cliniques collectés entre 1992 et 2003, 236 EV non polio ont été isolés dont les sérotypes les plus fréquents presque chaque année étaient E-6, -11 et -30 (Bahri *et al.*, 2005).

Ces données, déjà un peu anciennes, sont restreintes par deux contraintes techniques :

- Le typage des EV a été effectué à partir de souches isolées en culture à partir de prélèvements cliniques, ce qui réduit les résultats aux seules souches cultivables, en majorité de l'espèce B.
- Dans les années 2000, les techniques de typage moléculaire sont encore peu répandues dans les laboratoires de diagnostic, et les souches sont sérotypées par seroneutralisation, avec donc de nombreuses souches qui restent non serotypables en raison de l'évolution des sérotypes depuis la production des antisérums dans les années 50-60.

Des données plus récentes obtenues à partir de typage moléculaire seront présentées un peu plus loin dans cette introduction (P 77) et dans les travaux de la thèse (article 1).

4.1.5 Eradication de la poliomyélite

Depuis 1988, l'OMS a fixé un objectif d'éradication de la poliomyélite, initialement espérée en 2000, puis repoussé à 2005, et actuellement à 2018-2020, en raison des difficultés d'application de la vaccination dans deux régions : le sous-continent indien (Inde, Pakistan, Afghanistan) et certaines régions d'Afrique (Egypte, Niger et surtout Nord-Nigeria). Notons que la certification de l'éradication mondiale ne pourra être prononcée que 3 ans après le dernier cas confirmé dans le monde (CDC, 2007). Globalement, depuis le lancement de l'initiative mondiale pour l'éradication de la poliomyélite (IMEP), le nombre des cas a baissé de plus de 99 %. En 2012, il ne restait plus que trois pays d'endémie dans le

monde : le Nigéria, le Pakistan et l’Afghanistan. Dans ces pays de nombreux cas surviennent encore sous forme endémo- épidémique constituant donc un réservoir de virus et faisant persister le risque d’exportation de cas vers les pays devenus indemnes. Ainsi, à partir du Nord-Nigeria, la poliomyélite a été réimportée en Afrique subsaharienne, puis au Moyen-Orient et en Indonésie. En mai 2013 (**Figure 20**), Israël signalait l’isolement d’un PV sauvage de type 1 dans des prélèvements d’eaux usées dans le Sud du pays. Cette souche était identique à celle ayant récemment circulé au Pakistan et également retrouvée en décembre 2012 au Caire dans des prélèvements environnementaux (Anis *et al.*, 2013). En octobre 2013, l’OMS a rapporté 22 cas groupés de paralysie flasque aiguë en Syrie depuis le mois d’août. En novembre 2013, l’OMS confirmait qu’une souche sauvage de PV-1 avait été isolée chez 13 de ces 22 cas. Les premiers résultats de séquençage génétique montrent qu’il s’agit d’une souche proche de celles ayant circulé récemment au Pakistan, en Egypte et en Israël. En Syrie, le dernier cas de PV sauvage autochtone avait été rapporté en 1995, et le dernier cas importé en 1999 (Eichner & Brockmann, 2013).

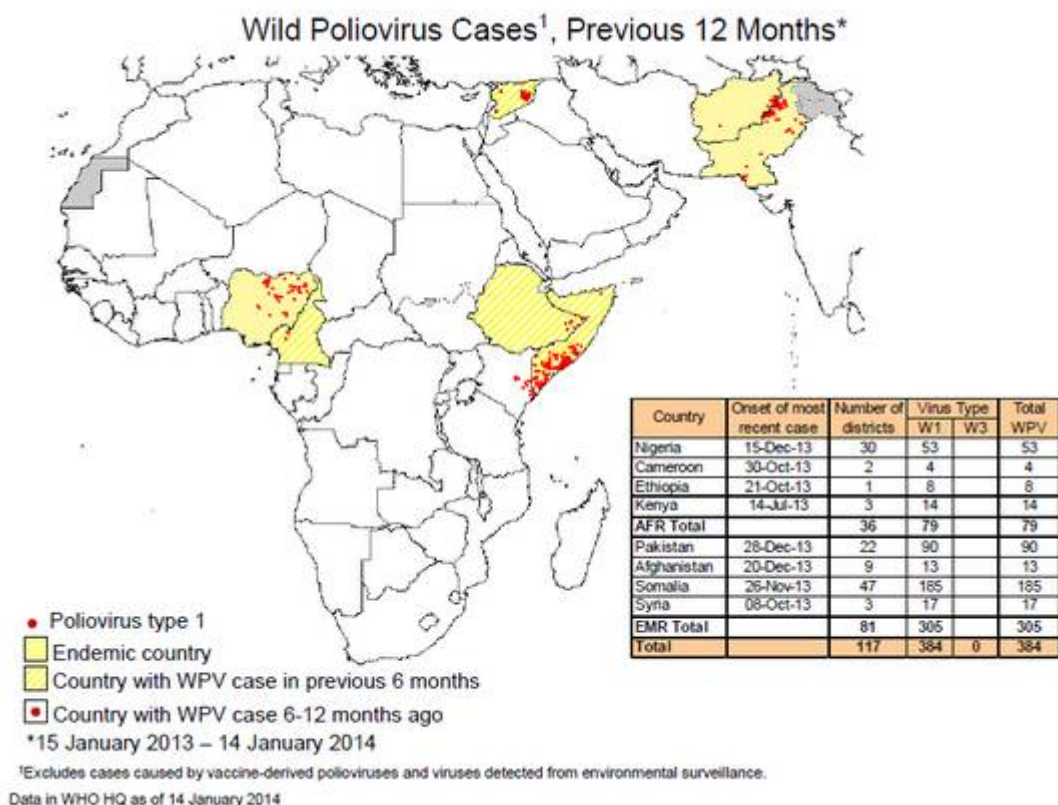


Figure 20 : Etat des lieux des cas de poliomyélite antérieure aiguë déclarés dans le monde entre janvier 2013 et janvier 2014. Données obtenues sur le site internet de l’OMS (<http://www.polioeradication.org/cascount.asp>).

En 1994, la Région OMS des Amériques a été certifiée exempte de poliomyélite, suivie en 2000 par la Région du Pacifique occidental puis, en juin 2002, par la Région Europe de l'OMS. Sur les trois types de PV sauvages (types 1, 2 et 3), la transmission du type 2 a été totalement interrompue avec succès depuis 1999.

Aujourd'hui, plus de 10 millions de personnes marchent, alors qu'elles auraient pu être paralysées par cette maladie. De plus, on estime à plus de 1,5 million le nombre de décès d'enfants évités grâce à l'administration systématique de vitamine A au cours des activités de vaccination anti-poliomyélique. En France, un réseau sentinelle a été créé en janvier 2000 afin de surveiller et de documenter la circulation des EV chez l'Homme et dans l'environnement dans le contexte mondial d'éradication des PV. Le Réseau de Surveillance des Entérovirus (RSE) étudie attentivement l'épidémiologie des infections à EV en France (Centre National de Référence des Entérovirus et Parechovirus).

En France métropolitaine, aucun PV sauvage n'a été identifié durant ces 5 années de surveillance tandis que des PV vaccinaux de sérotype 2 ont été détectés à cinq reprises (2000, 2003, 2004, 2006 et 2007) et deux reprises de sérotype 1 (2001 et 2009).

4.1.6 Prophylaxie et thérapie

La prévention non spécifique des infections à EV repose sur le respect des règles d'hygiène universelle. La prévention spécifique concerne uniquement les PV et est basée sur la vaccination. D'ailleurs la mise en place du programme d'éradication de la poliomyélite n'était envisageable que grâce à l'existence de deux vaccins efficaces mis au point dans les années 50 : le vaccin injectable de Jonas Salk constitué de particules virales pathogènes inactivées par le formol (VPI) et le vaccin polio oral (VPO) d'Albert Sabin, élaboré grâce à des souches vivantes atténuées. Le VPI confère une bonne réponse humorale générale, induisant essentiellement une immunité sérique et peu, sinon pas, d'immunité intestinale. Le VPO est constitué de souches qui ont été sélectionnées à partir de virus pathogènes, après de multiples passages *in vitro* et *in vivo*. Ces souches ont la capacité de se multiplier dans l'intestin humain sans provoquer de maladie neurologique et d'induire, comme les souches sauvages pathogènes, une immunité durable générale et intestinale. Cette dernière limite la multiplication et l'excrétion des virions et contribue ainsi à restreindre la circulation du PV en réduisant le nombre d'excréteurs potentiels. C'est l'une des raisons essentielles qui font du VPO le vaccin de l'éradication. Son faible coût et le fait qu'il puisse être administré par du personnel non médical ont également permis d'envisager son emploi

intensif (Kew *et al.*, 2005). Cependant, ce vaccin présente un inconvénient majeur lié à l'instabilité génétique et phénotypique des souches vaccinales, susceptibles de devenir neuropathogènes, voire épidémiogènes, comme l'ont montré quelques épidémies récentes. (Burns *et al.*, 2013 ; Minor *et al.*, 2012).

Toutefois, lorsque la couverture de vaccin antipoliomyélitique devient trop faible, les PV peuvent circuler dans les populations insuffisamment vaccinées et ensuite devenir pathogènes par les mutations et la recombinaison génétique avec d'autres EV de la même espèce, en particulier certains CV-A de l'espèce C. Des souches vaccinales recombinantes ont été impliquées dans plusieurs épidémies de poliomyélite paralytique. Deux épidémies de poliomyélite associées à ces souches dérivées du vaccin polio atténué (cPVDV) ont eu lieu dans le sud de Madagascar où la couverture vaccinale est faible, en 2001-2002 et en 2005. Ces cPVDV, de sérotypes 2 ou 3, ont été isolés des enfants paralysés et de certains de leurs contacts sains. D'autres souches de cPVDS ont été isolées dans la même région en 2011 chez ces enfants, ce qui indique que ces virus circulent à nouveau. Les campagnes de vaccination ont arrêté les épidémies en 2002 et 2005, de même que celle de 2011. Par conséquent, la plasticité génétique des souches de vaccin antipoliomyélitique qui menace le bénéfice de campagnes de vaccination est la cible d'une surveillance précise et un thème important de surveillance en santé publique (Delpeyroux *et al.*, 2013).

L'efficacité de plusieurs molécules antivirales telles que les interférons, les inhibiteurs de protéase, les composés se liant à la capsid, *in vitro* et *in vivo* (modèles animaux) a été bien documentée mais actuellement il n'existe pas de traitement spécifique contre les entéroviroses. Les immunoglobulines par voie intraveineuse peuvent servir à éviter une infection grave chez les sujets présentant un déficit constitutionnel de l'immunité humorale. Le pléconaril, en empêchant la décapsidation du virus, pouvait constituer un agent anti-EV puissant dans le traitement des infections chroniques neuroméningées chez les sujets agammaglobulinémique (Rotbart *et al.*, 1998 ; Pallansch & Roos, 2007) mais sa toxicité a empêché son utilisation à grande échelle. D'autres molécules sont en cours de développement, notamment en vue de la mise au point de traitements antiviraux efficaces contre l'EV-A71 (Abzug, 2014).

5 Classification des entérovirus humains

La famille des *Picornaviridae* comprend un nombre très important de membres distincts en raison de la très grande plasticité de leur génome.

5.1 Classification initiale

Les picornavirus sont la cause de nombreuses pathologies humaines et vétérinaires. Ils sont actuellement classés par la Comité International de Taxonomie Virale (ICTV) en 17 genres distincts et 37 espèces au sein de la famille des *Picornaviridae* : *Aphthovirus*, *Avihepatovirus*, *Cardiovirus*, *Erbovirus*, *Enterovirus*, *Hepatovirus*, *Kobuvirus*, *Parechovirus*, *Sapelovirus*, *Senecavirus*, *Teschovirus*, *Casovirus*, *Dicripivirus*, *Salivirus*, *Megrivirus* et *Tremovirus* (Adams *et al.*, 2013) mais leur classification évolue très rapidement, en particulier suite à la découverte régulière de nouveaux génotypes, grâce notamment à la métagénomique (séquençage à haut débit d'échantillons biologiques). La **Figure 21** montre l'arbre phylogénétique des différents genres au sein de la famille des *Picornaviridae* (Lauber & Gorbalenya, 2012). Le **Tableau 4** réunit les différents virus de la famille des *Picornaviridae* isolés dans l'espèce humaine (actualisation février 2014).

En 2012, le comité international de nomenclature des virus a défini 12 espèces composant le genre *Enterovirus* où l'on distingue : des espèces pathogènes pour l'Homme : 4 espèces d'EV noté de A à D et 3 rhinovirus noté de A à C ; et des espèces pathogènes pour les animaux : entérovirus bovin A (EV E), entérovirus B porcine (entérovirus G), entérovirus A Simien (entérovirus H). A cette classification s'ajoute deux nouvelles espèces : entérovirus bovin B (entérovirus F) et entérovirus simien non classés (entérovirus J). Le genre *Enterovirus* regroupe plus de 100 sérotypes. Les recombinaisons potentielles intra- et inter-espèces pendant l'évolution et la découverte de nouveaux virus font que la classification des picornavirus est régulièrement reconsidérée (Lauber & Gorbalenya, 2012 ; Adams *et al.*, 2013).

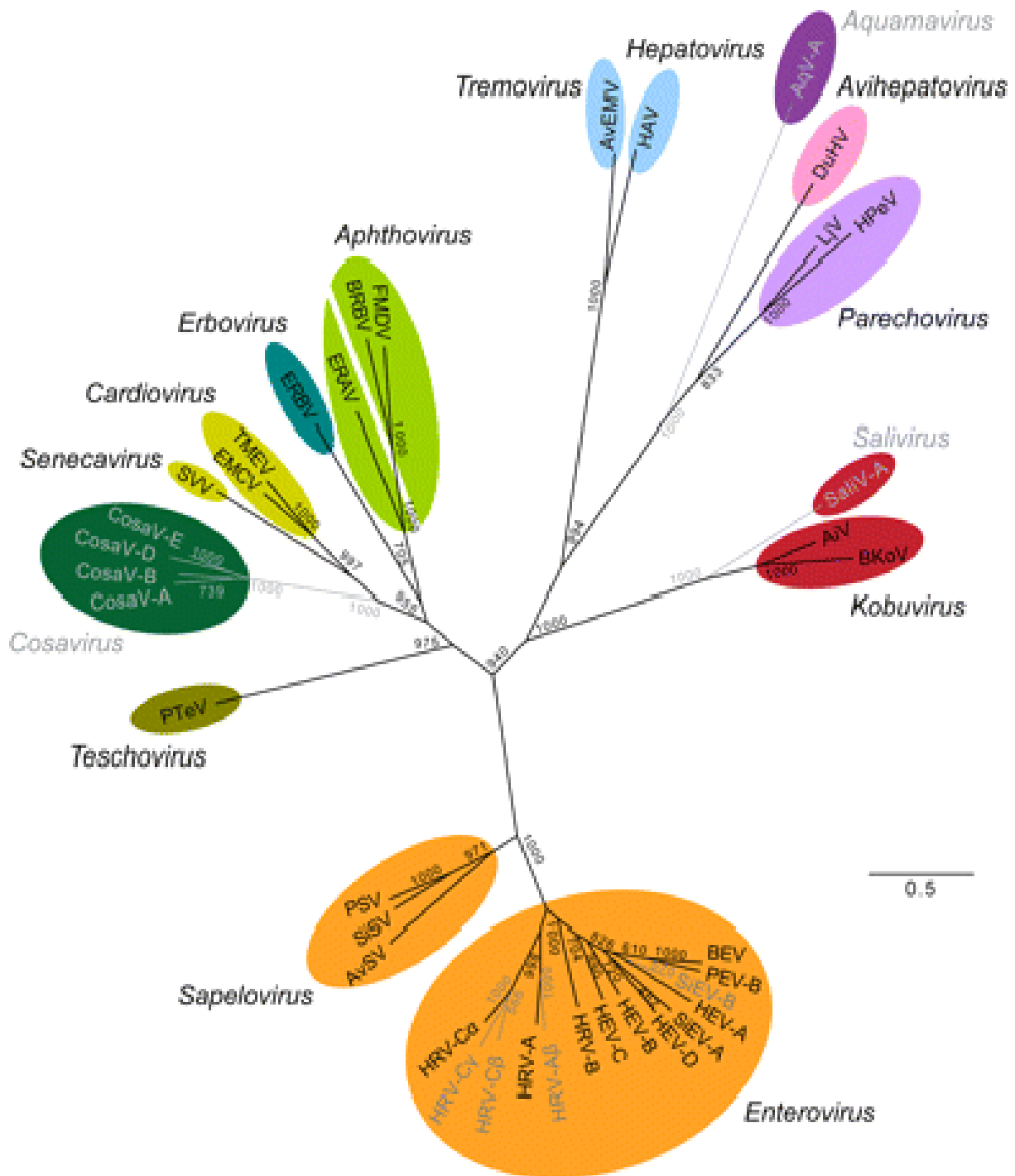


Figure 21 : Phylogénie et classification de la famille des *Picornaviridae* (Lauber & Gorbalenya, 2012).

Tableau 4 : *Picornaviridae* isolés dans l'espèce humaine selon <http://www.picornaviridae.com/> en 2014.

Genre	Espèce	Nombre de sérotypes	Noms et numéros des sérotypes
<i>Enterovirus</i>	<i>Enterovirus A</i>	18	Coxsackievirus (CV-) A2 à A8, A10, A12, A14 et A16 Entérovirus (EV-) A71, A76, A89, A90, A91, A114 et A119
	<i>Enterovirus B</i>	59	Coxsackievirus (CV-) A9, B1-B6 Echovirus (E-) 1 à 7, 9, 11 à 21, 24 à 27 et 29 à 33 Entérovirus (EV-) B69, B73 à B75, B77 à B88, B93, B97, B101, B106, B107, B110 et B111
	<i>Enterovirus C</i>	23	Poliovirus (PV-) 1 à 3 Coxsackievirus (CV-) A1, A11, A13, A17, A19, A20 à A22 et A24 Entérovirus (EV-) C95, C96, C99, C102, C104, C105, C109, C113, C116, C117 et C118
	<i>Enterovirus D</i>	4	EV-D68, EV-D70, EV-D94, EV-D111
	<i>Rhinovirus A</i>	80	Rhinovirus A (RV-A) 1 et 2, 7 à 13, 15 et 16, 18 à 25, 28 à 34, 36, 38 à 41, 43, 45 à 47, 49 à 51, 53 à 68, 71, 73 à 78, 80 à 82, 85, 88 à 90, 94, 96 et 100 à 109
	<i>Rhinovirus B</i>	32	Rhinovirus B (RV-B) 3 à 6, 14, 17, 26, 27, 35, 37, 42, 48, 52, 69, 70, 72, 79, 83, 84, 86, 91 à 93, 97 et 99 à 106
	<i>Rhinovirus C</i>	53	Rhinovirus C (RV-C) 1 à 53
<i>Cardiovirus</i>	<i>Theilovirus</i>	1	Vilyuisk human encephalomyelitis virus (VHEV)
		11	Saffold virus (SAFV) 1 à 11
<i>Hepatovirus</i>	<i>Hepatitis A virus</i>	1	Human hepatitis A virus (HHAV)
<i>Parechovirus</i>	<i>Parechovirus</i>	16	Parechovirus (HPeV) 1 (ex-echovirus 22), 2 (ex-echovirus 23), 3 à 16
	<i>Ljungan virus</i>	1	
<i>Kobuvirus</i>	<i>Aichivirus A</i>	1	Aichi virus (AiV)
<i>Cosavirus</i>	<i>Cosavirus A-D</i>	?	? (HCoSV A à D)

5.2 Relations phylogénétiques entre les entérovirus humains

Au fur et à mesure que les séquences nucléotidiques partielles ou complètes des souches prototypes d'EV sont enregistrées dans les banques de données, il devient possible d'effectuer une analyse génétique de ces virus. L'analyse phylogénétique, basée sur la comparaison des séquences génomiques, permet de déterminer les relations entre les différents sérotypes et ouvre la voie à l'adaptation de la classification virale. En effet, les comparaisons des séquences nucléotidiques soutiennent partiellement la subdivision classique des EV humains en PV, CV-A, CV-B et échovirus et, dans plusieurs cas, les relations génétiques ne sont pas en corrélation avec cette division (Pöyry *et al.*, 1996). Depuis 2012, les 3 espèces de rhinovirus sont rattachées au genre *Enterovirus* (Lauber & Gorbalenya, 2012).

L'analyse phylogénétique basée sur la comparaison des séquences nucléotidiques de la région 5' NC des quatre premières espèces d'EV humains (A, B, C, D) permet de distinguer deux groupes. Les 3 PV, CV-A1-11, 13, 15, 17-22, 24 et EV-70 forment le groupe I (PV-like); les CV-B, le reste des CV-A, tous les échovirus et tous les nouveaux types d'EV humains forment le groupe II (CV-B-like) (Pöyry *et al.*, 1996 ; Oberste *et al.*, 2004a ; Nasri *et al.*, 2007a).

La comparaison des séquences nucléotidiques et en acides aminés de la région codante du génome montre que les EV humains (hors les rhinovirus) se divisent en quatre lignées monophylétiques principales (Pulli *et al.*, 1995 ; Huttunen *et al.*, 1996 ; Pöyry *et al.*, 1996 ; Hyypiä *et al.*, 1997 ; Oberste *et al.*, 2004a ; Nasri *et al.*, 2007a). Les profils phylogénétiques, en particulier ceux basés sur l'analyse de la région P1, confirment la cohérence de certains groupes taxonomiques (PV, CV-B) et montrent la parenté génétique des CV-B et des échovirus (Oberste *et al.*, 2004a). Elles mettent aussi en évidence l'extrême hétérogénéité des CV-A et leur appartenance à des groupes génétiques distincts (Pulli *et al.*, 1995). D'autre part, la comparaison des séquences de chaque protéine individuelle montre les quatre mêmes groupes que ceux observés après analyse de la séquence codant la polyprotéine totale (Pöyry *et al.*, 1996 ; Oberste *et al.*, 1998 ; Oberste *et al.*, 1999 ; Casas *et al.*, 2001 ; Caro *et al.*, 2001 ; Norder *et al.*, 2001 ; Ishiko *et al.*, 2002a ; Nasri *et al.*, 2007b) (**Figure 22**).

L'analyse de la région 3'NC (**Figure 6**) montre les mêmes profils que ceux obtenus par analyse de la région codante (Pöyry *et al.*, 1996 ; Oberste *et al.*, 2004a ; Nasri *et al.*, 2007b).

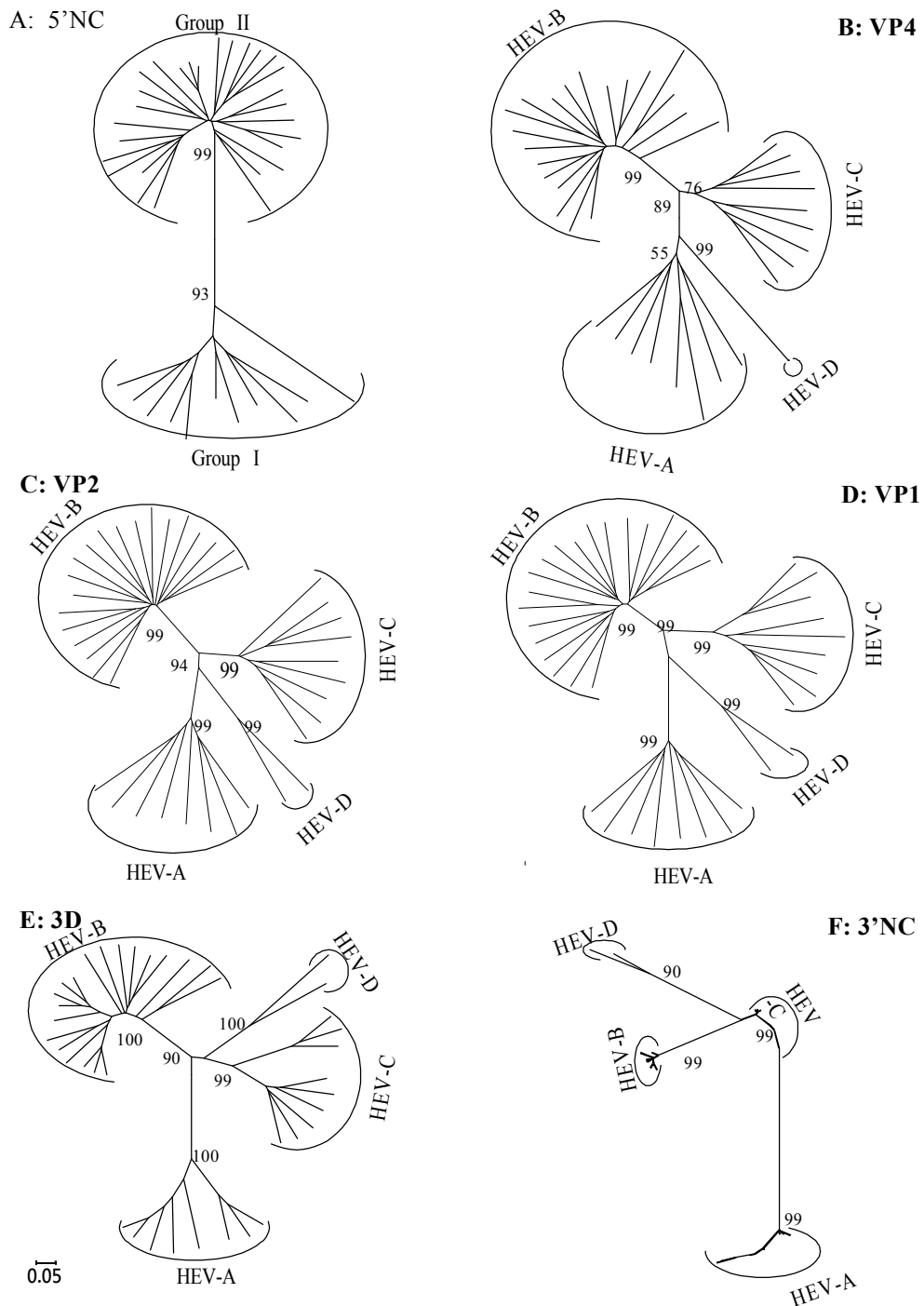


Figure 22 : Arbres phylogénétiques représentant la distribution des souches prototypes appartenant aux 39 principaux sérotypes d'EV humains en utilisant l'alignement de Clustal W et la méthode de « neighbour-joining » dans le logiciel Mega 3. La barre d'échelle représente la distance génétique calculée selon le modèle de Tamura-Nei. Les valeurs de bootstrap correspondant à 1000 répétitions sont présentées à chaque embranchement majeur. Les panneaux correspondent à l'analyse de la région 5' non codante (A), VP4 (B), VP2 (C), VP1 (D), 3D (E) et la région non codante 3' (F). HEV: entérovirus humain; NC: non codant (Nasri *et al.*, 2007b).

En revanche, la distance génétique entre les membres d'une espèce donnée est tellement faible qu'on n'arrive pas à distinguer les différents sérotypes. La principale variation entre les différents groupes est la longueur de cette région : les virus du groupe PV-like présentent la plus courte (69 à 72 nt) alors que ceux du groupe CV-B-like la plus longue (102 à 106 nt), les deux autres présentent une longueur intermédiaire (82 à 86 nt) (Pöyry *et al.*, 1996).

Ces études phylogénétiques montrent que les EV sont probablement dérivés d'un ancêtre commun, la multiplicité des génotypes était en partie le résultat d'une évolution complexe et divergente de ces virus. En raison probablement des contraintes structuro-fonctionnelles, les différentes régions génomiques des EV n'évoluent pas de la même manière et présentent des vitesses d'évolution différentes. La région codant les protéines de capsides évoluerait très rapidement en raison de l'importante pression de sélection de système immunitaire de l'hôte. En revanche, la région 5'NC évoluerait plus lentement que le reste du génome parce qu'elle est contrôlée par son environnement cellulaire.

6 Circulation des sérotypes d'entérovirus

6.1 Génotypes les plus courants

Lorsque l'infection est symptomatique, les manifestations les plus fréquemment diagnostiquées sont cérébro-méningées ; elles sont majoritairement représentées par des méningites ne nécessitant qu'un traitement symptomatique et évoluant rapidement vers la guérison complète sans séquelles. Les infections respiratoires sont associées plus fréquemment aux sérotypes suivants : échovirus 6, 7, 9, 11, 13, 30 ; CV B2, B4 et B5 et EV-A71, mais depuis ces dernières années de nouveaux sérotypes à tropisme respiratoire ont émergé. Il est rapporté que les infections les plus sévères sont dues aux EV-D68 et A71, ainsi qu'aux CVA, B2, B4 et B5.

Dans de très rares cas, on peut observer des encéphalites (une dizaine de cas par an en France), des paralysies et des ataxies. Les EV impliqués de manière prédominante dans les méningites sont des EV dits « neurotropes » comme l'échovirus 30 (E-30), l'E-6, l'E-11, l'E-13, l'E-18 ou le CV-B5, mais de nombreux autres sérotypes peuvent être associés. Les années au cours desquelles l'épidémie est plus marquée, un ou deux sérotypes majoritaires, c'est-à-dire représentant plus de 60 % des sérotypes

identifiés, sont détectés. A l'inverse, les années au cours desquelles l'épidémie est moins marquée, il circule plusieurs sérotypes représentant chacun moins de 30 % des sérotypes identifiés.

Les autres symptomatologies comprennent essentiellement le syndrome pied-main-bouche (HFMD) (surtout associé au CV-A16 et à l'EV-A71 mais aussi aux CV-A6 et CV-A10), des syndromes respiratoires le plus souvent peu sévères (surtout associés à l'EV-D68 et aux CV A et B2-B5) et des atteintes cardiaques (myocardites et péricardites aiguës, impliquant surtout des CV-B). Les EV les plus souvent rencontrés en pathologie néo-natale sont l'E-11 qui représente la moitié des cas publiés, et les CV-B (sauf le type 6) qui sont en cause dans un tiers des cas.

L'E-6 est un des nombreux sérotypes de l'espèce B des EV. Neurotrophe et épidémiogène, il est fréquemment impliqué dans des épidémies estivales de méningites aseptiques survenant principalement chez l'enfant de moins de 1 à 4 ans (Carolane *et al.*, 1985 ; Boyd *et al.*, 1987 ; Antona *et al.*, 2007 ; Lee *et al.*, 2010 ; Trallero *et al.*, 2010) et chez les nouveau-nés chez qui il peut être associé à des complications à type de pneumonie.

L'E-7 représente entre 4 et 8% des cas d'infections de tous types à EV. Il a été isolé dans 7 à 9% des seuls cas d'infections des voies respiratoires associées aux EV en France entre 1999 et 2005 (Antona *et al.*, 2007; Jacques *et al.*, 2008). Soixante pour cent des infections respiratoires à E-7 surviennent chez les enfants de moins d'un an (Khetsuriani *et al.*, 2006a ; Antona *et al.*, 2007 ; Jacques *et al.*, 2008). La circulation des E-7 présente un caractère épidémique cyclique, avec des intervalles irréguliers entre les périodes de forte et de faible activité. Cependant, les épidémies associées à E-7 sont rares avec des pics survenant plutôt en période de faible circulation endémique (Khetsuriani *et al.*, 2006a ; Trallero *et al.*, 2010). Une épidémie nosocomiale a été rapportée dans une unité de soins intensifs de néonatalogie (Wilson *et al.*, 1989).

Les E-9 ont souvent été associés à des épidémies d'infections communautaires (Ashwell *et al.*, 1996). Leur prévalence dans les infections respiratoires est estimée à 5% ; celles-ci surviendraient préférentiellement dans la tranche d'âge de moins de 1 an (Antona *et al.*, 2007 ; Khetsuriani *et al.*, 2006b). L'E-9 a un schéma de circulation épidémique avec une forte augmentation du taux de détection tous les 3 à 5 ans. L'infection à E-9 s'est parfois révélée fatale. Dans une série de cas d'infections communautaires pédiatriques à E-9, 4,5 % des enfants de moins de 1 mois hospitalisés en réanimation néonatalogique avaient développé des infections néonatales fatales dont certaines étaient multiviscérales et/ou respiratoires (Cheeseman *et al.*, 1977 ; Khetsuriani *et al.*, 2006a).

L'E-11 représente le génotype le plus fréquemment détecté chez les nourrissons âgés de moins de 1 an dans le monde. Ce virus a un schéma de circulation épidémique avec des pics survenant à intervalles irréguliers. Il est responsable de 7,6 à 18% des cas d'infections respiratoires et touche plus particulièrement les enfants de moins de 1 an (Antona *et al.*, 2007 ; Jacques *et al.*, 2008).

L'E-13 a un profil de circulation atypique. En effet, entre 1970 et 2000, il n'a été isolé que dans 0,5% des cas d'infections à EV. En 2000-2001, il a provoqué une importante épidémie de méningites à liquide clair à travers le monde. En France, il a concerné 420 cas en 2000, soit 32% de l'ensemble des EV isolés cette année-là. Depuis, le nombre de cas détectés a très nettement diminué (Antona *et al.*, 2007 ; Jacques *et al.*, 2008). Cependant ce virus est toujours en circulation et pourrait être responsable d'infections des voies respiratoires chez les enfants âgés de 5 à 14 ans en France et aux Etats-Unis (Kobayashi *et al.*, 2005 ; Antona *et al.*, 2007 ; Jacques *et al.*, 2008). Il a émergé au cours d'une épidémie mondiale en 2001. Avant 2000, il n'avait été associé à des épidémies que de façon sporadique. Aux Etats-Unis, il a représenté 24 % de tous les EV isolés en 2001, par rapport à 1,6 % en 2000 (Mullins *et al.*, 2004). Au Japon, 65 souches d'E-13 ont été isolées en 2001 et 2002, alors qu'il n'en avait été détecté qu'une seule auparavant. (Mizuta *et al.*, 2003). En Espagne, 135 isolats d'E13 ont été identifiés à partir des années 2000 (Avellón *et al.*, 2003). Il a été responsable d'une épidémie de méningite aseptique en France en 2006 (Mirand *et al.*, 2008b).

L'E-30 est souvent à l'origine d'épidémies de méningites aseptiques : en Belgique en 2000, à Taiwan et au Brésil en 2001, en France en 2005, en Espagne en 2006 et au Japon en 2007 (Wang *et al.*, 2002 ; Thoelen *et al.*, 2003a ; Kobayashi *et al.*, 2005 ; Dos Santos *et al.*, 2006 ; Akiyoshi *et al.*, 2007 ; Cabrerizo *et al.*, 2008 ; Mirand *et al.*, 2008b). Les E-30 sont retrouvés à l'échelle planétaire (Khetsuriani *et al.*, 2006b ; Trallero *et al.*, 2010). Ils ont été souvent isolés à partir de cas de méningite à liquide clair, mais ils seraient également responsable de 1 à 2% des cas de pathologies respiratoires en France et aux Etats-Unis (Khetsuriani *et al.*, 2006b ; Antona *et al.*, 2007 ; Jacques *et al.*, 2008 ; Trallero *et al.*, 2010). Ce sérotype infecte plutôt les enfants de plus de 1 an ainsi que les sujets de plus de 15 ans (Khetsuriani *et al.*, 2006b).

Le CV-B2 représente entre 6 et 7% des cas de pathologies respiratoires. Il circule de façon endémique avec chaque année un taux d'isolement assez variable. Il est, après l'E-11, l'EV le plus souvent identifié chez les enfants de moins de 1 an (Khetsuriani *et al.*, 2006b ; Antona *et al.*, 2007 ; Jacques *et al.*, 2008).

Le CV-B4 généralement circule de façon endémique et est très fréquemment isolé dans les cas d'infections des voies respiratoires (5 à 7%). Il est détecté surtout chez les jeunes enfants où il provoque plus fréquemment que les autres sérotypes des complications (Ray *et al.*, 1967 ; Porres *et al.*, 1985).

Le CV-B5 peut induire des pathologies cliniques similaires à celles observées avec les autres CV-B. Ce sérotype est connu pour causer des pics épidémiques d'une durée de 1 an tous les 3 à 6 ans (Khetsuriani *et al.*, 2006b). Sa prévalence dans les infections des voies respiratoires varie de 1 à 2 % chez les enfants de moins de 4 ans (Antona *et al.*, 2007; Jacques *et al.*, 2008).

En 2008, en Finlande, une épidémie atypique de HFMD (317 cas) a été signalée dans une population adulte. Les principaux sérotypes pathogènes détectés étaient CV-A6 et CV-A10 (Blomqvist *et al.*, 2010). Le CV-A6 a préalablement été associé à une épidémie d'herpangine et de HFMD à Taiwan (Lo *et al.*, 2011). Ces sérotypes sont considérées comme rares et circulent de façon endémique.

L'EV-A71 est également apparu comme une menace importante de santé publique au cours de deux dernières décennies. Outre des épidémies de syndrome main-pied-bouche (HFMD) (**Figure 17**) de grande envergure, ce sérotype continue d'être responsable de cas sévères et parfois mortels d'encéphalites, de syndromes neuro-respiratoires, de myocardites ou de paralysies flasques, en Asie (Chine, Viêt-Nam, Cambodge, Thaïlande, Philippines ...) et en Océanie (Australie, Nouvelle-Zélande) (Lv *et al.*, 2013). A Taiwan, en 1998, 129106 cas de HFMD ou herpangine ont été signalés, dont 405 cas de maladies neurologiques et 78 décès (Ho *et al.*, 1999). D'autres épidémies présentant des complications neurologiques ou des cas mortels ont été décrits à Singapour en 1997, dans l'ouest de l'Australie en 1999, au Japon en 2006 et en Chine en 2008 (McMinn *et al.*, 2001 ; Chan *et al.*, 2003 ; Hamaguchi *et al.*, 2008 ; Sun *et al.*, 2011). Aucune activité épidémique d'EV-A71 n'a été rapportée en Europe depuis les années 1970 mais des cas sporadiques ont été signalés en France, en Allemagne et aux Pays-Bas (Chumakov *et al.*, 1979 ; Chonmaitree *et al.*, 1981 ; Diedrich *et al.*, 2009 ; van der Sanden *et al.*, 2009 ; Schuffenecker *et al.*, 2011). Sous l'angle clinique, l'infection est généralement asymptomatique ou associée à une maladie non spécifique. Des affections plus graves peuvent survenir, particulièrement chez les jeunes enfants, à savoir : exanthème (y compris HFMD), herpangine, conjonctivite, encéphalite, méningite lymphocytaire bénigne, paralysie flasque aiguë, troubles respiratoires aigus et myopéricardite. Il importe de noter que l'infection à EV-A71 peut entraîner des complications même en l'absence de signes cliniques de HFMD. L'EV-A71 est transmis par contact direct avec les sécrétions du nez ou de la gorge, la salive, le liquide provenant de vésicules ou les selles d'une personne infectée. L'infection est particulièrement contagieuse durant la première semaine de

maladie aiguë, mais le virus peut être éliminé dans les selles pendant des semaines. Il n'existe aucun antiviral contre l'infection à EV-A71 mais de recherche intense notamment dans les pays du Sud Est asiatique. Le traitement curatif est centré sur la prise en charge des complications. L'administration intraveineuse d'immunoglobulines peut s'avérer utile pour prévenir des affections graves chez les patients atteints d'un déficit immunitaire ou fragiles. Très récemment, un vaccin vient d'être expérimenté avec succès en Chine (Li et al., 2014 ; Zhu *et al.*, 2014). Jusqu'en 2008, aucune grande épidémie d'EV-A71 n'a été rapportée en Chine continentale, mais des infections sporadiques étaient communes dans le secteur côtier du sud-est de même que dans les régions intérieures, comme Pékin, Chongqing et Jinan. De 1998 à 2004, le seul virus EV-A71 identifié en Chine continentale appartenait au génotype C4, indiquant un bien moindre variété en Chine qu'à Taïwan (Li *et al.*, 2005). Le génotype C4 a été à l'origine du décès d'une soixantaine d'enfants de moins de 3 ans au Cambodge d'avril à juillet 2012. La sévérité de ces infections dans cette région du monde reste en grande partie inexplicée (Nix, 2013 ; Zhu *et al.*, 2013).

6.2 Nouveaux génotypes

Ces dernières années, de nouveaux génotypes ont émergé ou ré-émergé ; ils ont été responsables de pathologies respiratoires aiguës chez l'enfant et chez l'adulte. Il s'agit notamment du CV-A21 et des EV-C104, -C109 et -D68.

Le CV-A21 est un génotype rare mais détectés le plus souvent dans des infections aiguës des voies respiratoires chez l'adulte (Magee & Miller, 1970 ; Schiff & Sherwood, 2000 Xiang *et al.*, 2012).

L'EV-C104 a été découvert en Suisse en 2009 dans une cohorte de patients incluant des enfants atteints d'infections respiratoires de type pneumonie (Tapparel *et al.*, 2009). Ce sérotype a également été isolé en Italie au cours de la surveillance épidémiologique des patients atteints de syndromes respiratoires et représente moins de 1% des prélèvements positifs à au moins un virus respiratoire (Piralla *et al.*, 2010, 2012; Tokarz *et al.*, 2012). En 2012, Kaida et al. ont montré que l'EV-C104 pouvait infecter aussi les adultes et était retrouvé dans les voies respiratoires hautes des sujets infectés (Kaida *et al.*, 2012). Ce virus pourrait préférentiellement infecter les sujets immunodéprimés comme les enfants greffés de moelle allogénique (Tapparel *et al.*, 2009).

Au cours de ces mêmes années, l'EV-C109 a été isolé au Nigeria chez des enfants hospitalisés pour troubles respiratoires aigus. Par la suite, deux autres études, la première en Hongrie et la seconde au Pérou, ont détecté ce génotype rare et montré sa circulation à l'échelle mondiale (Yozwiak *et al.*, 2010 ; Pankovics *et al.*, 2012 ; Tokarz *et al.*, 2012).

Depuis sa découverte en 1962 en Californie à partir de prélèvements respiratoires obtenus d'enfants atteints de bronchiolite ou de pneumonie, peu d'infections à EV-D68 ont été rapportées (Schieble *et al.*, 1967). Toutefois, au cours des dernières années, une augmentation de cas graves d'infections des voies respiratoires associées à EV-D68 a été signalée au Japon, aux Philippines, en Europe et aux Etats-Unis (Smyth & Openshaw, 2006 ; Imamura *et al.*, 2011 ; Rahamat-Langendoen *et al.*, 2011 ; Ikeda *et al.*, 2012 ; Jacobson *et al.*, 2012 ; Lauinger *et al.*, 2012 ; Linsuwanon *et al.*, 2012 ; Meijer *et al.*, 2012 ; Piralla *et al.*, 2012 ; Xiang *et al.*, 2012). A ce jour l'EV68 est considéré comme un agent pathogène émergent des voies respiratoires (Tokarz *et al.*, 2012). Mais la difficulté de détection de ce génotype est responsable d'une sous-estimation de sa prévalence et de son rôle dans les pathologies respiratoires aiguës en pédiatrie.

7 Variabilité génétique des entérovirus

La variabilité du génome des EV est une propriété fondamentale à la base de la diversité de ce genre viral, de son évolution, de sa pathogénicité et de ses caractéristiques épidémiologiques. La variabilité génétique des EV est due essentiellement à deux facteurs : les mutations ponctuelles dues aux erreurs commises lors de la réplication du génome viral par leur propre ARN polymérase et les recombinaisons génétiques qui font suite à un échange d'éléments génétiques entre deux virus durant leur réplication à l'intérieur d'une même cellule (Boslama *et al.*, 2007; Rakoto-Andrianarivelo *et al.*, 2008).

Une contribution récente de l'épidémiologie moléculaire des EV concerne l'exploration de la diversité génétique des sérotypes, la description des modes de circulation et la transmission des virus variants à l'origine d'épidémies. La prise en compte des caractéristiques épidémiologiques comme l'importation fréquente de souches d'origines géographiques différentes plaide en faveur d'une généralisation du génotypage des EV. Le génotypage permet aussi l'identification des souches recombinantes. La variation par recombinaison génétique homologue est essentielle au maintien de la diversité des EV. La fréquence des signatures moléculaires d'événements de recombinaison chez les souches circulantes suggère des co-infections nombreuses pendant leur circulation dans la population générale.

L'implication exacte de la recombinaison dans l'émergence des virus variants et l'épidémiologie des EV reste à explorer.

7.1 Les mutations ponctuelles

Les EV présentent un taux très élevé d'erreur lors de la réplication. Comme tous les virus à ARN, les EV possèdent leur propre ARN polymérase (protéine 3D^{pol}) dont l'unité codante est à l'extrémité 3' du génome. Le taux d'erreurs commises par celle-ci est de l'ordre de 10^{-3} à 10^{-4} substitution par site nucléotidique (Domingo, 1994). Aucune activité correctrice n'est associée au complexe de réplication. Ainsi, les EV existent sous forme de populations complexes de variants génétiques (Holland *et al.*, 1992). Le taux de mutation est si élevé que la présence d'un agent mutagène ne l'augmente que de très peu ($\sim 2,5$ fois) sous peine d'altérer la capacité répliquative du virus (Holland *et al.*, 1990). Ces mutations sont sélectionnées notamment par la pression de sélection du système immunitaire au niveau des protéines de capsid (Figure 23). L'accumulation des mutations est le premier élément pouvant expliquer la multiplicité des sérotypes d'une part, la multiplicité des variants à l'intérieur d'un même sérotype d'autre part. La dérive génétique qu'entraînent ces mutations s'observe aussi bien en comparant les séquences génomiques des isolats au cours du temps, qu'au décours d'une épidémie, ou enfin lors de l'excrétion chronique des souches chez un même malade. La part génétique qu'entraînent ces variations par mutation s'observe aussi bien en comparant les séquences génomiques des isolats au cours du temps qu'au cours d'une épidémie ou lors de l'excrétion chronique d'une souche chez un malade. En revanche, il a été montré que les EV présentent une relative stabilité en termes d'acides aminés, contrastant avec la forte variabilité nucléotidique. Cela s'explique par le fait que la plupart des mutations sont silencieuses, ne s'exprimant pas au niveau protéique. Toutefois, l'implication de ces mutations dans l'apparition du phénotype virulent est bien illustrée dans l'exemple des PV vaccinaux (VPO) qui, au cours de leur multiplication dans l'intestin, évoluent rapidement par mutations ponctuelles. Ces modifications peuvent affecter les déterminants génétiques de l'atténuation et être ainsi à l'origine de rares cas de PPAV (Holland & Domingo, 1998). Le rôle de ces mutations dans l'apparition du phénotype virulent des autres souches d'EV n'est pas encore bien élucidé.

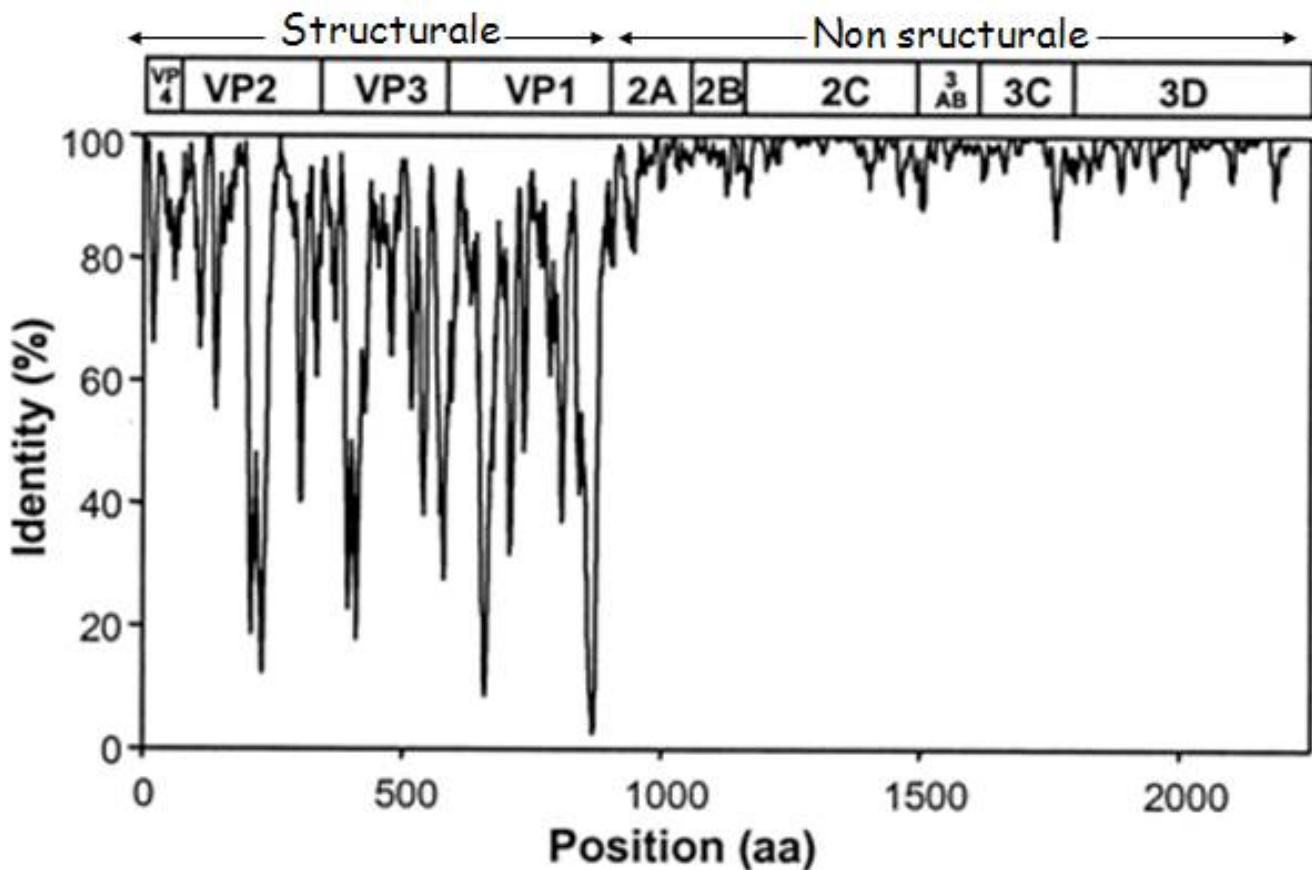


Figure 23 : Variabilité génétique au sein de l'espèce HEV-B par des études de similarité de leur polyprotéine (Oberste *et al.*, 2004b).

7.2 Les recombinaisons génétiques

La recombinaison génétique est également une des propriétés fondamentales de l'évolution des virus à ARN non segmenté. Elle participe à l'évolution naturelle des PV en particulier et des EV en général. Ce mécanisme de diversité génétique consiste en un échange de matériel génétique entre deux souches distinctes infectant une même cellule cible et pouvant aboutir à l'apparition d'un virus « mosaïque ». La recombinaison homologue implique l'échange d'éléments génétiques entre les deux génomes d'EV lors de la réplication dans une même cellule (Lukashev *et al.*, 2003; Lukashev, 2005). Le mécanisme est

communément considéré comme de type “ choix-copie ” (Kirkegaard & Baltimore, 1986). Le changement de brin est tel qu’il n’y a pas d’insertion ou de délétion au niveau du site de coupure. La recombinaison peut se produire dans tout le génome et peut donner lieu à des recombinants présentant des propriétés modifiées. La recombinaison viable a été observée principalement dans la région non structurale et strictement au sein d’une espèce, ce qui fait de la recombinaison naturelle un critère fiable de l’espèce (Oberste *et al.*, 2004b ; Lukashev *et al.*, 2005 ; Simmonds & Welch, 2006). Aucun motif de séquence consensus pour les sites de recombinaison n’a été déterminé. Il a été suggéré que la complexe polymérase est l’objet d’une pause prématurée pendant la transcription de brin négatif, en raison de la stabilité des éléments de structure secondaire.

7.2.1 Recombinaison chez les poliovirus

La recombinaison chez les PV, déjà observée *in vitro* dans les années 60 (Hirst, 1962), a ensuite été étudiée pour des souches isolées de personnes vaccinées à partir des souches de poliomyélite paralytique associée à la vaccination (PPAV) ou encore de l’environnement.

L’évolution par recombinaison donne naissance à des virus hybrides dont le génome est constitué en partie par celui de la souche vaccinale d’origine tandis que l’autre partie dérive d’une souche de sérotype différent, qu’il s’agisse d’un autre PV vaccinal, d’un PV sauvage ou encore d’un EV non poliomyélitique de la même espèce (HEV-C) (Cuervo *et al.*, 2001 ; Dahourou *et al.*, 2002 ; Savolainen-Kopra & Blomqvist, 2010).

Ce phénomène est extrêmement fréquent puisque, dans la littérature internationale, la proportion de souches recombinantes parmi celles isolées chez des vaccinés sains ou des individus atteints de PPAV est de 20 à 50%. Des récents travaux ont mis en évidence qu’une mutation G64S au niveau de la protéine 3D^{pol} (changement d’une glycine en sérine au niveau de l’acide aminé 64 de 3D^{pol}) du PV augmentait la fidélité de cette polymérase, générant ainsi moins de diversité virale. Cette baisse de diversité engendrerait une perte du neurotropisme et un phénotype atténué de PV chez la souris Tg-CD155 infectée (Blondel *et al.*, 2008).

Les échanges génétiques constituent un mode d’évolution privilégié du PV. La recombinaison génétique entre les PV du VPO apparaît favorisée par la multiplication simultanée des trois souches de sérotypes différents de VPO chez les vaccinés (Minor *et al.*, 1986 ; Cammack *et al.*, 1988). En effet, l’analyse comparative de souches issues de vaccinés sains et de patients atteints de PPAV montre une proportion

considérable de génomes recombinants (Furione *et al.*, 1993 ; Ion-Nedelcu *et al.*, 1997). Ainsi, plus de 50 % des souches vaccinales apparaissent sous forme de recombinants inter-typiques. La caractérisation des génomes issus de ces recombinaisons révèle l'existence d'associations génomiques et de régions de recombinaison préférentielles. De plus, les sites de recombinaison sont localisés préférentiellement dans les zones du génome codant les protéines non structurales. Cela suggère que des facteurs agissant au cours de la réplication et, probablement aussi, de la sélection chez l'hôte, déterminent les caractéristiques des génomes recombinants. La recombinaison entre PV vaccinal et souches sauvages a également été mise en évidence (Lipskaya *et al.*, 1991 ; Furione *et al.*, 1993 ; Georgescu *et al.*, 1995 ; Li *et al.*, 1996 ; Guillot *et al.*, 2000 ; Dahourou *et al.*, 2002) ; elle contribue à la dérive génétique des souches vaccinales et participe au moins dans certains cas à la réversion des souches vaccinales vers un phénotype pathogène responsables de PPAV. De plus, l'émergence de souches de PV pathogènes impliquées dans des épidémies de PPVA a été associée à des échanges interspécifiques entre souches vaccinales de PV et certains CV A de l'espèce C des EV humains (Rousset *et al.*, 2003). Ces différents échanges génétiques contribuent donc à la diversité phénotypique et éventuellement à la pathogénicité des PV.

7.2.2 Recombinaison chez les entérovirus non polio

L'existence de la recombinaison chez les virus à ARN positif est désormais bien établie (Lai, 1992). La première publication évoquant le rôle important de la recombinaison dans l'évolution des EV non poliomyélitiques date de 1999 (Santti *et al.*, 1999). Par analyse des séquences génomiques de certains EV, il a été montré le rôle de la recombinaison dans l'évolution du genre *Enterovirus*. Ces auteurs suggèrent un événement de recombinaison dans la région 5'NC qui pourrait expliquer le fait que les EV se répartissent seulement en deux groupes phylogénétiques dans cette partie de génome (**Figure 24**). L'analyse phylogénétique de la région 5'NC montre la répartition des 4 espèces d'EV en deux groupes, le groupe I qui comprend les espèces C et D et le groupe II que comprend les espèces A et B (Pöyry *et al.*, 1996). Il a été proposé que les quatre lignées génétiques d'origines distinctes aient évolué par mutations ponctuelles à partir d'un ancêtre commun. Au cours de l'évolution, un virus appartenant à l'espèce HEV-A aurait remplacé son extrémité 5'NC d'origine par celle d'un virus de l'espèce HEV-B lors d'un événement de recombinaison ou inversement (Santti *et al.*, 1999 ; Lindberg *et al.*, 2003). Tous les segments génomiques peuvent être impliqués dans la recombinaison, avec des zones privilégiées dans les régions non structurales 2A-2C. L'analyse de la fréquence de deux marqueurs génétiques du PV

montre que des échanges génomiques par recombinaison homologue ont lieu *in vitro* pendant la synthèse du brin d'ARN négatif (Jarvis & Kirkegaard, 1992). L'isolement de PV recombinants chez des sujets ayant reçu le vaccin triple oral en est une autre illustration. L'analyse du génome du CV-A21 montre une similitude de séquence avec les PV (Hughes *et al.*, 1989), qui est particulièrement élevée pour les 2000 nucléotides de l'extrémité 3'. Pour le CV-B5, il existe une similitude de séquence avec le SVDV (*swine vesicular disease virus*), plus marquée en 5' dans la région P1 codant les protéines structurales que dans la partie 3' (Knowles & McCauley, 1997).

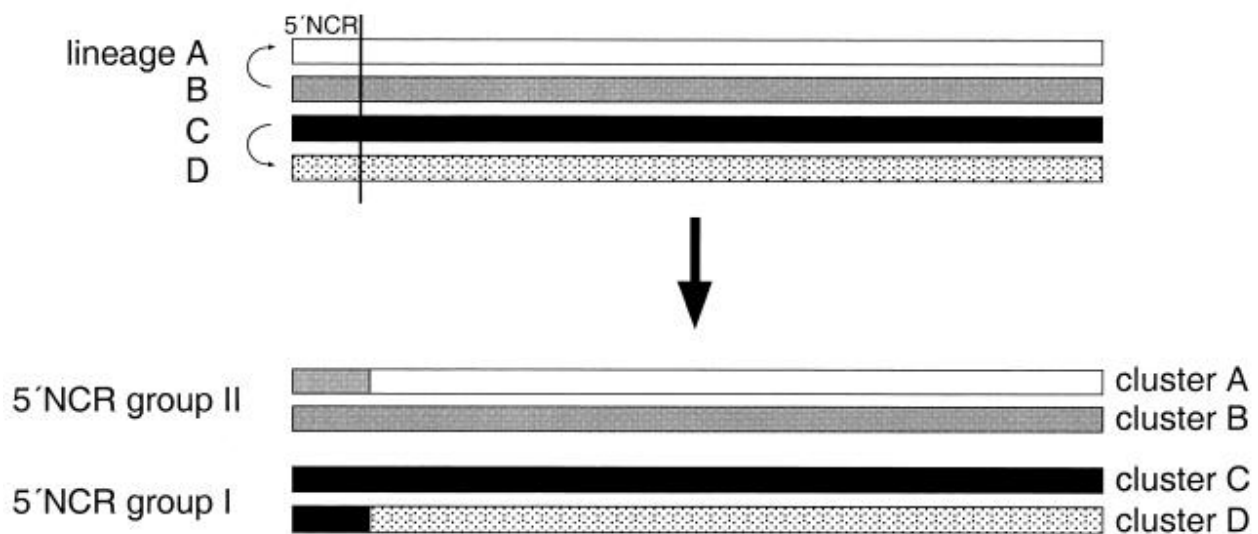


Figure 24 : Représentation schématique des événements possibles de recombinaison entre la région 5'NC et le reste du génome durant l'évolution des entérovirus qui pourraient expliquer l'existence seulement de deux groupes phylogénétiques, par analyse de la région 5'NC. Au cours de l'évolution, la lignée A aurait acquis la région 5'NC de la lignée B par un mécanisme de recombinaison (ou alternativement). Un événement identique se serait produit entre les lignées C et D (Santi *et al.*, 1999).

D'après une étude exhaustive réalisée en 2005 sur de multiples souches d'échovirus, Lukashev *et al.* (Lukashev *et al.*, 2005) ont montré que la recombinaison se situe essentiellement au niveau des régions génomiques qui codent les protéines non structurales 2ABC mais aussi au niveau de la protéine structurale VP4. En ce qui concerne les autres EV, la plupart des sites de recombinaison génétique ont également été localisés dans les régions non codantes du génome viral ou les régions qui codent les protéines non structurales. Du fait d'une forte divergence nucléotidique entre les séquences de sérotypes

différents et de son rôle primordial dans l'interaction virus-cellule et dans l'antigénicité, la région codant les protéines structurales VP2/VP3/VP1 semblait encore récemment ne pas pouvoir être un site de recombinaison. Cependant, une étude récente de notre groupe a mis en évidence l'existence de rares événements de recombinaison intertypique dans cette région entre différents sérotypes au sein de l'espèce HEV-B. (Bousslama *et al.*, 2007). Cette étude a mis en évidence une recombinaison intertypique entre une souche de CV-B3 et une autre de CV-B4 au niveau de la région codant la protéine VP3. De manière particulièrement intéressante, cette dernière étude met en évidence que la recombinaison génétique pourrait influencer les propriétés antigéniques de la particule virale. Ce phénomène de recombinaison au sein de P1 semble cependant peu fréquent, probablement en raison des contraintes exposées ci-dessus.

De nombreuses études réalisées ces dernières années montrent que le phénomène de recombinaison est ubiquitaire chez les EV humains et plus largement chez les *Picornaviridae*. Chaque espèce pourrait être représentée par des gènes de capsid spécifiques de type et un pool de séquences génomiques non structurales, soumises à un extraordinaire brassage par des recombinaisons intra- et inter-typiques. Au total, la recombinaison génétique assure le maintien de la diversité des EV et peut donner naissance à des variants aux caractéristiques nouvelles imprévisibles. Dans le même temps, elle préserve l'intégrité de l'espèce en maintenant une séquence consensus globale (Lukashev, 2010).

Si l'introduction de mutations ponctuelles et l'échange de segments génomiques par recombinaison sont deux éléments majeurs de la variation, la duplication de segments génomiques pourrait aussi être une source de diversité génétique.

7.2.3 Bases épidémiologiques de la variabilité des entérovirus

Ubiquitaires, les EV circulent abondamment dans les collectivités humaines et animales. Ils se multiplient au niveau pharyngé et digestif et se retrouvent dans les selles. Leur transmission se fait donc essentiellement par voie fécale-orale de façon directe ou indirecte, plus accessoirement par voie aérienne. Plusieurs phénomènes se conjuguent pour créer les conditions favorables soit à la survenue d'épidémies estivo-automnales dans les pays tempérés, soit au maintien d'infections endémiques dans les pays tropicaux et subtropicaux. Dans l'un comme dans l'autre cas, plusieurs sérotypes différents circulent, voire se remplacent au cours du temps pour ré-émerger de façon régulière en fonction du degré d'immunisation des populations (Melnick, 1996b).

Le premier phénomène est la résistance des EV dans le milieu extérieur, plusieurs jours à température ambiante, plusieurs années à 20°C. Ils se retrouvent dans les eaux usées des stations d'épuration où ils sont un bon témoin de la pollution virale des eaux (Nicand *et al.*, 1998). Leur isolement peut même avoir une valeur prédictive pour la survenue des épidémies saisonnières (Peigue-Lafeuille *et al.*, 1985). On les retrouve aussi dans les eaux douces naturelles, voire parfois dans l'eau de boisson si la chloration est insuffisante ou en cas de rupture de canalisation des circuits d'eau potable (Hurst, 1991). Ils peuvent être à l'origine d'infections nosocomiales (Dowsett, 1988 ; Breuer & Jeffries, 1990) si la désinfection des surfaces et de l'instrumentation ne fait pas appel à des produits virucides et si les précautions standard d'hygiène (lavage des mains notamment) sont défailantes.

Le deuxième phénomène est le titre élevé du virus dans les selles des sujets infectés, malades ou asymptomatiques compris entre 2,0 et 5,5 log₁₀ DICT 50 (dose infectieuse sur culture de tissu) (Melnick & Rennick, 1980) par gramme de selles.

Le troisième phénomène est la durée d'excrétion des EV chez le sujet infecté qui peut atteindre six semaines chez le sujet immunocompétent (Melnick & Rennick, 1980). Chez les immunodéprimés, surtout agammaglobulinémiques, la période d'excrétion peut se prolonger jusqu'à 6 ans et demi pour les EV non poliomyélitiques (McKinney *et al.*, 1987). Le même phénomène est connu pour les PV et peut même atteindre le record de presque 10 ans (Kew *et al.*, 1998). Le portage d'EV est donc fréquent dans la population générale. Il peut atteindre 9 % pour une population d'enfants admis à l'hôpital (Peigue-Lafeuille *et al.*, 1989). Durant les épidémies, 3 % des femmes enceintes à terme peuvent excréter un EV (Modlin, 1996). Ainsi, la réplication active et prolongée *in vivo*, la charge virale élevée et la présence simultanée de plusieurs sérotypes sont des facteurs épidémiologiques importants favorisant la variabilité des EV.

8 Diagnostic virologique d'une infection à entérovirus

La symptomatologie d'une infection à EV ne présente aucun signe clinique caractéristique. C'est pourquoi le diagnostic virologique reste primordial et permet de déterminer le rôle des EV dans l'étiologie du syndrome clinique observé. Comme pour la plupart des virus, le diagnostic virologique est basé sur la mise en évidence de l'un des constituants de la structure du virus (diagnostic virologique direct) ou sur la mise en évidence de la réponse du système immunitaire de l'hôte vis-à-vis de l'infection

virale (diagnostic virologique indirect). En raison de la diversité antigénique des EV et de la possibilité de réactions croisées, le diagnostic indirect a un intérêt limité dans le cas des infections à EV. En revanche, une meilleure connaissance de la structure du génome des EV a permis le développement des techniques directes par détection du génome viral. L'introduction des techniques moléculaires, plus sensibles, plus spécifiques et plus rapides dans le diagnostic des EV a constitué un progrès considérable tant dans les pathologies aiguës que dans les infections chroniques liées à ces agents.

8.1 Prélèvements et conservation des échantillons

Les EV peuvent être isolés à partir de prélèvements pathologiques (liquide céphalo-rachidien (LCR), selles, sécrétions rhino-pharyngées, sang périphérique, biopsies...) ou des prélèvements environnementaux (eaux, boues, coquillages...). Pour les infections des voies respiratoires supérieures, les prélèvements de gorge et de nez sont les plus utiles. Le lavage nasal et l'aspiration naso-pharyngée sont des prélèvements pouvant contenir les plus hauts titres de virus et peuvent fournir un grand nombre de cellules, notamment pour les techniques d'immunofluorescence. Les écouvillons naso-pharyngés sont plus faciles à obtenir et peuvent également être utilisés pour la culture (Storch, 1999). Le rendement des cultures virales peut être optimisé en combinant un frottis de gorge à un prélèvement naso-pharyngé dans le même tube de transport. Au laboratoire les échantillons biologiques destinés à la biologie moléculaire doivent être conservés à -70°C pour préserver l'intégrité du génome. Les autres prélèvements peuvent être conservés à -20°C .

8.2 Diagnostic virologique direct

8.2.1 Isolement par culture cellulaire

La culture cellulaire permet l'isolement de la souche virale à partir d'une variété d'échantillons cliniques tels que le LCR, les selles et le pharynx. Avant l'arrivée des outils de diagnostic moléculaire, la technique de référence pour la détection des EV au laboratoire était l'isolement du virus en culture cellulaire. La mise en évidence d'un EV en culture cellulaire se fait par l'observation de la survenue d'un ECP caractéristique de l'infection à EV qui est facilement observable par microscopie optique, à partir de cellules arrondies qui se détachent de la boîte de culture et finissent par subir la lyse.

La technique de culture cellulaire est relativement lente, nécessitant au moins 3 à 6 jours pour voir apparaître un ECP. La culture cellulaire est également limitée par les faibles titres viraux dans certains types d'échantillons tels que le LCR et par la difficulté d'isoler certains sérotypes qui poussent mal ou pas du tout dans les cultures cellulaires. Ainsi, CV-A1, CV-A19 et CV-A22 n'ont jamais pu être cultivés *in vitro*, mais exigent l'inoculation à des souriceaux nouveaux-nés (Lipson *et al.*, 1988).

Malgré l'utilisation de systèmes de culture en format microplaques ou en cupules, cette technique reste très lourde, avec des résultats souvent tardifs (apparition d'un ECP sur culture cellulaire 2 à 12 jours après l'inoculation). Du fait de l'existence de quatre espèces d'EV (hors rhinovirus) qui n'utilisent pas les mêmes récepteurs cellulaires pour entrer dans la cellule cible, il faut utiliser au moins deux à trois lignées cellulaires afin d'augmenter les chances d'isoler la souche virale pathogène. Classiquement on utilise des lignées continues de fibroblastes humains type MRC-5 associées à des cellules de rein de singe type *Rhesus monkey kidney* (Rh Mk) ou *Buffalo green monkey kidney* (BGM). Une lignée type MRC-5 seule ne permet qu'un taux de détection de 30 à 43% des souches d'EV ; d'où l'intérêt d'effectuer l'isolement sur deux ou trois types de lignées. En associant aux fibroblastes humains des cellules BGM et des cellules Hep-2 dérivées d'un carcinome épidermoïde du larynx, il est possible d'augmenter de 18% le nombre d'isollements positifs et de raccourcir le délai de positivité (Racaniello & Howley, 2007). L'ECP caractéristique des EV se traduit par l'apparition de grandes cellules réfringentes se généralisant à l'ensemble du tapis cellulaire. Pour confirmer que le virus isolé dans des cultures cellulaires est un EV, il est possible d'effectuer un test rapide à l'aide d'un antigène spécifique de groupe partagé par la plupart des sérotypes d'EV et situé dans la protéine VP1. Ce motif PALTAVETG (Samuelson A, 1990) est reconnu par les anticorps monoclonaux disponibles dans le commerce qui peuvent être utilisés dans des tests fluorescents ou enzymatiques (Yousef *et al.*, 1987 ; Trabelsi *et al.*, 1995 ; Bourlet *et al.*, 1998).

8.2.2 Hybridation moléculaire

L'hybridation moléculaire a constitué la première approche moléculaire pour la détection des EV (Hyypiä *et al.*, 1984 ; Rotbart *et al.*, 1984). Cette technique est basée sur l'utilisation de sondes complémentaires avec des séquences spécifiques du génome des EV. Ces sondes peuvent être des ARN (ribosondes) (Cova *et al.*, 1988 ; Petitjean *et al.*, 1990), des ADN complémentaires (ADNc) (Hyypiä *et al.*, 1987 ; Bruce *et al.*, 1989) ou des sondes oligonucléotidiques (Rotbart *et al.*, 1988 ; Bruce *et al.*, 1989). Les sondes ARN sont plus sensibles mais moins spécifiques que les sondes

ADNc ; les sondes oligonucléotidiques sont les plus spécifiques mais se révèlent aussi les moins sensibles. Les sondes ciblent différentes régions génomiques en fonction des objectifs : sondes universelles au niveau des régions 5'NC, 3'NC et la région codant la polymérase reconnaissent tous les EV ou sondes spécifiques d'un sérotype ou d'un variant sérotypique au niveau des régions codant les protéines structurales. L'hybridation moléculaire a été appliquée avec succès sur des cellules en culture infectées par les EV. Cependant, elle demeure insuffisamment sensible pour la détection directe d'EV à partir des prélèvements pathologiques dont la plupart contient une faible quantité de virus (Rotbart, 1991).

8.2.3 Techniques d'amplification du génome des entérovirus

Les limites de la culture cellulaire et de l'hybridation moléculaire ont favorisé le développement de techniques d'amplification par PCR pour la détection universelle des EV ciblant des amorces localisés dans le domaine V de la région 5'NC (**Figure 1**), hautement conservée parmi tous les EV, de sorte que tous les sérotypes soient détectés (Muir *et al.*, 1998).

Comparativement à la culture cellulaire et à l'hybridation moléculaire, la RT-PCR est une technique très sensible (entre 10 à 100 copies d'ARN génomique pour 200 µl de liquide biologique) et très spécifique (Pillet *et al.*, 2010). Elle permet un diagnostic étiologique en moins de 48h des infections à EV et ceci quel que soit le type de prélèvement. C'est une technique universelle qui se décline selon différentes variantes en fonction du type de sondes et du mode de révélation du produit d'amplification. Les amorces le plus souvent choisies sont localisées dans la région 5'NC ou bien au niveau de l'extrémité 3' du génome des EV (Zoll *et al.*, 2009 ; Muir *et al.*, 1998).

Afin de mieux standardiser et de rendre plus rapidement la détection des EV dans les échantillons cliniques, des techniques de RT-PCR en temps réel avec hybridation spécifique des produits d'amplification ont été développées et permettent de rendre un résultat qualitatif (positif ou négatif) rapide (24 heures) ou quantitatif en utilisant une gamme standardisée de plasmide ou d'ARN transcrits (Pozzetto, 2009 ; Pillet *et al.*, 2010 ; Lévêque *et al.*, 2012; Volle *et al.*, 2012).

Le test GeneXpert est une méthode de RT-PCR sensible et spécifique pour la détection de l'ARN d'EV dans les échantillons de LCR. Elle est entièrement automatisée et combine sur une seule cartouche réactionnelle les étapes d'extraction et d'amplification. Le temps de manipulation est très court et le test

ne nécessite aucune expertise en biologie moléculaire. Sa durée totale est de l'ordre de 2,5 h (Marlowe *et al.*, 2008).

8.3 Diagnostic virologique indirect : diagnostic sérologique

Les techniques indirectes ou sérologiques sont basées sur la recherche des anticorps anti-EV dans le sérum. Ces techniques ont connu un développement limité en raison de la multiplicité des sérotypes et de l'absence d'antigène de groupe pour les EV. La séroneutralisation, bien qu'elle soit lourde et onéreuse, reste la méthode sérologique la plus utilisée. Elle est basée sur l'inhibition du pouvoir infectieux du virus avec un antisérum donné. Deux sérums correspondant aux périodes aiguë et convalescente sont testés en parallèle à la recherche d'une séroconversion ou d'une variation significative du titre d'anticorps dans la phase tardive par rapport à celui de la phase précoce. D'autres techniques indirectes telle que la fixation du complément et l'inhibition de l'hémagglutination ont également été développées mais sont rarement appliquées par manque de sensibilité. En effet, les anticorps qui fixent le complément présentent de nombreuses réactions croisées hétérotypiques. De même, tous les EV n'agglutinent pas les érythrocytes. Des tests ELISA détectant les IgM et les IgG sont également disponibles mais les réactions croisées entre sérotypes rendent l'interprétation des résultats très complexe.

9 Identification des entérovirus humains

9.1 Rationnel pour le typage des entérovirus

En cas de diagnostic direct d'infection à EV, il est désormais recommandé, et les directives de la Direction générale de la santé vont actuellement dans ce sens, d'éliminer la possibilité qu'il s'agisse d'un PV et donc de faire la distinction entre PV ou EV non poliomyélitique, et ce quel que soit le contexte clinique (pathologie ou simple portage). Cette distinction, qu'elle soit effectuée par des techniques classiques ou par RT-PCR spécifique des PV, permet d'une part de surveiller la circulation des PV en vue de l'éradication de la poliomyélite, et d'autre part de transmettre les éventuelles souches de PV à un centre de référence afin de différencier les souches sauvages des souches vaccinales.

L'analyse des génomes est également nécessaire pour comprendre la pathogenèse des maladies et les facteurs de virulence viraux. Ainsi, dans une épidémie causée par l'EV-A71 (Zheng *et al.*, 1995), deux souches différentes ont été observées, l'une causant des syndromes pied-main-bouche, l'autre des méningites et des paralysies. Ces souches diffèrent par des mutations dans la région 5'NC, ce qui pourrait expliquer la plus grande neurovirulence des souches mutées, à l'instar des mutations observées dans la région 5'NC pour les PV. De même, la possibilité d'un lien entre des différences génétiques dans la région 5'NC chez les écovirus, en particulier au niveau du motif oligopyrimidique impliqué dans la liaison du ribosome à l'ARN, et le caractère plus ou moins neurovirulent des sérotypes a été évoqué, mais il s'agissait d'un petit nombre de souches, et ces souches correspondaient aux souches prototypes (Romero & Rotbart, 1995). Ce type d'étude mérite d'être poursuivi. Progresser dans ces différents domaines implique que les souches sauvages circulant au cours du temps et dans des régions géographiques différentes soient isolées, conservées et séquencées. Cette banque de souches sauvages et de séquences n'a cependant d'intérêt que si des données cliniques et épidémiologiques sont collectées en parallèle (Muir *et al.*, 1998).

En pratique quotidienne, il est souvent suffisant d'établir un diagnostic de « genre » sans spécifier le sérotype. Cependant la surveillance épidémiologique de la circulation des souches d'EV nécessite la détermination du sérotype de ces souches isolées dans des prélèvements cliniques, notamment dans le contexte mondial de l'éradication de la poliomyélite. D'autre part, les EV non poliomyélitiques constituent actuellement un risque épidémique majeur (Bailly, 2008; Palacios *et al.*, 2005). Au cours des 20 dernières années, l'épidémiologie de l'EV-A71 a été marquée par un changement dans la localisation géographique des épidémies (plus fréquentes dans le sud-est asiatique) et une augmentation de la fréquence des complications neurologiques sévères. En raison de son neurotropisme, l'EV-A71 fait donc l'objet d'une surveillance accrue dans certains pays d'Asie du Sud-Est. Une épidémie majeure a eu lieu en Chine en 2008, les autorités chinoises ayant fait état, au 6 mai 2008, de plus de 12 000 cas de syndrome « pied-main-bouche » dont 26 décès. Le typage des EV présente alors un intérêt majeur pour caractériser, dans le contexte d'une alerte sanitaire, le type responsable d'une épidémie de grande ampleur ou d'une manifestation clinique particulière (Podin *et al.*, 2006), ou encore lorsqu'une épidémie d'origine nosocomiale est suspectée (Bailly *et al.*, 2000). Par ailleurs, l'identification précise d'un EV non poliomyélitique est intéressante afin de progresser dans l'étude des relations entre les différents sérotypes et les pathologies engendrées. Le typage moléculaire des EV joue également un rôle important dans l'identification et la surveillance de nouveaux variants et par conséquent dans l'évolution de la classification de ces virus (Oberste *et al.*, 2004c).

9.2 Méthode d'identification classique par séroneutralisation

L'identification d'un sérotype conventionnel se fait classiquement par le test de Lim et Benyesh-Melnick (LBM) utilisant des mélanges (ou pools) d'antisérums dirigés contre différents sérotypes (Lim & Benyesh-Melnick, 1960). En raison du nombre élevé de sérotypes d'EV, il n'est pas possible de tester individuellement tous les sérotypes disponibles à partir d'une batterie d'antisérums spécifiques reconnaissant chaque sérotype. Le typage immunitaire est habituellement effectué par des tests de neutralisation en utilisant des mélanges d'antisérums polyclonaux obtenus par hyperimmunisation d'animaux (chevaux ou singes).

Deux sources de réactifs sont disponibles :

- les pools de Lim-Benyesh-Melnick se compose de deux ensembles de huit (AH) et sept (JP) pools capables d'identifier 42 sérotypes (y compris les trois sérotypes de PV et de 39 membres de l'espèce HEV-B) et 19 sérotypes de CV-A, respectivement (Lim & Benyesh-Melnick, 1960) (Melnick *et al.*, 1973) ;
- l'institut National de la Santé Publique et de l'environnement de Bilthoven aux Pays-Bas propose les pools RIVM qui sont en mesure d'identifier 30 sérotypes, dont EV-D68 et EV-A71 (Kapsenberg, 1988).

La **Figure 25** présente le principe du test de typage par séroneutralisation.

Quand un test de neutralisation a été réalisé par l'un de ces réactifs, l'identification peut être effectuée en utilisant l'antisérum polyclonal monovalent correspondant. Cette approche, bien que relativement standardisée, présente de nombreuses limitations : le procédé est long et coûteux ; la source de réactifs, préparée il y a plus de 40 ans, est en voie d'épuisement et la production de nouveaux stocks est improbable ; enfin, un nombre croissant de souches s'avère non typable par cette approche (Bendig & Earl, 2005). Cette variation intratypique a été montrée pour tous les sérotypes étudiés, aussi bien dans l'espace, en comparant des souches d'épidémies en différents points du globe que dans le temps. La dérive antigénique a été confirmée par l'utilisation d'anticorps monoclonaux (ACM). Pour les EV non poliomyélitiques par exemple, Prabhakar *et al.* ont montré la variabilité antigénique des isolats naturels de CV-B4 (Prabhakar *et al.*, 1982). Ils ont évalué la fréquence de mutation *in vitro* à un site antigénique à 10^{-4} , voire 10^{-2} , si plusieurs ACM sont utilisés comme agents de sélection. Ils ont montré aussi *in vitro* la labilité des épitopes en l'absence de sélection immunologique. Actuellement, au moins 10 % des souches isolées en culture ne sont pas sérotypables, c'est-à-dire ne sont pas neutralisées par les sérums de référence polyclonaux monovalents ou groupés dans les pools de Lim-Benyesh-Melnick (Bailly *et*

al., 1999). En effet, ces sérums de référence avaient été obtenus en immunisant des animaux avec les souches prototypes.

Le typage par neutralisation (technique de référence) et le typage par immunofluorescence avec trois pools d'ACM commercialisés dirigés contre les PV 1 à 3 pour l'un, les CV-B1 à 6 pour le deuxième, les E-4, 6, 9, 11, 30, 34 (échovirus les plus fréquents) pour le troisième, ont été comparés pour identifier 291 souches cliniques d'EV (Rigonan *et al.*, 1998). Les ACM ne permettaient pas d'identifier certains types de PV (22 souches sur 95 ne sont pas reconnues), de CV de types 2 et 4 (2 souches sur 26) ou d'échovirus (E-6, 11 et 30 : 7 souches sur 107), bien que certains anticorps soient dirigés contre ces types. À l'opposé, sur les 54 échovirus dont les sérotypes ne correspondent pas à ceux du pool, 8 étaient reconnus bien que n'appartiennent pas au type 1, 7 ou 14. Il est intéressant de noter que, sur les sept CV-A9 étudiés, cinq ont été reconnus par les ACM anti-echovirus.

Ces différentes contraintes ont orienté les récentes stratégies de typage vers l'analyse du génome viral.

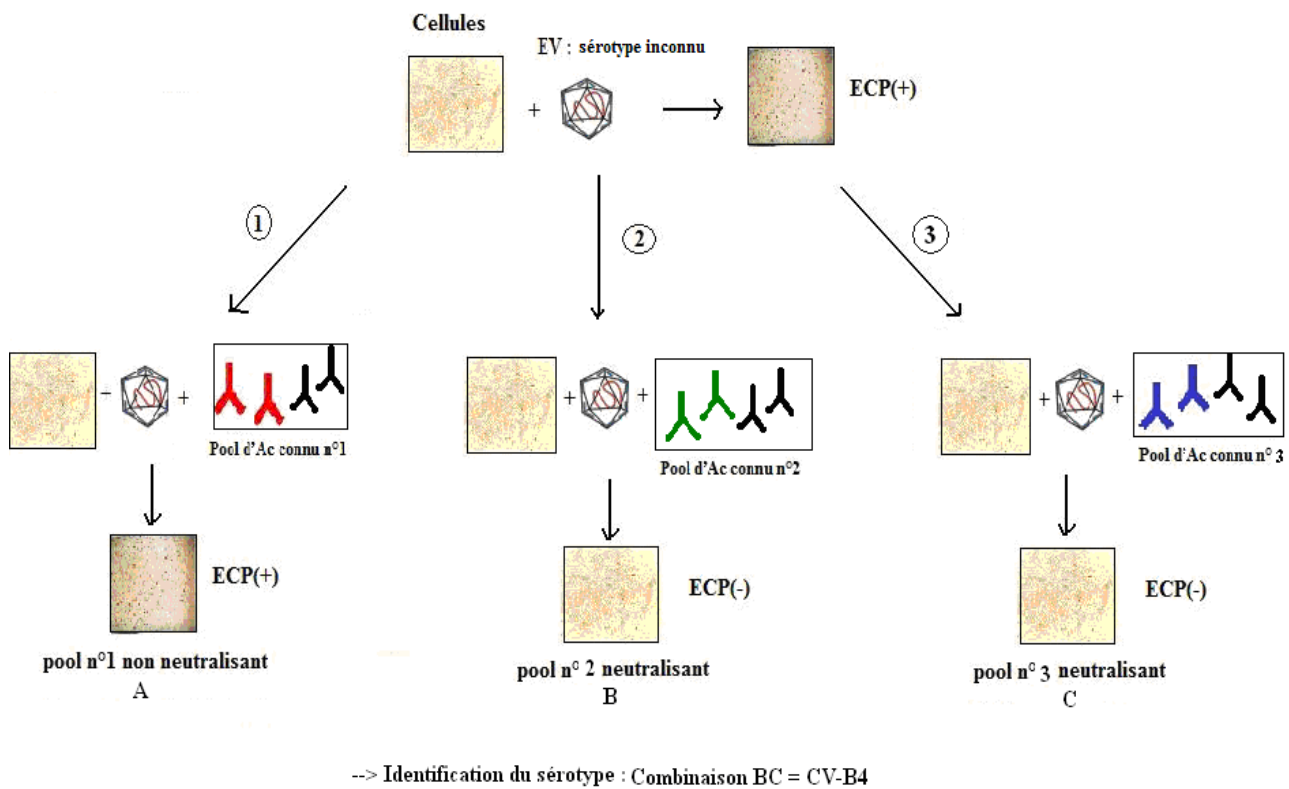


Figure 25 : Représentation schématique d'un test de typage par séroneutralisation (Muir *et al.*, 1998).

9.3 Techniques d'identification moléculaires des entérovirus

Le typage moléculaire des EV par l'analyse de leurs séquences nucléotidiques repose actuellement sur des bases moléculaires. Les techniques de RFLP ou d'analyse d'hétéroduplex ont été progressivement abandonnées au profit de méthodes basées sur l'amplification d'une région variable du génome encadrée par deux régions plus ou moins conservées, suivie par le séquençage de cette région. Le plus souvent cette région du génome code une des protéines structurales constituant la capsid virale où sont localisés les sites antigéniques de neutralisation. L'identification du sérotype se fait alors par la comparaison de la séquence obtenue avec les séquences disponibles dans les banques génomiques sur le réseau Internet. Les méthodes de typage moléculaire des EV reposent sur l'amplification de séquences ciblant une partie variable de la région codant une protéine de capsid VP1 (Oberste *et al.*, 1999) et, alternativement, VP2 (Nasri *et al.*, 2007a) ou VP4 (Ishiko *et al.*, 2002a) (**Figure 26**).

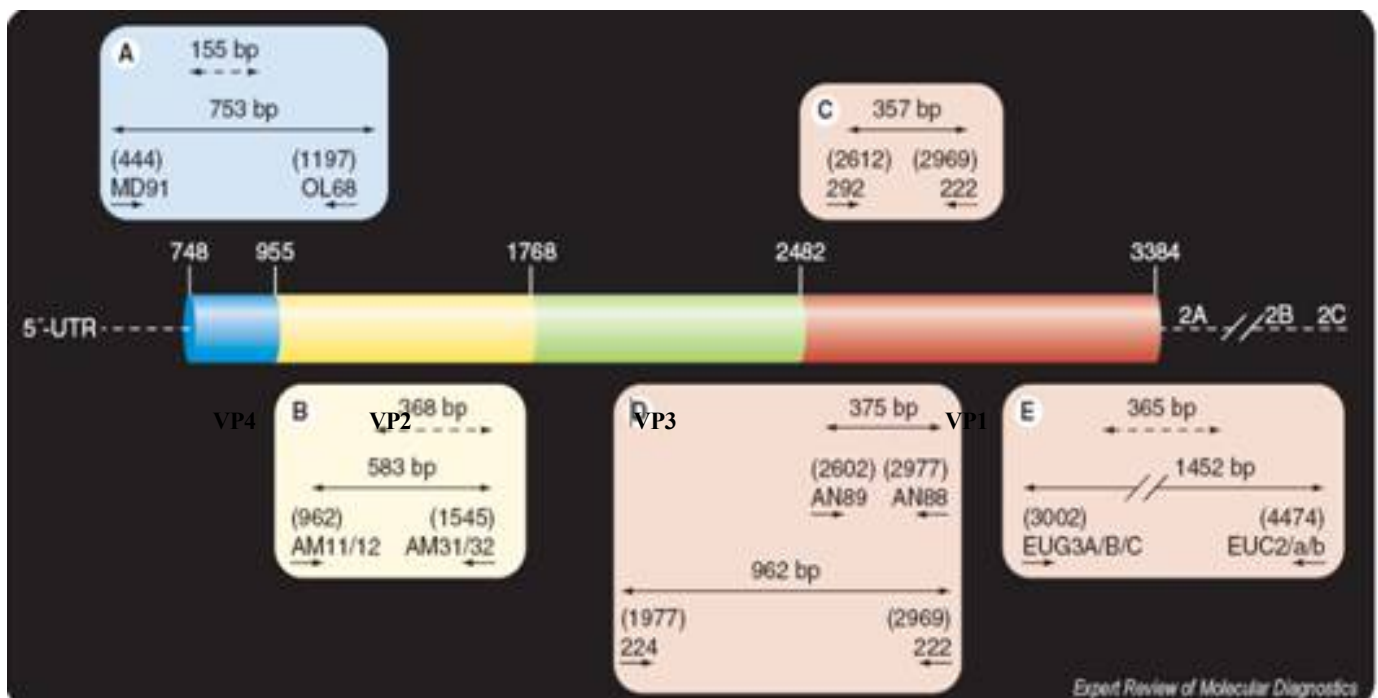


Figure 26 : Représentation schématique de la région génomique des entérovirus codant les protéines structurales. Les positions nucléotidiques correspondent à la séquence de la souche Lansing de PV 2. A, B, C, D et E représentent les principales stratégies adoptées pour le typage moléculaire des entérovirus (Nasri *et al.*, 2007b).

Pour contourner la technique de culture cellulaire et ses lacunes, les méthodes moléculaires ont été proposées pour l'amplification directe à partir d'échantillons cliniques. Atteindre des niveaux élevés de sensibilité et de spécificité est problématique, en particulier dans les échantillons de LCR qui contiennent généralement de très faibles titres viraux. Par conséquent, ces méthodes obligent souvent l'utilisation d'amplification nichée ou semi-nichée secondaires. En outre, l'utilisation d'amorces très dégénérées, contenant de l'inosine pour lutter contre la variabilité des séquences utilisées entre les sérotypes, peut souvent donner une amplification non spécifique des acides nucléiques de la cellule hôte. La technique de séquençage la plus couramment utilisée de génotypage est basée sur la méthode de Sanger, qui utilise des didésoxynucleotides en tant que terminateurs de chaîne d'ADN. Le pyroséquençage est une technique de séquençage en temps réel utilisant un ADN simple brin qui implique la détection de pyrophosphate libéré lors de l'élongation par des enzymes chimio luminescents ; il a été utilisé dans des essais de séquençage rapide de segments courts d'ADN.

9.3.1 Techniques basées sur le séquençage de la région codant VP1

La région codant la protéine VP1 est la plus variable du génome des EV et possède les principaux sites antigéniques de neutralisation et les domaines d'attachement aux récepteurs cellulaires. C'est la raison pour laquelle de nombreux chercheurs ont focalisé leurs études sur différentes régions de VP1 dans le but de mettre en place une technique de typage moléculaire des EV. La spécificité ainsi que la sensibilité de ces techniques ont été testés sur des souches prototypes et des isolats cliniques. Du fait de la variabilité importante observée au niveau de cette protéine, les auteurs ont été obligés de dessiner des amorces contenant des positions dégénérées qui consistent en un mélange de bases et de désoxyinosine. Le degré de dégénérescence ainsi que le nombre d'amorces par réaction varient en fonction des régions ciblées (**Figure 22** et **Figure 23**).

9.3.1.1 Typage à partir des souches isolées par culture cellulaire

9.3.1.1.1 Techniques visant le typage de tous les entérovirus

En 1999, le groupe de Steven Oberste (CDC, Atlanta, USA) a développé une technique de typage par séquençage partiel de la partie terminale de la région génomique codant la protéine VP1 correspondant à 450 pb. Le choix de cette région vient de l'importance des sites antigéniques au niveau de cette portion. Cette technique a permis le typage de 44 souches parmi les 64 souches prototypes testées. Lors de l'évaluation initiale, elle a permis l'identification de 51 isolats cliniques représentant 24 sérotypes (Oberste *et al.*, 1999). L'année suivante, le même groupe a développé une autre technique ciblant une région codant la partie centrale de la protéine VP1. Cette technique a permis l'identification de 55 isolats cliniques correspondant à des souches non typables par séroneutralisation (Oberste *et al.*, 2000). Ces deux études ont permis à leurs auteurs de mettre en place la technique de typage moléculaire des EV qui est à ce jour la plus utilisée dans les laboratoires. Cette technique consiste à amplifier et séquencer une région de 357 pb située dans la partie centrale de la région codant la protéine VP1 à l'aide des amorces 222 et 292 (**Figure 26C**) ; des amorces présentant plus de dégénérescence ont remplacé les amorces utilisées dans les études précédentes (Oberste *et al.*, 2000). Grâce à cette technique, 500 isolats cliniques ont été typés ainsi que toutes les souches prototypes (Oberste *et al.*, 2003). Cette technique manque cependant de sensibilité pour certains sérotypes, et en particulier l'EV-A71, en raison probablement de la dégénérescence des amorces utilisées (Kottaridi *et al.*, 2004 ; Nasri *et al.*, 2007a).

Suite aux résultats très encourageants obtenus en ciblant la région VP1, deux autres équipes ont proposés des variantes dans la même région. L'équipe suédoise de Norder *et al.* (2001) a publié d'autres amorces ciblant la partie initiale de la région VP1. Cette méthode a été appliquée pour l'identification de 28 souches prototypes d'échovirus et de 61 isolats cliniques représentant différents sérotypes d'échovirus. L'inconvénient de cette technique est qu'elle nécessite plusieurs amorces pour identifier les seuls échovirus (Norder *et al.*, 2001). Une autre équipe localisée à l'Institut Pasteur de Paris (Caro *et al.*, 2001) a publié l'année suivante une méthode de typage moléculaire des EV amplifiant une longue région de 1450 paires de bases englobant la partie terminale de VP1, les gènes 2A et 2B et la partie initiale du gène 2C (**Figure 26C**). La réaction de typage se fait par séquençage d'une région de 365 pb. Cette technique a permis l'identification de 59 souches prototypes sur les 64 testées et de 45 isolats cliniques dont 6 non typables représentant 21 sérotypes différents (Caro *et al.*, 2001). L'analyse phylogénétique a montré que les souches cliniques sont regroupées correctement avec leurs prototypes

homologues, avec une identité nucléotidique qui varie de 74,8 à 89,4 %. Cette technique a été appliquée avec succès pour identifier les souches correspondant à l'espèce HEV-C circulant à Madagascar (Rakoto-Andrianarivelo *et al.*, 2002).

9.3.1.1.2 Techniques visant le typage d'un sous-ensemble d'entérovirus

Afin d'éviter l'utilisation d'amorces dégénérées, d'autres auteurs ont choisi de cibler que les EV de l'espèce B (notamment les échovirus) car ces virus sont les plus fréquemment isolés en virologie clinique et sont à l'origine de la plupart des méningites virales. Pour cela, différentes stratégies ont été adoptées.

En 2002, une amplification de la région complète de VP1 suivie par une PCR nichée a été proposée par Bailly *et al.* (2002). Cette technique de typage direct n'a ciblé qu'un seul sérotype, E-30 qui est souvent à l'origine d'épidémies de méningites.

Une autre stratégie repose sur l'utilisation d'amorces spécifiques de l'espèce HEV-B au niveau du gène VP1 permettant une amplification directe des EV de l'espèce HEV-B à partir du LCR. Pour les EV appartenant aux autres espèces, le segment génomique comprenant le gène complet VP4 et partiel VP2 a été amplifié (Mirand *et al.*, 2008a, 2008b). Cette étude a fait également une comparaison de la répartition des différents sérotypes identifiés par la méthode de typage direct et la méthode de typage indirect.

9.3.1.2 Typage direct à partir d'échantillons cliniques

Toutes les méthodes décrites précédemment ont été développées pour l'identification des EV après amplification préalable sur culture cellulaire. En raison de la forte variabilité des régions sélectionnées pour le séquençage et par conséquent de l'emploi d'amorces dégénérées, la sensibilité de toutes ces méthodes ne s'est pas montrée suffisante pour permettre la caractérisation des souches directement à partir de prélèvements cliniques et notamment à partir du LCR.

En revanche, le typage de souches directement à partir de prélèvements cliniques (LCR, selles et prélèvements de gorge essentiellement) a été possible à l'aide d'amorces ciblant la région VP1 des membres de l'espèce HEV-B seulement (Bailly *et al.*, 2002 ; Thoelen *et al.*, 2003a ; Thoelen *et al.*, 2004).

Plus récemment, Nix *et al.* ont proposé une technique de séquençage ciblant tous les EV humains en utilisant la technologie CODEHOP. Il s'agit de la même région que celle analysée par Oberste *et al.* en 2003, (**Figure 26D**) à la différence que cette technique utilise une PCR semi-nichée avec une amorce sens sélectionnée dans la région VP3 pour la première PCR (Nix *et al.*, 2006). Les auteurs ont remplacé les amorces dégénérées 222-292 par un nouveau couple d'amorce AN89-AN88 dessiné selon la technologie CODEHOP (*Consensus Degenerate Hybrid Oligonucleotide Primer*) (**Figure 27**). L'amorce CODEHOP se compose d'une partie « clamp » non dégénérée dans l'extrémité 5' terminale et d'un noyau dégénéré dans sa partie 3', de telle sorte que le « clamp » augmente la stabilité du duplex amorce-matrice, ce qui permet d'augmenter la température d'hybridation et donc de réduire les amplifications non spécifiques (Rose *et al.*, 2005). Cette technique est expliquée plus en détails dans la partie expérimentale de ce travail. Ces amorces ciblent, par une PCR semi-nichée, une partie initiale de la région codant la protéine VP1 correspondant à 375 pb. Grâce à cette technique toutes les souches prototypes et 87 isolats cliniques présentant 29 sérotypes ont été identifiés par typage direct.

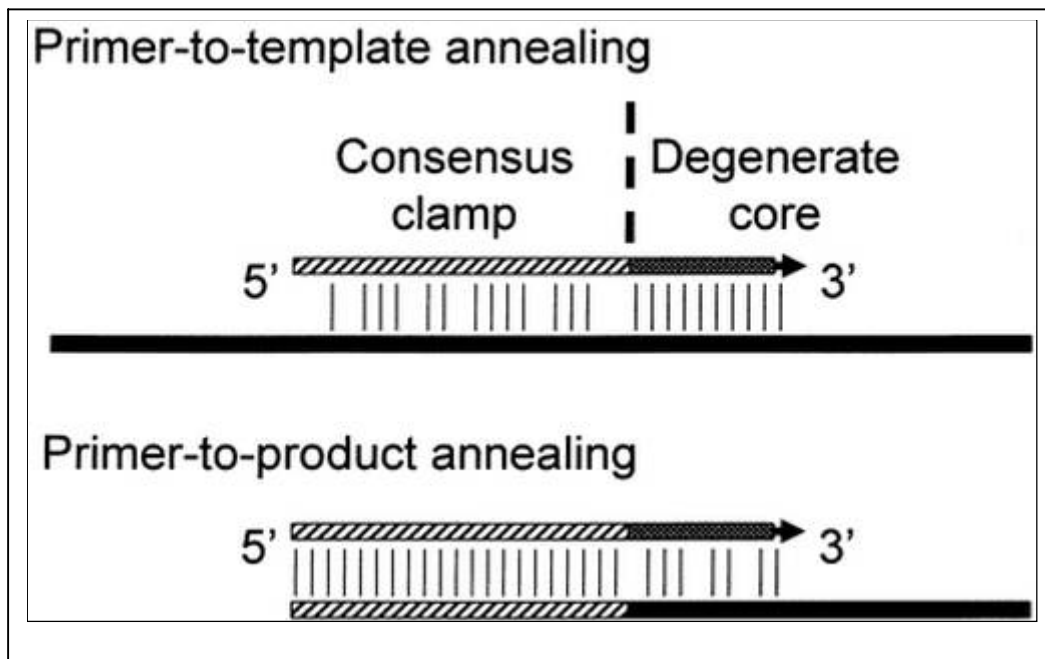


Figure 27 : Amplification avec des amorces CODEHOP (Rose *et al.*, 2003).

Une amplification directe de VP1 à partir d'échantillons de LCR a été testée, mais les résultats sont variables, allant de 64% à 96% de réussite. Tavakoli *et al.* ont amplifié les échantillons cliniques à l'aide de quatre protocoles différents (Tavakoli *et al.*, 2008).

Leitch *et al.* ont également décrit une méthode rapide basée sur la PCR en utilisant des amorces sans inosine ciblant spécifiquement la région VP1 des espèces EV -A ou EV- B (Leitch *et al.*, 2009b).

9.3.2 Technique basée sur le séquençage d'une région codant VP2

La partie initiale de la région codant la protéine VP2 a été étudiée par Casas *et al.* en 2001. Les auteurs ont essayé de typer des souches d'EV en ciblant une région correspondant à 160 pb. Cependant, l'analyse a révélé que la cible était trop peu discriminante et donc inappropriée pour le développement d'une technique de typage moléculaire.

En 2007, une nouvelle technique de typage utilisant cette région a été proposée par notre laboratoire en collaboration avec des chercheurs tunisiens (Nasri *et al.*, 2007b). Elle cible la partie centrale de la région codant la protéine capsidale VP2 correspondant à 583 pb. Elle utilise un couple d'amorces dégénérées constitué de deux amorces sens (AM11 et AM12) et deux amorces antisens (AM31 et AM32) (**Figure 26B**). Les produits d'amplification montrant des résultats négatifs suite à la première amplification sont soumis à une PCR semi-nichée pour augmenter la sensibilité en utilisant d'autres amorces ciblant une région plus interne de VP2 (AM21/AM22) tout en gardant les amorces antisens (AM31/AM 32). Cette région de 368 pb est utilisée pour le séquençage (**Figure 26B**). Grâce à cette technique, 116 isolats cliniques et environnementaux ont été typés, incluant 36 sérotypes dont EV-A71. Grâce à cette technique, certaines souches non typables par méthode sérologique ou par VP1 ont été typées. Par ailleurs, cette technique, couplée à la technique ciblant la région VP1 (Oberste *et al.*, 2000) a permis de mettre en évidence le premier évènement décrit de recombinaison naturelle inter-typique au niveau des gènes codant les protéines de capsid de deux types d'EV non polio (CVB-3 et CV-B4) (Bousslama *et al.*, 2007). Cette technique a servi de base pour le développement de la PCR CODEHOP décrite dans le premier article de la partie expérimentale de cette thèse.

9.3.3 Technique basée sur le séquençage d'une région codant VP4

Ishiko *et al.* ont proposé d'utiliser la séquence codant la protéine VP4 pour l'identification des EV (Ishiko *et al.*, 2002a, b). Pour cela une amorce sens (MD91) et un autre antisens (OL68) ont été utilisées. Ce couple d'amorces permet l'amplification d'un fragment correspondant à la partie terminale de la région 5'NC, à toute la région VP4 et à un tiers de l'extrémité 5' de la région VP2. A partir de ce

fragment amplifié de 753 pb, seulement 155 pb correspondant à la séquence du gène VP4 sont analysées pour la détermination du sérotype (**Figure 26A**). L'avantage majeur de cette méthode est l'utilisation des amorces situées dans des régions très conservées du génome entéroviral. En revanche cette technique est moins discriminante pour différencier les EV car elle cible une région moins variable codant une protéine de localisation interne et donc ne contenant pas de sites antigéniques de neutralisation. Cette technique a permis l'identification correcte de 66 souches prototypes et de 89 isolats cliniques représentant 26 sérotypes différents. Elle a différencié correctement CV-A24 et EV-D70 chez des patients souffrant de conjonctivite hémorragique aiguë (Ishiko *et al.*, 2002a).

**TRAVAUX
ORIGINAUX**

Les travaux personnels sont organisés en trois parties :

- le premier article décrit la technique de typage VP2 utilisant des amorces CODEHOP en la comparant aux deux autres techniques de typage disponibles au laboratoire : typage dans la région VP1 et typage dans la région VP2 sans amorces CODEHOP ; ce premier article évalue ensuite l'application de cette technique aux prélèvements cliniques identifiés au laboratoire au cours de la période 2010-2012 (Ibrahim *et al.*, 2013) ;
- le deuxième article applique la technique CODEHOP de typage VP2 à des prélèvements d'eaux usées provenant de la région de Monastir ; c'est, à notre connaissance, la première fois que ce type de technique a été utilisé sur des échantillons de l'environnement (Ibrahim *et al.*, 2014, soumis à publication) ;
- le troisième article présente l'épidémiologie moléculaire des souches d'EV isolées par culture cellulaire de prélèvements cliniques provenant d'enfants présentant un tableau de paralysie en Centre-Afrique. Le typage des souches a été réalisé à la fois par technique VP1 et technique VP2.

Pour ces trois études, nous proposons une brève introduction, l'article original tel qu'il a été publié et, si nécessaire, des compléments de résultats.

Une courte discussion assortie d'une conclusion et de perspectives clôturer cette partie.

ARTICLE 1

Mise au point et évaluation d'une technique de PCR permettant le typage des entérovirus directement à partir de produits pathologiques.

1 Description de la méthode et application aux prélèvements humains

1.1 Introduction à l'article 1

De nombreux arguments plaident pour le typage des souches d'EV dans les échantillons cliniques ou environnementaux, et notamment (i) la distinction entre EV polio et EV non polio, (ii) la surveillance épidémiologique environnementale et clinique de la circulation des EV (exemple : circulation de l'EV-A71 en Asie), (iii) la caractérisation des génotypes non ou difficilement cultivables et (iv) l'identification de nouveaux génotypes et de variants (Nasri *et al.*, 2007a). La méthode de référence pour le typage des souches d'EVs est actuellement l'analyse du gène *VPI* ; des méthodes alternatives ciblant les protéines de capsid VP2 ou VP4 ont également été décrites (pour une revue voir Nasri *et al.*, 2007a). Cependant, un jeu unique d'amorces est insuffisant pour amplifier tous les types d'EV, et l'utilisation d'amorces hautement dégénérées contenant de l'inosine expose au risque d'amplification non spécifique (Rose *et al.*, 1998 ; Nix *et al.*, 2006 ; Oberste *et al.*, 2010).

Jusqu'à présent, ces méthodes ont été surtout utilisées pour le typage des souches d'EV isolées en culture cellulaire. Or la culture cellulaire est une technique lourde, coûteuse et qui manque de sensibilité. Ces dernières années, un certain nombre de techniques ont donc été proposées avec l'objectif de typer directement les EV à partir d'échantillons cliniques. Certains auteurs ont proposé une stratégie en deux étapes avec utilisation d'amorces spécifiques ciblant un groupe d'EV et notamment l'espèce EV-B qui représente le plus grand nombre de souches observées en clinique (Thoelen *et al.*, 2003b ; Iturriza-Gómara *et al.*, 2006 ; Mirand *et al.*, 2006 ; Oberste *et al.*, 2006 ; Mirand *et al.*, 2008b). De façon alternative, il a été proposé d'utiliser des amorces originales basées sur le concept CODEHOP pour l'amplification et l'identification de nouveaux gènes partageant des homologies avec les séquences décrites précédemment (Rose *et al.*, 1998). La technique décrite par Nix *et al.* (Nix *et al.*, 2006) cible la région VP1 : les amorces dégénérées utilisées ont été remplacées par un nouveau couple d'amorces dessinées selon la technologie CODEHOP. Cette technique a été appliquée avec succès au typage des EV directement à partir d'échantillons cliniques.

Au cours des années précédentes, notre équipe a développé une technique de typage dans la région VP2 à partir de souches isolées en culture cellulaire. Le choix de la région VP2 vient de sa forte variabilité

génétique, de la présence à ce niveau de sites antigéniques de neutralisation et de la possibilité de dessiner trois amorces reconnaissant des séquences suffisamment conservées pour réaliser une PCR semi-nichée permettant d'augmenter la sensibilité de la technique (Nasri *et al.*, 2007b).

Le but de ce premier article était d'augmenter la sensibilité de la technique ciblant la région VP2 en utilisant une amplification spécifique à l'aide d'amorces dessinées selon l'approche CODEHOP. Après validation de la méthode sur des souches prototypes, un total de 352 échantillons cliniques trouvés positifs pour l'ARN des EV (138 par le kit EV Xpert® et 214 par le kit Enterovirus R-gene) pendant une période de trois ans (2010 - 2012) a été analysé de manière prospective par le génotypage de la région VP2. Au total, 204 (58 %) échantillons ont été typables. Une proportion plus élevée de prélèvements de gorge ou de selles a été trouvée typable par rapport aux échantillons de LCR (94 sur 142, 66,2%, vs 83 sur 169, 49,1%, $P < 0,01$ par le test du chi 2). En outre, la valeur médiane de seuil d'amplification (Ct) obtenue était plus faible pour les échantillons typables par rapport aux non typables (32,20 vs 33,01, $P < 0,05$ et 25,96 vs 31,74, $P < 0,001$, pour les techniques GeneXpert et R gene, respectivement, par le test de Mann-Whitney-Wilcoxon). Ces résultats suggèrent que, dans le cas de méningite à EV, un échantillon périphérique (prélèvement de gorge ou selles) susceptible de présenter une charge virale élevée doit être utilisé de préférence au LCR pour identifier le génotype d'EV impliqué en utilisant la méthode de typage VP2 sans isolement sur culture cellulaire.

En marge de l'article 1, nous présentons des résultats complémentaires non publiés sur (i) des comparaisons complémentaires des techniques de typage VP1 et VP2 sur les prélèvements trouvés positifs pour le génome entéroviral en 2010 ; (ii) la caractérisation plus poussée de souches d'E-11 mal reconnues par la technique VP2 et (iii) la description d'une épidémie due à une souche variante d'E-6 survenue en 2011.

1.2 Article 1 publié dans *Clinical Microbiology and Infection* (CMI) en 2013.

Partial sequencing of the VP2 capsid gene for direct enterovirus genotyping in clinical specimens

W. Ibrahim^{1,2}, N. Boukhadra¹, D. Nasri-Zoghliami², P. Berthelot¹, S. Omar³, T. Bourlet^{1,3}, B. Pozzetto^{1,3} and S. Pillet^{1,3}

1) EA-3064, Groupe Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes (GIMAP), Faculty of Medicine of Saint-Etienne, University of Lyon, Saint-Etienne, France, 2) Laboratory of Transmissible Diseases and Biologically Active Substances, Faculty of Pharmacy, Monastir, Tunisia and 3) Laboratory of Bacteriology and Virology, University Hospital of Saint-Etienne, Saint-Etienne, France

Abstract

Typing of human enterovirus (EV) remains a major goal for diagnostic and epidemiological purposes. Whereas sequencing of the VP1 coding region is the reference standard for EV typing, a method relying on sequencing of the VP2 coding region has been proposed as an alternative; however, this has been validated only on cell culture supernatants. To avoid the selection of cultivable strains and to quicken the identification step, a new semi-nested PCR method targeting the VP2 region was developed by use of the CODEHOP strategy. After validation of the method on reference and clinical strains, a total of 352 clinical specimens found to be positive for EV RNA (138 with the GeneXpert EV kit and 214 with the Enterovirus R-gene kit) during a 3-year period (2010–2012) were analysed prospectively for VP2 genotyping. Overall, 204 (58%) specimens were typeable. A higher proportion of throat swab/stool specimens than of cerebrospinal fluid (CSF) specimens was found to be typeable (94 of 142 (66.2%) vs. 83 of 169 (49.1%), respectively, $p < 0.01$ by the chi-square test). Moreover, the median C_t value obtained was lower for typeable specimens than for untypeable specimens (32.20 vs. 33.01, $p < 0.05$, and 25.96 vs. 31.74, $p < 0.001$, for the GeneXpert and R-gene tests, respectively, by the Mann–Whitney–Wilcoxon test). These results suggest that, in cases of EV meningitis, a peripheral specimen (i.e. throat swab or stool) that is susceptible to exhibiting a higher viral load should be used in preference to CSF for identifying the causative EV genotype by use of the VP2 typing method without cell culture isolation.

Keywords: Clinical specimen, human enterovirus, molecular epidemiology, typing method, viral load, VP2 capsid protein

Original Submission: 31 August 2013; **Revised Submission:** 2 November 2013; **Accepted:** 19 December 2013

Editor: T. A. Zupanc

Article published online: 27 December 2013

Clin Microbiol Infect

Corresponding author: B. Pozzetto, GIMAP-EA 3064, Faculté de Médecine Jacques Lisfranc, 15 rue Ambroise Paré, 42023 Saint-Etienne Cedex 02, France
E-mail: bruno.pozzetto@univ-st-etienne.fr

Introduction

Human enteroviruses (EVs) are small, non-enveloped viruses belonging to the *Enterovirus* genus of the *Picomaviridae* family. The EV genome consists of a single-stranded linear RNA molecule of approximately 7500 nucleotides with one open reading frame flanked by two 5' and 3' non-coding regions

(NCs) [1]. The open reading frame encodes a polyprotein that is subsequently cleaved into structural proteins (VP4, VP2, VP3, and VP1) that are assembled to form the viral capsid, and non-structural proteins that are implicated in virus replication and maturation.

EVs are mainly transmitted via the faecal–oral route, but also by droplets from the upper respiratory tract, and are responsible for many human infections, with a broad range of clinical manifestations; most of them are asymptomatic or mild, but some can lead to severe presentations, especially in neonates and immunocompromised patients. Certain EV infections are considered to be emerging, as exemplified by the severe epidemics in Asia with EV-A71 [2].

Originally subdivided on the basis of antigenic properties and according to their natural and experimental pathogenesis,

human EVs are currently classified as four species (EV-A to EV-D), with species C including the three poliovirus (PV) serotypes [3,4]. More than 100 genotypes have been reported to date, and new ones are regularly described (<http://www.picornaviridae.com>). There are many reasons for typing EV strains in clinical or environmental specimens, including: (i) rapid identification of strains with high clinical relevance (i.e. PV in countries where PV infection is not still eradicated or EV-A71 strains are related to encephalitis); (ii) epidemiological and clinical monitoring of EV circulation in humans; (iii) epidemiological surveillance of EV circulation in the environment; and (iv) identification of new genotypes and variants [5].

The reference standard for typing of strains is currently analysis of the VP1 gene; alternative methods targeting the VP2 or VP4 capsid proteins have also been described [5]. However, a unique set of primers is hardly sufficient for amplifying all EV types, and the use of degenerate primers with high inosine content carries the risk of non-specific amplification [6–8]. Importantly, almost all of these methods have been used for typing HEV strains isolated in cell culture; few of them have succeeded in amplifying EV sequences directly from clinical samples, preventing selection by cell culture.

These pitfalls led some authors to propose a two-step strategy involving the use of specific primers targeting one group of EVs [9–13]. Alternatively, an original primer design has been proposed for the amplification and identification of new genes sharing homologies with previously described sequences [8]. This strategy, named CODEHOP for COnsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primers, led to the description of new viruses, including herpesvirus types, by targeting the conserved DNA polymerase gene [14] and papillomavirus types by amplifying homologue genes in the L1 protein-coding region [15]. This original strategy has been proposed for EV typing by adaptation of the primers most commonly used for targeting of the VP1 region [16] with a CODEHOP design [6].

The aim of this study was to adapt the primers targeting the VP2 region, which was shown to be useful in EV typing [17], according to the CODEHOP design; an increase in sensitivity of the test could allow EV typing directly in clinical specimens without previous isolation by cell culture. After validation with dilutions of cell culture supernatants, the new method was tested prospectively on 352 clinical specimens that were found to be positive for EV over a 3-year period in Saint-Etienne, France. Overall, 58% of the specimens were typed successfully. Huge differences were observed according to the origin of clinical specimens and to the level of the viral load, suggesting that peripheral specimens are more suitable than cerebrospi-

nal fluid (CSF) specimens for direct typing of EV in clinical practice.

Materials and Methods

Viral strains and analytical sensitivity analysis

For the reference and clinical strains used for the development of the technique, virus titration was performed according to the Reed and Muench method, and titres were expressed as 50% tissue culture infective dose (TCID₅₀)/50 µL. Virus stocks were ten-fold serially diluted in phosphate-buffered saline before RNA extraction; the results were recorded as the lowest detectable log₁₀ dilution and the corresponding concentration.

Clinical specimens

A total of 352 consecutive specimens (169 CSFs, 107 throat swabs, 35 stools, 19 respiratory secretions, 17 blood specimens, and five cutaneous swabs) taken from patients showing EV infection at the University Hospital of Saint-Etienne, France, over a 3-year period (2010–2012) and found to be positive for EV RNA in the 5'NC region on a routine basis, were included prospectively for typing analysis. A point-of-care strategy with the Xpert EV kit (Cepheid Europe, Maurens-Scopont, France) detected 138 positive CSF specimens, and all of the other specimens tested positive with the Enterovirus R-gene kit (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France).

RNA extraction

Viral RNA was extracted from 200 µL of cell culture supernatant or clinical specimen with the NUCLESENS easy-MAG instrument (bioMérieux). The specific B protocol was used according to the manufacturer's recommendations, and nucleic acids were eluted in 50 µL.

Amplification experiments

All experiments were performed with the general precautions and conditions previously described [17].

5'NC region. For CSF specimens, EV RNA was detected with either the Xpert EV kit on the GeneXpert instrument (Cepheid) in cases of emergency, or with the Enterovirus R-gene kit on the ABI PRISM 7500 system (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) in routine use, both tests being commercial one-step reverse transcription and real-time PCR assays. For other clinical specimens, the EV genome was detected with the R-gene kit. The analytical sensitivity was evaluated on reference strains to 0.0002–

200 TCID₅₀/mL for GeneXpert [18] and 0.002–245 TCID₅₀/50 µL for R-gene [19].

VPI region. The reagent and amplification conditions were those published previously [6].

VP2 region. Ten microlitres of extracted RNA was reverse transcribed into cDNA at 42°C for 45 min with 200 units of SuperScriptIII reverse transcriptase (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), 2.5 ng/µL random primers (Invitrogen), and 10 units of RnaseOUT recombinant RNase inhibitor (Invitrogen). A first amplification step was performed by using two pairs of sense (AM11 and AM12) and antisense (AM31 and AM32) primers as previously described [17], in order to obtain a fragment of 584 bp. For the classic VP2 method, the second amplification was performed as previously described [17]. CODEHOP PCR was performed with 2 µL of the first PCR product, 1.25 units of HotStar Taq DNA polymerase (Qiagen, Courtaboeuf, France), 40 pmol of primers NS20 (TCCAAGGGCTGGTGGTGAARYTNCC) and NS30 (TTR TTGGTCCGCAGGTTGATCMWYTGRTGNGG) and 3 mM MgCl₂ in a final volume of 50 µL. The Taq polymerase was activated by incubation at 95°C for 15 min prior to 30 amplification cycles of 95°C for 30 s, 65°C for 45 s, and 72°C for 45 s. The expected size of the amplicon was 379 bp (with reference to PV-1; GenBank accession number V01149).

Template purification and sequencing

The amplicons were purified with the High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics, Meylan, France) or a QIAquick gel extraction kit (Qiagen), depending on the presence of single or multiple bands, respectively. The purified products were sequenced according to the Sanger method, with the GenomeLab Dye Terminator Cycle Sequencing Quick Start kit (Beckman Coulter, Villepinte, France), as previously described [17]. The sequencing primers were NS20/NS30 and AN89/AN88 [6] for the VP2 region and the VPI region, respectively. After purification of the amplicons with the Dye-Terminator Ex 2.0 kit (Qiagen), the electrophoresis and analysis of DNA sequence reactions were performed with the CEQ8000 automated DNA sequencer (Beckman Coulter).

Sequence analysis and phylogeny

To determine the EV type, the sequences were compared with all of the corresponding EV sequences available in the GenBank database for the VP2 region by the use of BLAST software [20]. By analogy with VPI [21], and as previously described [17], nucleotide sequence homology of at least 75% was required for assignment to the same genotype. Sequence alignments were performed with the ClustalW2 program [22].

Statistical analysis

Chi-square and Mann–Whitney–Wilcoxon tests were performed with SPSS software version 20.0 (IBM, Chicago, IL, USA). A p-value of <0.05 was considered to be statistically significant.

Results

Technical validation of the CODEHOP VP2 typing method

CODEHOP primers (NS20 and NS30) were defined in a conserved region of the VP2 protein previously selected for its pertinence for EV typing [17]. Each of these new primers was designed according to the CODEHOP strategy [8,14] by use of the computer algorithm available at <http://blocks.fhcrc.org>. The 5' non-degenerate end of 15 bases for both primers corresponded to the 5' consensus clamp, i.e. the most probable nucleotide predicted for each flanking codon; the 3' degenerate core of 11 bases and 17 bases for NS20 and NS30, respectively, encoded highly conserved amino acids (see Fig. 1a,b for primer NS20).

In order to validate the CODEHOP semi-nested protocol, different parameters, including annealing temperature, amount of primers, and MgCl₂ concentration, were tested for the development of a sensitive molecular technique. With the optimal conditions reported in the previous section, the new semi-nested PCR was shown to be more sensitive and to show fewer adventitious bands than the initial version of the VP2 test with conventional primers [17] for five reference strains belonging to the four different human EV species (Fig. 1c).

The ability of the primers to match the 95 genotypes of EV for which the VP2 gene sequence is available was tested by nucleotide sequence alignment; no major mismatch was observed for any of the primers used (sense and antisense primers for first and nested PCR assays) (data not shown). In addition, the sensitivity of the new method was compared with those of the EV R-gene kit targeting the 5'NC region and of the VPI method on ten-fold serial dilutions of 14 EV reference or clinical strains (Table 1). Both typing methods were less sensitive than the R-gene test, with the exception of the CV-A21 strain, for which the VP2 method was 1 log₁₀ more sensitive. The VP2 method was more sensitive than or as sensitive as the VPI method for, respectively, six (CV-A9, E-4, E-11, E-30, CV-A21, and EV-D70) and seven (CV-A16, EV-A71, E-17, CV-B3, CV-A24, PV-2, and PV-3) strains; it was 1 log₁₀ less sensitive than the VPI method for PV-1.

A preliminary study was performed on 98 clinical specimens found to be positive for EV in 2010 to control the accuracy of the VP2 test by comparison with the reference VPI CODE-

(a)

E-3	[AY302553	(51)	DQPTQPDVATCRPYTLDSIQWQKSSDQWKKFPFALKDMGLFQGNMYYHYLGRSG	13
E-4	[AY302557	(51)	DQPTQPDVATCRPYTLDSVWQKSSPGWKKFPFALKDMGLFQGNMYYHYLGRSG	10
E-5	[AP083069	(51)	DQPTQPDVATCRPYTLDSVWQKSSAGWKKFPFALKDMGLFQGNMYYHYLGRAG	9
E-6	[AY302558	(51)	DQPTQPDVATCRPYTLDSVWQKSSDQWKKFPFALKDMGLFQGNMYYHYLGRSG	11
E-7	[AY036579	(51)	DQPTQPDVATCRPYTLDSVWQKSSAGWKKFPFALKDMGLFQGNMYYHYLGRAG	9
E-9	[X84981	(51)	DQPTQPDVATCRPYTLDSVWQKSSAGWKKFPFALKDMGLFQGNMYYHYLGRAG	10
EV-100	[DQ902713	(51)	DQPTQPDVATCRPYTLDSVWQKSSDQWKKFPFALKDMGLFQGNMYYHYLGRSG	12
EV-101	[AY843308	(51)	DQPTQPDVATCRPYTLDSIQWQKSSPGWKKFPFALKDMGLFQGNMYYHYLGRAG	10
EV-68	[AY426531	(51)	DKPTQPETSTORPYTLRSVWQKSSPGWKKLPFALANIGKFGQNVQYHYLYRSG	24
EV-69	[AY302560	(51)	DQPTQPDVATCRPYTLDSVWQKSSAGWKKFPFALKDMGLFQGNMYYHYLGRAG	10
EV-70	[D00820	(51)	DKPTQPETSTORPYTLRSKQKSSSPPGWKKLPFALAIQIMFGQNVQYHYLYRSG	24
EV-71	[U22521	(51)	DKPTQPDVATCRPYTLDSVWQKSSDQWKKFPFALKDMGLFQGNMYYHYLGRAG	28
EV-73	[AF241359	(51)	DQPTQPDVATCRPYTLDSVWQKSSAGWKKFPFALKDMGLFQGNMYYHYLGRAG	9
EV-74	[AY556057	(51)	DQPTQPDVATCRPYTLDSVWQKSSDQWKKFPFALKDMGLFQGNMYYHYLGRAG	11
EV-75	[AY556070	(51)	DQPTQPDVATCRPYTLDSVWQKSSDQWKKFPFALKDMGLFQGNMYYHYLGRAG	10
EV-76	[AY697458	(54)	TRPQVSVNRPYTLPAKLVHTTGTQTSKQYKRFQVLTETGVFPQNAQPHLYRSG	100
EV-77	[AJ493062	(51)	DQPTQPDVATCRPYTLDSVWQKSSDQWKKFPFALKDMGLFQGNMYYHYLGRAG	10
EV-78	[AY208120	(51)	DQPTQPDVATCRPYTLDSVWQKSSAGWKKFPFALKDMGLFQGNMYYHYLGRAG	11
EV-79	[AY843297	(51)	DQPTQPDVATCRPYTLDSIQWQKSSPGWKKFPFALKDMGLFQGNMYYHYLGRAG	10
EV-80	[AY843298	(51)	DQPTQPDVATCRPYTLDSVWQKSSDQWKKFPFALKDMGLFQGNMYYHYLGRAG	11

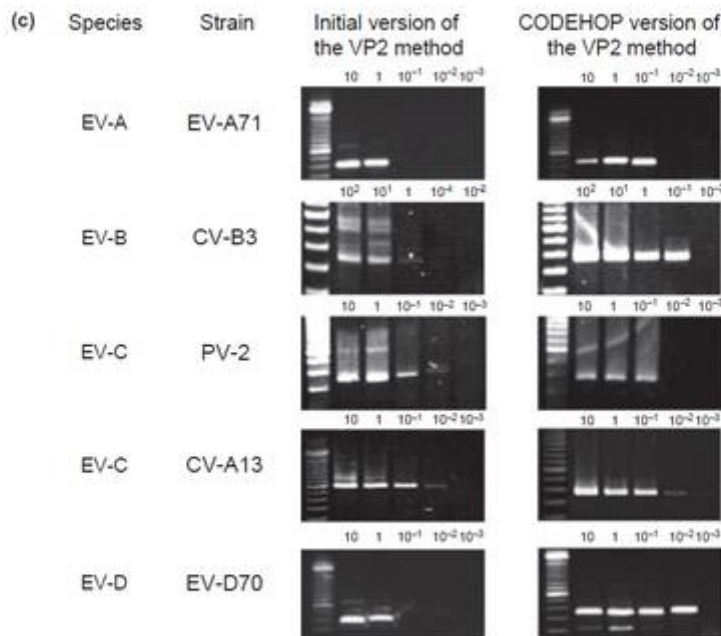
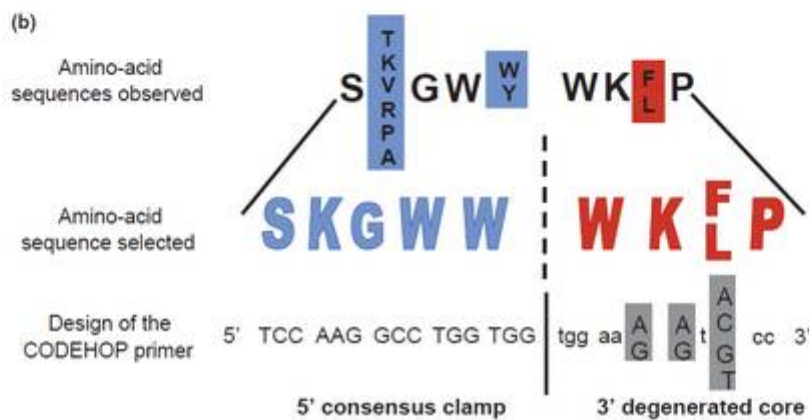


FIG. 1. Set-up of the CODEHOP VP2 typing method. (a) Design of the NS20 primer (the same strategy was used for NS30). After alignment of the sequences of EV, including the newly described ones, the conserved blocks were determined according to <http://blocks.fhcrc.org>. The amino acid block corresponding to the region previously used for the AM21 and AM22 primers was selected. The targeted sequence of the block is shown in a red box. (b) Design of the NS20 primer. The most frequent amino acid was selected in each position of the block, and the nucleotide sequence was designed with a 5' consensus clamp and a 3' degenerate core according to the CODEHOP strategy. (c) Electrophoregrams of amplification products of a variety of enterovirus strains belonging to different species after use of either the initial version (left-side panels) of the VP2 typing method described in [17], or the CODEHOP version of this test (right-side panels). The strains used are those listed in Table 1 at the same multiplicity of infection.

TABLE 1. Analytical sensitivity of the new VP2 typing method in comparison with that of the Enterovirus R-gene kit and of the VP1 typing method

Species	Serotypes	Strain	Titre (TCID ₅₀ /50 µL)	Lowest detectable titre (TCID ₅₀ /50 µL)		
				Detection by targeting the 5'NC region (R-gene assay)	Genotyping by targeting the VP1 region [6]	Genotyping by targeting the VP2 region
HEV-A	CV-A16	Reference G-10	10 ⁶	10 ⁻²	10 ⁻¹	10 ⁻¹
	EV-A71	Reference BrCr	10 ⁶	10 ⁻²	10 ⁻¹	10 ⁻¹
HEV-B	CV-A9	Clinical isolate SE-81-3363*	10 ⁶	10 ⁻²	10 ⁻¹	10 ⁻²
	E-4	Clinical isolate (1980)	10 ⁶	10 ⁻¹	1	10 ⁻¹
	E-11	Clinical isolate SE-02-70530*	10 ⁶	1	10	1
	E-17	Clinical isolate SE-99-94960*	10 ⁷	10 ⁻⁴	10 ⁻¹	10 ⁻¹
	CV-B3	Clinical isolate (1995)	5 × 10 ⁶	10 ⁻²	10 ⁻¹	10 ⁻¹
	E-30	Reference Bastiani	5 × 10 ⁶	10 ⁻³	10 ⁻²	10 ⁻³
HEV-C	CV-A21	Reference Kuykendall	5 × 10 ⁶	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻²
	CV-A24	Reference Joseph	10 ⁶	10 ⁻³	10 ⁻³	10 ⁻³
	PV-1	Reference Sabin	10 ⁶	10 ⁻¹	1	10
	PV-2	Reference Sabin	10 ⁶	10 ⁻²	10 ⁻¹	10 ⁻¹
	PV-3	Reference Sabin	5 × 10 ⁶	10 ⁻²	1	1
HEV-D	EV-D70	Reference J670/71	10 ⁷	10 ⁻²	10	10 ⁻¹

NC, non-coding region; TCID₅₀, 50% tissue culture infectious dose.
*Strain previously characterized [17].

HOP method [6]. Overall, 35, 29 and 34 specimens were shown to be typeable with both methods, typeable with only one method, or untypeable, respectively. The 35 specimens that were typeable with both methods showed the same genotype in all cases (one CV-A4, one CV-A6, one CV-A10, seven CV-B2, two CV-B5, 11 E-6, four E-11, one E-16, one E-18, four E-30, and two EV-D68). The agreement between the typing methods was 70.4% ($p < 0.001$, Cohen kappa coefficient of 0.41, 95% CI 0.23–0.59). The sensitivities of the typing methods were very similar (48.0% and 53.1% for VP1 and VP2, respectively; not significant by the chi-square test).

Prospective evaluation of the CODEHOP VP2 typing method over a period of 3 years

A panel of 352 consecutive clinical specimens found to be positive for the EV genome over a period of 3 years (2010–2012) with two different commercial detection kits was used for evaluation of the VP2 method. Overall, 204 clinical specimens were shown to be typeable (58.0%); for the assigned type, all of them showed high nucleic acid homology (>75%) with at least one of the corresponding sequences available in GenBank by BLAST alignment. The detailed results are shown in Table 2 (distribution of specimens by year and by

TABLE 2. Efficacy of typing of the VP2 typing method on 352 clinical specimens recovered between 2010 and 2012

Origin (5'NC detection method used)	Year						Total	
	2010		2011		2012		Total	Total
	Typed (%)	Total	Typed (%)	Total	Typed (%)	Total		
CSF (GeneXpert)	14 (37.8)	37	32 (45.7)	70	21 (67.7)	31	67 (48.6)	138
CSF (R-gene)	6 (54.5)	11	7 (41.2)	17	3 (100)	3	16 (51.6)	31
Throat (R-gene)	21 (61.8)	34	29 (65.9)	44	19 (65.5)	29	69 (64.5)	107
Stools (R-gene)	3 (75.0)	4	8 (72.7)	11	14 (70.0)	20	25 (71.4)	35
Other* (R-gene)	8 (66.7)	12	8 (57.1)	14	11 (73.3)	15	27 (65.8)	41
Total	52 (53.1)	98	84 (53.8)	156	68 (69.4)	98	204 (58.0)	352

CSF, cerebrospinal fluid; NC, non-coding region.
*Blood, respiratory samples, and cutaneous swabs.

origin of specimen) and Table 3 (list of EV genotypes by year of recovery). With regard to specimen origin, a higher proportion of throat/stool specimens than of CSF specimens was found to be typeable (94 of 142 (66.2%) vs. 83 of 169 (49.1%), $p < 0.01$ by the chi-square test). Regarding CSF, Table 2 shows poor performance of VP2 typing for samples found to be positive in 2010 with the GeneXpert test; this is attributable, at least in part, to a few strains of E-11 being missed with this method but not with the VPI method (data not shown).

In the light of the latter results, the sensitivity of the typing method was suspected to be related to the viral loads in the different clinical specimens. As shown in Fig. 2, the median C_t value obtained with the screening 5'NC methods was lower for typeable specimens than for untypeable specimens. A receiver operating characteristic curve could be traced for the R-gene test; it allowed the determination of threshold values of 20, 23, 26 and 32 for typeabilities of 90%, 75%, 50% and 10%, respectively.

Discussion

With reference and clinical strains, the newly described CODEHOP VP2 method was shown to be more sensitive and specific (fewer interfering bands) than the original VP2 method previously described in our laboratory [17]. This method showed at least the same sensitivity, and even better sensitivity, than the VPI reference method [6] on different strains belonging to the four species of EV, except for the PV-1 vaccine strain.

TABLE 3. Genotypes detected in the 204 clinical specimens that could be typed with the VP2 method

Genotype	Year			Total
	2010	2011	2012	
CV-A2	0	1	0	1
CV-A4	2	0	3	5
CV-A6	3	6	11	20
CV-A10	3	0	3	6
CV-A16	0	0	1	1
EV-A71	0	0	1	1
CV-B1	0	0	1	1
CV-B2	10	1	0	11
CV-B3	0	1	0	1
CV-B4	0	1	22	23
CV-B5	2	2	10	14
E-2	0	2	0	2
E-4	2	0	0	2
E-5	0	0	1	1
E-6	13	56	0	69
E-7	0	3	2	5
E-9	0	3	6	9
E-11	4	1	1	6
E-16	3	0	0	3
E-17	1	0	0	1
E-18	1	1	2	4
E-25	1	2	4	7
E-30	4	4	0	8
EV-D68	3	0	0	3

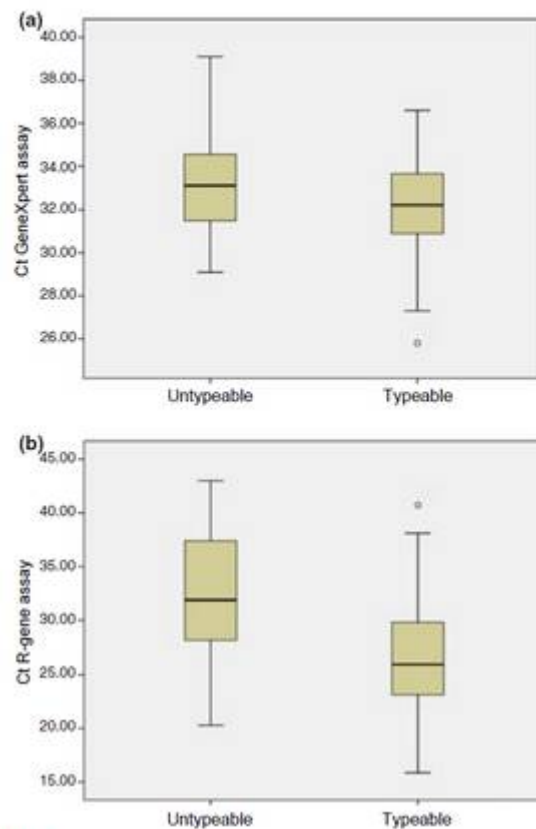


FIG. 2. Box plots comparing the C_t values obtained with (a) the GeneXpert test and (b) the R-gene test targeting the 5'NC region in two groups of samples according to their typeability by use of the VP2 method. The median C_t value obtained was lower for typeable samples than for untypeable ones (32.20 vs. 33.01, $p < 0.05$ for the GeneXpert test, and 25.96 vs. 31.74, $p < 0.001$ for the R-gene test, by use of the Mann-Whitney-Wilcoxon test).

Following these encouraging results and by analogy with the VPI strategy using CODEHOP primers [6], we prospectively evaluated the capacity of the CODEHOP VP2 method to be used for EV typing without any culture step on a large panel of clinical specimens found to be positive with sensitive RT-PCR assays based on the 5'NC region. Globally, a genotype could be assigned to 58.0% of the specimens, with a clear relationship between the ability to type and the viral load. The overall sensitivity of the methods targeting the four A to D species of human EV on clinical specimens without cell culture amplification is not very high (approximately 50%), even when CODEHOP degenerated primers are used ([23] (this study)). Several studies have reported higher typing performance either with a panel of specimens containing exclusively EV-B strains [24,25] or with species B-specific primers [9,11,13,26–

29]. In the light of these considerations, two strategies could be proposed for EV typing in human specimens. The first would consist of starting with a method covering a large spectrum of EV types, as shown in this study, and retesting the negative specimens with species-specific primers chosen according to clinical and epidemiological data, whereas the second would consist of starting with species-specific primers (notably EV-B species), and retesting the untypeable specimens with a CODEHOP method covering the whole range of EV types. Moreover, from an epidemiological point of view, obtaining an exhaustive picture of all of the circulating genotypes of EV is not realistic. However, the typing method must be able to detect almost uniformly all of the different types of EV.

The results from the present study, notably those shown in Fig. 2, suggest that the capacity for a specimen to be typed is related to its viral load. CSF specimens, which are known to show low viral loads [7,30], were found herein to give a typing result in c. 50% of the tested specimens; by contrast, 66% of the other specimens were found to be typeable with the same strategy. Consequently, the initial viral load observed with the screening 5'NC technique could be used to determine which strategy has a higher probability of giving a positive typing result. In CSF specimens and in peripheral specimens with low viral loads, the methods using species-specific primers could be recommended first, whereas the CODEHOP method targeting the VP2 region could be preferred on samples with high viral loads (a threshold of 23 with the R-gene test was shown to allow the typing of 75% of the samples in this study). In the case of EV neurological disease, it is suggested to use a peripheral specimen (throat swab or stools) as well as a CSF specimen, to increase the chance of typing the causative EV strain with the VP2 method. Even if it is preferable to use CSF to firmly identify the type responsible for a neurological disease, the use of peripheral specimens has already been recommended for diagnostic purpose [27,31–33].

In conclusion, the newly described VP2 typing method with CODEHOP primers was shown to be a good alternative to the reference method targeting the VP1 region for characterizing EV strains without cell culture isolation, at least in those clinical specimens with high viral loads. Large multicentre studies are needed to evaluate the place of this new typing method among the different strategies that are emerging with the increased use of molecular biology in the field of EV epidemiology.

Acknowledgements

W. Ibrahim was supported by a grant from the Rhône-Alpes region (MIRA programme between Tunisia and France). The

authors thank F. Delpeyroux for his advice and encouragement in the conduct of this project.

Author Contributions

W. Ibrahim: performed most of the experiments. N. Boukhadra, D. Nasri-Zoghalmi, and S. Pillet: set up the CODEHOP VP2 typing method. P. Berthelot: performed the statistical analysis and contributed to analysis of the results. S. Omar, T. Bourlet, and S. Pillet: participated in the epidemiological surveillance of EV over the 3-year period. B. Pozzetto and S. Pillet: conceived the research, designed the study, analysed the results, and wrote the paper.

Transparency Declaration

The authors have no conflicts of interest to declare.

References

- Racaniello VR. *Picornaviridae: the viruses and their replication*. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields virology*, 5th edn. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2007: 795–838.
- Ooi MH, Wong SC, Lewthwaite P, Cardosa MJ, Solomon T. Clinical features, diagnosis, and management of enterovirus 71. *Lancet Neurol* 2010; 9: 1097–1105.
- Adams MJ, King AMQ, Carstens EB. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2013). *Arch Virol* 2013; 158: 2023–2030.
- Knowles NJ, Hovi T, Hyypia T et al. *Picornaviridae*. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego, CA: Elsevier, 2012: 855–880.
- Nasri D, Bouslama L, Pillet S, Bourlet T, Aouni M, Pozzetto B. Basic rationale, current methods and future directions for molecular typing of human enterovirus. *Expert Rev Mol Diagn* 2007; 7: 419–434.
- Nix WA, Oberste MS, Pallansch MA. Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 2698–2704.
- Oberste MS, Penaranda S, Rogers SL, Henderson E, Nix WA. Comparative evaluation of Taqman real-time PCR and semi-nested VP1 PCR for detection of enteroviruses in clinical specimens. *J Clin Virol* 2010; 49: 73–74.
- Rose TM, Schultz ER, Henikoff JG, Pietrokovski S, McCallum CM, Henikoff S. Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences. *Nucleic Acids Res* 1998; 26: 1628–1635.
- Iturriza-Gómara M, Megson B, Gray J. Molecular detection and characterization of human enteroviruses directly from clinical samples using RT-PCR and DNA sequencing. *J Med Virol* 2006; 78: 243–253.
- Mirand A, Archimbaud C, Henquell C et al. Prospective identification of HEV-B enteroviruses during the 2005 outbreak. *J Med Virol* 2006; 78: 1624–1634.

11. Mirand A, Henquell C, Archimbaud C et al. Prospective identification of enteroviruses involved in meningitis in 2006 through direct genotyping in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 87–96.
12. Oberste MS, Maher K, Williams AJ et al. Species-specific RT-PCR amplification of human enteroviruses: a tool for rapid species identification of uncharacterized enteroviruses. *J Gen Virol* 2006; 87: 119–128.
13. Thoelen I, Lemey P, Van Der Donck I, Beuselinck K, Lindberg AM, Van Ranst M. Molecular typing and epidemiology of enteroviruses identified from an outbreak of aseptic meningitis in Belgium during the summer of 2000. *J Med Virol* 2003; 70: 420–429.
14. Rose TM. CODEHOP-mediated PCR—a powerful technique for the identification and characterization of viral genomes. *Viol J* 2005; 2: 20.
15. Baines JE, McGovern RM, Persing D, Gostout BS. Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers (CODEHOP) for the detection of novel papillomaviruses and their application to esophageal and tonsillar carcinomas. *J Virol Methods* 2005; 123: 81–87.
16. Oberste MS, Nix WA, Maher K, Pallansch MA. Improved molecular identification of enteroviruses by RT-PCR and amplicon sequencing. *J Clin Virol* 2003; 26: 375–377.
17. Nasri D, Bouslama L, Omar S et al. Typing of human enterovirus by partial sequencing of VP2. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 2370–2379.
18. Kost CB, Rogers B, Oberste MS et al. Multicenter beta trial of the GeneXpert enterovirus assay. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 1081–1086.
19. Pillet S, Billaud G, Omar S, Lina B, Pozzetto B, Schuffenecker I. Multicenter evaluation of the ENTEROVIRUS R-gene real-time RT-PCR assay for the detection of enteroviruses in clinical specimens. *J Clin Virol* 2010; 47: 54–59.
20. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990; 215: 403–410.
21. Oberste MS, Michele SM, Maher K et al. Molecular identification and characterization of two proposed new enterovirus serotypes, EV74 and EV75. *J Gen Virol* 2004; 85: 3205–3212.
22. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 2007; 23: 2947–2948.
23. Kumar A, Shukla D, Kumar R et al. Molecular identification of enteroviruses associated with aseptic meningitis in children from India. *Arch Virol* 2013; 158: 211–215.
24. Brunel D, Lévêque N, Jacques J, Renois F, Motte J, Andréoletti L. Clinical and virological features of an aseptic meningitis outbreak in North-Eastern France, 2005. *J Clin Virol* 2008; 42: 225–228.
25. Kumar A, Shukla D, Kumar R, Idris MZ, Misra UK, Dhole TN. Molecular epidemiological study of enteroviruses associated with encephalitis in children from India. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 3509–3512.
26. Cabrerizo M, Echevarria JE, González I, de Miguel T, Trallero G. Molecular epidemiological study of HEV-B enteroviruses involved in the increase in meningitis cases occurred in Spain during 2006. *J Med Virol* 2008; 80: 1018–1024.
27. Leitch ECM, Harvala H, Robertson I, Ubbilos I, Templeton K, Simmonds P. Direct identification of human enterovirus serotypes in cerebrospinal fluid by amplification and sequencing of the VP1 region. *J Clin Virol* 2009; 44: 119–124.
28. Mirand A, Henquell C, Archimbaud C et al. Outbreak of hand, foot and mouth disease/herpangina associated with coxsackievirus A6 and A10 infections in 2010, France: a large citywide, prospective observational study. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18: E110–E118.
29. Tavakoli NP, Wang H, Nattanmai S, Dupuis M, Fusco H, Hull R. Detection and typing of enteroviruses from CSF specimens from patients diagnosed with meningitis/encephalitis. *J Clin Virol* 2008; 43: 207–211.
30. Volle R, Nourrisson C, Mirand A et al. Quantitative real-time RT-PCR assay for research studies on enterovirus infections in the central nervous system. *J Virol Methods* 2012; 185: 142–148.
31. Foray S, Pailloud F, Thouvenot D, Floret D, Aymard M, Lina B. Evaluation of combining upper respiratory tract swab samples with cerebrospinal fluid examination for the diagnosis of enteroviral meningitis in children. *J Med Virol* 1999; 57: 193–197.
32. Pallansch M, Roos R. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields virology*, 5th edn. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2007: 839–893.
33. Siafakas N, Attilakos A, Vourli S et al. Molecular detection and identification of enteroviruses in children admitted to a university hospital in Greece. *Mol Cell Probes* 2011; 25: 249–254.

1.3 Données complémentaires

1.3.1 Comparaison VP1/VP2 sur les prélèvements de 2010

La sensibilité de la nouvelle technique VP2 a été comparée à celles du kit enterovirus R-Gene ciblant la région 5'NC et de la technique de typage VP1 CODEHOP de Nix (Nix *et al.*, 2006) sur des dilutions de 10 en 10 de 14 souches d'EVs appartenant aux 4 espèces isolées chez l'homme (souches de référence ou souches cliniques). Les résultats figurent dans le **Tableau 5**, pages suivantes. Les deux méthodes de typage ont été moins sensibles que le test R-Gene, à l'exception de la souche CV- A21 pour laquelle la technique VP2 était plus sensible de 1 log₁₀. La technique VP2 a été plus sensible que la méthode VP1 pour 6 souches (CV- A9, E-4, E-11, E-30, CV- A21 et EV- D70) et aussi sensible que cette dernière pour 7 souches (CV-A16, EV- A71, E-17, CV-B3, CV- A24, PV-2 et PV- 3). En revanche, elle a été moins sensible que VP1 de 1 log₁₀ pour PV-1.

Une autre étude préliminaire a été effectuée sur 98 échantillons cliniques trouvés positifs pour la présence de génome d'EV en 2010 : le test VP2 a été comparé à la méthode de référence VP1 CODEHOP (Nix *et al.*, 2006). Les résultats figurent dans le **Tableau 6**.

Tableau 6 : Comparaison des résultats de typage par VP1 et VP2 sur 98 prélèvements cliniques dans lesquels du génome entéroviral a été détecté.

	Méthode de typage VP1		
	positif	négatif	total
Positif	35	17	52
Négative	12	34	46
Total	47	51	98

Dans l'ensemble, 35, 29 et 34 échantillons se sont avérés typables par les deux techniques, typables par une seule technique ou non typables, respectivement. L'accord entre les deux techniques de typage a été de 70,4 % ($P < 0,001$, coefficient kappa de Cohen = 0,41, IC 95 % [0,23 ; 0,59]). La sensibilité des deux méthodes de typage était très proche (48,0% et 53,1% pour VP1 et VP2, respectivement ; NS par le test du χ^2).

Les 35 échantillons typables par les deux techniques ont montré le même génotype dans tous les cas (1 CV- A4, 1 CV- A6, 1 CV- A10, 7 CV- B2, 2 CV- B5, 11 E- 6, 4 E-11, 1 E-16, 1 E-18, 4 E-30 et 2 EV-D68).

Le **Tableau 7**, pages suivantes, montre le détail des résultats des échantillons trouvés discordants par les deux tests. Vingt-neuf échantillons présentant des résultats discordants, dont 5 souches appartenant à l'espèce A, n'ont pas pu être typés par la méthode VP1 alors que 9 souches d'E-11 n'ont pas pu être typées par la méthode VP2. La non-reconnaissance de certaines souches d'E-11 par le système VP2 est approfondie au paragraphe suivant.

1.3.2 Problème des E-11 non détectés par la méthode VP2

L'analyse phylogénétique des séquences VP1 d'E-11 a montré que les 13 souches circulant dans la région de Saint-Etienne en 2010 appartenaient au même cluster (à l'exception de la souche SE-10-40325 qui était légèrement différente). Ces souches se rapprochent génétiquement du génogroupe D5 (**Figure 28**, panneau de droite, pages suivantes) qui est le génogroupe majoritaire circulant ces dernières années dans le monde (McWilliam Leitch *et al.*, 2010 ; Fares *et al.*, 2011). Les quatre séquences qui ont été obtenues dans la région VP2 appartiennent également au génogroupe D5 (**Figure 28**, panneau de gauche, pages suivantes). Ces résultats suggèrent que la non détection par la méthode VP2 de certains EV de type E-11 n'est pas liée à la circulation d'une souche variante, mais éventuellement à l'amplification parasite de séquences humaines du chromosome 19 pour ces 9 échantillons (**Figure 29**).

1.3.3 Identification d'un nouveau variant d'E-6

Un nouveau variant d'E-6 a été mis en évidence lors d'une épidémie de grande envergure au cours de l'année 2011. Ce variant a été identifié à la fois par la technique VP1 utilisée dans d'autres laboratoires français et notamment au centre de référence des EV de Lyon et Clermont-Ferrand (**Figure 30**, panneau

de gauche) et par la technique VP2 utilisée dans notre laboratoire (**Figure 30**, panneau de droite). Ces résultats montrent que la technique VP2 est apte à détecter un nouveau variant au même titre que la technique VP1.

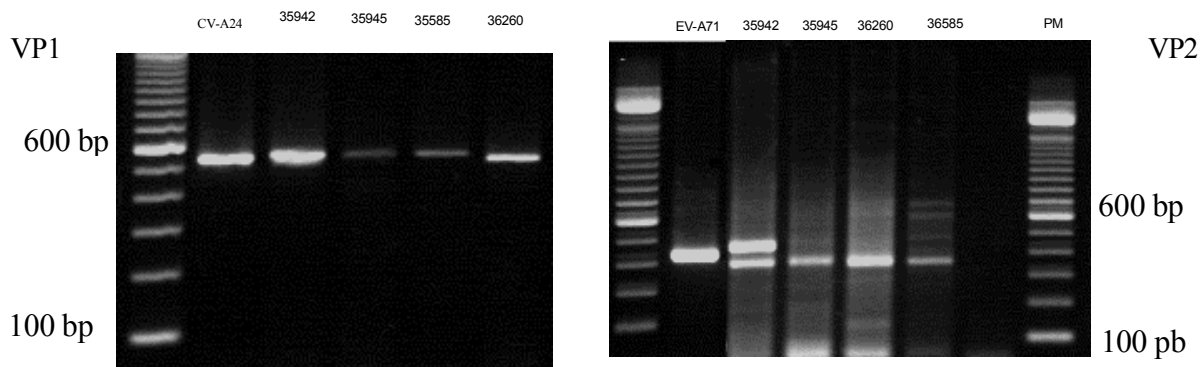


Figure 29 : Electrophorégrammes montrant les amplicons obtenus pour une souche de référence (CV-A24 à gauche et EV-A71 à droite) et 4 échantillons cliniques séquencés comme E-11 par le test VP1 et non typés par le test VP2 (qui a amplifié en lieu et place une séquence de chromosome 19 humain). Le gel de gauche correspond au typage VP1 et celui de droite au typage VP2.

Tableau 5 : Sensibilité analytique de la nouvelle méthode de géotypage VP2 en comparaison avec celle du kit R-gene enterovirus et de la méthode de géotypage VP1 (Nix *et al.*, 2006) sur différentes souches d'entérovirus prototypes ou cliniques.

Species	Serotypes	Strain	Titre (TCID ₅₀ /50µl)	Lowest detectable titre (TCID ₅₀ /50 µl)		
				Detection by targeting the 5'NC region (R-gene assay)	Genotyping by targeting the VP1 region [6]	Genotyping by targeting the VP2 region
HEV-A	CV-A16	Reference G-10	10 ⁶	10 ⁻²	10 ⁻¹	10 ⁻¹
	EV-A71	Reference BrCr	10 ⁵	10 ⁻²	10 ⁻¹	10 ⁻¹
HEV-B	CV-A9	Clinical isolate SE-81-3363 ^a	10 ⁵	10 ⁻²	10 ⁻¹	10 ⁻²
	E-4	Clinical isolate (1980)	10 ⁶	10 ⁻¹	1	10 ⁻¹
	E-11	Clinical isolate SE-02-70530 ^a	10 ⁶	1	10	1
	E-17	Clinical isolate SE-99-94960 ^a	10 ³	10 ⁻⁴	10 ⁻¹	10 ⁻¹
	CV-B3	Clinical isolate (1995)	5 10 ⁶	10 ⁻²	10 ⁻¹	10 ⁻¹
	E-30	Reference Bastianni	5 10 ⁴	10 ⁻³	10 ⁻²	10 ⁻³
	HEV-C	CV-A21	Reference Kuykendall	5 10 ⁵	10 ⁻¹	10 ⁻¹
	CV-A24	Reference Joseph	10 ⁴	10 ⁻³	10 ⁻³	10 ⁻³
	PV-1	Reference Sabin	10 ⁶	10 ⁻¹	1	10
	PV-2	Reference Sabin	10 ⁶	10 ⁻²	10 ⁻¹	10 ⁻¹
	PV-3	Reference Sabin	5 10 ⁶	10 ⁻²	1	1
HEV-D	EV-D70	Reference J670/71	10 ⁵	10 ⁻²	10	10 ⁻¹

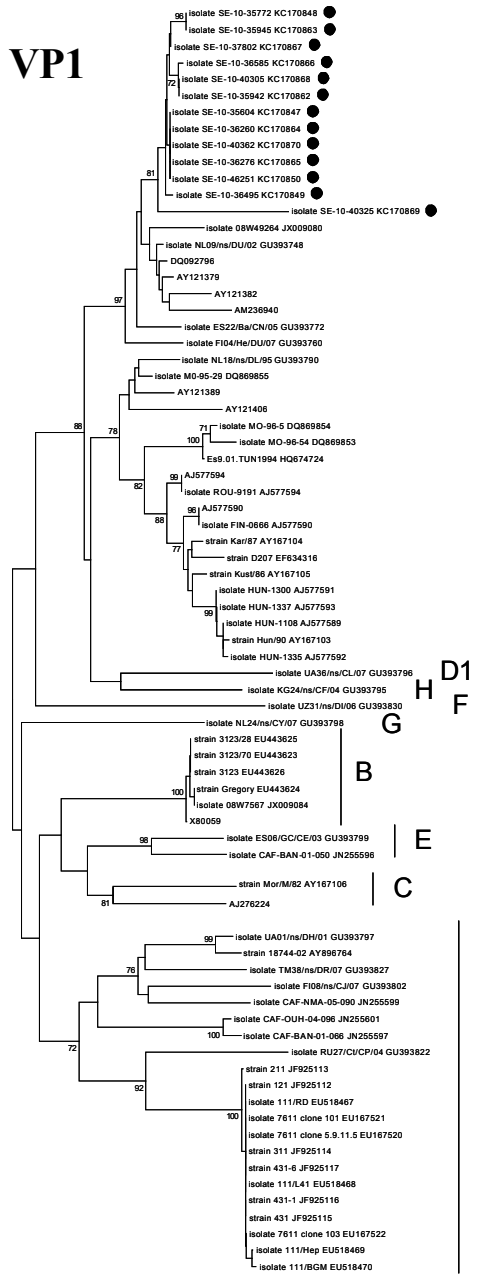
^a strain previously characterized (Nasri *et al.*, 2007b). TCID₅₀: Tissue Culture Infectious Dose 50%.

Tableau 7: Liste des échantillons montrant des discordances de typage. Les scores d'identité ont été calculés par référence à la souche prototype (<http://www.picornaviridae.com>) et à la souche présentant la plus forte homologie avec le logiciel BLAST.

Typing method that succeeded	Specimen identification	Genbank accession No.	Species	Specimen material	Comparison with:						
					the prototype strain			the strain exhibiting the highest score with BLAST			
					Genotype	Genbank accession No.	% nucleotide identity	Genotype	Genbank accession No.	% nucleotide identity	
VP2 only	SE-10-40388	KC170807	EV-A	NPA	CV-A4	AY421762	82.7	CV-A4	FJ530953	90.1	
	SE-10-36957	KC170808	EV-A	Throat swab	CV-A6	AY421764	80.1	CV-A6	JQ946051	89.7	
	SE-10-41388	KC170809	EV-A	Throat swab	CV-A6	AY421764	82.2	CV-A6	JQ946051	91.4	
	SE-10-36449	KC170810	EV-A	Blood	CV-A10	AY421767	74.2	CV-A10	HQ728262	80.9	
	SE-10-37483	KC170811	EV-A	Throat swab	CV-A10	AY421767	72.7	CV-A10	HQ728262	80.2	
	SE-10-36488	KC170812	EV-B	Throat swab	CV-B2	AF081485	80.5	CV-B2	DQ869749	92.5	
	SE-10-36577	KC170813	EV-B	Throat swab	CV-B2	AF081485	80.7	CV-B2	DQ869749	92.9	
	SE-10-36720	KC170814	EV-B	Blood	CV-B2	AF081485	81.0	CV-B2	DQ869749	92.9	
	SE-10-38356	KC170815	EV-B	CSF	E-4	AY302557	77.7	E-4	AF222977	81.6	
	SE-10-38406	KC170816	EV-B	Throat swab	E-4	AY302557	76.5	E-4	AF222977	81.0	
	SE-10-40701	KC170817	EV-B	CSF	E-6	AY302558	77.9	E-6	AY896761	82.5	
	SE-10-40804	KC170818	EV-B	Throat swab	E-6	AY302558	77.9	E-6	AY896761	82.1	
	SE-10-36708	KC170819	EV-B	CSF	E-16	AY302542	82.1	E-16	AY302542	82.1	
	SE-10-37277	KC170820	EV-B	CSF	E-16	AY302542	81.8	E-16	AY302542	81.8	
	SE-10-36762	KC170821	EV-B	CSF	E-17	AY302543	79.6	E-17	DQ869724	88.6	
	SE-10-38998	KC170822	EV-B	Throat swab	E-25	AY302549	78.2	E-25	HM031191	94.3	
	SE-10-39097	KC170823	EV-D	Throat swab	EV-D68	AY426531	84.4	EV-D68	JX070222	94.4	
	VP1 only	SE-10-42117	KC170859	EV-A	Throat swab	CV-A16	U05876	77.5	CV-A16	GQ429240	96.1
		SE-10-35497	KC170860	EV-B	Throat swab	CV-B5	AF114383	76.6	CV-B5	AM711052	95.8
		SE-10-40868	KC170861	EV-B	CSF	CV-B5	AF114383	76.9	CV-B5	GQ352398	95.8
SE-10-35942		KC170862	EV-B	NPA	E-11	X80059	76.8	E-11	GU393726	96.3	
SE-10-35945		KC170863	EV-B	CSF	E-11	X80059	75.9	E-11	GU393726	93.0	
SE-10-36260		KC170864	EV-B	CSF	E-11	X80059	76.3	E-11	GU393726	94.0	
SE-10-36276		KC170865	EV-B	Throat swab	E-11	X80059	75.6	E-11	GU393726	93.3	
SE-10-36585		KC170866	EV-B	Throat swab	E-11	X80059	76.5	E-11	GU393726	94.1	
SE-10-37802		KC170867	EV-B	Throat swab	E-11	X80059	76.7	E-11	GU393726	94.4	
SE-10-40305		KC170868	EV-B	Throat swab	E-11	X80059	76.5	E-11	GU393726	94.0	
SE-10-40325		KC170869	EV-B	CSF	E-11	X80059	70.9	E-11	GU393726	87.1	
SE-10-40362		KC170870	EV-B	NPA	E-11	X80059	75.4	E-11	GU393726	92.7	

CSF: Cerebrospinal fluid; NPA: Nasopharyngeal aspirate.

VP1



VP2

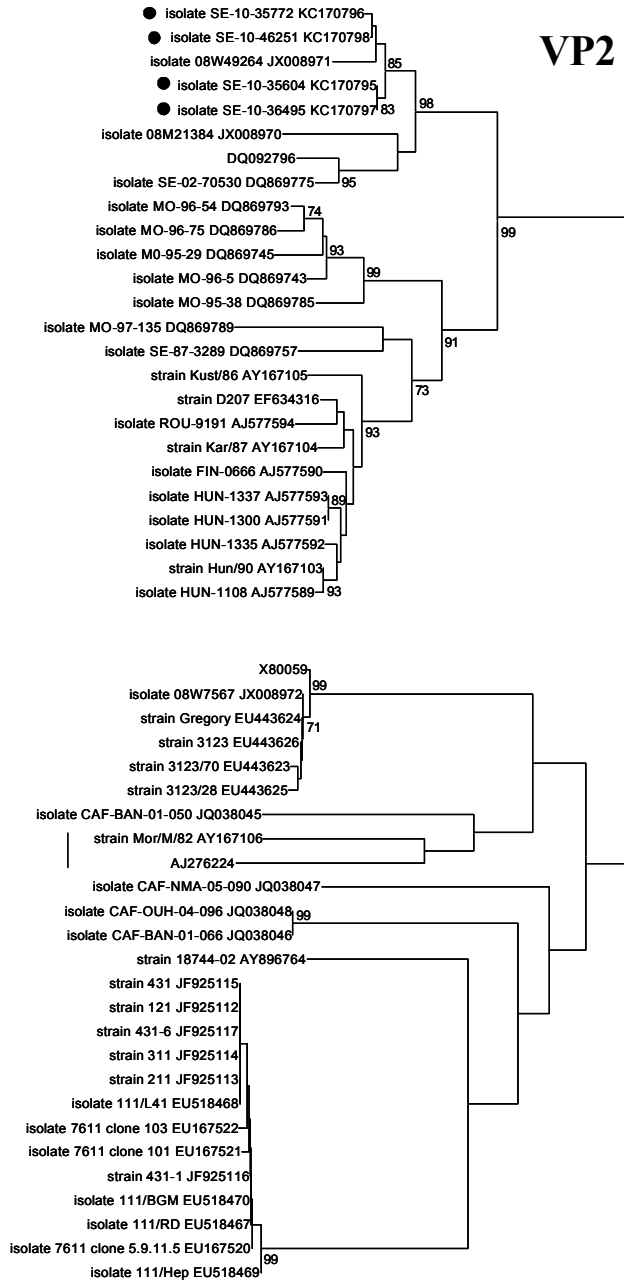
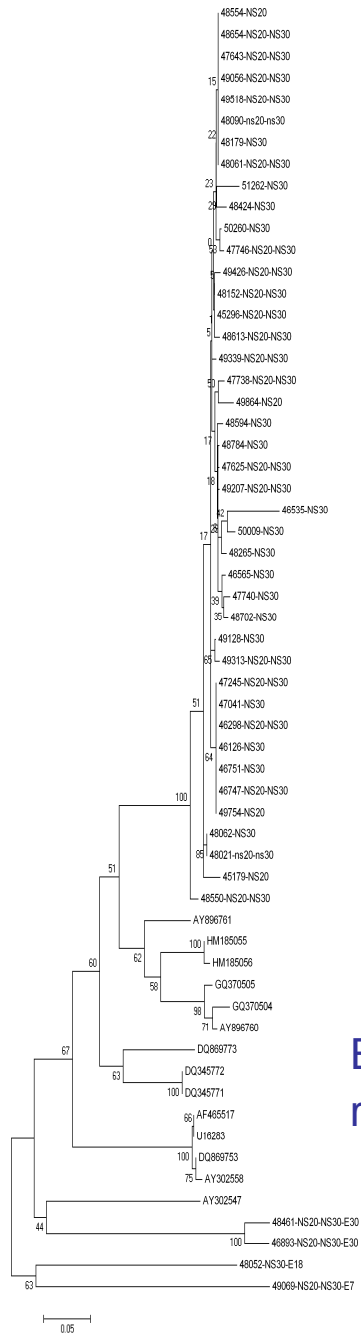


Figure 28 : Analyse phylogénétique de VP1 (arbre de gauche) et VP2 (arbre de droite) des séquences de souches d'entérovirus de sérotype E-11. Les lettres (certaines avec un chiffre) correspondent aux différents génogroupes d'E-11. Les souches notées • sont celles qui ont été typées dans cette étude ; elles appartiennent toutes au génogroupe D5.



Epidémie
2011

E-6 de
ref/Genbank

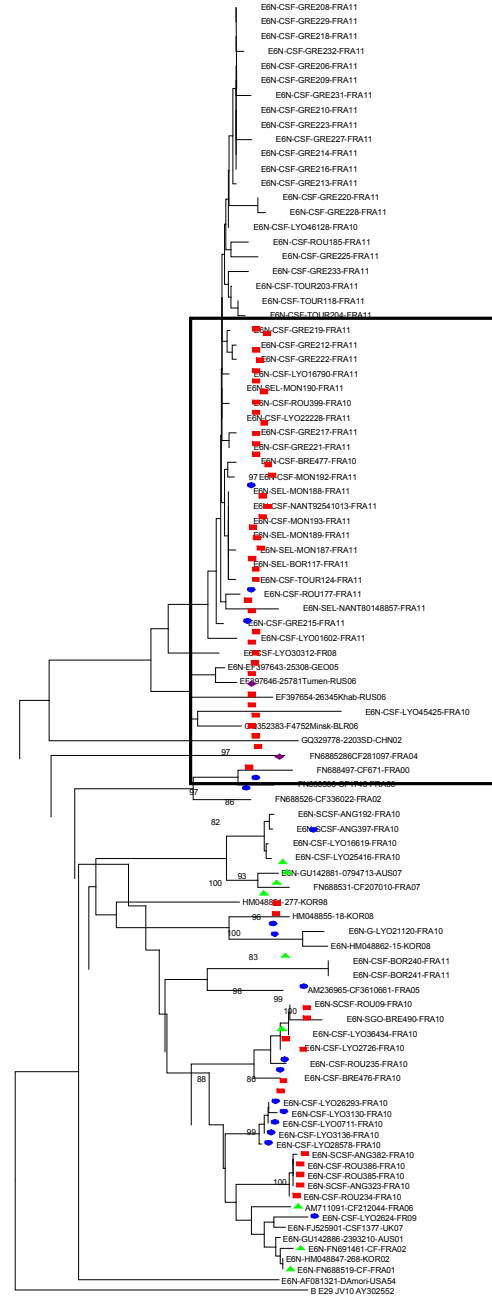


Figure 30 : Analyse phylogénétique de VP1 (arbre de gauche) et VP2 (arbre de droite) des séquences d'entérovirus de sérotype E6.

ARTICLE 2

**Validation de la technique VP2 sur les
prélèvements environnementaux**

1 Résumé de l'article 2

Ce travail de typage moléculaire a évalué la nouvelle technique de typage VP2 décrite ci-dessus sur des échantillons environnementaux en comparaison avec la technique de référence VP1 de Nix (Nix *et al.*, 2006). Cette partie environnementale de l'étude a été réalisée sur 172 prélèvements environnementaux d'eaux usées qui ont été prélevés dans différentes régions de Tunisie. Sur les 172 échantillons testés, 52 prélèvements (30,23%) ont été détectés positifs à l'aide de la technique ciblant la région 5'NC. En utilisant les deux techniques de typage moléculaire ciblant deux régions différents VP1 et VP2 par la stratégie CODEHOP, 33 prélèvements sur 52 (63,46%) ont été trouvés négatifs et seulement 19 prélèvements ont été trouvés positifs par au moins une technique de typage avec la proportion suivante: VP1 (-) / VP2 (+) = 13 (25 %) ; VP1 (+) / VP2 (-) = 2 (3,84 %) et VP1 (+) / VP2 (+) = 4 (7,7 %).

2 Présentation de l'article 2

Direct typing of human enteroviruses from wastewater samples (soumis à J. Virol. Methods).

Direct typing of human enteroviruses from wastewater samples

Wafa Ibrahim^{1,2}, Imène Ouerdani¹, Sylvie Pillet², Mahjoub Aouni¹, Bruno Pozzetto*², Rafik Harrath¹

¹Laboratory of Transmissible Diseases and Biologically Active Substances, Faculty of Pharmacy, Monastir, Tunisia,

²Laboratory of Bacteriology and Virology, University Hospital of Saint-Etienne, Saint-Etienne, France,

* Corresponding author: Pr. Bruno Pozzetto

Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène

Hôpital Nord

Centre Hospitalier Universitaire de Saint-Etienne

F-42055 Saint-Etienne Cedex 02, France

Tel: 33 4 77 82 84 34

Fax: 33 4 77 82 84 60

E-mail: bruno.pozzetto@univ-st-etienne.fr

Abstract

A RT-PCR approach for the direct detection and typing of human enteroviruses in the environment is described herein. A semi-nested RT-PCR using COnsensus-DEgenerated Hybrid Oligonucleotide Primers (CODEHOP) designed from the *VP2* genome region has been developed for the direct typing of enteroviruses in clinical samples (Ibrahim et al., 2014). This CODEHOP/*VP2* PCR strategy as well as the CODEHOP/*VP1* technique described by Nix et al. in 2006, were tested comparatively for the detection and typing of enteroviruses in 172 wastewater samples. Virus particles were first extracted and concentrated from wastewater samples by using respectively beef extract and polyethylene glycol 6000, and the presence of enteroviruses was screened by a RT-PCR method using primers from the 5'-end non coding region (5'NCR). Fifty-two of 172 samples (30.23%) were revealed positive by the 5'NCR method. From these 52 samples, only 19 samples (36.54%) were found positive by at least one of the two CODEHOP techniques, with the following distribution: $VP1(+)/VP2(+)$ = 4 (7,7%), $VP1(-)/VP2(+)$ = 13 (25%) and $VP1(+)/VP2(-)$ = 2 (3,84%). These results illustrate that the direct typing of enteroviruses in environmental samples is insensitive, possibly due to the presence of large amounts of amplification inhibitors; however, the *VP2* method was found able to allow the direct detection and typing of *c.* one third of the positive environmental samples.

Key-words: enteroviruses, wastewater, environment, RT-PCR, CODEHOP.

Introduction

The presence of infectious agents in water environment is a key determinant for the evaluation of the level of microbiological pollution, with major impacts on the control of the faecal risk for human and animal health. For this purpose, the detection of coliforms is usually required but it is a poor reflect of viral contamination (Noble & Furhman, 2001). For evaluating the latter risk, different markers have been proposed, including notably bacteriophages, enteroviruses (EVs) and adenoviruses (Fong & Lipp, 2005; Gantzer et al., 1998; Hot et al., 2003; Metcalf et al., 1995).

EVs are small non enveloped RNA viruses belonging to the *Picornaviridae* family and displaying a high genetic diversity (more than 100 genotypes distributed in four species in humans). They are highly resistant in the water environment that can retain their infectivity for months (Fong & Lipp, 2005; Rajtar et al., 2008; Wetz et al., 2004). The advantage of EVs as a marker of viral contamination of wastewaters is that some genotypes are relatively easy to cultivate in cell culture, which is still the reference method in terms of environmental surveillance (Ehlers et al., 2005). However, this technique is time-consuming, difficult to standardize and not easy to implement in all the environmental laboratories. During the last ten years, molecular methods were proposed for supplanting cell culture in environmental samples, notably for the detection of EV genome (Bosch et al., 2008; Metcalf et al., 1995; Rajtar et al., 2008).

By contrast to cell culture, one of the limits of current molecular methods using primers located in the 5' end non coding region (5'NCR) of the viral genome, which is highly conserved within the *Enterovirus* genus, is the difficulty for further typing the EV sequences detected in environmental samples. Indeed, typing EV strains present in wastewaters may be an important goal, notably for tracing the presence of polio strains in areas where these agents are still in circulation (Hovi et al., 2012), but also for epidemiological purposes (e.g. establishment of a

relationship between genotypes present in wastewaters and those responsible for epidemic episodes in humans) (Khetsuriani et al., 2010; Richter et al., 2011).

In this study, we evaluated a newly described typing method of EVs targeting the VP2 region of the viral genome (Ibrahim et al., 2013) for detecting and typing EVs in wastewater samples. By contrast to methods using primers located in the 5'NCR, this method permits the direct typing of EVs after sequencing of the amplicons. It was evaluated in comparison to a current PCR method targeting the 5'NCR and to another typing method targeting the VP1 gene that can be considered as the gold standard for typing EVs (Nix et al., 2006).

Materials and methods

1. Virus recovery from wastewater samples

One hundred and seventy two samples of wastewater were collected from stations of water treatment in different regions of Tunisia. Samples were added to 1 % (v/v) of 0.05 M aluminum chloride and adjusted to pH 3.5 with HCl. The mixture was homogenized for 30 min then centrifuged at 2500 g for 15 min at 4°C. The pellet was resuspended in 100 ml of 10 % beef extract (Oxoid, Basingstoke, UK) and adjusted to pH 7. The mixture was homogenized again and centrifuged at 10 000 g for 30 min at 4°C. The supernatant was used for virus detection.

2. Concentration of virus suspensions

Virus particles recovered from wastewater samples were concentrated by precipitation with polyethylene glycol (PEG) 6000 (Prolabo, Fontenay sous Bois, France), as previously described (Lewis & Metcalf, 1988). In brief, suspensions were mixed with 5 % (v/ v) PEG 6000 and incubated at 4°C overnight. The mixtures were then centrifuged at 10000 g for 45 min. The pellet was resuspended in 10 ml of 0.1 M phosphate buffer pH 7.2 and then filtered through a 0.22 µm Millex-GS membrane (Millipore, Molsheim, France). The suspension was either treated immediately or stored at -20°C until use.

3. RNA extraction

For RNA extraction, 100 µl of the previous suspension were homogenized in 900 µl of TRI-Reagent (Sigma, St-Louis, MO) and incubated for 5 min at room temperature. The mixture was centrifuged at 12000g for 10 min at 48°C to remove insoluble debris. The supernatant was then added to 200 ml of chloroform and incubated for 15 min at room temperature. After centrifugation at 48°C for 15 min at 12000g, the aqueous phase containing RNA was precipitated with 500 µl of isopropanol for 10 min at room temperature. After centrifugation as

above, the pellet was washed once in 1 ml of 75% ethanol, dried in a speed-vacuum apparatus and suspended in 60 µl of diethylpyrocarbonate-treated water.

4. RNA amplification

4.1. 5'NCR

The primers NC1 and E2 (Table 1) used for the amplification of the 5' untranslated region of the enterovirus genome were described by Rotbart (1991) and synthesized by Eurogentec (Seraing, Belgium). They generate a 152 bp PCR product. Synthesis and amplification of cDNA were performed in a single tube with the Superscript1 OneStep RT-PCR kit (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) according to the manufacturer's instructions, in a total volume of 50 µl containing 1 mM of each primer, 10 µl of extracted RNA, 1 µl of RT-Taq polymerase, 25 µl of RT-PCR buffer, 0.5 µl of RNase inhibitor and 12 µl of sterilized bidistilled water. The RT reaction was performed at 50°C for 30 min, followed by enzyme inactivation at 94°C for 2 min. The mixture was then subjected to 38 cycles of amplification, consisting of denaturation for 30 sec at 94°C, annealing for 30 sec at 60°C, and extension for 30 sec at 68°C. At the end of the reaction, a further extension step was performed at 68°C for 7 min. The RT-PCR was carried out with a Perkin-Elmer 9600 thermocycler (Perkin-Elmer, Boston, MA). A positive control and a water control were included in each PCR reaction.

The amplified RT-PCR products were analyzed on a 3% Metaphor1 agarose gel (Invitrogen) and visualized under ultraviolet light after addition of ethidium bromide (Sigma). A 100-bp DNA ladder (Invitrogen) was used as size marker.

4.2. VPI region

Ten microliters of extracted RNA were reverse transcribed into cDNA at 42°C for 45 min using 200 units of SuperScriptIII reverse transcriptase and 2.5 ng/µl of random primers

(Invitrogen) in the presence of 10 units of RNase OUT recombinant RNase inhibitor (Invitrogen). For the amplification step, the reagents and experimental conditions were those published previously (Nix et al., 2006). Table 1 shows the sequence and genomic location of the primers.

4.3. *VP2 region*

The reverse transcriptase step was the same as described for the *VP1* region. The amplification technique has been reported recently (Ibrahim et al., 2013). A first amplification step was performed by using two pairs of sense (AM11 and AM12) and antisense (AM31 and AM32) primers in order to obtain a fragment of 584 bp (Table 1). The CODEHOP PCR was performed using 2 µl of the first PCR product, 1.25 unit of HotStar Taq DNA polymerase (QIAGEN, Courtaboeuf, France), 40 pmol of primers NS20 and NS30 (Table 1), MgCl₂ 3 mM in a final volume of 50 µl. The Taq polymerase was activated by incubation at 95°C for 15 min prior to 30 amplification cycles of 95°C for 30 s, 65°C for 45 s, and 72°C for 45 s. The expected size of the amplicon was 379 bp (with reference to PV-1).

5. Template purification and sequencing

The amplicons of the *VP1* or *VP2* region were purified using the High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics, Meylan, France) or the QIAquick gel extraction kit (QIAGEN), depending on the presence of single or multiple bands, respectively. The purified products were sequenced according to the Sanger method with the GenomeLab Dye Terminator Cycle Sequencing Quick Start kit according to the manufacturer's instructions (Beckman Coulter, Villepinte, France) as described (Ibrahim et al., 2013). The sequencing primers were NS20/NS30 and AN89/AN88 for the *VP2* and *VP1* region, respectively (Table 1). After purification of the amplicons with the Dye-Terminator Ex 2.0 kit (QIAGEN), the electrophoresis and analysis of DNA sequence reactions were performed with the automated DNA sequencer CEQ8000 (Beckman Coulter).

6. Sequence analysis and phylogeny

To determine the enterovirus type, the sequences were compared to all the corresponding EV sequences available in GenBank database for the corresponding *VP1* or *VP2* capsid region by using BLAST software (Altschul et al., 1990). Nucleotide sequence homology of at least 75% was required for assignment to the same genotype (Oberste et al., 2000, 2004).

Results

From the 172 wastewater samples included into the study, 52 (30.23 %) were found positive for the presence of EV genome with a PCR method using primers located within the 5'NCR of EV genome. These 52 positive specimens were tested comparatively for typing by using two tests based on the CODEHOP technology and targeting two different regions coding for viral capsid proteins, VP1 and VP2, respectively. As shown in Figure 1, 33 (63.46 %) samples from 52 were negative and only 19 (36.54%) were positive by combining the two tests (11.54 and 32.69 % for VP1 and VP2, respectively). Globally, the sensitivity was low by comparison to the technique of reference (5'NCR) and the two typing tests were poorly correlated.

Figure 1 displays the different types of EVs recovered in the environmental samples. The typed strains belonged to three (A, B and C) of the four human EV species (with exception of rhinoviruses). From the 4 samples found positive by both typing techniques, a same genotype was recovered in only one sample (CV B3) (Figure 1).

Discussion

Several recent studies have reported global overview of circulating EVs detected in the water environment of a given area using cell culture followed by seroneutralisation with RIVM/WHO antisera (Pellegrinelli et al., 2013) or, more frequently, by molecular typing in the VP1 region (Amdiouni et al., 2012; Richter et al., 2011; Shukla et al., 2013) for identifying the circulating genotypes. To our knowledge, the present work is the first to propose direct typing of EVs in environmental specimens without any cell culture step. The main advantage of this approach is to identify genotypes that are not or poorly culturable, as exemplified by most of the coxsackievirus A genotypes or EV-A71 that is currently responsible for large outbreaks of hand foot and mouth disease in children with severe and fatal cases in China and South-East Asia (Solomon et al., 2010).

The results depicted in Figure 1 demonstrate the feasibility of the direct approach, even if the sensitivity of the test needs to be improved before recommending its routine use. The high number of missed specimens by using the amplification methods targeting the VP1 and VP2 region could be explained, at least in part, by the high susceptibility of PCR assays using CODEHOP primers to inhibitors such as polysaccharides and humic, fulvic or tannic acids, frequently found in environmental samples and especially in wastewater and sludge (Monpotheo et al., 2004; Gregory et al., 2006).

Another surprising finding of this study was the high proportion of discrepant results between the two typing methods. Only four samples were found positive by both tests and only one of them was shown to be contaminated by the same genotype. For the three other specimens, the presence of a mixture of different genotypes is the more probable hypothesis unless an intra-capsidal recombination event occurred between two strains of the same species, as previously

shown for a strain recovered from a clinical isolate (Bousslama et al., 2007); limit dilutions of the strains in cell culture are ongoing in our laboratory to decide between the two hypotheses.

Presently, there is no ideal approach for studying the contamination of environmental samples by EVs. Cell culture associated to molecular typing of culturable strains is the more usual technique for studying the diversity of EV strains circulating in a given area at a given time; however, the technique is fastidious and only culturable strains are identified. Molecular detection of EVs by using primers in the 5'NCR is used when no typing is required; actually, the sequencing of this region is not recommended because of its low variability (Muir et al., 1998), even if it has been used episodically (Hsu et al., 2008; Lee & Lee, 2008). This second approach is particularly useful when EVs are detected together with other enteric viruses (Allmann et al., 2013; Hassine et al., 2010); combined to real-time PCR, it allows a direct quantification of the viruses present in the specimen (Bosch et al., 2008). The third strategy is the one reported herein; it consists in the amplification of a hypervariable region that can be further sequenced for direct typing. Despite its lower sensitivity and its inability to measure the viral load, it could represent a good compromise for giving a rapid overview of the EV genotypes that are contaminating presently the water environment, notably for epidemiological purpose in relation with the identified clinical strains of EVs (Richter et al., 2011) or with the global polio eradication program (Hovi et al., 2012).

From the results of the present study, it can be concluded the feasibility of a molecular strategy targeting viral proteins, and notably VP2, for direct typing of EVs in environmental samples. Much work remains to be done for improving the sensitivity of the technique and for reducing the influence of PCR inhibitors; other less contaminated environmental samples such as drinking water or shellfish would be probably less impacted by these inhibitors.

References

- Allmann E, Pan L, Li L, Li D, Wang S, Lu Y. Presence of enteroviruses in recreational water in Wuhan, China. *J. Virol. Methods* 2013, 193:327-331.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 1990, 215:403–410.
- Amdiouni H, Faouzi A, Fariat N, Hassar M, Soukri A, Nourlil J. Detection and molecular identification of human adenoviruses and enteroviruses in wastewater from Morocco. *Lett. Appl. Microbiol.* 2012, 54:359-366.
- Bosch A, Guix S, Sano D, Pintó RM. New tools for the study and direct surveillance of viral pathogens in water. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2008, 19:295-301.
- Bousslama L, Nasri D, Chollet L, Belguith K, Bourlet T, Aouni M, Pozzetto B, Pillet S. Natural recombination event within the capsid genomic region leading to a chimeric strain of human enterovirus B. *J. Virol.* 2007, 81:8944-8952.
- Ehlers MM, Grabow WO, Pavlov DN. Detection of enteroviruses in untreated and treated drinking water supplies in South Africa. *Water Res.* 2005, 39:2253-2258.
- Fong TT, Lipp EK. Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2005, 69:357-371.
- Gantzer C, Lucena F, Schwartzbrod L, Jofre J. Indicateurs de contamination virale du milieu hydrique : mythe ou réalité ? *Virologie* 1998, 2:117-125.
- Gregory JB, Litaker RW, Noble RT. Rapid one-step quantitative reverse transcriptase PCR assay with competitive internal positive control for detection of enteroviruses in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006, 72:3960-7.
- Hassine M, Sdiri K, Riabi S, Beji A, Aouni Z, Aouni M. Détection des virus entériques dans les eaux usées de la région de Monastir par RT-PCR. *Tunis. Med.* 2010, 88:70-75.
- Hot D, Legeay O, Jacques J, Gantzer C, Caudrelier Y, Guyard K, Lange M, Andréoletti L. Detection of somatic phages, infectious enteroviruses and enterovirus genomes as

- indicators of human enteric viral pollution in surface water. *Water Res.* 2003 37:4703-4710.
- Hovi T, Shulman LM, van der Avoort H, Deshpande J, Roivainen M, De Gourville EM. Role of environmental poliovirus surveillance in global polio eradication and beyond. *Epidemiol. Infect.* 2012, 140:1-13.
- Hsu BM, Chen CH, Wan MT. Prevalence of enteroviruses in hot spring recreation areas of Taiwan. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2008, 52:253-259.
- Ibrahim W, Boukhadra N, Nasri-Zoghalmi D, Berthelot P, Omar S, Bourlet T, Pozzetto B, Pillet S. Partial sequencing of VP2 capsid gene for direct enterovirus genotyping in clinical specimens. *Clin. Microbiol. Infect.* 2013, in press.
- Khetsuriani N, Kutateladze T, Zangaladze E, Shutkova T, Peñaranda S, Nix WA, Pallansch MA, Oberste MS. High degree of genetic diversity of non-polio enteroviruses identified in Georgia by environmental and clinical surveillance, 2002-2005. *J. Med. Microbiol.* 2010, 59:1340-1347.
- Lee G, Lee C. Molecular detection and characterization of human enteroviruses in Korean surface water. *J. Microbiol.* 2008, 46:319-324.
- Lewis G, Metcalf TG. Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses including hepatitis A and human rotavirus from oyster, water, and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 1988, 5:1983-1988.
- Metcalf TG, Melnick JL, Estes MK. Environmental virology: from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology--a trip of over 50 years. *Annu. Rev. Microbiol.* 1995, 49:461-487.
- Monpoeho S, Maul A, Bonnin C, Patria L, Ranarijaona S, Billaudel S, Ferré V. Clearance of human-pathogenic viruses from sludge: study of four stabilization processes by real-time reverse transcription-PCR and cell culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004, 70:5434-5440.

- Muir P, Kämmerer U, Korn K, Mulders MN, Pöyry T, Weissbrich B, Kandolf R, Cleator GM, van Loon AM. Molecular typing of enteroviruses: current status and future requirements. *Clin. Microbiol. Rev.* 1998, 11:202-227.
- Nasri D, Bouzlama L, Omar S, Saoudin H, Bourlet T, Aouni M, Pozzetto B, Pillet S. Typing of human enterovirus by partial sequencing of VP2. *J. Clin. Microbiol.* 2007, 45:2370–2379.
- Nix WA, Oberste MS, Pallansch MA. Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 2006, 44:2698–2704.
- Noble RT, Fuhrman JA. Enteroviruses detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction from the coastal waters of Santa Monica Bay, California: Low correlation to bacterial indicator levels. *Hydrobiologia* 2001, 460:175-184.
- 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.
- Oberste MS, Michele SM, Maher K, Schnurr D, Cisterna D, Junttila N, Uddin M, Chomel J-J, Lau C-S, Ridha W, al-Busaidy S, Norder H, Magnus LO, Pallansch MA. Molecular identification and characterization of two proposed new enterovirus serotypes, EV74 and EV75. *J. Gen. Virol.* 2004, 85:3205–3212.
- Pellegrinelli L, Binda S, Chiaramonte I, Primache V, Fiore L, Battistone A, Fiore S, Gambino M, Bubba L, Barbi M. Detection and distribution of culturable Human Enteroviruses through environmental surveillance in Milan, Italy. *J. Appl. Microbiol.* 2013, 115:1231-1239.
- Rajtar B, Majek M, Polański Ł, Polz-Dacewicz M. Enteroviruses in water environment--a potential threat to public health. *Ann. Agric. Environ. Med.* 2008, 15:199-203.
- Richter J, Tryfonos C, Christodoulou C. Circulation of enteroviruses in Cyprus assessed by molecular analysis of clinical specimens and sewage isolates. *J. Appl. Microbiol.* 2011, 111:491-498.

- Rotbart HA. Nucleic acid detection systems for enteroviruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 1991, 4:156-168.
- Shukla D, Kumar A, Srivastava S, Idris MZ, Dhole TN. Environmental surveillance of enterovirus in Northern India using an integrated shell vial culture with a semi-nested RT PCR and partial sequencing of the VP1 gene. *J. Med. Virol.* 2013, 85:505-511.
- Solomon T, Lewthwaite P, Perera D, Cardoso MJ, McMinn P, Ooi MH. Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of enterovirus 71. *Lancet Infect. Dis.* 2010, 10:778-790.
- Wetz JJ, Lipp EK, Griffin DW, Lukasik J, Wait D, Sobsey MD, Scott TM, Rose JB. Presence, infectivity, and stability of enteric viruses in seawater: relationship to marine water quality in the Florida Keys. *Mar Pollut Bull.* 2004 Apr;48(7-8):698-704.

Figure 1: Enterovirus typing in wastewater specimens from the region of Monastir, Tunisia, by using CODEHOP RT-PCR methods with primers located in the VP1 and VP2 regions of the enterovirus genome. 5'NCR: 5' non coding region.

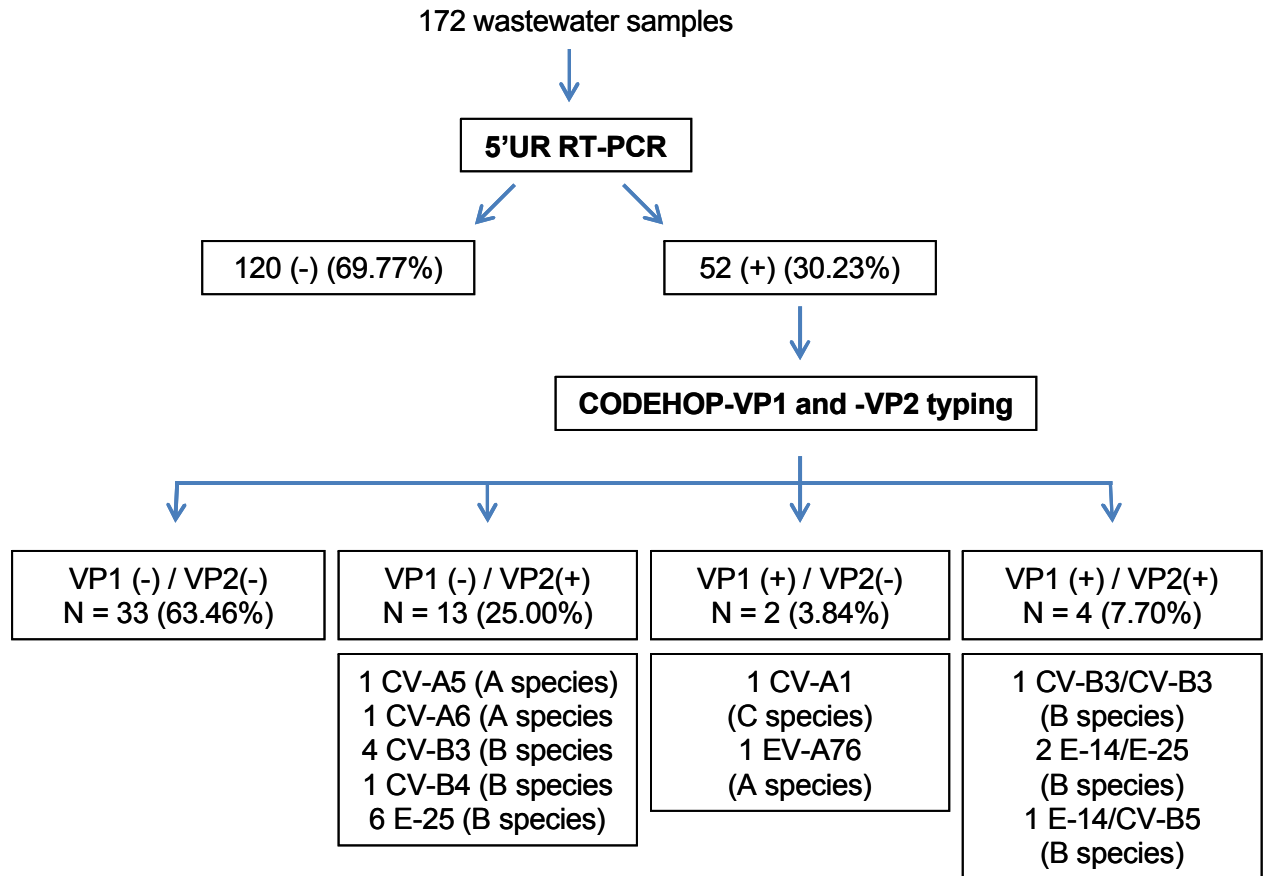


Table 1: Primers used in this study.

Primer	Sequence ^a	Gene ^b	Location ^c	Reference
NC1	CTCCGGCCCCTGATTGCG	5'NCR	445-462	Rotbart, 1991
E2	ATTGTCACCATAAGCCA	5'NCR	596-577	Rotbart, 1991
AN32	GTYTGCCA	VP1	3009-3002	Nix et al., 2006
AN33	GAYTGCCA	VP1	3009-3002	Nix et al., 2006
AN34	CCRTCRTA	VP1	3111-3104	Nix et al., 2006
AN35	RCTYTGCCA	VP1	3009-3002	Nix et al., 2006
224	GCIATGYTIGGIACICAYRT	VP3	1977-1996	Nix et al., 2006
222	CICCIGGIGGIAYRWACAT	VP1	2969-2951	Nix et al., 2006
292	MIGCIGYIGARACNGG	VP1	2613-2628	Nix et al., 2006
AN89 ^d	<i><u>CCAGCACTGACAGCAGYNGARAYNGG</u></i>	VP1	2603-2628	Nix et al., 2006
AN88 ^d	<i><u>TACTGGACCACCTGGNGGNAYRWACAT</u></i>	VP1	2977-2951	Nix et al., 2006
AM11	GARGCITGYGGITAYAGYGA	VP2	962–981	Nasri et al., 2007
AM12	GARGARTGYGGITAYAGYGA	VP2	962–981	Nasri et al., 2007
AM31	TTDATDATYTGRTGIGG	VP2	1545–1529	Nasri et al., 2007
AM32	TTDATCCA YTGRTGIGG	VP2	1545–1529	Nasri et al., 2007
NS20 ^d	<i><u>TCCAAGGGCTGGTGGTGGAARYTNCC</u></i>	VP2	1172–1197	Ibrahim et al., 2013
NS30 ^d	<i><u>TTRTTGGTCCGCAGGTTGATCMWYTGR</u></i> <i><u>TGNGG</u></i>	VP2	1560–1529	Ibrahim et al., 2013

^a The following standard ambiguity codes were used: D = G, A, or T; R = A or G; Y = T or C; N = A, T, C, or G; M = A or C; W = A or T, and I = deoxyinosine.

^b 5'NCR: 5' non coding region; VP: viral protein.

^c With reference to the sequence of PV-1 Mahoney (GenBank accession number V01149).

^d The 5' nondegenerate clamp portion and the 3' degenerate core region of the CODEHOP primers are in italic type and underlined, respectively.

ARTICLE 3

**Travail épidémiologique à partir de souches
d'EV isolés en Centre-Afrique**

1 Résumé de l'article 3

Des souches pathogènes de PV n'ont pas été récemment isolées en République Centrafricaine (RCA). Cependant, en tant que membre du réseau mondial de surveillance de la poliomyélite, l'Institut Pasteur de Bangui, RCA, est responsable des investigations virologiques de tous les cas de paralysie flasque aiguë humaine survenant dans ce pays. Ces recherches impliquent la collection d'échantillons de selles de chaque patient présentant une paralysie flasque aiguë et la détection de PV par isolement sur culture cellulaire (Anonymous, 2004).

Dans le but d'améliorer la connaissance de la circulation des EV dans ce pays, un panel d'EV-non polio a été analysé rétrospectivement. Ces virus ont été isolés par culture cellulaire entre 1997 et 2006 dans les différentes régions de RCA à partir d'échantillons de selles d'enfants souffrant de paralysie flasque aiguë. Leur génotype a été déterminé par séquençage des régions VP1 et VP2, et les analyses phylogénétiques ont été effectuées en collaboration avec le laboratoire du Pr. Francis Delpeyroux à l'Institut Pasteur de Paris. Le but de cette étude était triple :

- évaluer la technique sur des souches très différentes de celles qui ont été utilisées à Saint-Etienne (avec une beaucoup plus grande diversité) ;
- tester la capacité de la technique à distinguer les EV polio des EV non polio dans le cadre de l'éradication de la poliomyélite.
- analyser la variabilité génétique des EV isolés dans ce contexte, avec une recherche de virus recombinants au sein de la capsidie par un double typage VP1 et VP2 (Bousslama et al., 2007 ; Jegouic et al., 2009).

L'utilisation en parallèle de techniques de typage ciblant deux régions différentes (VP1 et VP2) peut permettre la détection de virus recombinants. Dans ce but, nous avons utilisé la nouvelle technique VP2 décrite dans les articles précédents pour tester 98 souches d'EV isolées et typées par la technique VP1 à l'Institut Pasteur de Paris. Les résultats obtenus avec la nouvelle technique VP2 corrélaient dans 88% des cas avec la technique de référence VP1.

Les analyses moléculaires ont mis en évidence la grande diversité des types et des lignages d'EV qui circulent en RCA, dont 42 types appartenant aux 4 espèces d'EV, et ont révélé l'existence d'un nouveau génogroupe d'EV-A71.

La présence importante d'EV-C rend la recombinaison entre PV et d'autres espèces HEV-C possible et pourrait favoriser l'émergence d'un recombinant PV dérivé du vaccin similaire à

ceux qui ont été impliqués dans des épidémies répétées de paralysie flasque dans plusieurs pays en développement.

2 Publication de l'article 3 dans J. Clin. Microbiol.

J. Clin. Microbiol. 2012, 50(5):1650. DOI: 10.1128/JCM.06657-11.

Molecular Characterization of Human Enteroviruses in the Central African Republic: Uncovering Wide Diversity and Identification of a New Human Enterovirus A71 Genogroup

Maël Bessaud,^{a,b,*} Sylvie Pillet,^c Wafa Ibrahim,^c Marie-Line Joffret,^{a,b} Bruno Pozzetto,^c Francis Delpeyroux,^{a,b} and Ionela Gouandjika-Vasilache^d

Institut Pasteur, Unité de Biologie des virus entériques, Paris, France^a; INSERM, Paris, France^b; Université de Lyon, Faculté de Médecine de Saint-Etienne, Saint-Etienne, France^c; and Institut Pasteur de Bangui, Laboratoire virus entériques/rougeole, Bangui, Central African Republic^d

Human enteroviruses (HEV) are among the most common viruses infecting humans. Their circulation has been widely studied in most parts of the world but not in sub-Saharan Africa, where poliomyelitis remains prevalent. We report here the molecular characterization of 98 nonpoliovirus (non-PV) HEV strains isolated from 93 randomly selected cell culture-positive supernatants from stool samples collected from 1997 through 2006 from children with acute flaccid paralysis living in the Central African Republic (CAR). The isolates were typed by sequencing the VP1 coding region and sequenced further in the VP2 coding region, and phylogenetic studies were carried out. Among the 98 VP1 sequences, 3, 74, 18, and 3 were found to belong to the HEV-A, -B, -C, and -D species, respectively. Overall, 42 types were detected. In most cases, the VP2 type was correlated with that of the VP1 region. Some of the isolates belonged to lineages that also contain viruses isolated in distant countries, while others belonged to lineages containing viruses isolated only in Africa. In particular, one isolate (type EV-A71) did not fall into any of the genogroups already described, indicating the existence of a previously unknown genogroup for this type. These results illustrate the considerable diversity of HEV isolates from the stools of paralyzed children in the CAR. The presence of diverse HEV-C types makes recombination between poliovirus and other HEV-C species possible and could promote the emergence of recombinant vaccine-derived polioviruses similar to those that have been implicated in repeated poliomyelitis outbreaks in several developing countries.

Human enteroviruses (HEV) (family *Picornaviridae*, genus *Enterovirus*) are among the most common viruses infecting humans. On the basis of the phylogenetic clustering of these viruses, they have been assigned to four species (HEV-A to -D) containing more than 100 types. The HEV-C species include the three types of poliovirus (PV) known to cause poliomyelitis.

HEV virions are icosahedral, have no envelope, and contain a single positively stranded RNA genome about 7,500 nucleotides (nt) in length. The genome contains only one functional open reading frame encoding a viral polyprotein that is cleaved to give rise to the functional proteins (48). The N-terminal part of the polyprotein contains the four structural proteins (VP1 to VP4) that are assembled to form the virion; the C-terminal part of the polyprotein contains the nonstructural viral proteins, including proteases and the RNA-dependent RNA polymerase.

Non-PV HEV-A to -D species cause a wide spectrum of diseases, with clinical signs ranging from mild febrile illness, such as the common cold, to severe forms, such as acute hemorrhagic conjunctivitis, myocarditis, encephalitis, and acute flaccid paralysis (47). Moreover, some HEV strains, such as HEV-C in particular, can recombine with the live attenuated vaccine PV strains to generate new neurovirulent viruses (22, 55); such vaccine-derived PV (VDPV) strains have already been implicated in many poliomyelitis outbreaks in various countries (31, 38). Pathogenic VDPV strains have never been isolated in the Central African Republic (CAR), but the widespread use of live attenuated PV vaccine in this country has raised fears about the possible emergence of pathogenic VDPV strains, which have already been found in several other sub-Saharan African countries (4), including the Democratic Republic of the Congo, which borders the CAR.

As a member of the worldwide network for poliomyelitis surveillance, the Institut Pasteur de Bangui, CAR, is responsible for virological investigations of all cases of human acute flaccid paralysis occurring in this country. These investigations involve the collection of stool samples from every patient with acute flaccid paralysis and the detection of PV by isolation in cell cultures (2). If cell cultures are found to be positive for HEV but negative for PV, the corresponding isolates are classified as non-PV HEV; no further investigations are conducted, but these isolates are added to the laboratory collection.

The circulation of HEV has been studied in many parts of the world, but little is known about the pattern of HEV circulation in sub-Saharan Africa, including the CAR. With the aim of improving knowledge of HEV circulation in this country, we retrospectively analyzed a panel of viruses classified as non-PV HEV, isolated from 1997 through 2006 in different regions of the CAR. These viruses were recovered from stool samples of children suffering from acute flaccid paralysis. Their genotypes were deter-

Received 14 December 2011 Returned for modification 17 January 2012

Accepted 2 February 2012

Published ahead of print 15 February 2012

Address correspondence to Maël Bessaud, maël.bessaud@ird.fr, or Francis Delpeyroux, francis.delpeyroux@pasteur.fr.

* Present address: IRD, UMR190, Marseille, France.

M. Bessaud and S. Pillet contributed equally to this article.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JCM.06657-11

mined by sequencing the VP1 and VP2 regions, and phylogenetic analyses were conducted. These molecular analyses highlighted the tremendous diversity of HEV types and lineages circulating in the CAR, including at least 42 types from the 4 HEV species, and revealed the existence of a new genogroup within the type EV-A71.

MATERIALS AND METHODS

Virus samples. Ninety-three cell culture supernatants positive for non-PV HEV were randomly selected from the virus collection of the Institut Pasteur de Bangui, CAR. All these strains were isolated on human rhabdomyosarcoma (RD) or human larynx epidermoid carcinoma (HEp-2c) cells infected with stool samples from children with acute flaccid paralysis (35). All these samples had been collected in the CAR from 1997 through 2006 for the purpose of diagnosis, in the context of poliomyelitis surveillance. All the supernatants considered in this study had previously tested negative for PV with WHO standard techniques (2).

Sequencing of the VP1 and VP2 coding regions. The VP1 region was amplified by reverse transcription-PCR (RT-PCR) with generic primers amplifying the entire VP1 sequence (~900 nt) of members of the species HEV-A to -D (11). If no amplicons were obtained, the samples were subjected to seminested PCR, leading to amplification of the first half of the VP1 sequence (~470 nt). Sequencing was performed with a BigDye Terminator version 3.1 kit (Applied Biosystems) on an ABI Prism 3140 automated sequencer (Applied Biosystems). For some amplicons, the electropherograms showed superimposed peaks along the entire length of the sequence, suggesting the presence of a mixture of VP1 sequences. The corresponding amplicons were then inserted into the pCR-Blunt plasmid with a Zero Blunt PCR cloning kit (Invitrogen), and 10 clones were sequenced for each sample.

RT-PCR targeting the central part of VP2 (~300 nt) was carried out on 89 of the 93 supernatants as previously described (40). Sequencing was performed with a GenomeLab Dye Terminator cycle sequencing Quick Start kit (Beckman Coulter) and a CEQ8000 automated DNA sequencer (Beckman Coulter).

Sequences were submitted to GenBank (see below). Isolate names are given in the following format: region of isolation-year of isolation-laboratory number.

Sequence analyses. The sequences were compared with those of prototype and field strains available in GenBank (the respective accession numbers are shown here; see Fig. 2 to 5). Multiple sequence alignments were performed with CLC Main Workbench 6.0 software (CLC bio). Phylograms were constructed with the MEGA5 program (58), using the Jukes-Cantor algorithm for genetic distance determination and the neighbor-joining method. The robustness of the resulting trees was assessed with 1,000 bootstrap replications.

Nucleotide sequence accession numbers. Sequences determined in this work have been submitted to GenBank (accession numbers JN255588 to JN255685 and JQ038038 to JQ038109 for the VP1 and VP2 regions, respectively).

RESULTS

The geographic distribution of the stool samples reflected the heterogeneity of population density in the CAR (Fig. 1A), with the highest densities found in the western part of the country, including, in particular, the capital, Bangui.

VP1 typing. The VP1 typing method was used to screen the 93 randomly selected cell culture supernatants. Strain mixing was detected in four samples, three of which had two different VP1 sequences, the remaining sample having three VP1 sequences. Overall, 98 VP1 sequences were fully or partly determined (Table 1). They belonged to 42 different types of the four HEV-A to -D species. More than 75% of the isolates belonged to species HEV-B, and about 20% belonged to species HEV-C. Only three isolates

belonged to species HEV-A and three to species HEV-D. The most common types were echovirus 7 (E-7), coxsackievirus A 13 (CV-A13), E-13, E-11, and E-21, which together accounted for more than one-third (35 of 98) of the isolates.

Only three of the isolates collected before 2004 belonged to species other than HEV-B, even though more than half the isolates (52 of 98) were collected during this period. The distributions of the four HEV species isolated before and after 2004 differed significantly ($P < 0.001$ in chi-square analysis) (Fig. 1B). Few HEV-C isolates were collected from 1997 through 2003, whereas HEV-C accounted for 34.8% of the isolates collected during 2004 to 2006. These differences may have resulted, at least in part, from the introduction in 2004 of the HEp-2c cell line for the routine culture of HEV in the Institut Pasteur de Bangui laboratory (100% of the HEV-A, 10% of the HEV-B, 90% of the HEV-C, and most of the HEV-D isolates in this study grew on the HEp-2c cell line).

VP2 typing. In addition to the typing of VP1, we also typed 89 supernatants by sequencing part of the VP2 region, as described above. Seven of these samples could not be amplified by this method, and 11 gave results discordant with those for the VP1 sequence; those 18 samples, which merit additional detailed investigations (mixing of strains, recombinant strains, etc.), were discarded from this epidemiological study. We report in Table 1 the VP2 typing results for the 71 isolates that gave results concordant with those determined with the VP1 typing method.

Phylogenetic analyses of HEV-A isolates. Only three HEV-A isolates were found in the panel. They belonged to types CV-A10 and EV-A71.

The two CV-A10 isolates were almost identical over the region of VP1 sequenced in this study. They belonged to lineage III (data not shown), which also includes isolates from Asia (26).

In the VP1 region, isolate NMA-03-008 displayed nucleotide and amino acid homologies of 79.9% and 93.6%, respectively, with the EV-A71 prototype strain BrCr. Nevertheless, it did not fall into any of the four known genogroups of EV-A71 (18, 23a, 56, 65) (Fig. 2A). The VP1 sequence of this isolate was very similar to a short VP1 sequence (~300 nt) from a strain isolated in Nigeria in 2004 (GenBank accession number GQ496527). These two sequences displayed nucleotide and amino acid homologies of 92.7% and 97.0%, respectively. Compared with sequences representative of the four EV-A71 genogroups, these two sequences formed a separate cluster containing no other sequence (Fig. 2B). Despite the relatively small number of VP2 sequences from field viruses available from public databases, the phylogram for this region also supported the classification of isolate NMA-03-008 in a new genogroup (Fig. 2C). The analyses performed for both VP1 and VP2 indicated that isolate NMA-03-008 belonged to a previously unknown genogroup of EV-A71.

Phylogenetic analyses of HEV-B. In VP1 analysis, 74 of the 89 sequences segregated with the HEV-B species and could be assigned to 32 different types. Seven HEV-B strains corresponded to recently described types (EV-B69, EV-B74, EV-B77, EV-B80, EV-B84, and EV-B101) for which only a few sequences are currently available in databases. The VP2 and VP1 methods gave the same type identification for 53 of these isolates (Table 1).

Based on the VP1 region, the Central African strains of the E-6, -11, -13, and -30 types belonged to several lineages that have already been described for these types and that include strains iso-

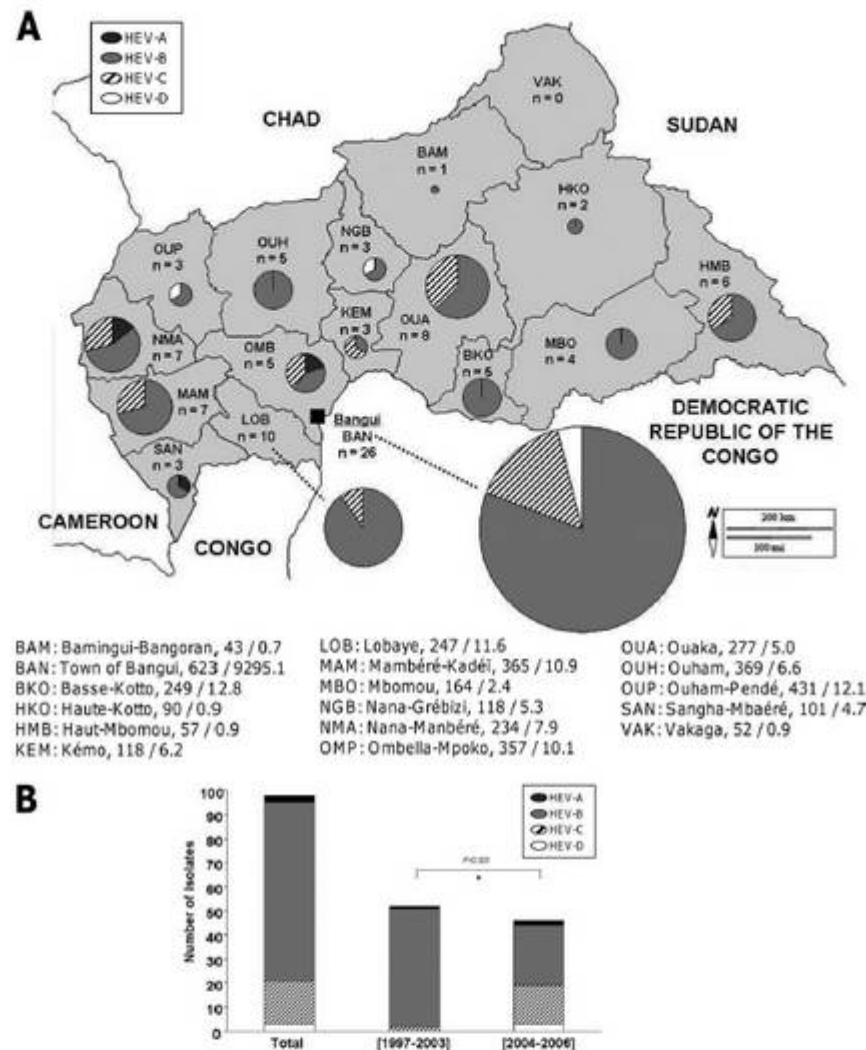


FIG 1 Distribution of the 98 HEV VP1 sequences. (A) Geographic distribution of the sequences in the 16 prefectures of the CAR and in the town of Bangui. Below the map, the number of inhabitants (in thousands) and the population density (in inhabitants per square kilometer) are indicated for each prefecture and for Bangui (data are from the 2003 census). (B) Distribution of the VP1 sequences within the 4 HEV species according to the period of isolation. *, chi-square analysis. The figure was drawn with an outline map provided by d-maps.com (<http://d-maps.com/index.php?lang=fr>).

lated from elsewhere around the world (9, 10, 27) (data not shown).

The E-7 type featured at least four main clusters (34), as supported by bootstrap values higher than 77% (Fig. 3); the prototype strain Wallace did not fall into any of these clusters and constituted a separate lineage. The A and C clusters contained isolates from different continents, whereas the B cluster contained only isolates from China. All eight E-7 isolates from the CAR grouped together in a new cluster (cluster D; bootstrap value of 96%) containing no previously reported sequences. A similar clustering was observed for the VP2 sequences of E-7 strains (data not shown).

Phylogenetic analyses of HEV-C. VP1 analysis assigned the 18 HEV-C isolates to seven different types, with almost half these

sequences being of the CV-A13 type (Table 1). Previous phylogenetic analyses based on VP1 sequencing identified several clusters in this type (12). The eight Central African CV-A13 isolates fell into three of these clusters (Fig. 4): two fell into cluster A, which also contained strains isolated in North America and Asia between 1998 and 2000, and two others into cluster C, together with strains isolated in Madagascar. The four remaining sequences clustered with a strain isolated in the Democratic Republic of the Congo in 2000 (30); those five sequences together displayed homologies of at least 83.8% and 95.1% at the nucleotide and peptide levels, respectively. Together, they defined a new cluster, cluster D (bootstrap value of 100%). Those five sequences displayed a 6-nt-long deletion with respect to the other CV-A13 strains (VP1 nt 453 to 458, according to the numbering of prototype strain Flores). The

TABLE 1 Distribution of the Central African non-PV HEV into species and types

Species and type	No. of typed strains		GenBank accession no.	
	VP1	VP2	VP1	VP2
HEV-A	3	3		
CV-A10	2	2	JN255588–JN255589	JQ038038–JQ038039
EV-A71	1	1	JN255590	JQ038040
HEV-B	74	53		
CV-A9	1	1	JN255591	JQ038041
CV-B1	1	1	JN255592	JQ038042
CV-B4	1	1	JN255593	JQ038043
CV-B5	1		JN255594	
CV-B6	1	1	JN255595	JQ038044
E-1	3	1	JN255615–JN255617	JQ038058
E-2	1	1	JN255632	JQ038071
E-3	3	2	JN255639–JN255641	JQ038075–JQ038076
E-4	3		JN255642–JN255644	
E-5	1		JN255645	
E-6	3	3	JN255646–JN255648	JQ038077–JQ038079
E-7	8	7	JN255649–JN255656	JQ038080–JQ038086
E-9	1		JN255657	
E-11	6	4	JN255596–JN255601	JQ038045–JQ038048
E-12	1	1	JN255602	JQ038049
E-13	7	4	JN255603–JN255609	JQ038050–JQ038053
E-14	2	1	JN255610–JN255611	JQ038054
E-19	3	3	JN255612–JN255614	JQ038055–JQ038057
E-20	3	2	JN255618–JN255620	JQ038059–JQ038060
E-21	6	5	JN255621–JN255626	JQ038061–JQ038065
E-25	3	3	JN255627–JN255629	JQ038066–JQ038068
E-26	1	1	JN255630	JQ038069
E-29	1	1	JN255631	JQ038070
E-30	4	1	JN255633–JN255636	JQ038072
E-32	1	1	JN255637	JQ038073
E-33	1	1	JN255638	JQ038074
EV-B69	1	1	JN255659	JQ038088
EV-B74	2	2	JN255660–JN255661	JQ038089–JQ038090
EV-B77	1	1	JN255662	JQ038091
EV-B80	1	1	JN255663	JQ038092
EV-B84	1	1	JN255664	JQ038093
EV-B101	1	1	JN255658	JQ038087
HEV-C	18	13		
CV-A13	8	6	JN255665–JN255672	JQ038094–JQ038099
CV-A17	1	1	JN255673	JQ038100
CV-A20	4	4	JN255674–JN255677	JQ038101–JQ038102, JQ038104–JQ038105
CV-A21	1		JN255678	
CV-A24	2	2	JN255679–JN255680	JQ038106–JQ038107
EV-C99	1		JN255682	
EV-C102	1		JN255681	
HEV-D	3	2		
EV-D111	3	2	JN255683–JN255685	JQ038108–JQ038109
Total	98	71		

phylogenetic tree based on the CV-A13 VP2 region displayed a similar pattern of clustering (data not shown).

Within the CV-A17 type, the VP1 sequence of isolate BAN-06-114 grouped with a strain isolated in the Democratic Republic of the Congo in 2000 (30), with a bootstrap value of 99% (Fig. 4). Within the EV-C99 type, the VP1 sequence of isolate MAM-06-060a fell into cluster B (12), which also contained sequences from Asia and North America (data not shown). Compared with VP1 sequences available in GenBank, the four CV-A20 and the two CV-A24 isolates constituted a unique lineage in their respective types (data not shown).

Phylogenetic analyses of HEV-D. According to VP1 analysis, the three Central African HEV-D strains belonged to the recently described EV-D111 type, which previously included only two isolates (24, 30). As the five sequences depicted in Fig. 5 were obtained with primers targeting different regions of the genome, they displayed a match over only ~350 nt (nt 117 to 471, according to KK2640 VP1 numbering). In this region, they featured homologies higher than 81.4% and 89.9% at the nucleotide and peptide levels, respectively. Despite the small number of sequences available for this type, two clusters were distinguishable in the VP1 region (Fig. 5).

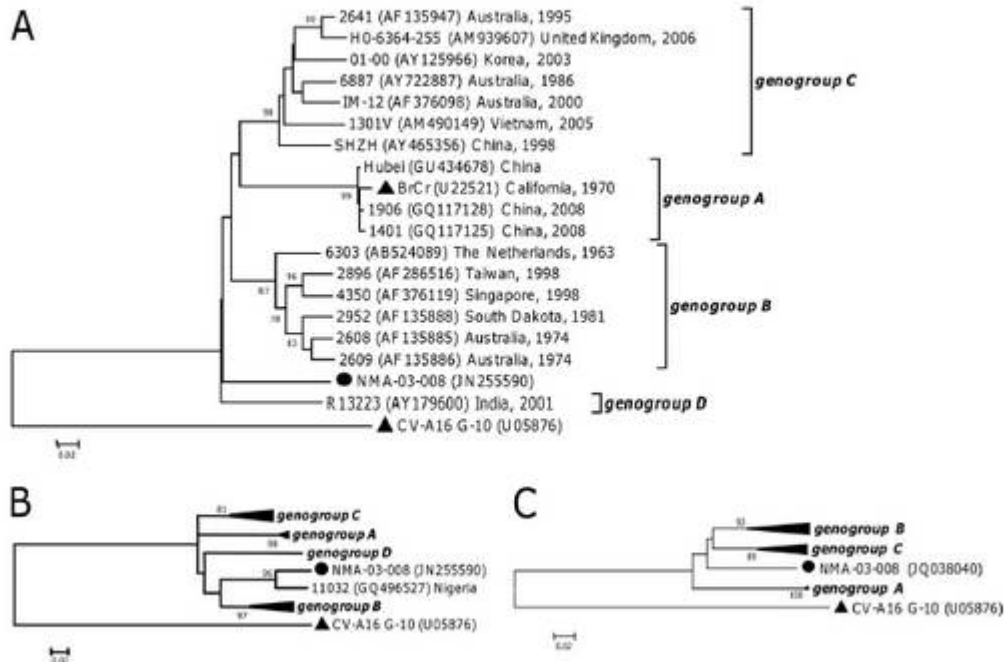


FIG 2 Phylogenetic relationships between the Central African EV-A71 sequences and other EV-A71 sequences representing the different genogroups. (A) Phylogram based on VP1 sequences (nt 1 to 855 according to BrCr VP1 numbering). (B) Phylogram based on partial VP1 sequences (nt 157 to 458 according to BrCr VP1 numbering). (C) Phylogram based on partial VP2 sequences (nt 229 to 523 according to BrCr VP2 numbering). The Central African sequences are indicated by filled circles. For the other sequences, the location and year of isolation are indicated, if known. Filled triangles indicate the prototype strains. The percent bootstrap values are indicated if higher than 75. The CV-A16 G-10 sequence was introduced for correct rooting of the trees.

No EV-D111 VP2 sequences were available from public databases. In comparison with other HEV-D VP2 sequences, the two Central African EV-D111 VP2 sequences clustered together (data not shown), displaying a nucleotide homology of 87.8% and an amino acid homology of 97.8%.

DISCUSSION

Our main goal in this study was to investigate the diversity of HEV strains circulating in the CAR by analyzing non-PV HEV strains isolated from the stools of children with acute flaccid paralysis of unknown origin. In addition to PV, other viruses, such as West Nile virus, Epstein-Barr virus, and non-PV HEV, may be implicated in acute flaccid paralysis (30, 33, 37, 54, 66). As this study was performed retrospectively, it was not possible to establish a causal link between the clinical symptoms and the presence of an HEV strain in the stools of the children. We have therefore a partial picture of the diversity of HEV in the CAR rather than a panel of the HEV strains actually responsible for acute flaccid paralysis.

We first subjected all the isolates to molecular typing on the basis of their VP1 sequences, which is the method most commonly used for HEV typing (11, 17, 20, 42–45, 62). An alternative typing method (40, 41), based on partial sequencing of the VP2 region, was used in parallel. A huge diversity of serotypes was observed. Most of the isolates belonged to species HEV-B, consistent with previous observations in many epidemiological investigations on HEV circulating in other countries (3, 6, 8, 13, 59, 63). This predominance could have been partly due to cell culture techniques, which may favor the detection of this species (19, 25), as suggested

by the significant increase in the isolation of non-B HEV since 2004, when the systematic testing of stool samples on HEP-2c cells was introduced (Fig. 1B). The use of this cell line increased the frequency with which strains belonging to the HEV-C species were isolated in previous studies in Madagascar (49, 51). Similar results were also recently obtained in Cameroon (S. Sadeuh-Mba and F. Delpeyroux, unpublished data).

The VP1 method showed that the isolates belonged to 42 different types and to several lineages within some of these types; most of these typing results were confirmed by VP2 analysis (Table 1). Obtained from fewer than 100 stool samples, this result revealed the huge diversity of HEV strains cocirculating in the CAR. Some of the isolates belonged to lineages that also contained viruses isolated in distant countries, suggesting probable worldwide circulation of the viruses concerned. In contrast, some of the CAR isolates were found to belong to lineages containing viruses isolated only in Africa. Thus, the three HEV-D isolates of this study belonged to the recently described EV-D111 type (Fig. 5), which had previously been found only in Cameroon (24) and in the Democratic Republic of the Congo (30), both of which border the CAR. Similarly, some CV-A13 and CV-A17 isolates from the CAR defined new clusters within their own type with viruses isolated in the Democratic Republic of the Congo in 2000 to 2001 (30).

Through the use of both VP1 and VP2 analyses, this study also identified an EV-A71 VP1 sequence that did not belong to the genogroups already described within this type (Fig. 2). That VP1

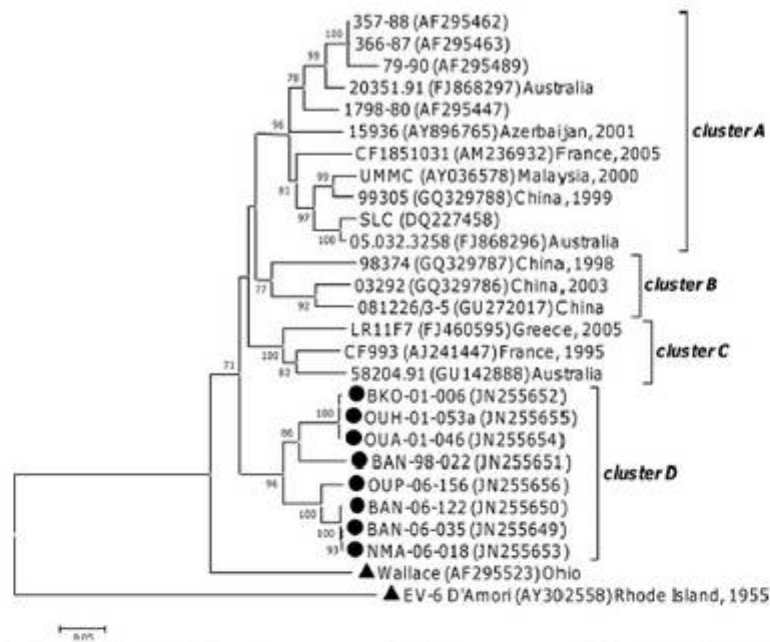


FIG 3 Phylogenetic relationships between the Central African E-7 sequences and other E-7 sequences available in GenBank (nt 1 to 413 according to Wallace VP1 numbering). The Central African sequences are indicated by filled circles. For the other sequences, the location and year of isolation are indicated, if known. The percent bootstrap values are indicated if higher than 70. Filled triangles indicate the prototype strains. The E-6 D'Amori sequence was introduced for correct rooting of the tree.

sequence was close to a sequence of an EV-A71 isolate from Nigeria. Many EV-A71 strains collected worldwide have been sequenced, but only few were from Africa. Besides the two sequences analyzed here, only two other African strains, isolated in Kenya, have been partly sequenced in the VP1 region. Both these strains were shown to belong to genogroup C (21). Our findings indicate that there is an additional genogroup whose limited circulation, which is apparently confined to Africa, could explain the fact that it was not detected before. Since the occurrence of severe outbreaks in Europe in the 1970s, EV-A71 has been considered a major threat capable of causing poliomyelitis-like disease (1, 46, 47). It is known to be the major cause of hand, foot, and mouth disease (HFMD) and has been implicated in tens of thousands of cases in Asia, with hundreds of fatal cases of neurologic disorders, since the late 1990s. Over the same period, EV-A71 has been implicated in rare and limited outbreaks in developed countries (65). The rapid spread of HFMD in Asia, a region where the disease is endemic, appears to be related to the diversification of certain genogroups and the emergence of new subgenogroups (61). The factors underlying the evolution, diversification, and pathogenicity of this virus remain obscure. The discovery of a previously unknown genogroup circulating in at least some African regions may provide a useful additional piece of the puzzle. Given the highly pathogenic nature of some EV-A71 strains (46, 57), the pathogenicity and ability to cause epidemics of members of this new genogroup should be investigated in future studies.

With the VP1 method, five supernatants were found to contain at least two different types but this number probably represents an underestimation (30). The detection of mixed genomic sequences in field samples requires the cloning of RT-PCR products and the

sequencing of several clones for each sample. This process is labor-intensive and not suitable for the screening of a large number of samples. We therefore chose to sequence the RT-PCR products directly, introducing a cloning step only when electropherograms showed superimposed peaks. The presence of two or more viruses would account for the discordance between VP1 and VP2 typing results for some samples. Alternatively, these discrepancies may have resulted from recombination events that had occurred within the capsid region. Such events are believed to be infrequent, probably because of the structural constraints imposed on virions, but previous studies have shown that they can occur in both PV species (14, 15, 23, 36, 39, 60, 67) and non-PV HEV species (16). Further analyses are under way to determine whether the discrepancies observed between the VP1 and VP2 methods for some samples can be attributed to such uncommon recombination events.

Given the bias due to the cell lines used for virus isolation mentioned above, the proportions of HEV-C strains detected in the CAR (approximately 18% for the whole period and 35% during the 2004 to 2006 period) are noteworthy. In most of the epidemiological studies that have been performed on HEV-infected patients in developed countries, the proportions of HEV-C isolates ranged from 0% to 4.7% (6, 8, 32, 52, 59, 63, 64). The high proportion of HEV-C species isolates in this study could have been due to the selection of stool samples from children with acute flaccid paralysis: in an investigation carried out over a 5-year period in China, in the same clinical context, 195 isolates were typed and 32 (16.4%) were found to be HEV-C (13). Similarly, in Cambodia, 40% of the non-PV HEV isolates from patients with acute flaccid paralysis were found to belong to the HEV-C species (7).

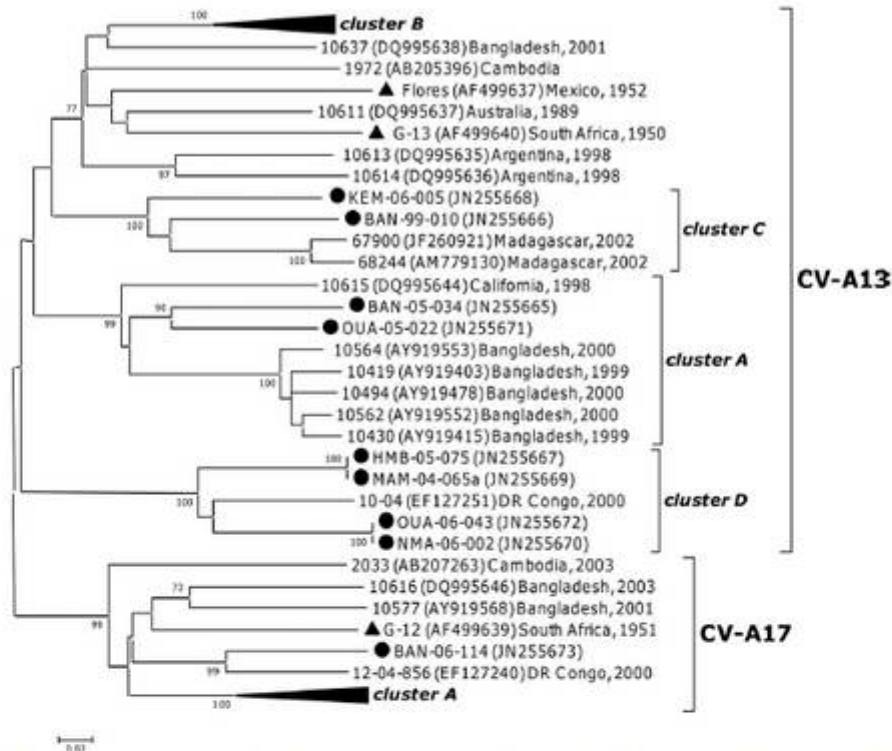


FIG 4 Phylogenetic relationships between partial VP1 Central African CV-A13 and CV-A17 sequences and sequences available in GenBank (nt 1 to 449 according to Flores VP1 numbering). The Central African sequences are indicated by filled circles. For the other sequences, the location and year of isolation are indicated in the tree. Filled triangles indicate the prototype strains. Previously reported clusters that do not contain any Central African sequences are collapsed. Percent bootstrap values are indicated if higher than 70.

The HEV-C species also include the three PV types. Intraspecies recombination events between wild-type or vaccine PV stains and non-PV HEV-C strains have been previously reported to have given rise to epidemic recombinant VDPV strains (22, 38). The cocirculation of PV and other HEV-C strains might provide a favorable context for the occurrence of such recombination events. Thus, the two outbreaks due to recombinant VDPV that occurred in Madagascar in the 2000s (50, 53) were linked to the high frequency of HEV-C on this island (12, 28, 29, 49, 51). A recombinant PV/non-PV HEV-C virus was also identified in Cambodia (7). The high frequency of HEV-C in the CAR, associated with the widespread use of oral PV vaccine and the sporadic importation of wild-type PV strains into the country (PV-3 in

2009 and PV-1 in 2011, according to reference 5), could promote the emergence of recombinant VDPV.

In conclusion, this retrospective report highlights the considerable diversity of HEV species circulating in the CAR. That population contains a number of lineages of viruses circulating worldwide but also several lineages that seem to be limited to Africa. In particular, the newly identified EV-A71 genogroup described here has never been observed outside central Africa and merits particular attention due to its potential pathogenicity. The high proportion of HEV-C isolates among those collected from children with acute flaccid paralysis is also a matter of concern, as it suggests that there may be a risk of emergence of recombinant PV/non-PV HEV-C strains with increased virulence.

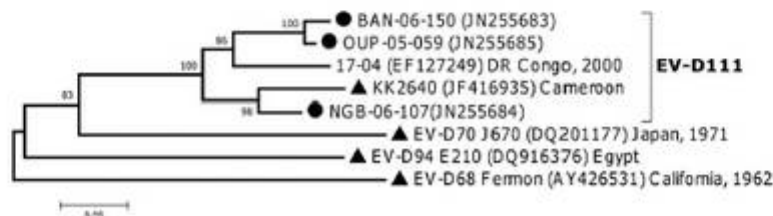


FIG 5 Phylogenetic relationships between Central African EV-D111 sequences and other HEV-D sequences, based on partial VP1 sequences (nt 117 to 471 according to KK2640 VPI numbering). The Central African sequences are indicated by filled circles. For the other sequences, the location and year of isolation are indicated, if known. Filled triangles indicate the prototype strains.

ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to Coralie Tran, Jean-Michel Thiberge, Laure Diancourt, and Valérie Caro (Plateforme de géotypage des pathogènes et santé publique, Institut Pasteur, Paris, France) for virus sequencing, Matthew Pfloum (Emory University, Atlanta, GA) for initiating the VP1 amplification work, Alexandre Manirakiza (Institut Pasteur de Bangui) for the selection of isolates, and Jean-Luc Bailly (Université d'Auvergne) for fruitful advice.

This study was funded by the Institut Pasteur (PTR276), the French Agence nationale de la recherche (ANR 09 MIEN 019), the Fondation pour la recherche médicale (DMI20091117313), and the WHO/CAR bureau office.

REFERENCES

- Abzug MJ. 2009. Enterovirus 71: emergence of the new poliomyelitis. *S. Afr. J. Epidemiol. Infect.* 24:5–8.
- Anonymous. 2004. Isolation and identification of polioviruses, p 87–100. *In* Polio laboratory manual. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Anonymous. 2010. Non-PV enterovirus and human parechovirus surveillance—United States, 2006–2008. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 59:1577–1580.
- Anonymous. 2011. Update on vaccine-derived polioviruses—worldwide, July 2009–March 2011. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 60:846–850.
- Anonymous. 2011. Wild poliovirus 2005–2011. World Health Organization, Geneva, Switzerland. http://www.polioeradication.org/Portals/0/Document/Data&Monitoring/Wild_poliovirus_list_2005_2011_08Nov.pdf.
- Antona D, et al. 2007. Surveillance of enteroviruses in France, 2000–2004. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 26:403–412.
- Arita M, et al. 2005. A Sabin 3-derived poliovirus recombinant contained a sequence homologous with indigenous human enterovirus species C in the viral polymerase coding region. *J. Virol.* 79:12650–12657.
- Bahri O, et al. 2005. Enteroviruses in Tunisia: virological surveillance over 12 years (1992–2003). *J. Med. Microbiol.* 54:63–69.
- Bailly JL, et al. 2009. Phylogeography of circulating populations of human echovirus 30 over 50 years: nucleotide polymorphism and signature of purifying selection in the VP1 capsid protein gene. *Infect. Genet. Evol.* 9:699–708.
- Bailly JL, et al. 2011. Repeated genomic transfers from echovirus 30 to echovirus 6 lineages indicate co-divergence between co-circulating populations of the two human enterovirus serotypes. *Infect. Genet. Evol.* 11: 276–289.
- Bessaud M, et al. 2008. Characterization of the genome of human enteroviruses: design of generic primers for amplification and sequencing of different regions of the viral genome. *J. Virol. Methods* 149:277–284.
- Bessaud M, Joffret ML, Holmblat B, Razafindratsimandresy R, Delpeyroux F. 2011. Genetic relationship between cocirculating human enteroviruses species C. *PLoS One* 6:e24823.
- Bingjun T, et al. 2008. Molecular typing and epidemiology of non-PV enteroviruses isolated from Yunnan Province, the People's Republic of China. *J. Med. Virol.* 80:670–679.
- Blomqvist S, Bruu AL, Stenvik M, Hovi T. 2003. Characterization of a recombinant type 3/type 2 poliovirus isolated from a healthy vaccinee and containing a chimeric capsid protein VP1. *J. Gen. Virol.* 84:573–580.
- Blomqvist S, et al. 2010. Recurrent isolation of poliovirus 3 strains with chimeric capsid protein Vp1 suggests a recombination hot-spot site in Vp1. *Virus Res.* 151:246–251.
- Bousslama L, et al. 2007. Natural recombination event within the capsid genomic region leading to a chimeric strain of human enterovirus B. *J. Virol.* 81:8944–8952.
- Brown BA, et al. 2009. Resolving ambiguities in genetic typing of human enterovirus species C clinical isolates and identification of enterovirus 96, 99 and 102. *J. Gen. Virol.* 90:1713–1723.
- Brown BA, Oberste MS, Alexander JP, Jr, Kennett ML, Pallansch MA. 1999. Molecular epidemiology and evolution of enterovirus 71 strains isolated from 1970 to 1998. *J. Virol.* 73:9969–9975.
- Bryden AS. 1992. Isolation of enteroviruses and adenoviruses in continuous simian cell lines. *Med. Lab. Sci.* 49:60–65.
- Caro V, Guillot S, Delpeyroux F, Crainic R. 2001. Molecular strategy for 'serotyping' of human enteroviruses. *J. Gen. Virol.* 82:79–91.
- Chakraborty R, et al. 2004. An epidemic of enterovirus 71 infection among HIV-1-infected orphans in Nairobi. *AIDS* 18:1968–1970.
- Combels N, Holmblat B, Joffret ML, Colbere-Garapin F, Delpeyroux F. 2011. Recombination between poliovirus and coxsackie A viruses of species C: a model of viral genetic plasticity and emergence. *Viruses* 3:1460–1484.
- Dedevidis E, et al. 2008. Complete genomic characterization of an intertypic Sabin 3/Sabin 2 capsid recombinant. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 52:343–351.
- Deshpande JM, Nadkarni SS, Francis PP. 2003. Enterovirus 71 isolated from a case of acute flaccid paralysis in India represents a new genotype. *Curr. Sci.* 84:1350–1353.
- Harvala H, et al. 2011. Detection and genetic characterization of enteroviruses circulating among wild populations of chimpanzees in Cameroon: relationship with human and simian enteroviruses. *J. Virol.* 85:4480–4486.
- Heim A. 2005. From poliovirus surveillance to enterovirus surveillance: a complete picture? *J. Med. Microbiol.* 54:1–2.
- Hu YF, et al. 2011. Complete genome analysis of coxsackievirus A2, a4, a5, and a10 strains isolated from hand, foot, and mouth disease patients in China revealing frequent recombination of human enterovirus A. *J. Clin. Microbiol.* 49:2426–2434.
- Iwai M, et al. 2006. Molecular epidemiology of echoviruses 11 and 13, based on an environmental surveillance conducted in Toyama Prefecture, 2002–2003. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:6381–6387.
- Jegouic S, et al. 2009. Recombination between polioviruses and co-circulating coxsackie A viruses: role in the emergence of pathogenic vaccine-derived polioviruses. *PLoS Pathog.* 5:e1000412.
- Joffret ML, et al. Common and diverse features of co-circulating type 2 and 3 recombinant vaccine-derived polioviruses isolated from patients with poliomyelitis and healthy children. *J. Infect. Dis.*, in press.
- Junttila N, et al. 2007. New enteroviruses, EV-93 and EV-94, associated with acute flaccid paralysis in the Democratic Republic of the Congo. *J. Med. Virol.* 79:393–400.
- Kew OM, Sutter RW, de Gourville EM, Dowdle WR, Pallansch MA. 2005. Vaccine-derived polioviruses and the endgame strategy for global polio eradication. *Annu. Rev. Microbiol.* 59:587–635.
- Khetsuriani N, Lamonte A, Oberste MS, Pallansch M. 2006. Neonatal enterovirus infections reported to the national enterovirus surveillance system in the United States, 1983–2003. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 25:889–893.
- Kincaid O, Lipton HL. 2006. Viral myelitis: an update. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 6:469–474.
- Kyriakopoulou Z, et al. 2010. Molecular identification and full genome analysis of an echovirus 7 strain isolated from the environment in Greece. *Virus Genes* 40:183–192.
- Manirakiza A, Picard E, Ngbale R, Menard D, Gouandjika-Vasilache I. 2010. OPV strains circulation in HIV infected infants after National Immunisation Days in Bangui, Central African Republic. *BMC Res. Notes* 3:136.
- Martin J, et al. 2002. Isolation of an intertypic poliovirus capsid recombinant from a child with vaccine-associated paralytic poliomyelitis. *J. Virol.* 76:10921–10928.
- Mehrabi Z, et al. 2011. Molecular detection of different types of non-PV enteroviruses in acute flaccid paralysis cases and healthy children, a pilot study. *J. Clin. Virol.* 50:181–182.
- Minor P. 2009. Vaccine-derived poliovirus (VDPV): impact on poliomyelitis eradication. *Vaccine* 27:2649–2652.
- Mueller JE, et al. 2009. Environmental poliovirus surveillance during oral poliovirus vaccine and inactivated poliovirus vaccine use in Cordoba Province, Argentina. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:1395–1401.
- Nasri D, et al. 2007. Typing of human enterovirus by partial sequencing of VP2. *J. Clin. Microbiol.* 45:2370–2379.
- Nasri D, et al. 2007. Basic rationale, current methods and future directions for molecular typing of human enterovirus. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 7:419–434.
- Nix WA, Oberste MS, Pallansch MA. 2006. Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 44:2698–2704.
- Norder H, Bjerregaard L, Magnius LO. 2001. Homotypic echoviruses share aminoterminal VP1 sequence homology applicable for typing. *J. Med. Virol.* 63:35–44.

44. Oberste MS, et al. 1999. Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. *J. Clin. Microbiol.* 37:1288–1293.
45. Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Pallansch MA. 1999. Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification. *J. Virol.* 73:1941–1948.
46. Ooi MH, Wong SC, Lewthwaite P, Cardoso MJ, Solomon T. 2010. Clinical features, diagnosis, and management of enterovirus 71. *Lancet Neurol.* 9:1097–1105.
47. Palacios G, Oberste MS. 2005. Enteroviruses as agents of emerging infectious diseases. *J. Neurovirol.* 11:424–433.
48. Racaniello VR. 2007. *Picornaviridae: the viruses and their replication*, p 795–838. In Knipe DM (ed), *Fields virology*, 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
49. Rakoto-Andrianarivelo M, et al. 2007. Co-circulation and evolution of polioviruses and species C enteroviruses in a district of Madagascar. *PLoS Pathog.* 3:e191.
50. Rakoto-Andrianarivelo M, et al. 2008. Reemergence of recombinant vaccine-derived poliovirus outbreak in Madagascar. *J. Infect. Dis.* 197:1427–1435.
51. Rakoto-Andrianarivelo M, et al. 2005. High frequency of human enterovirus species C circulation in Madagascar. *J. Clin. Microbiol.* 43:242–249.
52. Roth B, Enders M, Arents A, Pfitzner A, Terletskaia-Ladwig E. 2007. Epidemiologic aspects and laboratory features of enterovirus infections in Western Germany, 2000–2005. *J. Med. Virol.* 79:956–962.
53. Rousset D, et al. 2003. Recombinant vaccine-derived poliovirus in Madagascar. *Emerg. Infect. Dis.* 9:885–887.
54. Saad M, et al. 2005. Acute flaccid paralysis: the spectrum of a newly recognized complication of West Nile virus infection. *J. Infect.* 51:120–127.
55. Savolainen-Kopra C, Blomqvist S. 2010. Mechanisms of genetic variation in polioviruses. *Rev. Med. Virol.* 20:358–371.
56. Schuffenecker I, et al. 2011. Epidemiology of human enterovirus 71 infections in France, 2000–2009. *J. Clin. Virol.* 50:50–56.
57. Solomon T, et al. 2010. Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of enterovirus 71. *Lancet Infect. Dis.* 10:778–790.
58. Tamura K, et al. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28:2731–2739.
59. Tan CY, et al. 2011. A retrospective overview of enterovirus infection diagnosis and molecular epidemiology in the public hospitals of Marseille, France (1985–2005). *PLoS One* 6:e18022.
60. Tao Z, et al. 2010. Isolation of a recombinant type 3/type 2 poliovirus with a chimeric capsid VP1 from sewage in Shandong, China. *Virus Res.* 150:56–60.
61. Tee KK, et al. 2010. Evolutionary genetics of human enterovirus 71: origin, population dynamics, natural selection, and seasonal periodicity of the VP1 gene. *J. Virol.* 84:3339–3350.
62. Thoelen I, et al. 2004. Analysis of the serotype and genotype correlation of VP1 and the 5′ noncoding region in an epidemiological survey of the human enterovirus B species. *J. Clin. Microbiol.* 42:963–971.
63. Trallero G, et al. 2010. Enteroviruses in Spain over the decade 1998–2007: virological and epidemiological studies. *J. Clin. Virol.* 47:170–176.
64. Tseng FC, et al. 2007. Epidemiological survey of enterovirus infections occurring in Taiwan between 2000 and 2005: analysis of sentinel physician surveillance data. *J. Med. Virol.* 79:1850–1860.
65. van der Sanden S, van der Avoort H, Lemey P, Uslu G, Koopmans M. 2010. Evolutionary trajectory of the VP1 gene of human enterovirus 71 genogroup B and C viruses. *J. Gen. Virol.* 91:1949–1958.
66. Wong M, Connolly AM, Noetzel MJ. 1999. Poliomyelitis-like syndrome associated with Epstein-Barr virus infection. *Pediatr. Neurol.* 20:235–237.
67. Zhang Y, et al. 2010. Characterization of a rare natural intertypic type 2/type 3 penta-recombinant vaccine-derived poliovirus isolated from a child with acute flaccid paralysis. *J. Gen. Virol.* 91:421–429.

3 Données complémentaires

L'utilisation en parallèle de deux techniques de typage ciblant deux régions différentes (VP1 et VP2) peut permettre la détection de virus recombinants (notamment la présence de recombinaisons intra- et inter-typiques, voire inter-espèces). Dans ce but, on a utilisé la technique VP2 mise au point dans le cadre de cette thèse sur 98 souches d'EV isolées et typées par la technique VP1 à l'institut Pasteur de Bangui (RCA). Parmi ces 98 souches, 7 n'ont pas pu être amplifiées par la technique VP2 et 11 ont montré des résultats discordants. Ces 11 souches « discordantes » par typage VP1 et VP2 ont été analysées au cours d'un stage à l'Institut Pasteur de Paris, dans l'Unité de Virologie du Pr. Francis Delpeyroux.

3.1 Clonage

Un clonage par dilutions limites a été effectué sur quatre des 11 souches discordantes avec 3 clones analysés par souche (**Tableau 8**) (**Figure 31**).

Tableau 8 : Clonage de 4 souches d'EV isolées à l'institut Pasteur de Bangui. Trois clones ont été produits par chaque virus.

	Nom de la souche	Clone 1	Clone 2	Clone 3
1	HMB-03-016	cl1.1 P1/RD du 16/02/12	cl1.2 P1/RD du 16/02/12	cl1.3 P1/RD du 16/02/12
2	KEM-01-083	cl1.1 P1/RD du 16/02/12	cl1.2 P1/RD du 16/02/12	cl1.3 P1/RD du 16/02/12
3	LOB-97007C3	cl1.1 P1/RD du 17/02/12	cl1.2 P1/RD du 17/02/12	cl1.3 P1/RD du 17/02/12
4	MAM-06-060	cl1.1 P1/RD du 17/02/12	cl1.2 P1/RD du 17/02/12	cl1.3 P1/RD du 17/02/12

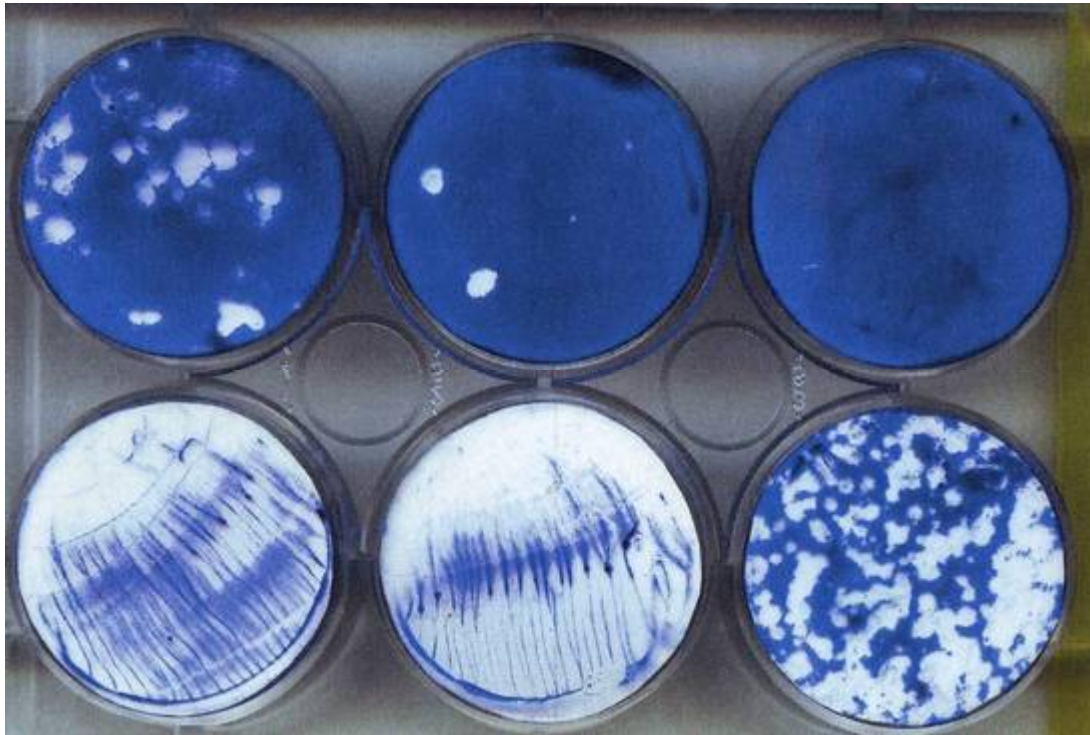


Figure 31 : Illustration du clonage pour le clone c11.1 P1/RD du 17/02/2012.

3.2 Résultats

Pour les 11 souches montrant des résultats discordants entre les typages VP1 et VP2, il était légitime de suspecter la présence soit d'un mélange de plusieurs souches, soit de souches recombinantes. Dans les 11 cas, il a été mis en évidence un mélange de souches identifiées alternativement par typage VP1 et VP2. Les souches identifiées dans chacun des mélanges correspondaient aux sérotypes mis en évidence par les typages antérieurs.

DISCUSSION GENERALE

La surveillance épidémiologique de la circulation des souches d'EV nécessite la détermination du sérotype de ces souches isolées dans des prélèvements cliniques, notamment dans le contexte mondial de l'éradication de la poliomyélite.

Cependant, les EV non polio doivent également faire l'objet d'une surveillance renforcée surtout s'il s'agit des sérotypes responsables d'épidémies de grande ampleur ou de pathologies sévères (EV-A71).

En utilisant des souches de référence et des souches cliniques, la méthode CODEHOP VP2 que nous avons mise au point s'est avérée plus sensible et spécifique (moins de bandes parasites) que la technique originale VP2 décrite précédemment dans notre laboratoire (Nasri *et al.*, 2007b). Par comparaison avec la méthode de référence VP1 (Nix *et al.*, 2006) sur des souches appartenant aux 4 espèces d'EV, cette technique présentait au moins la même sensibilité, et, pour plusieurs d'entre elles, une meilleure sensibilité, à l'exception de la souche vaccinale PV-1, moins bien reconnue par typage VP2 (**Figure 1 de l'article 1 et Tableau 5**).

Suite à ces résultats encourageants, nous avons évalué prospectivement la capacité de cette nouvelle technique à typer les EV sans recourir à l'étape de culture cellulaire. Cette technique VP2 a été évaluée sur un large panel d'échantillons cliniques trouvés positifs par une technique moléculaire de criblage ciblant la région 5'NC. Globalement, le géotypage a été possible pour 58,0 % des échantillons, avec une corrélation positive entre la capacité de typage et la charge virale des échantillons.

Le **Tableau 9** présente la synthèse d'une série d'études qui ont rapporté des performances de typage direct des EV à partir d'échantillons cliniques. Certaines ont testé un panel d'échantillons contenant exclusivement ou principalement des souches d'EV de l'espèce B (Brunel *et al.*, 2008 ; Kumar *et al.*, 2012, 2013) ou ont utilisé des amorces spécifiques de l'espèce B (Iturriza-Gómara *et al.*, 2006a ; Mirand *et al.*, 2008b ; Thoelen *et al.*, 2003a ; Cabrerizo *et al.*, 2008a ; Leitch *et al.*, 2009a ; Mirand *et al.*, 2012 ; Tavakoli *et al.*, 2008b), ce qui rend plus facile l'obtention d'un typage. Pour beaucoup de ces études, le dénominateur (nombre total de souches) n'est pas toujours très clairement défini. Avec des amorces « pan-entérovirus », la sensibilité globale des techniques de typage direct ciblant les quatre espèces d'EV humaines (A à D) sur des échantillons cliniques n'est pas très élevé, même en utilisant des amorces dégénérées de type CODEHOP (**Tableau 9**).

Tableau 9: Genotyping efficiency by direct analysis in various clinical specimens.

Author (year)	Prospective/Retrospective	Region (ref)	Number of PCR steps	Species specific primers	Samples			Reported % genotyping success
					Types	Predominance of one species	Number analyzed	
Ibrahim (2013)	Prospective	VP2 (Ibrahim et al., 2013)	2 (nested PCR)	No	CSF, throat and stools mainly	No	352	58.0
Ibrahim (2013) (unpublished)	Prospective	VP1 (Nix <i>et al.</i> , 2006b)	2 (nested PCR)	No	CSF mainly	EV-B mainly	98	48.0
		VP2 (Ibrahim et al., 2013)	2 (nested PCR)	No	CSF mainly	EV-B mainly	98	53.0
		VP1 (Nix <i>et al.</i> , 2006b) and VP2 (Ibrahim et al., 2013)	4 (2 nested PCR)	No	CSF mainly	EV-B mainly	98	65.0
Casas (2001a)	Retrospective	VP1	2 (nested)	no	14 CSF and 4 stools	no	18	100
Casas (2001b)								

Thoelen (2003c)	Prospective	VP1	2 (nested PCR)	yes (EV-B only)	CSF	EV-B only	122	65
Iturriza-Gomara (2006)	Retrospective	VP1	2 (semi-nested PCR) for each species (A, B and C)	yes (EV-A, B or C)	Serum	no	47	0
					CSF		9	66.7
					Feces Throat		24 5	87.5 100
Tavakoli (2008)	Prospective	VP1 (Thoelen <i>et al.</i> , 2003c) first and then (Nix <i>et al.</i> , 2006b)	2 (nested PCR)	yes (EV-B only) for the first method, and no for the second	CSF mainly and some stools	EV-B mainly	67	88.1
Mirand (2008)	Retrospective	VP1 (Mirand <i>et al.</i> , 2006b)	2 (semi-nested)	yes (EV-B)	CSF	EV-B only	45	93.3
	Retrospective	VP1 (Mirand <i>et al.</i> , 2006b) and VP4/VP2	4 (2 semi-nested)	yes (EV-B) for VP1	CSF	EV-B only	45	97.8
	Prospective	VP1 (Mirand <i>et al.</i> , 2006b)	2 (semi-nested)	yes (EV-B)	CSF	EV-B only	54	77.8

	Prospective	VP1 (Mirand <i>et al.</i> , 2006b) and VP4/VP2	4 (2 semi-nested)	yes (EV-B) for VP1	CSF	EV-B mainly	54	96.3
	Prospective	VP1 (Mirand <i>et al.</i> , 2006b) and VP4/VP2 (Mirand <i>et al.</i> , 2008c)	4 (2 semi-nested)	yes (EV-B) for VP1	throat	no	143	90.2
Brunel (2008)	Prospective	VP1 (Oberste <i>et al.</i> , 2003b)	1	no	CSF	EV-B mainly	73	69.9
Bolanaki (2008)	Retrospective	VP1 (Oberste <i>et al.</i> , 2003b)	1	no	Stools	no	30	100
Bolanaki (2008)	Retrospective	VP1 (Caro <i>et al.</i> , 2001b)	1	no	Stools	no	30	100
Cabrerizo (2008)	Prospective	VP1 (Casas <i>et al.</i> , 2001b) with modifications	1 first PCR and 3 different semi-nested PCR according to (Oberste <i>et al.</i> , 2006b)	yes (3 sets of primers species specific (EV-A, B or C) according to (Oberste <i>et al.</i> , 2006b)	CSF (n=202) Throat (n=13)	EV-B only	215	64.2

McWilliam Leitch (2009)	Prospective	VP1 (Leitch <i>et al.</i> , 2009a)	1 st PCR then 2 different semi-nested PCR (EV-A or B)	yes (EV-A or B) and then sequencing in the 5'NC	CSF mainly	EV-B mainly	64	97
Mirand (2012)	Prospective	VP1 (Mirand <i>et al.</i> , 2006b)	2 (semi-nested)	yes (EV-B)	throat	no	143	74.8
Kumar (2012)	Prospective	VP1 (Nix <i>et al.</i> , 2006b)	2 (semi-nested)	No	CSF	EV-B only	45	88.9
Papadakis (2014)	Prospective	VP1	2 (nested PCR) (1 st round : Casas <i>et al.</i> , 2001, and 2 nd round : Oberste <i>et al.</i> , 1999)	No	CSF	EV-B mainly	729	43.0

Dans une étude très récente conduite à Victoria, Australie, le génotypage VP1, réalisée directement sur 729 échantillons positifs de LCR pour EV entre 2007 et 2012, a donné un taux d'identification de 43% (Papadakis *et al.* 2014).

A la lumière de ces considérations, deux stratégies peuvent être proposées pour le typage d'EV dans des échantillons humains. La première consiste à commencer par une technique couvrant un large spectre de types d'EV, comme le montre notre travail, et à retester les échantillons négatifs avec des amorces spécifiques des espèces choisies en fonction de données cliniques et épidémiologiques. La seconde stratégie consiste en l'utilisation d'amorces spécifiques d'espèce B puis d'une technique de plus large spectre pour les souches non identifiées à ce premier stade, comme par exemple cela est effectué au laboratoire de Virologie de Clermont Ferrand, France (Mirand *et al.*, 2008a).

D'un point de vue épidémiologique, un relevé exhaustif de tous les génotypes circulants n'est pas nécessaire. Cependant la méthode de typage doit être capable de détecter presque uniformément tous les différents types d'EV.

Les résultats du premier article suggèrent que la capacité d'une souche à être typée dans un prélèvement clinique est liée à son origine et à sa charge virale. Ces deux paramètres sont largement confondus (Oberste *et al.*, 2010 ; Volle *et al.*, 2012). Actuellement, les échantillons de LCR, qui sont connus pour leur faible charge virale ont été typés dans environ 50% des cas, en revanche, 66 % des autres types d'échantillons (gorges, selles) ont été trouvés typables par la même stratégie. Par conséquent, la charge virale initiale observée avec la technique de détection 5'NC pourrait être utilisée pour déterminer quelle stratégie a la plus grande probabilité de permettre un typage. Dans le LCR et dans des échantillons périphériques ayant une charge virale faible, les techniques utilisant des amorces spécifiques d'espèce pourraient être recommandées en premier, alors que la méthode CODEHOP ciblant la région VP2 pourrait être réalisée sur des échantillons présentant une charge virale élevée (un CT < 23 avec le test R-gene est associé à une probabilité de typage de 75 %). En cas de méningite à EV, il est suggéré d'utiliser un échantillon périphérique (prélèvement de gorge ou des selles) en complément du LCR pour augmenter la chance de typer la souche d'EV impliquée lorsque l'on utilise la méthode de typage VP2.

Malgré les améliorations portées à notre technique en utilisant des amorces plus performantes fondées sur l'approche CODEHOP, cette dernière reste limitée dans quelques cas de typage à cause de la présence de séquences humaines qui interfèrent sur la spécificité des amorces CODEHOP. Cette limitation a été observée notamment en cas d'infection par E-11.

Par ailleurs, la technique de typage VP2 a été utilisée, en parallèle avec la technique VP1, pour typer directement les EV présents dans les prélèvements environnementaux. Malgré une sensibilité encore très médiocre liée, en grande partie, à la présence d'inhibiteurs des réactions PCR dans ce type d'échantillons, cette approche s'est avérée possible, notamment avec la technique VP2 qui a permis le recouvrement de types appartenant à au moins 3 des 4 espèces d'EV humains (**Figure 1 de l'article 2**).

En somme, la méthode de typage VP2 nouvellement décrite utilisant des amorces CODEHOP s'est révélée être une bonne alternative à la technique de référence VP1 pour l'identification des souches d'EV sans recours à l'isolement sur culture cellulaire, au moins dans les échantillons cliniques avec une charge virale élevée.

Comme beaucoup de virus à ARN, l'évolution naturelle des EV repose sur l'accumulation de mutations ponctuelles et sur la recombinaison génétique. La recombinaison génétique se définit par l'échange d'éléments génétiques entre deux virus durant leur réplication à l'intérieur d'une même cellule, aboutissant à l'apparition d'un virus « chimérique » ou « mosaïque ». Alors que le rôle de la recombinaison dans l'évolution des PV a été démontrée depuis longtemps, ce n'est que récemment qu'est apparue l'importance de ce phénomène dans l'évolution des EV non polio (Santti *et al.*, 1999). Ces études ont démontré que les régions codant les protéines non structurales sont les sites préférentiels des événements de la recombinaison et que celles codant les protéines de capsid VP2-VP3-VP1 constituent, en revanche, un bloc dans lequel la fréquence de recombinaison est très faible. Dans le travail de Bouslama *et al.*, l'étude des souches d'EV par analyse simultanée de deux régions génomiques codant deux protéines de structure différentes, VP2 et VP1, a permis de caractériser une nouvelle souche résultant d'un événement de recombinaison entre deux souches de CV-B (CV-B3 et CV-B4) au niveau de la région génomique codant la protéine de capsid VP3 (Bouslama *et al.*, 2007).

L'utilisation en parallèle de deux techniques de typage ciblant deux régions différentes (VP1 et VP2) peut ainsi permettre la détection de virus recombinants. Dans ce but, on a utilisé la nouvelle technique VP2 mise au point pour tester 98 souches d'EV isolées et typées par la technique VP1 à l'institut Pasteur de Bangui (République Centre-Africaine). Les résultats obtenus avec la nouvelle technique VP2 corrélaient dans 88% des cas la technique de référence VP1. Concernant les 11 souches montrant des résultats discordants entre les typages VP1 et VP2, il était légitime de suspecter la présence soit d'un mélange de plusieurs souches, soit de souches recombinantes. L'analyse

approfondie de ces 11 souches a mis en évidence un mélange de souches identifiées alternativement par le typage VP1 et VP2. Les souches identifiées dans chacun des mélanges correspondaient aux sérotypes mis en évidence par les typages antérieurs.

Grâce à l'utilisation de deux cibles dans VP1 et VP2, cette approche a également identifié une séquence VP1 d'EV-A71 qui n'appartenaient pas aux génogroupes déjà décrits au sein de ce type. Cette séquence VP1 était proche d'une séquence d'une souche d'EV-A71 isolée au Nigeria. De nombreuses souches d'EV-A71 recueillies dans le monde entier ont été séquencées, mais seulement quelques-unes venaient d'Afrique. Depuis l'apparition de quelques cas graves en Europe dans les années 1970, et surtout en Asie du Sud-Est depuis la fin des années 1990, l'EV-A71 a été considéré comme un menace majeure capable de provoquer une infection grave avec un tropisme neurologique (Abzug, 2009 ; Ooi *et al.*, 2010). Ce type est connu pour être la principale cause du syndrome main-pied-bouche (HFMD) et a été impliqué dans des dizaines de milliers de cas en Asie, avec des centaines de cas mortels de troubles neurologiques depuis la fin des années 1990. Sur la même période, EV-A71 a été impliqué dans les épidémies rares et limitées dans les pays développés (van der Sanden S, 2010), avec peu des cas mortels (Vallet *et al.*, 2009 ; Schuffenecker *et al.*, 2011 ; Kassab, 2013). La propagation rapide de HFMD en Asie, une région où la maladie est endémique, semble être liée à la diversification de certains génogroupes et à l'émergence de nouveaux « subgénogroupes » (Tee *et al.*, 2010) en combinaison avec une sensibilité génétique particulière de ces populations (Lv *et al.*, 2013).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les EV sont de petits virus à ARN qui représentent un excellent marqueur de pollution fécale et sont très fréquemment retrouvés dans les eaux contaminées par des fécès, les coquillages ou les aliments crus. Par ailleurs, ces virus sont responsables de nombreuses infections dans l'espèce humaine, allant de formes inapparentes à des pathologies mortelles. La détection et l'identification des EV ont reposé pendant longtemps sur les techniques de culture cellulaire. Le typage des souches se fait désormais par séquençage des gènes codant les protéines de capsid (VP1, VP2 et VP4). Le principal écueil de la plupart de ces techniques est la nécessité de travailler à partir de souches isolées en culture cellulaire. Plus récemment, des auteurs ont proposé des techniques combinées de détection et de typage utilisant une amplification directe à partir d'échantillons cliniques ou environnementaux.

Nous avons mis au point une nouvelle méthode de typage des EV reposant sur l'amplification d'une partie de la région VP2 à l'aide d'amorces dessinées selon la stratégie CODEHOP.

Sous l'angle diagnostique, les perspectives de cette innovation technologique sont importantes puisqu'elle permet de s'affranchir de la culture cellulaire pour la détection et le typage des EV. Cet objectif a été rempli et la technique est désormais utilisée en routine dans notre laboratoire pour le typage des EV. La mise au point d'un test commercial pourrait être envisagée.

Sur un plan de la virologie fondamentale, cette technique, couplée à la technique VP1, permet de rechercher des recombinaisons inter-typiques au sein des différentes espèces d'EV, tant dans la nature que chez l'homme ; le travail fait à l'Institut Pasteur de Paris n'a malheureusement pas permis d'identifier de telles souches.

Sur le plan épidémiologique, il est possible grâce à ce test :

- (i) de proposer une surveillance environnementale (comme cela a été démontré sur les prélèvements d'eaux usées de Monastir),
- (ii) de suivre les génotypes circulants en temps réel,
- (iii) de faire la distinction polio et non polio nécessaire au suivi de l'éradication de cette pathologie (objectif prioritaire de l'OMS),
- (iv) d'évaluer le rôle pathologique de génotypes peu ou pas cultivables,
- (v) et enfin de mettre en évidence de nouveaux génotypes, comme cela a été testé dans l'étude faite sur des prélèvements de selles provenant de Centre-Afrique.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Abzug MJ. (2009).** Enterovirus 71: emergence of the new poliomyelitis. *SAfr J Epidemiol Infect* 24:5– 8.
- Abzug, MJ. (2014).** The enteroviruses: problems in need of treatments. *J Infect* 68, 108-14.
- Adams, M. J., King, A. M. Q. & Carstens, E. B. (2013).** Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2013). *Arch Virol* 158, 2023–2030.
- Agol, V. I., Paul, A. V. & Wimmer, E. (1999).** Paradoxes of the replication of picornaviral genomes. *Virus Res* 62, 129–147.
- Agrez, M. V., Shafren, D. R., Gu, X., Cox, K., Sheppard, D. & Barry, R. D. (1997).** Integrin alpha v beta 6 enhances coxsackievirus B1 lytic infection of human colon cancer cells. *Virology* 239, 71–77.
- Akiyoshi, K., Nakagawa, N. & Suga, T. (2007).** An outbreak of aseptic meningitis in a nursery school caused by echovirus type 30 in Kobe, Japan. *Jpn J Infect Dis* 60, 66–68.
- Aldabe, R. & Carrasco, L. (1995).** Induction of membrane proliferation by poliovirus proteins 2C and 2BC. *Biochem Biophys Res Commun* 206, 64–76.
- Aldabe, R., Barco, A. & Carrasco, L. (1996).** Membrane permeabilization by poliovirus proteins 2B and 2BC. *J Biol Chem* 271, 23134–23137.
- Ammendolia, M. G., Tinari, A., Calcabrini, A. & Superti, F. (1999).** Poliovirus infection induces apoptosis in CaCo-2 cells. *J Med Virol* 59, 122–129.
- Andino, R., Rieckhof, G. E., Achacoso, P. L. & Baltimore, D. (1993).** Poliovirus RNA synthesis utilizes an RNP complex formed around the 5'-end of viral RNA. *EMBO J* 12, 3587–3598.
- Andréoletti, L., Lesay, M., Deschildre, A., Lambert, V., Dewilde, A. & Wattré, P. (2000).** Differential detection of rhinoviruses and enteroviruses RNA sequences associated with classical immunofluorescence assay detection of respiratory virus antigens in nasopharyngeal swabs from infants with bronchiolitis. *J Med Virol* 61, 341–346.
- Andréoletti, L., Bourlet, T., Moukassa, D., Rey, L., Hot, D., Li, Y., Lambert, V., Gosselin, B.,**

- Mosnier, JF., Stankowiak, C., Wattré, P (2000).** Enteroviruses can persist with or without active viral replication in cardiac tissue of patients with end-stage ischemic or dilated cardiomyopathy. *J Infect Dis.*182(4).
- Anis, E., Kopel, E., Singer, S. R., Kaliner, E., Moerman, L., Moran-Gilad, J., Sofer, D., Manor, Y., Shulman, L. M. & other authors. (2013).** Insidious reintroduction of wild poliovirus into Israel, 2013. *Euro Surveill* **18**.
- Antona, D., Chomel, J.-J. & Enterovirus Surveillance Laboratory Network. (2005).** Increase in viral meningitis cases reported in France, summer 2005. *Euro Surveill* **10**, E050908.1.
- Antona, D., Lévêque, N., Chomel, J. J., Dubrou, S., Lévy-Bruhl, D. & Lina, B. (2007).** Surveillance of enteroviruses in France, 2000-2004. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **26**, 403–412.
- Arnold, E., Luo, M., Vriend, G., Rossmann, M. G., Palmenberg, A. C., Parks, G. D., Nicklin, M. J. & Wimmer, E. (1987).** Implications of the picornavirus capsid structure for polyprotein processing. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**, 21–25.
- Ashwell, M. J., Smith, D. W., Phillips, P. A. & Rouse, I. L. (1996).** Viral meningitis due to echovirus types 6 and 9: epidemiological data from Western Australia. *Epidemiol Infect* **117**, 507–512.
- Auvinen, P., Mäkelä, M. J., Roivainen, M., Kallajoki, M., Vainionpää, R. & Hyypiä, T. (1993).** Mapping of antigenic sites of coxsackievirus B3 by synthetic peptides. *APMIS* **101**, 517–528.
- Avellón, A., Casas, I., Trallero, G., Pérez, C., Tenorio, A. & Palacios, G. (2003).** Molecular analysis of echovirus 13 isolates and aseptic meningitis, Spain. *Emerging Infect Dis* **9**, 934–941.
- Badorff, C., Berkely, N., Mehrotra, S., Talhouk, J. W., Rhoads, R. E. & Knowlton, K. U. (2000).** Enteroviral protease 2A directly cleaves dystrophin and is inhibited by a dystrophin-

based substrate analogue. *J Biol Chem* **275**, 11191–11197.

Bahri, O., Rezig, D., Nejma-Oueslati, B. B., Yahia, A. B., Sassi, J. B., Hogga, N., Sadraoui, A. & Triki, H. (2005). Enteroviruses in Tunisia: virological surveillance over 12 years (1992-2003). *J Med Microbiol* **54**, 63–69.

Bailey, J. M. & Tapprich, W. E. (2007). Structure of the 5' Nontranslated Region of the Coxsackievirus B3 Genome: Chemical Modification and Comparative Sequence Analysis. *J Virol* **81**, 650–668.

Bailly, J.-L., Chambon, M. & Peigue-Lafeuille, H. (1999). Diversité et variabilité des entérovirus. *Virologie* **3**, 281–95.

Bailly, J. L., Béguet, A., Chambon, M., Henquell, C. & Peigue-Lafeuille, H. (2000). Nosocomial transmission of echovirus 30: molecular evidence by phylogenetic analysis of the VP1 encoding sequence. *J Clin Microbiol* **38**, 2889–2892.

Bailly, J. L., Brosseau, D., Archimbaud, C., Chambon, M., Henquell, C. & Peigue-Lafeuille, H. (2002). Genetic diversity of echovirus 30 during a meningitis outbreak, demonstrated by direct molecular typing from cerebrospinal fluid. *J Med Virol* **68**, 558–567.

Bailly, J. L., Mirand, A., Henquell, C., Chambon, M., Charbonné, F., Traoré, O. & Peigue-Lafeuille, H. (2008). Génotypage et épidémiologie moléculaire des entérovirus non poliomyélitiques. *Virologie*, **12** (1) : 53-65.

Baines, JE., McGovern, RM., Persing, D., Gostout, BS. (2005). Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers (CODEHOP) for the detection of novel papillomaviruses and their application to esophageal and tonsillar carcinomas. *J. Virol. Methods* **123**:81–87.

Baltera, R. F., Jr & Tershak, D. R. (1992). Role of amino acid residue 187 of poliovirus polypeptide 2C in determining the guanidine trait. *Intervirology* **33**, 165–172.

Banerjee, R., Echeverri, A. & Dasgupta, A. (1997). Poliovirus-encoded 2C polypeptide

- specifically binds to the 3'-terminal sequences of viral negative-strand RNA. *J Virol* **71**, 9570–9578.
- Banerjee, R., Tsai, W., Kim, W. & Dasgupta, A. (2001).** Interaction of poliovirus-encoded 2C/2BC polypeptides with the 3' terminus negative-strand cloverleaf requires an intact stem-loop b. *Virology* **280**, 41–51.
- Barco, A. & Carrasco, L. (1995).** A human virus protein, poliovirus protein 2BC, induces membrane proliferation and blocks the exocytic pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **14**, 3349–3364.
- Barco, A., Feduchi, E. & Carrasco, L. (2000).** Poliovirus protease 3C(pro) kills cells by apoptosis. *Virology* **266**, 352–360.
- Barton, D. J. & Flanagan, J. B. (1997).** Synchronous replication of poliovirus RNA: initiation of negative-strand RNA synthesis requires the guanidine-inhibited activity of protein 2C. *J Virol* **71**, 8482–8489.
- Barton, D. J., Morasco, B. J. & Flanagan, J. B. (1999).** Translating ribosomes inhibit poliovirus negative-strand RNA synthesis. *J Virol* **73**, 10104–10112.
- Basavappa, R., Syed, R., Flore, O., Icenogle, J. P., Filman, D. J. & Hogle, J. M. (1994).** Role and mechanism of the maturation cleavage of VP0 in poliovirus assembly: structure of the empty capsid assembly intermediate at 2.9 Å resolution. *Protein Sci* **3**, 1651–1669.
- Beatrice, S. T., Katze, M. G., Zajac, B. A. & Crowell, R. L. (1980).** Induction of neutralizing antibodies by the coxsackievirus B3 virion polypeptide, VP2. *Virology* **104**, 426–438.
- Beck, M. A., Tracy, S., Coller, B. A., Chapman, N. M., Hufnagel, G., Johnson, J. E. & Lomonosoff, G. (1992).** Comoviruses and enteroviruses share a T cell epitope. *Virology* **186**, 238–246.
- Begier, E. M., Oberste, M. S., Landry, M. L., Brennan, T., Mlynarski, D., Mshar, P. A.,**

- Frenette, K., Rabatsky-Ehr, T., Purviance, K. & other authors. (2008).** An outbreak of concurrent echovirus 30 and coxsackievirus A1 infections associated with sea swimming among a group of travelers to Mexico. *Clin Infect Dis* **47**, 616–623.
- Belnap, D. M., Filman, D. J., Trus, B. L., Cheng, N., Booy, F. P., Conway, J. F., Curry, S., Hiremath, C. N., Tsang, S. K. & other authors. (2000).** Molecular tectonic model of virus structural transitions: the putative cell entry states of poliovirus. *J Virol* **74**, 1342–1354.
- Belsham, G. J. & Sonenberg, N. (2000).** Picornavirus RNA translation: roles for cellular proteins. *Trends Microbiol* **8**, 330–335.
- Bendig, J. & Earl, P. (2005).** The Lim Benyesh-Melnick antiserum pools for serotyping human enterovirus cell culture isolates—still useful, but may fail to identify current strains of echovirus 18. *Journal of Virological Methods* **127**, 96–99.
- Bessaud, M., Pillet, S., Ibrahim, W., Joffret, M-L., Pozzetto, B., Delpeyroux, F., Gouandjika-Vasilache, I., (2012).** Molecular characterization of human enteroviruses in the Central African Republic: uncovering wide diversity and identification of a new human enterovirus A71 genogroup. *J. Clin. Microbiol.* **50**:1650–1658.
- Bienz, K., Egger, D., Troxler, M. & Pasamontes, L. (1990).** Structural organization of poliovirus RNA replication is mediated by viral proteins of the P2 genomic region. *J Virol* **64**, 1156–1163.
- Blomqvist, S., Klemola, P., Kaijalainen, S., Paananen, A., Simonen, M-L., Vuorinen, T. & Roivainen, M. (2010).** Co-circulation of coxsackieviruses A6 and A10 in hand, foot and mouth disease outbreak in Finland. *J Clin Virol* **48**, 49–54.
- Blondel, B., Autret, A., Brisac, C., Pelletier, I., Martin-Latil, S., Jegouic, S., Bessaud, M., Joffret, M. L., Balanant, J. & other authors. (2008).** Genetic evolution of poliovirus: success and difficulties in the eradication of paralytic poliomyelitis. *Med Trop (Mars)* **68**,

189–202.

- Bolanaki, E., Kottaridi, C., Markoulatos, P., Margaritis, L., Katsorchis, T. (2005).** A comparative amplification of five different genomic regions on Coxsackie A and B viruses. Implications in clinical diagnostics. *Mol. Cell. Probes* **19**:127–135.
- Bolanaki, E., Kottaridi, C., Dedepsidis, E., Kyriakopoulou, Z., Pliaka, V., Pratti, A., Levidiotou-Stefanou, S. & Markoulatos, P. (2008).** Direct extraction and molecular characterization of enteroviruses genomes from human faecal samples. *Mol Cell Probes* **22**, 156–161.
- Borman, A. M., Deliat, F. G. & Kean, K. M. (1994).** Sequences within the poliovirus internal ribosome entry segment control viral RNA synthesis. *EMBO J* **13**, 3149–3157.
- Borman, A. M., Kirchweger, R., Ziegler, E., Rhoads, R. E., Skern, T. & Kean, K. M. (1997).** eIF4G and its proteolytic cleavage products: effect on initiation of protein synthesis from capped, uncapped, and IRES-containing mRNAs. *RNA* **3**, 186–196.
- Bourlet, T., Gharbi, J., Omar, S., Aouni, M. & Pozzetto, B. (1998).** Comparison of a rapid culture method combining an immunoperoxidase test and a group specific anti-VP1 monoclonal antibody with conventional virus isolation techniques for routine detection of enteroviruses in stools. *J Med Virol* **54**, 204–209.
- Bourlet, T., Caro, V., Minjolle, S., Jusselin, I., Pozzetto, B., Crainic, R., Colimon, R. (2003).** New PCR test that recognizes all human prototypes of enterovirus: application for clinical diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* **41**:1750–1752.
- Bouslama, L., Nasri, D., Chollet, L., Belguith, K., Bourlet, T., Aouni, M., Pozzetto, B. & Pillet, S. (2007).** Natural recombination event within the capsid genomic region leading to a chimeric strain of human enterovirus B. *J Virol* **81**, 8944–8952.
- Bowles, K. R., Gibson, J., Wu, J., Shaffer, L. G., Towbin, J. A. & Bowles, N. E. (1999).** Genomic

- organization and chromosomal localization of the human Coxsackievirus B-adenovirus receptor gene. *Hum Genet* **105**, 354–359.
- Boyd, M. T., Jordan, S. W. & Davis, L. E. (1987).** Fatal pneumonitis from congenital echovirus type 6 infection. *Pediatr Infect Dis J* **6**, 1138–1139.
- Breuer, J. & Jeffries, D. J. (1990).** Control of viral infections in hospitals. *J Hosp Infect* **16**, 191–221.
- Bruce, C., Al-Nakib, W., Forsyth, M., Stanway, G. & Almond, J. W. (1989).** Detection of enteroviruses using cDNA and synthetic oligonucleotide probes. *Viol Methods* **25**, 233–240.
- Brunel, D., Lévêque, N., Jacques, J., Renois, F., Motte, J. & Andréoletti, L. (2008).** Clinical and virological features of an aseptic meningitis outbreak in North-Eastern France, 2005. *J Clin Virol* **42**, 225–228.
- Burns, CC1., Shaw, J., Jorba, J., Bukbuk, D., Adu, F., Gumedede, N., Pate, MA., Abanida, EA., Gasasira, A., Iber, J., Chen, Q., Vincent, A., Chenoweth, P., Henderson, E., Wannemuehler, K., Naem, A., Umami, RN., Nishimura, Y., Shimizu, H., Baba, M., Adeniji, A., Williams, AJ., Kilpatrick, DR., Oberste, MS., Wassilak, SG., Tomori, O., Pallansch, MA., Kew, O (2013).** Multiple independent emergences of type 2 vaccine-derived polioviruses during a large outbreak in northern Nigeria. *J Virol.* **87**:4907-22.
- Cabrerizo, M., Echevarria, J. E., González, I., de Miguel, T. & Trallero, G. (2008).** Molecular epidemiological study of HEV-B enteroviruses involved in the increase in meningitis cases occurred in Spain during 2006. *J Med Virol* **80**, 1018–1024.
- Cammack, N., Phillips, A., Dunn, G., Patel, V. & Minor, P. D. (1988).** Intertypic genomic rearrangements of poliovirus strains in vaccinees. *Virology* **167**, 507–514.
- Campanella, M., de Jong, A. S., Lanke, K. W. H., Melchers, W. J. G., Willems, P. H. G. M., Pinton, P., Rizzuto, R. & van Kuppeveld, F. J. M. (2004).** The coxsackievirus 2B protein suppresses apoptotic host cell responses by manipulating intracellular Ca²⁺ homeostasis. *J*

Biol Chem **279**, 18440–18450.

- Capaul SE, Gorgievski-Hrisoho M. (2005).** Detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid (CSF) using NucliSens EasyQ Enterovirus assay. *J. Clin. Virol.* **32**:236–240.
- Caro, V., Guillot, S., Delpeyroux, F. & Crainic, R. (2001).** Molecular strategy for ‘serotyping’ of human enteroviruses. *J Gen Virol* **82**, 79–91.
- Carolane, D. J., Long, A. M., McKeever, P. A., Hobbs, S. J. & Roome, A. P. (1985).** Prevention of spread of echovirus 6 in a special care baby unit. *Arch Dis Child* **60**, 674–676.
- Casas, I., Palacios, G. F., Trallero, G., Cisterna, D., Freire, M. C. & Tenorio, A. (2001).** Molecular characterization of human enteroviruses in clinical samples: comparison between VP2, VP1, and RNA polymerase regions using RT nested PCR assays and direct sequencing of products. *J Med Virol* **65**, 138–148.
- Chan, K. P., Goh, K. T., Chong, C. Y., Teo, E. S., Lau, G. & Ling, A. E. (2003).** Epidemic hand, foot and mouth disease caused by human enterovirus 71, Singapore. *Emerging Infect Dis* **9**, 78–85.
- Chang, K. H., Auvinen, P., Hyypiä, T. & Stanway, G. (1989).** The Nucleotide Sequence of Coxsackievirus A9; Implications for Receptor Binding and Enterovirus Classification. *J Gen Virol* **70**, 3269–3280.
- Charini, W. A., Todd, S., Gutman, G. A. & Semler, B. L. (1994).** Transduction of a human RNA sequence by poliovirus. *J Virol* **68**, 6547–6552.
- Cheeseman, S. H., Hirsch, M. S., Keller, E. W. & Keim, D. E. (1977).** Fatal neonatal pneumonia caused by Echovirus type 9. *Am J Dis Child* **131**, 1169.
- Cheng, L. L., Ng, P. C., Chan, P. K.-S., Wong, H. L., Cheng, F. W. T. & Tang, J. W.-T. (2006).** Probable intrafamilial transmission of coxsackievirus b3 with vertical transmission, severe early-onset neonatal hepatitis, and prolonged viral RNA shedding. *Pediatrics* **118**, e929–933.

- Chiang, P. S., Huang, M.-L., Luo, S.-T., Lin, T.-Y., Tsao, K.-C. & Lee, M.-S. (2012).** Comparing molecular methods for early detection and serotyping of enteroviruses in throat swabs of pediatric patients. *PLoS ONE* **7**, e48269.
- Cho, M. W., Richards, O. C., Dmitrieva, T. M., Agol, V. & Ehrenfeld, E. (1993).** RNA duplex unwinding activity of poliovirus RNA-dependent RNA polymerase 3Dpol. *J Virol* **67**, 3010–3018.
- Cho, M. W., Teterina, N., Egger, D., Bienz, K. & Ehrenfeld, E. (1994).** Membrane rearrangement and vesicle induction by recombinant poliovirus 2C and 2BC in human cells. *Virology* **202**, 129–145.
- Chonmaitree, T., Menegus, M. A., Schervish-Swierkosz, E. M. & Schwalenstocker, E. (1981).** Enterovirus 71 infection: report of an outbreak with two cases of paralysis and a review of the literature. *Pediatrics* **67**, 489–493.
- Chopra, A., Rana, P. V., Narayanaswamy, A. S., Bajpai, C. P. & Madan, V. S. (1986).** Neurological complications following acute viral conjunctivitis: a new profile. *Trop Geogr Med* **38**, 197–202.
- Chow, M., Newman, J. F., Filman, D., Hogle, J. M., Rowlands, D. J. & Brown, F. (1987).** Myristylation of picornavirus capsid protein VP4 and its structural significance. *Nature* **327**, 482–486.
- Chumakov, M., Voroshilova, M., Shindarov, L., Lavrova, I., Gracheva, L., Koroleva, G., Vasilenko, S., Brodvarova, I., Nikolova, M. & other authors. (1979).** Enterovirus 71 isolated from cases of epidemic poliomyelitis-like disease in Bulgaria. *Arch Virol* **60**, 329–340.
- Colbère-Garapin, F., Pelletier, I., Pavio, N. & Duncan, G. (1997).** L'infection persistante de cellules nerveuses humaines par le poliovirus. *Virologie* **1**, 237–47.

- Cooper, PD. (1978).** *Picornaviridae*: second report. *Intervirology* **10**, 165–180.
- Cova, L., Kopecka, H., Aymard, M. & Girard, M. (1988).** Use of cRNA probes for the detection of enteroviruses by molecular hybridization. *J Med Virol* **24**, 11–18.
- Coyne, C. B. & Bergelson, J. M. (2006).** Virus-induced Abl and Fyn kinase signals permit coxsackievirus entry through epithelial tight junctions. *Cell* **124**, 119–131.
- Cuervo, N. S., Guillot, S., Romanenkova, N., Combiescu, M., Aubert-Combiescu, A., Seghier, M., Caro, V., Crainic, R. & Delpeyroux, F. (2001).** Genomic features of intertypic recombinant sabin poliovirus strains excreted by primary vaccinees. *J Virol* **75**, 5740–5751.
- Dahling, D. R., Safferman, R. S. & Wright, B. A. (1989).** Isolation of enterovirus and reovirus from sewage and treated effluents in selected Puerto Rican communities. *Appl Environ Microbiol* **55**, 503–506.
- Dahourou, G., Guillot, S., Le Gall, O. & Crainic, R. (2002).** Genetic recombination in wild-type poliovirus. *J Gen Virol* **83**, 3103–3110.
- Danthi, P., Tosteson, M., Li, Q.-H. & Chow, M. (2003).** Genome delivery and ion channel properties are altered in VP4 mutants of poliovirus. *J Virol* **77**, 5266–5274.
- Delpeyroux, F., Colbère-Garapin, F., Razafindratsimandresy, R., Sadeuh-Mba, S., Joffret, M.-L., Rousset, D. & Blondel, B. (2013).** [Eradication of poliomyelitis and emergence of pathogenic vaccine-derived polioviruses: from Madagascar to Cameroon]. *Med Sci (Paris)* **29**, 1034–1041.
- Diedrich, S., Weinbrecht, A. & Schreier, E. (2009).** Seroprevalence and molecular epidemiology of enterovirus 71 in Germany. *Arch Virol* **154**, 1139–1142.
- Doedens, J., Maynell, L. A., Klymkowsky, M. W. & Kirkegaard, K. (1994).** Secretory pathway function, but not cytoskeletal integrity, is required in poliovirus infection. *Arch Virol Suppl* **9**, 159–172.

- Doedens, J. R. & Kirkegaard, K. (1995).** Inhibition of cellular protein secretion by poliovirus proteins 2B and 3A. *EMBO J* **14**, 894–907.
- Doedens, J. R., Giddings, T. H., Jr & Kirkegaard, K. (1997).** Inhibition of endoplasmic reticulum-to-Golgi traffic by poliovirus protein 3A: genetic and ultrastructural analysis. *J Virol* **71**, 9054–9064.
- De Crom, SCM., Obihara, CC., van Loon, AM., Argilagos-Alvarez, AA., Peeters, MF., van Furth, AM., Rossen, JWA. (2012).** Detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid: comparison of two molecular assays. *J. Virol. Methods* **179**:104–107.
- Domingo, E., Escarmis, C., Sevilla, N., Moya, A., Elena, SF., Quer, J., Novella, IS., Holland, JJ. (1996).** Basic concepts in RNA virus evolution. *FASEB J* **10**: 859-64.
- Dos Santos, G. P. L., Skraba, I., Oliveira, D., Lima, A. A. F., de Melo, M. M. M., Kmetzsch, C. I., da Costa, E. V. & da Silva, E. E. (2006).** Enterovirus meningitis in Brazil, 1998-2003. *J Med Virol* **78**, 98–104.
- Dowsett, E. G. (1988).** Human enteroviral infections. *J Hosp Infect* **11**, 103–115.
- Echeverri, A., Banerjee, R. & Dasgupta, A. (1998).** Amino-terminal region of poliovirus 2C protein is sufficient for membrane binding. *Virus Res* **54**, 217–223.
- Eichner, M. & Brockmann, S. O. (2013).** Polio emergence in Syria and Israel endangers Europe. *Lancet* **382**, 1777.
- Emini, E. A., Jameson, B. A., Lewis, A. J., Larsen, G. R. & Wimmer, E. (1982).** Poliovirus neutralization epitopes: analysis and localization with neutralizing monoclonal antibodies. *J Virol* **43**, 997–1005.
- Enders, J. F. (1972).** Early observations on cytopathogenicity of poliovirus. *Am J Clin Pathol* **57**, 846–847.
- Evans, D. J. & Almond, J. W. (1998).** Cell receptors for picornaviruses as determinants of cell

tropism and pathogenesis. *Trends Microbiol* **6**, 198–202.

Fares, W., Rezig, D., Seghier, M., Ben Yahia, A., Touzi, H. & Triki, H. (2011). Phylogenetic analysis of complete VP1 sequences of echoviruses 11 and 6: high genetic diversity and circulation of genotypes with a wide geographical and temporal range. *J Med Microbiol* **60**, 1017–1025.

Fauquet & Mayo. (2005). Family Picornaviridae. In «Virus Taxonomy. Eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. In *Virus Taxonomy*, 9th edn., pp. 757–778. Stanway, G et al.

Faustini, A., Fano, V., Muscillo, M., Zaniratti, S., La Rosa, G., Tribuzi, L. & Perucci, C. A. (2006). An outbreak of aseptic meningitis due to echovirus 30 associated with attending school and swimming in pools. *Int J Infect Dis* **10**, 291–297.

Feder, HM Jr., Bennett, N., Modlin, JF (2014). Atypical hand, foot, and mouth disease: a vesiculobullous eruption caused by Coxsackie virus A6. *Lancet Infect Dis*.**14**:83-6.

Filman, D. J., Syed, R., Chow, M., Macadam, A. J., Minor, P. D. & Hogle, J. M. (1989). Structural factors that control conformational transitions and serotype specificity in type 3 poliovirus. *EMBO J* **8**, 1567–1579.

Flexner, S. & Noguchi, H. (1913). EXPERIMENTS ON THE CULTIVATION OF THE MICROORGANISM CAUSING EPIDEMIC POLIOMYELITIS. *J Exp Med* **18**, 461–485.

Flodström-Tullberg, M., Hultcrantz, M., Stotland, A., Maday, A., Tsai, D., Fine, C., Williams, B., Silverman, R. & Sarvetnick, N. (2005). RNase L and double-stranded RNA-dependent protein kinase exert complementary roles in islet cell defense during coxsackievirus infection. *J Immunol* **174**, 1171–1177.

Foo, D. G. W., Alonso, S., Phoon, M. C., Ramachandran, N. P., Chow, V. T. K. & Poh, C. L. (2007). Identification of neutralizing linear epitopes from the VP1 capsid protein of Enterovirus 71 using synthetic peptides. *Virus Res* **125**, 61–68.

- Fuchs, A., Cella, M., Giurisato, E., Shaw, A. S. & Colonna, M. (2004).** Cutting edge: CD96 (tactile) promotes NK cell-target cell adhesion by interacting with the poliovirus receptor (CD155). *J Immunol* **172**, 3994–3998.
- Furione, M., Guillot, S., Otelea, D., Balanant, J., Candrea, A. & Crainic, R. (1993).** Polioviruses with natural recombinant genomes isolated from vaccine-associated paralytic poliomyelitis. *Virology* **196**, 199–208.
- Gamarnik, A. V. & Andino, R. (1997).** Two functional complexes formed by KH domain containing proteins with the 5' noncoding region of poliovirus RNA. *RNA* **3**, 882–892.
- Gamarnik, A. V. & Andino, R. (1998).** Switch from translation to RNA replication in a positive-stranded RNA virus. *Genes Dev* **12**, 2293–2304.
- Gamarnik, A. V. & Andino, R. (2000).** Interactions of viral protein 3CD and poly(rC) binding protein with the 5' untranslated region of the poliovirus genome. *J Virol* **74**, 2219–2226.
- Georgescu, M. M., Delpeyroux, F. & Crainic, R. (1995).** Tripartite genome organization of a natural type 2 vaccine/nonvaccine recombinant poliovirus. *J Gen Virol* **76 (Pt 9)**, 2343–2348.
- Girard, S., Couderc, T., Destombes, J., Thiesson, D., Delpeyroux, F. & Blondel, B. (1999).** Poliovirus induces apoptosis in the mouse central nervous system. *J Virol* **73**, 6066–6072.
- Goldstaub, D., Gradi, A., Bercovitch, Z., Grosman, Z., Nophar, Y., Luria, S., Sonenberg, N. & Kahana, C. (2000).** Poliovirus 2A protease induces apoptotic cell death. *Mol Cell Biol* **20**, 1271–1277.
- Gradi, A., Svitkin, Y. V., Imataka, H. & Sonenberg, N. (1998).** Proteolysis of human eukaryotic translation initiation factor eIF4GII, but not eIF4GI, coincides with the shutoff of host protein synthesis after poliovirus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 11089–11094.
- Greve, J. M., Davis, G., Meyer, A. M., Forte, C. P., Yost, S. C., Marlor, C. W., Kamarck, M. E. & McClelland, A. (1989).** The major human rhinovirus receptor is ICAM-1. *Cell* **56**, 839–

- Gromeier, M., Bossert, B., Arita, M., Nomoto, A. & Wimmer, E. (1999).** Dual stem loops within the poliovirus internal ribosomal entry site control neurovirulence. *J Virol* **73**, 958–964.
- Gromeier, M., Solecki, D., Patel, D. D. & Wimmer, E. (2000).** Expression of the human poliovirus receptor/CD155 gene during development of the central nervous system: implications for the pathogenesis of poliomyelitis. *Virology* **273**, 248–257.
- Guillot, S., Caro, V., Cuervo, N., Korotkova, E., Combiescu, M., Persu, A., Aubert-Combiescu, A., Delpeyroux, F. & Crainic, R. (2000).** Natural genetic exchanges between vaccine and wild poliovirus strains in humans. *J Virol* **74**, 8434–8443.
- Gustin, K. E. & Sarnow, P. (2001).** Effects of poliovirus infection on nucleo-cytoplasmic trafficking and nuclear pore complex composition. *EMBO J* **20**, 240–249.
- Hamaguchi, T., Fujisawa, H., Sakai, K., Okino, S., Kurosaki, N., Nishimura, Y., Shimizu, H. & Yamada, M. (2008).** Acute encephalitis caused by intrafamilial transmission of enterovirus 71 in adult. *Emerging Infect Dis* **14**, 828–830.
- Hanecak, R., Semler, B. L., Anderson, C. W. & Wimmer, E. (1982).** Proteolytic processing of poliovirus polypeptides: antibodies to polypeptide P3-7c inhibit cleavage at glutamine-glycine pairs. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**, 3973–3977.
- Hauri, A. M., Schimmelpfennig, M., Walter-Domes, M., Letz, A., Diedrich, S., Lopez-Pila, J. & Schreier, E. (2005).** An outbreak of viral meningitis associated with a public swimming pond. *Epidemiol Infect* **133**, 291–298.
- Hawkes, M. T. & Vaudry, W. (2005).** Nonpolio enterovirus infection in the neonate and young infant. *Paediatr Child Health* **10**, 383–388.
- He, Y., Lin, F., Chipman, P. R., Bator, C. M., Baker, T. S., Shoham, M., Kuhn, R. J., Medof, M. E. & Rossmann, M. G. (2002a).** Structure of decay-accelerating factor bound to echovirus 7:

- A virus-receptor complex. *PNAS* **99**, 10325–10329.
- He, Y., Lin, F., Chipman, P. R., Bator, C. M., Baker, T. S., Shoham, M., Kuhn, R. J., Medof, M. E. & Rossmann, M. G. (2002b).** Structure of decay-accelerating factor bound to echovirus 7: a virus-receptor complex. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 10325–10329.
- Hejkal, T. W., Keswick, B., LaBelle, R. L., Gerba, C. P., Sanchez, Y., Dreesman, G., Hafkin, B. & Melnick, J. L. (1982).** Viruses in a Community Water Supply Associated With an Outbreak of Gastroenteritis and Infectious Hepatitis (PDF). *Journal - American Water Works Association* **74**, 318–321.
- Hellen, C. U., Kräusslich, H. G. & Wimmer, E. (1989).** Proteolytic processing of polyproteins in the replication of RNA viruses. *Biochemistry* **28**, 9881–9890.
- Hellen, C. U., Lee, C. K. & Wimmer, E. (1992).** Determinants of substrate recognition by poliovirus 2A proteinase. *J Virol* **66**, 3330–3338.
- Hellen, C. U. & Wimmer, E. (1995).** Translation of encephalomyocarditis virus RNA by internal ribosomal entry. *Curr Top Microbiol Immunol* **203**, 31–63.
- Hirst, G. K. (1962).** Genetic recombination with Newcastle disease virus, polioviruses, and influenza. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **27**, 303–309.
- Ho, M., Chen, E. R., Hsu, K. H., Twu, S. J., Chen, K. T., Tsai, S. F., Wang, J. R. & Shih, S. R. (1999).** An epidemic of enterovirus 71 infection in Taiwan. Taiwan Enterovirus Epidemic Working Group. *N Engl J Med* **341**, 929–935.
- Hogle, J. M., Chow, M. & Filman, D. J. (1985).** Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution. *Science* **229**, 1358–1365.
- Hogle, J. M. & Filman, D. J. (1989).** The antigenic structure of poliovirus. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci* **323**, 467–478.
- Holland, J. J., Domingo, E., de la Torre, J. C. & Steinhauer, D. A. (1990).** Mutation frequencies

- at defined single codon sites in vesicular stomatitis virus and poliovirus can be increased only slightly by chemical mutagenesis. *J Virol* **64**, 3960–3962.
- Holland, J. J., De La Torre, J. C. & Steinhauer, D. A. (1992).** RNA virus populations as quasispecies. *Curr Top Microbiol Immunol* **176**, 1–20.
- Holland, J. & Domingo, E. (1998).** Origin and evolution of viruses. *Virus Genes* **16**, 13–21.
- Hope, D. A., Diamond, S. E. & Kirkegaard, K. (1997).** Genetic dissection of interaction between poliovirus 3D polymerase and viral protein 3AB. *J Virol* **71**, 9490–9498.
- Hughes, P. J., North, C., Minor, P. D. & Stanway, G. (1989).** The Complete Nucleotide Sequence of Coxsackievirus A21. *J Gen Virol* **70**, 2943–2952.
- Hurst, C. J. (1991).** Presence of enteric viruses in freshwater and their removal by the conventional drinking water treatment process. *Bull World Health Organ* **69**, 113–119.
- Huttunen, P., Santti, J., Pulli, T. & Hyypiä, T. (1996).** The major echovirus group is genetically coherent and related to coxsackie B viruses. *J Gen Virol* **77**, 715–725.
- Hyypiä, T., Stålhandske, P., Vainionpää, R. & Pettersson, U. (1984).** Detection of enteroviruses by spot hybridization. *J Clin Microbiol* **19**, 436–438.
- Hyypiä, T., Maaronen, M., Auvinen, P., Stålhandske, P., Pettersson, U., Stanway, G., Hughes, P., Ryan, M., Almond, J. & Stenvik, M. (1987).** Nucleic acid sequence relationships between enterovirus serotypes. *Mol Cell Probes* **1**, 169–176.
- Hyypiä, T., Hovi, T., Knowles, N. J. & Stanway, G. (1997).** Classification of enteroviruses based on molecular and biological properties. *J Gen Virol* **78**, 1–11.
- Ibrahim, W., Boukhadra, N., Nasri-Zoghalmi, D., Berthelot, P., Omar, S., Bourlet, T., Pozzetto, B. & Pillet, S. (2013).** Partial sequencing of VP2 capsid gene for direct enterovirus genotyping in clinical specimens. *Clin Microbiol Infect.* **10**, 1469-0691.
- Ida-Hosonuma, M., Iwasaki, T., Yoshikawa, T., Nagata, N., Sato, Y., Sata, T., Yoneyama, M.,**

- Fujita, T., Taya, C. & other authors. (2005).** The alpha/beta interferon response controls tissue tropism and pathogenicity of poliovirus. *J Virol* **79**, 4460–4469.
- Ikeda, T., Mizuta, K., Abiko, C., Aoki, Y., Itagaki, T., Katsushima, F., Katsushima, Y., Matsuzaki, Y., Fuji, N. & other authors. (2012).** Acute respiratory infections due to enterovirus 68 in Yamagata, Japan between 2005 and 2010. *Microbiol Immunol* **56**, 139–143.
- Imamura, T., Fuji, N., Suzuki, A., Tamaki, R., Saito, M., Aniceto, R., Galang, H., Sombrero, L., Lupisan, S. & Oshitani, H. (2011).** Enterovirus 68 among children with severe acute respiratory infection, the Philippines. *Emerging Infect Dis* **17**, 1430–1435.
- Ion-Nedelcu, N., Strebel, P. M., Toma, F., Biberi-Moroeanu, S., Combiescu, M., Persu, A., Aubert-Combiescu, A., Plotkin, S. A. & Sutter, R. W. (1997).** Sequential and combined use of inactivated and oral poliovirus vaccines: Dolj District, Romania, 1992-1994. *J Infect Dis* **175 Suppl 1**, S241–246.
- Ishii, T., Shiroki, K., Iwai, A. & Nomoto, A. (1999).** Identification of a new element for RNA replication within the internal ribosome entry site of poliovirus RNA. *J Gen Virol* **80 (Pt 4)**, 917–920.
- Ishiko, H., Shimada, Y., Yonaha, M., Hashimoto, O., Hayashi, A., Sakae, K. & Takeda, N. (2002a).** Molecular diagnosis of human enteroviruses by phylogeny-based classification by use of the VP4 sequence. *J Infect Dis* **185**, 744–754.
- Ishiko, H., Miura, R., Shimada, Y., Hayashi, A., Nakajima, H., Yamazaki, S. & Takeda, N. (2002b).** Human Rhinovirus 87 Identified as Human Enterovirus 68 by VP4-Based Molecular Diagnosis. *Intervirology* **45**, 136–141.
- Iturriza-Gómara, M., Megson, B. & Gray, J. (2006).** Molecular detection and characterization of human enteroviruses directly from clinical samples using RT-PCR and DNA sequencing. *Journal of Medical Virology* **78**, 243–253.

- Jacobson, S. J., Konings, D. A. & Sarnow, P. (1993).** Biochemical and genetic evidence for a pseudoknot structure at the 3' terminus of the poliovirus RNA genome and its role in viral RNA amplification. *J Virol* **67**, 2961–2971.
- Jackson, T., Ellard, F. M., Ghazaleh, R. A., Brookes, S. M., Blakemore, W. E., Corteyn, A. H., Stuart, D. I., Newman, J. W. & King, A. M. (1996).** Efficient infection of cells in culture by type O foot-and-mouth disease virus requires binding to cell surface heparan sulfate. *J Virol* **70**, 5282–5287.
- Jacobson, L. M., Redd, J. T., Schneider, E., Lu, X., Chern, S.-W. W., Oberste, M. S., Erdman, D. D., Fischer, G. E., Armstrong, G. L. & other authors. (2012).** Outbreak of lower respiratory tract illness associated with human enterovirus 68 among American Indian children. *Pediatr Infect Dis J* **31**, 309–312.
- Jacques, J., Bouscambert-Duchamp, M., Moret, H., Carquin, J., Brodard, V., Lina, B., Motte, J. & Andréoletti, L. (2006).** Association of respiratory picornaviruses with acute bronchiolitis in French infants. *J Clin Virol* **35**, 463–466.
- Jacques, J., Moret, H., Minette, D., Lévêque, N., Jovenin, N., Deslée, G., Lebargy, F., Motte, J. & Andréoletti, L. (2008).** Epidemiological, molecular, and clinical features of enterovirus respiratory infections in French children between 1999 and 2005. *J Clin Microbiol* **46**, 206–213.
- Jaïdane, H., Sané, F., Hiar, R., Goffard, A., Gharbi, J., Geenen, V., Hober, D. (2012).** Immunology in the clinic review series; focus on type 1 diabetes and viruses: enterovirus, thymus and type 1 diabetes pathogenesis. *Clin Exp Immunol.* **168**(1):39-46.
- Jartti, T., Lehtinen, P., Vuorinen, T., Osterback, R., van den Hoogen, B., Osterhaus, A. D. M. E. & Ruuskanen, O. (2004).** Respiratory picornaviruses and respiratory syncytial virus as causative agents of acute expiratory wheezing in children. *Emerging Infect Dis* **10**, 1095–1101.

- Jarvis, T. C. & Kirkegaard, K. (1992).** Poliovirus RNA recombination: mechanistic studies in the absence of selection. *EMBO J* **11**, 3135–3145.
- Jegouic, S., Joffret, M.-L., Blanchard, C., Riquet, F. B., Perret, C., Pelletier, I., Colbere-Garapin, F., Rakoto-Andrianarivelo, M. & Delpeyroux, F. (2009).** Recombination between polioviruses and co-circulating Coxsackie A viruses: role in the emergence of pathogenic vaccine-derived polioviruses. *PLoS Pathog* **5**, e1000412.
- Johnson, K. L. & Sarnow, P. (1991).** Three poliovirus 2B mutants exhibit noncomplementable defects in viral RNA amplification and display dosage-dependent dominance over wild-type poliovirus. *J Virol* **65**, 4341–4349.
- Joffret, M.L., Jégouic, S., Bessaud, M., Balanant, J., Tran, C., Caro, V., Holmblat, B., Razafindratsimandresy, R., Reynes, J.M., Rakoto-Andrianarivelo, M., Delpeyroux, F. (2012).** Common and diverse features of cocirculating type 2 and 3 recombinant vaccine-derived polioviruses isolated from patients with poliomyelitis and healthy children. *J. Infect. Dis.* **205**.1363–1373.
- Kaida, A., Kubo, H., Sekiguchi, J., Hase, A. & Iritani, N. (2012).** Enterovirus 104 infection in adult, Japan, 2011. *Emerging Infect Dis* **18**, 882–883.
- Kapsenberg, J. G. (1988).** Picornaviridae: The Enteroviruses (Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses). In *Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases Principles and Practice*, pp. 692–722. Springer New York.
- Kassab S. (2013).** Fatal case of enterovirus 71 infection and rituximab therapy, france, 2012. *Emerg Infect Dis*, **19**. 1345-7.
- Keswick, B. H., Gerba, C. P. & Goyal, S. M. (1981).** Occurrence of enteroviruses in community swimming pools. *Am J Public Health* **71**, 1026–1030.
- Kew, O. M., Sutter, R. W., Nottay, B. K., McDonough, M. J., Prevots, D. R., Quick, L. &**

- Pallansch, M. A. (1998).** Prolonged replication of a type 1 vaccine-derived poliovirus in an immunodeficient patient. *J Clin Microbiol* **36**, 2893–2899.
- Kew, O. M., Sutter, R. W., de Gourville, E. M., Dowdle, W. R. & Pallansch, M. A. (2005).** Vaccine-derived polioviruses and the endgame strategy for global polio eradication. *Annu Rev Microbiol* **59**, 587–635.
- Khetsuriani, N., Lamonte-Fowlkes, A., Oberst, S., Pallansch, M. A. & Centers for Disease Control and Prevention. (2006a).** Enterovirus surveillance--United States, 1970-2005. *MMWR* **55**, 1–20.
- Khetsuriani, N., Lamonte, A., Oberste, M. S. & Pallansch, M. (2006b).** Neonatal enterovirus infections reported to the national enterovirus surveillance system in the United States, 1983-2003. *Pediatr Infect Dis J* **25**, 889–893.
- Kirkegaard, K. & Baltimore, D. (1986).** The mechanism of RNA recombination in poliovirus. *Cell* **47**, 433–443.
- Kitamura, N., Semler, B. L., Rothberg, P. G., Larsen, G. R., Adler, C. J., Dorner, A. J., Emini, E. A., Hanecak, R., Lee, J. J. & other authors. (1981).** Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. *Nature* **291**, 547–553.
- Kliewer, S. & Dasgupta, A. (1988).** An RNA polymerase II transcription factor inactivated in poliovirus-infected cells copurifies with transcription factor TFIID. *Mol Cell Biol* **8**, 3175–3182.
- Knowles, N. J. & McCauley, J. W. (1997).** Coxsackievirus B5 and the relationship to swine vesicular disease virus. *Curr Top Microbiol Immunol* **223**, 153–167.
- Knowles NJ. (2012).** *Picornaviridae*. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *San Diego; Elsevier* ,855–880.

- Knowlton, K. U. (2008).** CVB infection and mechanisms of viral cardiomyopathy. *Curr Top Microbiol Immunol* **323**, 315–335.
- Kobayashi, K.-I., Haruta, T., Kubota, M., Akiyoshi, K., Suga, T. & Ito, M. (2005).** Clinical spectrum in hospitalized children with echovirus type 13 infection. *Pediatr Int* **47**, 185–189.
- Kottaridi, C., Bolanaki, E. & Markoulatos, P. (2004).** Amplification of Echoviruses genomic regions by different RT-PCR protocols—a comparative study. *Molecular and Cellular Probes* **18**, 263–269.
- Kost, CB., Rogers, B., Oberste, MS., Robinson, C., Eaves, BL., Leos, K., Danielson, S., Satya, M., Weir, F., Nolte, FS. (2007).** Multicenter beta trial of the GeneXpert enterovirus assay. *J. Clin. Microbiol.* **45**:1081–1086.
- Kräusslich, H. G., Hölscher, C., Reuer, Q., Harber, J. & Wimmer, E. (1990).** Myristoylation of the poliovirus polyprotein is required for proteolytic processing of the capsid and for viral infectivity. *J Virol* **64**, 2433–2436.
- Kristensson, K. (1999).** The discovery of the poliovirus. *Brain Research Bulletin* **50**, 461.
- Kumar, A., Shukla, D., Kumar, R., Idris, M. Z., Misra, U. K. & Dhole, T. N. (2012).** Molecular epidemiological study of enteroviruses associated with encephalitis in children from India. *J Clin Microbiol* **50**, 3509–3512.
- Kimura, M. (1980).** A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* **16**:111–120.
- Lai, M. M. (1992).** RNA recombination in animal and plant viruses. *Microbiol Rev* **56**, 61–79.
- Lama, J. & Carrasco, L. (1995).** Mutations in the hydrophobic domain of poliovirus protein 3AB abrogate its permeabilizing activity. *FEBS Lett* **367**, 5–11.
- Lama, J., Sanz, M. A. & Carrasco, L. (1998).** Genetic analysis of poliovirus protein 3A: characterization of a non-cytopathic mutant virus defective in killing Vero cells. *J Gen Virol* **79**, 1911–1921.

- Lange, R., Peng, X., Wimmer, E., Lipp, M. & Bernhardt, G. (2001).** The poliovirus receptor CD155 mediates cell-to-matrix contacts by specifically binding to vitronectin. *Virology* **285**, 218–227.
- Larkin, MA., Blackshields, G., Brown, NP., Chenna, R., McGettigan, PA., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, IM., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, JD., Gibson, TJ., Higgins, DG. (2007).** Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**:2947–2948.
- Lauber, C. & Gorbalenya, A. E. (2012).** Toward genetics-based virus taxonomy: comparative analysis of a genetics-based classification and the taxonomy of picornaviruses. *J Virol* **86**, 3905–3915.
- Lauinger, I. L., Bible, J. M., Halligan, E. P., Aarons, E. J., MacMahon, E. & Tong, C. Y. W. (2012).** Lineages, sub-lineages and variants of enterovirus 68 in recent outbreaks. *PLoS ONE* **7**, e36005.
- Lee, C. K. & Wimmer, E. (1988).** Proteolytic processing of poliovirus polyprotein: elimination of 2Apro-mediated, alternative cleavage of polypeptide 3CD by in vitro mutagenesis. *Virology* **166**, 405–414.
- Lee, H.-Y., Chen, C.-J., Huang, Y.-C., Li, W.-C., Chiu, C.-H., Huang, C.-G., Tsao, K.-C., Wu, C.-T. & Lin, T.-Y. (2010).** Clinical features of echovirus 6 and 9 infections in children. *J Clin Virol* **49**, 175–179.
- Lashkevich, V. A. (2008).** [100 years of studying poliomyelitis virus and nonpoliomyelitis enteroviruses]. *Vopr Virusol* **53**, 41–44.
- Leitch, E. C. M., Harvala, H., Robertson, I., Ubbilos, I., Templeton, K. & Simmonds, P. (2009).** Direct identification of human enterovirus serotypes in cerebrospinal fluid by amplification and sequencing of the VP1 region. *J Clin Virol* **44**, 119–124.
- Lentz, K. N., Smith, A. D., Geisler, S. C., Cox, S., Buontempo, P., Skelton, A., DeMartino, J.,**

- Rozhon, E., Schwartz, J. & other authors. (1997).** Structure of poliovirus type 2 Lansing complexed with antiviral agent SCH48973: comparison of the structural and biological properties of three poliovirus serotypes. *Structure* **5**, 961–978.
- Lévêque, N., Huguet, P., Norder, H. & Chomel, J.-J. (2010).** [Enteroviruses responsible for acute hemorrhagic conjunctivitis]. *Med Mal Infect* **40**, 212–218.
- Lévêque, N., Renois, F., Talmud, D., Nguyen, Y., Lesaffre, F., Boulagnon, C., Bruneval, P., Fornes, P. & Andréoletti, L. (2012).** Quantitative genomic and antigenomic enterovirus RNA detection in explanted heart tissue samples from patients with end-stage idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Clin Microbiol* **50**, 3378–3380.
- Li, J., Zhang, L. B., Yoneyama, T., Yoshida, H., Shimizu, H., Yoshii, K., Hara, M., Nomura, T., Yoshikura, H. & other authors. (1996).** Genetic basis of the neurovirulence of type 1 polioviruses isolated from vaccine-associated paralytic patients. *Arch Virol* **141**, 1047–1054.
- Li, J. P. & Baltimore, D. (1990).** An intragenic revertant of a poliovirus 2C mutant has an uncoating defect. *J Virol* **64**, 1102–1107.
- Li, L., He, Y., Yang, H., Zhu, J., Xu, X., Dong, J., Zhu, Y. & Jin, Q. (2005).** Genetic characteristics of human enterovirus 71 and coxsackievirus A16 circulating from 1999 to 2004 in Shenzhen, People’s Republic of China. *J Clin Microbiol* **43**, 3835–3839.
- Li, R1., Liu, L., Mo, Z., Wang, X., Xia, J., Liang, Z., Zhang, Y., Li, Y., Mao, Q., Wang, J., Jiang, L., Dong, C., Che, Y., Huang, T., Jiang, Z., Xie, Z., Wang, L., Liao, Y., Liang, Y., Nong, Y., Liu, J., Zhao, H., Na, R., Guo, L., Pu, J., Yang, E., Sun, L., Cui, P., Shi, H., Wang, J., Li, Q (2014).** An inactivated enterovirus 71 vaccine in healthy children. *N Engl J Med.* **27**, 829-37.
- LIM, K. A. & BENYESH-MELNICK, M. (1960).** Typing of viruses by combinations of antiserum pools. Application to typing of enteroviruses (Coxsackie and ECHO). *J Immunol* **84**, 309–317.

- Lin, J.-Y., Chen, T.-C., Weng, K.-F., Chang, S.-C., Chen, L.-L. & Shih, S.-R. (2009).** Viral and host proteins involved in picornavirus life cycle. *J Biomed Sci* **16**, 103.
- Lindberg, A. M., Andersson, P., Savolainen, C., Mulders, M. N. & Hovi, T. (2003).** Evolution of the genome of Human enterovirus B: incongruence between phylogenies of the VP1 and 3CD regions indicates frequent recombination within the species. *J Gen Virol* **84**, 1223–1235.
- Linsuwanon, P., Puenpa, J., Suwannakarn, K., Auksornkitti, V., Vichiwattana, P., Korkong, S., Theamboonlers, A. & Poovorawan, Y. (2012).** Molecular epidemiology and evolution of human enterovirus serotype 68 in Thailand, 2006-2011. *PLoS ONE* **7**, e35190.
- Lippy, E. C. & Waltrip, S. C. (1984).** Waterborne Disease Outbreaks -- 1946-1980: A Thirty- Five-Year Perspective (PDF). *Journal - American Water Works Association* **76**, 60–67.
- Lipson, S. M., Walderman, R., Costello, P. & Szabo, K. (1988).** Sensitivity of rhabdomyosarcoma and guinea pig embryo cell cultures to field isolates of difficult-to-cultivate group A coxsackieviruses. *J Clin Microbiol* **26**, 1298–1303.
- Lipkin, W. I. (2012).** Worldwide emergence of multiple clades of enterovirus 68. *J Gen Virol* **93**, 1952–1958.
- Lo, S.-H., Huang, Y.-C., Huang, C.-G., Tsao, K.-C., Li, W.-C., Hsieh, Y.-C., Chiu, C.-H. & Lin, T.-Y. (2011).** Clinical and epidemiologic features of Coxsackievirus A6 infection in children in northern Taiwan between 2004 and 2009. *J Microbiol Immunol Infect* **44**, 252–257.
- Lukashev, A. N., Lashkevich, V. A., Ivanova, O. E., Koroleva, G. A., Hinkkanen, A. E. & Ilonen, J. (2003).** Recombination in circulating enteroviruses. *J Virol* **77**, 10423–10431.
- Lukashev, A. N. (2005).** Role of recombination in evolution of enteroviruses. *Rev Med Virol* **15**, 157–167.
- Lukashev, A. N. (2010).** Recombination among picornaviruses. *Rev Med Virol* **20**, 327–337.
- Lv, T., Li, J., Han, Z. & Chen, Z. (2013).** Association of interleukin-17F gene polymorphism with

enterovirus 71 encephalitis in patients with hand, foot, and mouth disease. *Inflammation* **36**, 977–981.

Lafeuille, HP. (2002). Virologie médicale. *Collection AZAY, Presses Universitaires, Lyon.*

Marc, D., Drugeon, G., Haenni, A. L., Girard, M. & van der Werf, S. (1989). Role of myristoylation of poliovirus capsid protein VP4 as determined by site-directed mutagenesis of its N-terminal sequence. *EMBO J* **8**, 2661–2668.

Marlowe, E. M., Novak, S. M., Dunn, J. J., Smith, A., Cumpio, J., Makalintal, E., Barnes, D. & Burchette, R. J. (2008). Performance of the GeneXpert enterovirus assay for detection of enteroviral RNA in cerebrospinal fluid. *J Clin Virol* **43**, 110–113.

Mateu, M. G. (1995). Antibody recognition of picornaviruses and escape from neutralization: a structural view. *Virus Res* **38**, 1–24.

Mbida, AD., Pozzetto, B., Sabido, O., Akono, Y., Grattard, F., Habib, M., Gaudin, OG. (1991). Competition binding studies with biotinylated echovirus 11 in cytofluorimetry analysis. *J. Virol. Methods* **35**:169–176.

McBride, A. E., Schlegel, A. & Kirkegaard, K. (1996). Human protein Sam68 relocalization and interaction with poliovirus RNA polymerase in infected cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 2296–2301.

McCarthy, P. L., Klig, J. E., Kennedy, W. P. & Kahn, J. S. (2000). Fever without apparent source on clinical examination, lower respiratory infections in children, and enterovirus infections. *Curr Opin Pediatr* **12**, 77–95.

McKinney, R. E., Jr, Katz, S. L. & Wilfert, C. M. (1987). Chronic enteroviral meningoencephalitis in agammaglobulinemic patients. *Rev Infect Dis* **9**, 334–356.

McMinn, P., Stratov, I., Nagarajan, L. & Davis, S. (2001). Neurological manifestations of enterovirus 71 infection in children during an outbreak of hand, foot, and mouth disease in

Western Australia. *Clin Infect Dis* **32**, 236–242.

McWilliam Leitch, E. C., Cabrerizo, M., Cardoso, J., Harvala, H., Ivanova, O. E., Kroes, A. C. M., Lukashev, A., Muir, P., Odoom, J. & other authors. (2010). Evolutionary dynamics and temporal/geographical correlates of recombination in the human enterovirus echovirus types 9, 11, and 30. *J Virol* **84**, 9292–9300.

Meijer, A., van der Sanden, S., Snijders, B. E. P., Jaramillo-Gutierrez, G., Bont, L., van der Ent, C. K., Overduin, P., Jenny, S. L., Jusic, E. & other authors. (2012). Emergence and epidemic occurrence of enterovirus 68 respiratory infections in The Netherlands in 2010. *Virology* **423**, 49–57.

Melnick, J. L. (1996a). Current status of poliovirus infections. *Clin Microbiol Rev* **9**, 293–300.

Melnick, J. L. (1996b). My role in the discovery and classification of the enteroviruses. *Annu Rev Microbiol* **50**, 1–24.

Melnick, J. L. & Rennick, V. (1980). Infectivity titers of enterovirus as found in human stools. *J Med Virol* **5**, 205–220.

Melnick, J. L., Rennick, V., Hampil, B., Schmidt, N. J. & Ho, H. H. (1973). Lyophilized combination pools of enterovirus equine antisera: preparation and test procedures for the identification of field strains of 42 enteroviruses. *Bull World Health Organ* **48**, 263–268.

Mendelsohn, C. L., Wimmer, E. & Racaniello, V. R. (1989). Cellular receptor for poliovirus: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. *Cell* **56**, 855–865.

Mertens, T., Hager, H. & Eggers, H. J. (1982). Epidemiology of an outbreak in a maternity unit of infections with an antigenic variant of Echovirus 11. *J Med Virol* **9**, 81–91.

Minor, P. D., John, A., Ferguson, M. & Icenogle, J. P. (1986). Antigenic and molecular evolution of the vaccine strain of type 3 poliovirus during the period of excretion by a primary

- vaccinee. *J Gen Virol* **67** (Pt 4), 693–706.
- Minor, P. D. (1990).** Antigenic structure of picornaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* **161**, 121–154.
- Minor, PD (2012).** The polio-eradication programme and issues of the end game. *J Gen Virol* **93**:457-74.
- Mirand, A., Archimbaud, C., Henquell, C., Michel, Y., Chambon, M., Peigue-Lafeuille, H. & Bailly, J.-L. (2006).** Prospective identification of HEV-B enteroviruses during the 2005 outbreak. *J Med Virol* **78**, 1624–1634.
- Mirand, A., Bailly, J.-L., Henquell, C. & Peigue-Lafeuille, H. (2008a).** [Rapid enterovirus genotyping in cerebrospinal fluids: a two-year prospective study in a virology laboratory setting]. *Pathol Biol* **56**, 471–481.
- Mirand, A., Henquell, C., Archimbaud, C., Chambon, M., Charbonne, F., Peigue-Lafeuille, H. & Bailly, J.-L. (2008b).** Prospective identification of enteroviruses involved in meningitis in 2006 through direct genotyping in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* **46**, 87–96.
- Mirand, A., Henquell, C., Archimbaud, C., Ughetto, S., Antona, D., Bailly, J.-L. & Peigue-Lafeuille, H (2012).** Outbreak of hand, foot and mouth disease/herpangina associated with coxsackievirus A6 and A10 infections in 2010, France: a large citywide, prospective observational study. *Clin Microbiol Infect* **18**, E110–118.
- Mirand, A., Schuffenecker, I., Henquell, C., Billaud, G., Jugie, G., Falcon, D., Mahul, A., Archimbaud, C., Terletskaia-Ladwig, E. & other authors. (2010).** Phylogenetic evidence for a recent spread of two populations of human enterovirus 71 in European countries. *J Gen Virol* **91**, 2263–2277.
- Mirand, A., Henquell, C., Archimbaud, C., Ughetto, S., Antona, D., Bailly, J.-L. & Peigue-Lafeuille, H. (2012).** Outbreak of hand, foot and mouth disease/herpangina associated with

- coxsackievirus A6 and A10 infections in 2010, France: a large citywide, prospective observational study. *Clin Microbiol Infect* **18**, E110–118.
- Mirzayan, C. & Wimmer, E. (1994).** Biochemical studies on poliovirus polypeptide 2C: evidence for ATPase activity. *Virology* **199**, 176–187.
- Mistchenko, A. S., Viegas, M., Latta, M. P. D. & Barrero, P. R. (2006).** Molecular and epidemiologic analysis of enterovirus B neurological infection in Argentine children. *J Clin Virol* **37**, 293–299.
- Mizuta, K., Abiko, C., Murata, T., Itagaki, T., Katsushima, N., Akiba, T., Sakamoto, M., Ootani, K. & Murayama, S. (2003).** Re-emergence of echovirus type 13 infections in 2002 in Yamagata, Japan. *J Infect* **47**, 243–247.
- Modlin, J. F. (1996).** Update on enterovirus infections in infants and children. *Adv Pediatr Infect Dis* **12**, 155–180.
- Montes, M., Artieda, J., Piñeiro, LD., Gastesi, M., Diez-Nieves, I., Cilla, G (2013).** Hand, foot, and mouth disease outbreak and coxsackievirus A6, northern Spain, 2011. *Emerg Infect Dis* **19**: 10.3201
- Molla, A., Paul, A. V., Schmid, M., Jang, S. K. & Wimmer, E. (1993).** Studies on dicistronic polioviruses implicate viral proteinase 2Apro in RNA replication. *Virology* **196**, 739–747.
- Molla, A., Harris, K. S., Paul, A. V., Shin, S. H., Mugavero, J. & Wimmer, E. (1994).** Stimulation of poliovirus proteinase 3Cpro-related proteolysis by the genome-linked protein VPg and its precursor 3AB. *J Biol Chem* **269**, 27015–27020.
- Moscufo, N., Simons, J. & Chow, M. (1991).** Myristoylation is important at multiple stages in poliovirus assembly. *J Virol* **65**, 2372–2380.
- Moscufo, N. & Chow, M. (1992).** Myristate-protein interactions in poliovirus: interactions of VP4 threonine 28 contribute to the structural conformation of assembly intermediates and the stability of assembled virions. *J Virol* **66**, 6849–6857.

- Muckelbauer, J. K., Kremer, M., Minor, I., Tong, L., Zlotnick, A., Johnson, J. E. & Rossmann, M. G. (1995).** Structure determination of coxsackievirus B3 to 3.5 Å resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **51**, 871–887.
- Mueller, S. & Wimmer, E. (2003).** Recruitment of nectin-3 to cell-cell junctions through trans-heterophilic interaction with CD155, a vitronectin and poliovirus receptor that localizes to alpha(v)beta3 integrin-containing membrane microdomains. *J Biol Chem* **278**, 31251–31260.
- Muir, P., Kämmerer, U., Korn, K., Mulders, M. N., Pöyry, T., Weissbrich, B., Kandolf, R., Cleator, G. M. & Loon, A. M. van. (1998).** Molecular Typing of Enteroviruses: Current Status and Future Requirements. *Clin Microbiol Rev* **11**, 202–227.
- Mullins, J. A., Khetsuriani, N., Nix, W. A., Oberste, M. S., LaMonte, A., Kilpatrick, D. R., Dunn, J., Langer, J., McMinn, P. & other authors. (2004).** Emergence of echovirus type 13 as a prominent enterovirus. *Clin Infect Dis* **38**, 70–77.
- Nasri, D., Bouzlama, L., Pillet, S., Bourlet, T., Aouni, M. & Pozzetto, B. (2007a).** Basic rationale, current methods and future directions for molecular typing of human enterovirus. *Expert Rev Mol Diagn* **7**, 419–434.
- Nasri, D., Bouzlama, L., Omar, S., Saoudin, H., Bourlet, T., Aouni, M., Pozzetto, B. & Pillet, S. (2007b).** Typing of human enterovirus by partial sequencing of VP2. *J Clin Microbiol* **45**, 2370–2379.
- Neff, S., Sá-Carvalho, D., Rieder, E., Mason, P. W., Blystone, S. D., Brown, E. J. & Baxt, B. (1998).** Foot-and-mouth disease virus virulent for cattle utilizes the integrin alpha(v)beta3 as its receptor. *J Virol* **72**, 3587–3594.
- Neufeld, K. L., Richards, O. C. & Ehrenfeld, E. (1991).** Purification, characterization, and comparison of poliovirus RNA polymerase from native and recombinant sources. *J Biol Chem* **266**, 24212–24219.

- Neufeld, K. L., Galarza, J. M., Richards, O. C., Summers, D. F. & Ehrenfeld, E. (1994).** Identification of terminal adenylyl transferase activity of the poliovirus polymerase 3Dpol. *J Virol* **68**, 5811–5818.
- Newman, J. F. & Brown, F. (1997).** Foot-and-mouth disease virus and poliovirus particles contain proteins of the replication complex. *J Virol* **71**, 7657–7662.
- Neznanov, N., Kondratova, A., Chumakov, K. M., Angres, B., Zhumabayeva, B., Agol, V. I. & Gudkov, A. V. (2001).** Poliovirus protein 3A inhibits tumor necrosis factor (TNF)-induced apoptosis by eliminating the TNF receptor from the cell surface. *J Virol* **75**, 10409–10420.
- Nicand, E., Teysou, R. & Buisson, Y. (1998).** Le risque fécal viral en 1998. *Virologie* **2**, 103–16.
- Nilsson, E. C., Jamshidi, F., Johansson, S. M. C., Oberste, M. S. & Arnberg, N. (2008).** Sialic acid is a cellular receptor for coxsackievirus A24 variant, an emerging virus with pandemic potential. *J Virol* **82**, 3061–3068.
- Nix, W. A., Oberste, M. S. & Pallansch, M. A. (2006).** Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens. *J Clin Microbiol* **44**, 2698–2704.
- Nix, WA1., Khetsuriani, N., Peñaranda, S., Maher, K., Venczel, L., Cselkó, Z., Freire, MC., Cisterna, D., Lema, CL., Rosales, P., Rodriguez, JR., Rodriguez, W., Halkyer, P., Ronveaux, O., Pallansch, MA., Oberste, MS (2013).** Diversity of picornaviruses in rural Bolivia. *J Gen Virol* **94**:2017-28.
- Ninove, L., Nougairede, A., Gazin, C., Zandotti, C., Drancourt, M., de Lamballerie, X., Charrel, RN. (2011).** Comparative detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid: GeneXpert system vs. real-time RT-PCR assay. *Clin. Microbiol. Infect.* **17**:1890–1894.
- Norder, H., Bjerregaard, L. & Magnius, L. O. (2001).** Homotypic echoviruses share aminoterminal VP1 sequence homology applicable for typing. *J Med Virol* **63**, 35–44.
- Nolte, FS., Rogers, BB., Tang, YW., Oberste, MS., Robinson, CC., Kehl, KS., Rand, KA.,**

- Rotbart, HA., Romero, JR., Nyquist, AC., Persing, DH. (2011).** Evaluation of a rapid and completely automated real-time reverse transcriptase PCR assay for diagnosis of enteroviral meningitis. *J. Clin. Microbiol.* **49**:528–533.
- Oberste, M. S., Maher, K. & Pallansch, M. A. (1998).** Complete sequence of echovirus 23 and its relationship to echovirus 22 and other human enteroviruses. *Virus Res* **56**, 217–223.
- Oberste, M. S., Maher, K., Kilpatrick, D. R., Flemister, M. R., Brown, B. A. & Pallansch, M. A. (1999).** Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. *J Clin Microbiol* **37**, 1288–1293.
- Oberste, M. S., Maher, K., Flemister, M. R., Marchetti, G., Kilpatrick, D. R. & Pallansch, M. A. (2000).** Comparison of classic and molecular approaches for the identification of untypeable enteroviruses. *J Clin Microbiol* **38**, 1170–1174.
- Oberste, M. S., Nix, W. A., Maher, K. & Pallansch, M. A. (2003).** Improved molecular identification of enteroviruses by RT-PCR and amplicon sequencing. *J Clin Virol* **26**, 375–377.
- Oberste, M. S., Maher, K., Schnurr, D., Flemister, M. R., Lovchik, J. C., Peters, H., Sessions, W., Kirk, C., Chatterjee, N. & other authors. (2004a).** Enterovirus 68 is associated with respiratory illness and shares biological features with both the enteroviruses and the rhinoviruses. *J Gen Virol* **85**, 2577–2584.
- Oberste, M. S., Maher, K. & Pallansch, M. A. (2004b).** Evidence for frequent recombination within species human enterovirus B based on complete genomic sequences of all thirty-seven serotypes. *J Virol* **78**, 855–867.
- Oberste, M. S., Peñaranda, S., Maher, K. & Pallansch, M. A. (2004c).** Complete genome sequences of all members of the species Human enterovirus A. *J Gen Virol* **85**, 1597–1607.
- Oberste, MS., Michele, SM., Maher, K., Schnurr, D., Cisterna, D., Junttila, N., Uddin, M.,**

- Chomel, J.J., Lau, C.S., Ridha, W., al-Busaidy, S., Norder, H., Magnus, L.O., Pallansch, M.A. (2004).** Molecular identification and characterization of two proposed new enterovirus serotypes, EV74 and EV75. *J. Gen. Virol.* **85**:3205–3212.
- Oberste, M. S., Maher, K., Williams, A. J., Dybdahl-Sissoko, N., Brown, B. A., Gookin, M. S., Peñaranda, S., Mishrik, N., Uddin, M. & Pallansch, M. A. (2006).** Species-specific RT-PCR amplification of human enteroviruses: a tool for rapid species identification of uncharacterized enteroviruses. *J Gen Virol* **87**, 119–128.
- Oberste, M. S., Peñaranda, S., Rogers, S. L., Henderson, E. & Nix, W. A. (2010).** Comparative evaluation of Taqman real-time PCR and semi-nested VP1 PCR for detection of enteroviruses in clinical specimens. *J Clin Virol* **49**, 73–74.
- Ooi, M. H., Wong, S. C., Lewthwaite, P., Cardoso, M. J. & Solomon, T. (2010).** Clinical features, diagnosis, and management of enterovirus 71. *Lancet Neurol* **9**, 1097–1105.
- Page, G. S., Mosser, A. G., Hogle, J. M., Filman, D. J., Rueckert, R. R. & Chow, M. (1988).** Three-dimensional structure of poliovirus serotype 1 neutralizing determinants. *J Virol* **62**, 1781–1794.
- Palacios, G. & Oberste, M. S. (2005).** Enteroviruses as agents of emerging infectious diseases. *J Neurovirol* **11**, 424–433.
- Pallansch, M. A. & Roos, R. (2007).** Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses, and newer enteroviruses. In *Picornaviridae*, Fields Virology, P.M.Howley.Philadelphia, Lippincott Williams And Wilkins., pp. 839–93.
- Pankovics, P., Boros, A., Szabó, H., Székely, G., Gyurkovits, K. & Reuter, G. (2012).** Human enterovirus 109 (EV109) in acute paediatric respiratory disease in Hungary. *Acta Microbiol Immunol Hung* **59**, 285–290.
- Paul, A. V., van Boom, J. H., Filippov, D. & Wimmer, E. (1998).** Protein-primed RNA synthesis

- by purified poliovirus RNA polymerase. *Nature* **393**, 280–284.
- Peigue-Lafeuille, H., Laveran, H., Auberger, M., Chambon, M., Trimolet, M. & Beytout, D. (1985).** [Evaluation of 4 years of surveillance of enteroviruses in sewage. Correlation with human pathology]. *Rev Epidemiol Sante Publique* **33**, 445–451.
- Peigue-Lafeuille, H. H., De Champs, C., Laveran, H., Labbe, A., Chambon, M., Beytout, D. & Cluzel, R. (1989).** Survey of viruses of the gut in 10,477 children admitted to general paediatric wards from 1981 to 1986. *J Hosp Infect* **14**, 375–378.
- Pelletier, J. & Sonenberg, N. (1988).** Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* **334**, 320–325.
- Petitjean, J., Quibriac, M., Freymuth, F., Fuchs, F., Laconche, N., Aymard, M. & Kopecka, H. (1990).** Specific detection of enteroviruses in clinical samples by molecular hybridization using poliovirus subgenomic riboprobes. *J Clin Microbiol* **28**, 307–311.
- Pierangeli, A., Bucci, M., Pagnotti, P., Degener, A. M. & Perez Bercoff, R. (1995).** Mutational analysis of the 3'-terminal extra-cistronic region of poliovirus RNA: secondary structure is not the only requirement for minus strand RNA replication. *FEBS Lett* **374**, 327–332.
- Pillet, S., Billaud, G., Omar, S., Lina, B., Pozzetto, B. & Schuffenecker, I. (2010).** Multicenter evaluation of the ENTEROVIRUS R-gene real-time RT-PCR assay for the detection of enteroviruses in clinical specimens. *J Clin Virol* **47**, 54–59.
- Pilipenko, E. V., Poperechny, K. V., Maslova, S. V., Melchers, W. J., Slot, H. J. & Agol, V. I. (1996).** Cis-element, oriR, involved in the initiation of (-) strand poliovirus RNA: a quasi-globular multi-domain RNA structure maintained by tertiary ('kissing') interactions. *EMBO J* **15**, 5428–5436.
- Piralla, A., Rovida, F., Baldanti, F. & Gerna, G. (2010).** Enterovirus genotype EV-104 in humans, Italy, 2008-2009. *Emerging Infect Dis* **16**, 1018–1021.

- Piralla, A., Lilleri, D., Sarasini, A., Marchi, A., Zecca, M., Stronati, M., Baldanti, F. & Gerna, G. (2012).** Human rhinovirus and human respiratory enterovirus (EV68 and EV104) infections in hospitalized patients in Italy, 2008-2009. *Diagn Microbiol Infect Dis* **73**, 162–167.
- Plotch, S. J. & Palant, O. (1995).** Poliovirus protein 3AB forms a complex with and stimulates the activity of the viral RNA polymerase, 3Dpol. *J Virol* **69**, 7169–7179.
- Podin, Y., Gias, E. L., Ong, F., Leong, Y.-W., Yee, S.-F., Yusof, M. A., Perera, D., Teo, B., Wee, T.-Y. & other authors. (2006).** Sentinel surveillance for human enterovirus 71 in Sarawak, Malaysia: lessons from the first 7 years. *BMC Public Health* **6**, 180.
- Porres, E. R., Werthammer, J., Moss, N., Bernstein, J. M. & Belshe, R. B. (1985).** Fatal coxsackievirus B4 infection in a neonate. *South Med J* **78**, 1254–1256.
- Porter, A. G. (1993).** Picornavirus nonstructural proteins: emerging roles in virus replication and inhibition of host cell functions. *J Virol* **67**, 6917–6921.
- Powell, R. M., Ward, T., Goodfellow, I., Almond, J. W. & Evans, D. J. (1999).** Mapping the binding domains on decay accelerating factor (DAF) for haemagglutinating enteroviruses: implications for the evolution of a DAF-binding phenotype. *J Gen Virol* **80 (Pt 12)**, 3145–3152.
- Pöyry, T., Kinnunen, L., Hyypiä, T., Brown, B., Horsnell, C., Hovi, T. & Stanway, G. (1996).** Genetic and phylogenetic clustering of enteroviruses. *J Gen Virol* **77 (Pt 8)**, 1699–1717.
- Pozzetto B. (2009).** Entérovirus et autres picornavirus pathogènes pour l’homme (à l’exception du virus de l’hépatite A). , EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Biologie clinique, 90–55–0045.
- Prabhakar, B. S., Haspel, M. V., McClintock, P. R. & Notkins, A. L. (1982).** High frequency of antigenic variants among naturally occurring human Coxsackie B4 virus isolates identified by monoclonal antibodies. *Nature* **300**, 374–376.

- Pulli, T., Koskimies, P. & Hyypiä, T. (1995).** Molecular comparison of coxsackie A virus serotypes. *Virology* **212**, 30–38.
- Pulli, T., Lankinen, H., Roivainen, M. & Hyypiä, T. (1998a).** Antigenic sites of coxsackievirus A9. *Virology* **240**, 202–212.
- Pulli, T., Roivainen, M., Hovi, T. & Hyypiä, T. (1998b).** Induction of neutralizing antibodies by synthetic peptides representing the C terminus of coxsackievirus A9 capsid protein VP1. *J Gen Virol* **79 (Pt 9)**, 2249–2253.
- Putnak, J. R. & Phillips, B. A. (1981).** Differences between poliovirus empty capsids formed in vivo and those formed in vitro: a role for the morphopoietic factor. *J Virol* **40**, 173–183.
- Racaniello V. & Howley, P. M. (2007).** *Picornaviridae: the viruses and their replication*. In *Fields VIROLOGY*, 5th edn., pp. pp795–838. Philadelphia: Racaniello V.
- Rahamat-Langendoen, J., Riezebos-Brilman, A., Borger, R., van der Heide, R., Brandenburg, A., Schölvink, E. & Niesters, H. G. M. (2011).** Upsurge of human enterovirus 68 infections in patients with severe respiratory tract infections. *J Clin Virol* **52**, 103–106.
- Rakoto-Andrianarivelo, M., Rousset, D., Razafindratsimandresy, R. & Delpeyroux, D. (2002).** [New method of molecular typing in human Enteroviruses: characterization of Madagascar ‘untypable’ strains]. *Arch Inst Pasteur Madagascar* **68**, 55–58.
- Rakoto-Andrianarivelo, M., Jegouic, S., Bessaud, M. & Delpeyroux, F. (2008).** [Polioviruses and species C enteroviruses, viruses of the same species and ‘tribe’]. *Med Sci (Paris)* **24**, 452–453.
- Ray, C. G., Plexico, K. L., Wenner, H. A. & Chin, T. D. (1967).** Acute respiratory illness associated with Coxsackie B4 virus in children. *Pediatrics* **39**, 220–226.
- Reetoo, K. N., Osman, S. A., Illavia, S. J., Cameron-Wilson, C. L., Banatvala, J. E. & Muir, P. (2000).** Quantitative analysis of viral RNA kinetics in coxsackievirus B3-induced murine

- myocarditis: biphasic pattern of clearance following acute infection, with persistence of residual viral RNA throughout and beyond the inflammatory phase of disease. *J Gen Virol* **81**, 2755–2762.
- Reimann, B. Y., Zell, R. & Kandolf, R. (1991).** Mapping of a neutralizing antigenic site of Coxsackievirus B4 by construction of an antigen chimera. *J Virol* **65**, 3475–3480.
- Reed, L.J., Muench, H. (1938).** A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American Journal of Epidemiology* **27**:493–497.
- Ren, RB., Costantini, F., Gorgacz, E. J., Lee, J. J. & Racaniello, V. R. (1990).** Transgenic mice expressing a human poliovirus receptor: a new model for poliomyelitis. *Cell* **63**, 353–362.
- Richards, O. C., Spagnolo, J. F., Lyle, J. M., Vleck, S. E., Kuchta, R. D. & Kirkegaard, K. (2006).** Intramolecular and intermolecular uridylylation by poliovirus RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol* **80**, 7405–7415.
- Rico-Hesse, R., Pallansch, M. A., Nottay, B. K. & Kew, O. M. (1987).** Geographic distribution of wild poliovirus type 1 genotypes. *Virology* **160**, 311–322.
- Rigonan, A. S., Mann, L. & Chonmaitree, T. (1998).** Use of Monoclonal Antibodies To Identify Serotypes of Enterovirus Isolates. *J Clin Microbiol* **36**, 1877–1881.
- Rodríguez, P. L. & Carrasco, L. (1993).** Poliovirus protein 2C has ATPase and GTPase activities. *J Biol Chem* **268**, 8105–8110.
- Rohll, J. B., Percy, N., Ley, R., Evans, D. J., Almond, J. W. & Barclay, W. S. (1994).** The 5'-untranslated regions of picornavirus RNAs contain independent functional domains essential for RNA replication and translation. *J Virol* **68**, 4384–4391.
- Romero, J. R. & Rotbart, H. A. (1995).** Sequence analysis of the downstream 5' nontranslated region of seven echoviruses with different neurovirulence phenotypes. *J Virol* **69**, 1370–1375.
- Rose, T. M., Schultz, E. R., Henikoff, J. G., Pietrokovski, S., McCallum, C. M. & Henikoff, S.**

- (1998). Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences. *Nucleic Acids Res* **26**, 1628–1635.
- Rose, T. M., Henikoff, J. G. & Henikoff, S. (2003).** CODEHOP (COnsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer) PCR primer design. *Nucleic Acids Res* **31**, 3763–3766.
- Rose, T. M. (2005).** CODEHOP-mediated PCR – A powerful technique for the identification and characterization of viral genomes. *Virology Journal* **2**, 20.
- Rossmann, M. G. (2000).** Distinct cellular receptor interactions in poliovirus and rhinoviruses. *EMBO J* **19**, 1207–1216.
- Rossmann, M. G., He, Y. & Kuhn, R. J. (2002).** Picornavirus-receptor interactions. *Trends Microbiol* **10**, 324–331.
- Rotbart, H. A., Levin, M. J. & Villarreal, L. P. (1984).** Use of subgenomic poliovirus DNA hybridization probes to detect the major subgroups of enteroviruses. *J Clin Microbiol* **20**, 1105–1108.
- Rotbart, H. A., Eastman, P. S., Ruth, J. L., Hirata, K. K. & Levin, M. J. (1988).** Nonisotopic oligomeric probes for the human enteroviruses. *J Clin Microbiol* **26**, 2669–2671.
- Rotbart, H. A. (1991).** Nucleic acid detection systems for enteroviruses. *Clin Microbiol Rev* **4**, 156–168.
- Rotbart, H. A. (1995).** Enteroviral infections of the central nervous system. *Clin Infect Dis* **20**, 971–981.
- Rotbart, H. A., O’Connell, J. F. & McKinlay, M. A. (1998).** Treatment of human enterovirus infections. *Antiviral Res* **38**, 1–14.
- Rousset, D., Rakoto-Andrianarivelo, M., Razafindratsimandresy, R., Randriamanalina, B., Guillot, S., Balanant, J., Mauclère, P. & Delpyroux, F. (2003).** Recombinant vaccine-derived poliovirus in Madagascar. *Emerging Infect Dis* **9**, 885–887.

- Rubinstein, S. J., Hammerle, T., Wimmer, E. & Dasgupta, A. (1992).** Infection of HeLa cells with poliovirus results in modification of a complex that binds to the rRNA promoter. *J Virol* **66**, 3062–3068.
- Sabin, A. B. (1959).** Present position of immunization against poliomyelitis with live virus vaccines. *Br Med J* **1**, 663–680.
- Sabin, A. B. (1985).** Oral poliovirus vaccine: history of its development and use and current challenge to eliminate poliomyelitis from the world. *J Infect Dis* **151**, 420–436.
- el-Sageyer, M. M., Szendrői, A., Hütter, E., Uj, M., Szücs, G., Mezey, I., Tóth, I., Kátai, A., Kapiller, Z. & other authors. (1998).** Characterisation of an echovirus type 11' (prime) epidemic strain causing haemorrhagic syndrome in newborn babies in Hungary. *Acta Virol* **42**, 157–166.
- Salako, M. A., Carter, M. J. & Kass, G. E. N. (2006).** Coxsackievirus protein 2BC blocks host cell apoptosis by inhibiting caspase-3. *J Biol Chem* **281**, 16296–16304.
- Solomon, T., Lewthwaite, P., Perera, D., Cardoso, MJ., McMinn, P., Ooi, MH. (2010).** Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of enterovirus 71. *Lancet Infect Dis* **10**:778–790.
- Salk, J. E. (1956).** Poliomyelitis vaccine in the fall of 1955. *Am J Public Health Nations Health* **46**, 1–14.
- Salk, J. E. (1959).** Poliomyelitis vaccine preparation and administration; analysis of basic premises and current practices. *J Am Med Assoc* **169**, 1829–1838.
- Samuelson A. (1990).** Aspects on the serodiagnosis of enterovirus infections by ELISA. *Serodiagn ImmunotherInfect* **4**, 395–406.
- Sandelin, K., Tuomioja, M. & Erkkilä, H. (1977).** Echovirus type 7 isolated from conjunctival scrapings. *Scand J Infect Dis* **9**, 71–73.
- Sandoval, I. V. & Carrasco, L. (1997).** Poliovirus infection and expression of the poliovirus protein

- 2B provoke the disassembly of the Golgi complex, the organelle target for the antipoliovirus drug Ro-090179. *J Virol* **71**, 4679–4693.
- SANDY, C., O'Neill, D., McCoy, A., Sethi, D.(2003).** *La santé, l'environnement et le fardeau des maladies. Department for International Development (DFID).*P60.
- Saitou N, Nei M.** 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**:406–425.
- Santti, J., Hyypiä, T., Kinnunen, L. & Salminen, M. (1999).** Evidence of recombination among enteroviruses. *J Virol* **73**, 8741–8749.
- Sarnow, P. (1989).** Role of 3'-end sequences in infectivity of poliovirus transcripts made in vitro. *J Virol* **63**, 467–470.
- Savolainen-Kopra, C. & Blomqvist, S. (2010).** Mechanisms of genetic variation in polioviruses. *Rev Med Virol* **20**, 358–371.
- Schieble, J. H., Fox, V. L. & Lennette, E. H. (1967).** A probable new human picornavirus associated with respiratory diseases. *Am J Epidemiol* **85**, 297–310.
- Schuffenecker, I., Mirand, A., Antona, D., Henquell, C., Chomel, J.-J., Archimbaud, C., Billaud, G., Peigue-Lafeuille, H., Lina, B. & Bailly, J.-L. (2011).** Epidemiology of human enterovirus 71 infections in France, 2000-2009. *J Clin Virol* **50**, 50–56.
- Schwartzbrod, L. (1991).** Virologie des milieux hydriques. In *Virologie des milieux hydriques*, Ouvrage 320.10. p 304.
- Seme K, Mocilnik T, Komlos KF, Doplihar A, Persing DH, Poljak M.** 2008. GeneXpert enterovirus assay: one-year experience in a routine laboratory setting and evaluation on three proficiency panels. *J. Clin. Microbiol.* **46**:1510–1513.
- Shafren, D. R., Dorahy, D. J., Ingham, R. A., Burns, G. F. & Barry, R. D. (1997).** Cocksackievirus A21 binds to decay-accelerating factor but requires intercellular adhesion molecule 1 for cell

entry. *J Virol* **71**, 4736–4743.

Sharma, R., Raychaudhuri, S. & Dasgupta, A. (2004). Nuclear entry of poliovirus protease-polymerase precursor 3CD: implications for host cell transcription shut-off. *Virology* **320**, 195–205.

She, R. C., Hymas, W. C., Taggart, E. W., Petti, C. A. & Hillyard, D. R. (2010). Performance of enterovirus genotyping targeting the VP1 and VP2 regions on non-typeable isolates and patient specimens. *J Virol Methods* **165**, 46–50.

Shieh, Y. C., Calci, K. R. & Baric, R. S. (1999). A method to detect low levels of enteric viruses in contaminated oysters. *Appl Environ Microbiol* **65**, 4709–4714.

Shindarov, L. M., Chumakov, M. P., Voroshilova, M. K., Bojinov, S., Vasilenko, S. M., Iordanov, I., Kirov, I. D., Kamenov, E., Leshchinskaya, E. V. & other authors. (1979). Epidemiological, clinical, and pathomorphological characteristics of epidemic poliomyelitis-like disease caused by enterovirus 71. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* **23**, 284–295.

Shiroki, K., Ishii, T., Aoki, T., Kobashi, M., Ohka, S. & Nomoto, A. (1995). A new cis-acting element for RNA replication within the 5' noncoding region of poliovirus type 1 RNA. *J Virol* **69**, 6825–6832.

Simmonds, P. & Welch, J. (2006). Frequency and dynamics of recombination within different species of human enteroviruses. *J Virol* **80**, 483–493.

Skinner, M. A., Racaniello, V. R., Dunn, G., Cooper, J., Minor, P. D. & Almond, J. W. (1989). New model for the secondary structure of the 5' non-coding RNA of poliovirus is supported by biochemical and genetic data that also show that RNA secondary structure is important in neurovirulence. *J Mol Biol* **207**, 379–392.

Smyth, R. L. & Openshaw, P. J. M. (2006). Bronchiolitis. *Lancet* **368**, 312–322.

Spear, P. G. (2004). Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry. *Cell Microbiol* **6**,

401–410.

- Staheli, JP., Ryan, JT., Bruce, AG., Boyce, R., Rose, TM. (2009).** Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers (CODEHOPs) for the detection of novel viruses in non-human primates. *Methods* **49**:32–41.
- Storch, G. (1999).** Respiratory Infections. In *Essentials of Diagnostic Virology*. 61-63.
- Strebel, K. & Beck, E. (1986).** A second protease of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **58**, 893–899.
- Sun, L., Zheng, H., Zheng, H., Guo, X., He, J., Guan, D., Kang, M., Liu, Z., Ke, C. & other authors. (2011).** An enterovirus 71 epidemic in Guangdong Province of China, 2008: epidemiological, clinical, and virogenic manifestations. *Jpn J Infect Dis* **64**, 13–18.
- Svitkin, Y. V., Gorbalenya, A. E., Kazachkov, Y. A. & Agol, V. I. (1979).** Encephalomyocarditis virus-specific polypeptide p22 possessing a proteolytic activity: Preliminary mapping on the viral genome. *FEBS Letters* **108**, 6–9.
- Svitkin, Y. V., Maslova, S. V. & Agol, V. I. (1985).** The genomes of attenuated and virulent poliovirus strains differ in their in vitro translation efficiencies. *Virology* **147**, 243–252.
- Tamura, K., Nei, M. (1993).** Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* **10**:512–526.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. (2007).** MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* **24**:1596–1599.
- Tapparel, C., L’Huillier, A. G., Rougemont, A.-L., Beghetti, M., Barazzone-Argiroffo, C. & Kaiser, L. (2009).** Pneumonia and pericarditis in a child with HRV-C infection: a case report. *J Clin Virol* **45**, 157–160.
- Tavakoli, N. P., Wang, H., Nattanmai, S., Dupuis, M., Fusco, H. & Hull, R. (2008).** Detection and typing of enteroviruses from CSF specimens from patients diagnosed with

meningitis/encephalitis. *Journal of Clinical Virology* **43**, 207–211.

- Tee, K. K., Lam, T. T.-Y., Chan, Y. F., Bible, J. M., Kamarulzaman, A., Tong, C. Y. W., Takebe, Y. & Pybus, O. G. (2010).** Evolutionary Genetics of Human Enterovirus 71: Origin, Population Dynamics, Natural Selection, and Seasonal Periodicity of the VP1 Gene. *J Virol* **84**, 3339–3350.
- Thoelen, I., Lemey, P., Van Der Donck, I., Beuselinck, K., Lindberg, A. M. & Van Ranst, M. (2003).** Molecular typing and epidemiology of enteroviruses identified from an outbreak of aseptic meningitis in Belgium during the summer of 2000. *J Med Virol* **70**, 420–429.
- Thoelen, I., Moës, E., Lemey, P., Mostmans, S., Wollants, E., Lindberg, A. M., Vandamme, A.-M. & Van Ranst, M. (2004).** Analysis of the serotype and genotype correlation of VP1 and the 5' noncoding region in an epidemiological survey of the human enterovirus B species. *J Clin Microbiol* **42**, 963–971.
- Thompson, S. R. & Sarnow, P. (2003).** Enterovirus 71 contains a type I IRES element that functions when eukaryotic initiation factor eIF4G is cleaved. *Virology* **315**, 259–266.
- Tokarz, R., Firth, C., Madhi, S. A., Howie, S. R. C., Wu, W., Sall, A. A., Haq, S., Briese, T. & Lipkin, W. I. (2012).** Worldwide emergence of multiple clades of enterovirus 68. *J Gen Virol* **93**, 1952–1958.
- Tomasec, P., Wang, E. C. Y., Davison, A. J., Vojtesek, B., Armstrong, M., Griffin, C., McSharry, B. P., Morris, R. J., Llewellyn-Lacey, S. & other authors. (2005).** Downregulation of natural killer cell-activating ligand CD155 by human cytomegalovirus UL141. *Nat Immunol* **6**, 181–188.
- Towner, J. S., Ho, T. V. & Semler, B. L. (1996).** Determinants of membrane association for poliovirus protein 3AB. *J Biol Chem* **271**, 26810–26818.
- Toyoda, H., Nicklin, M. J., Murray, M. G., Anderson, C. W., Dunn, J. J., Studier, F. W. &**

- Wimmer, E. (1986a).** A second virus-encoded proteinase involved in proteolytic processing of poliovirus polyprotein. *Cell* **45**, 761–770.
- Toyoda, H., Nicklin, M. J., Murray, M. G., Anderson, C. W., Dunn, J. J., Studier, F. W. & Wimmer, E. (1986b).** A second virus-encoded proteinase involved in proteolytic processing of poliovirus polyprotein. *Cell* **45**, 761–770.
- Toyoda, H., Franco, D., Fujita, K., Paul, A. V. & Wimmer, E. (2007).** Replication of poliovirus requires binding of the poly(rC) binding protein to the cloverleaf as well as to the adjacent C-rich spacer sequence between the cloverleaf and the internal ribosomal entry site. *J Virol* **81**, 10017–10028.
- Trabelsi, A., Grattard, F., Nejmeddine, M., Aouni, M., Bourlet, T. & Pozzetto, B. (1995).** Evaluation of an enterovirus group-specific anti-VP1 monoclonal antibody, 5-D8/1, in comparison with neutralization and PCR for rapid identification of enteroviruses in cell culture. *J Clin Microbiol* **33**, 2454–2457.
- Trallero, G., Avellon, A., Otero, A., De Miguel, T., Pérez, C., Rabella, N., Rubio, G., Echevarria, J. E. & Cabrerizo, M. (2010).** Enteroviruses in Spain over the decade 1998-2007: virological and epidemiological studies. *J Clin Virol* **47**, 170–176.
- Tsukiyama-Kohara, K., Iizuka, N., Kohara, M. & Nomoto, A. (1992).** Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J Virol* **66**, 1476–1483.
- Vallet, S., Legrand Quillien, M. C., Dailland, T., Podeur, G., Gouriou, S., Schuffenecker, I., Payan, C. & Marcorelles, P. (2009).** Fatal case of enterovirus 71 infection, France, 2007. *Emerging Infect Dis* **15**, 1837–1840.
- Van der Sanden, S., Koopmans, M., Uslu, G., van der Avoort, H. & Dutch Working Group for Clinical Virology. (2009).** Epidemiology of enterovirus 71 in the Netherlands, 1963 to 2008. *J Clin Microbiol* **47**, 2826–2833.

- Van der Sanden S, van der S. S. (2010).** Evolutionary trajectory of the VP1 gene of human enterovirus 71 genogroup B and C viruses. *J Gen Virol* 1949–1958.
- Van kuppeveld F J, Melchers, W. J., Kirkegaard, K. & Doedens, J. R. (1997).** Structure-function analysis of coxsackie B3 virus protein 2B. *Virology* **227**, 111–118.
- Van Vliet KE, Muir P, Echevarria JM, Klapper PE, Cleator GM, Van Loon AM. 2001.** Multicenter Proficiency Testing of Nucleic Acid Amplification Methods for the Detection of Enteroviruses. *J Clin Microbiol* **39**:3390–3392.
- Vance, L. M., Moscufo, N., Chow, M. & Heinz, B. A. (1997).** Poliovirus 2C region functions during encapsidation of viral RNA. *J Virol* **71**, 8759–8765.
- Varela-Calvino, R., Skowera, A., Arif, S. & Peakman, M. (2004).** Identification of a naturally processed cytotoxic CD8 T-cell epitope of coxsackievirus B4, presented by HLA-A2.1 and located in the PEVKEK region of the P2C nonstructural protein. *J Virol* **78**, 13399–13408.
- Volle, R., Nourrisson, C., Mirand, A., Regagnon, C., Chambon, M., Henquell, C., Bailly, J.-L., Peigue-Lafeuille, H. & Archimbaud, C. (2012).** Quantitative real-time RT-PCR assay for research studies on enterovirus infections in the central nervous system. *J Virol Methods* **185**, 142–148.
- Wadia, N. H., Katrak, S. M., Misra, V. P., Wadia, P. N., Miyamura, K., Hashimoto, K., Ogino, T., Hikiji, T. & Kono, R. (1983).** Polio-like motor paralysis associated with acute hemorrhagic conjunctivitis in an outbreak in 1981 in Bombay, India: clinical and serologic studies. *J Infect Dis* **147**, 660–668.
- Wang, J.-R., Tsai, H.-P., Huang, S.-W., Kuo, P.-H., Kiang, D. & Liu, C.-C. (2002).** Laboratory diagnosis and genetic analysis of an echovirus 30-associated outbreak of aseptic meningitis in Taiwan in 2001. *J Clin Microbiol* **40**, 4439–4444.
- Ward, T., Powell, R. M., Pipkin, P. A., Evans, D. J., Minor, P. D. & Almond, J. W. (1998).** Role

- for beta2-microglobulin in echovirus infection of rhabdomyosarcoma cells. *J Virol* **72**, 5360–5365.
- Wessels, E., Duijsings, D., Notebaart, R. A., Melchers, W. J. G. & van Kuppeveld, F. J. M. (2005).** A proline-rich region in the coxsackievirus 3A protein is required for the protein to inhibit endoplasmic reticulum-to-golgi transport. *J Virol* **79**, 5163–5173.
- Wien, M. W., Chow, M. & Hogle, J. M. (1996).** Poliovirus: new insights from an old paradigm. *Structure* **4**, 763–767.
- Wilson, C. W., Stevenson, D. K. & Arvin, A. M. (1989).** A concurrent epidemic of respiratory syncytial virus and echovirus 7 infections in an intensive care nursery. *Pediatr Infect Dis J* **8**, 24–29.
- Wimmer, E., Hellen, C. U. & Cao, X. (1993).** Genetics of poliovirus. *Annu Rev Genet* **27**, 353–436.
- Xiang, W., Harris, K. S., Alexander, L. & Wimmer, E. (1995).** Interaction between the 5'-terminal cloverleaf and 3AB/3CDpro of poliovirus is essential for RNA replication. *J Virol* **69**, 3658–3667.
- Xiang, W., Paul, A. V. & Wimmer, E. (1997).** RNA Signals in Enterovirus and Rhinovirus Genome Replication. *Seminars in Virology* **8**, 256–273.
- Xiang, W., Cuconati, A., Hope, D., Kirkegaard, K. & Wimmer, E. (1998).** Complete protein linkage map of poliovirus P3 proteins: interaction of polymerase 3Dpol with VPg and with genetic variants of 3AB. *J Virol* **72**, 6732–6741.
- Xiang, Z., Gonzalez, R., Wang, Z., Ren, L., Xiao, Y., Li, J., Li, Y., Vernet, G., Paranhos-Baccalà, G. & other authors. (2012).** Coxsackievirus A21, enterovirus 68, and acute respiratory tract infection, China. *Emerging Infect Dis* **18**, 821–824.
- Xiao, C., Bator-Kelly, C. M., Rieder, E., Chipman, P. R., Craig, A., Kuhn, R. J., Wimmer, E. & Rossmann, M. G. (2005).** The crystal structure of coxsackievirus A21 and its interaction

- with ICAM-1. *Structure* **13**, 1019–1033.
- Yousef, G. E., Brown, I. N. & Mowbray, J. F. (1987).** Derivation and biochemical characterization of an enterovirus group-specific monoclonal antibody. *Intervirology* **28**, 163–170.
- Yozwiak, N. L., Skewes-Cox, P., Gordon, A., Saborio, S., Kuan, G., Balmaseda, A., Ganem, D., Harris, E. & DeRisi, J. L. (2010).** Human enterovirus 109: a novel interspecies recombinant enterovirus isolated from a case of acute pediatric respiratory illness in Nicaragua. *J Virol* **84**, 9047–9058.
- Ypma-Wong, M. F., Dewalt, P. G., Johnson, V. H., Lamb, J. G. & Semler, B. L. (1988).** Protein 3CD is the major poliovirus proteinase responsible for cleavage of the P1 capsid precursor. *Virology* **166**, 265–270.
- Zheng, Z. M., He, P. J., Caueffield, D., Neumann, M., Specter, S., Baker, C. C. & Bankowski, M. J. (1995).** Enterovirus 71 isolated from China is serologically similar to the prototype E71 BrCr strain but differs in the 5'-noncoding region. *J Med Virol* **47**, 161–167.
- Zhu, J., Luo, Z., Wang, J., Xu, Z., Chen, H., Fan, D., Gao, N., Ping, G., Zhou, Z. & other authors. (2013).** Phylogenetic analysis of Enterovirus 71 circulating in Beijing, China from 2007 to 2009. *PLoS ONE* **8**, e56318.
- Zhu, F., Xu, W., Xia, J., Liang, Z., Liu, Y., Zhang, X., Tan, X., Wang, L., Mao, Q. & other authors. (2014).** Efficacy, safety, and immunogenicity of an enterovirus 71 vaccine in China. *N Engl J Med* **370**, 818–828.
- Zoll, G. J., Melchers, W. J., Kopecka, H., Jambroes, G., van der Poel, H. J. & Galama, J. M. (1992).** General primer-mediated polymerase chain reaction for detection of enteroviruses: application for diagnostic routine and persistent infections. *J Clin Microbiol* **30**, 160–165.
- Zoll, J., Heus, H. A., van Kuppeveld, F. J. M. & Melchers, W. J. G. (2009).** The structure–function relationship of the enterovirus 3'-UTR. *Virus Research* **139**, 209–216.