

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE SAAD DAHLAB - BLIDA 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master dans le domaine SNV
Filière Sciences Biologiques

Option : Génétique

Thème

Génotypage des entérovirus dans les eaux usées avant et pendant la pandémie de Covid 19 dans la région de Koléa

Présenté par :

Date de soutenance : 14/09/2022

- LOUZRI AMINE
- ALI CHERIF TAREK

Devant le jury :

• Nom et Prénom	Grade/ Lieu	Qualité
M ^{me} AMOKRANE.A	MCA/USDB1	Présidente
M ^{me} BENHOUNA.S	MCB/USDB1	Examinatrice
M ^{me} ANES BOULAHBAL Dahbia Leila	Dr/IPA	Promotrice
M ^r BENYAHIA Nourreddine	MAB/USDB1	Co-promoteur

Promotion : 2021-2022

Remerciements

Remerciements

Tout d'abord, nous remercions Dieu, notre créateur de nous avoir donné la force, la volonté et le courage afin d'accomplir cette mission.

Nous souhaitons exprimer nos remerciements les plus sincères à tous ceux et celles qui nous ont apportés leur aide et qui ont contribué, de près ou de loin, à l'élaboration de ce mémoire.

*Nous tenons aussi à remercier profondément **Dr. Dahbia-Leila ANES BOULAHBAL**, responsable du laboratoire national de référence **OMS** pour la surveillance de la poliomyélite en Algérie pour sa disponibilité et ses conseils pertinents qui nous ont aidé de façon très significative à l'amélioration de ce mémoire.*

*Nos vifs remerciements à notre Co-promoteur **Dr. Nourreddine BENYAHIA**; Maître-assistant **A** à l'université de **Blida**, pour son aide, ses conseils qui ont contribué à alimenter notre réflexion.*

*Mes remerciements les plus chaleureux aux membres du jury, **Mme AMOKRANE** et **Mme BENHOUNA** qui nous ont fait l'honneur d'accepter de juger notre travail de fin d'étude.*

*Nous voudrions exprimer notre reconnaissance envers les collègues de laboratoire des entérovirus : **S. Sellami, A. Benyahia, S. Chikhaoui, A. Dellal, et L. Aoufi** et de laboratoire virus des hépatites virales : **Mme A. Bensalem, Ch.Kerioui, K. Selmani, A. Kabouya, Gh. Aouizrat, N. Hihi, M. Soltani, N. Bencherifa, S. Lemdani** qui nous ont apporté leur soutien moral et intellectuel tout au long de notre démarche.*

*Enfin, un grand merci à tous nos enseignants de l'université de **Blida 1**.*

Dédicace

Dédicace

A Mes chers parents ;

Pour leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études.

Pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral.

A ma femme, pour la patience et le soutien dont elle a fait preuve pendant ces deux dernières années

Spéciale dédicace à mes chers enfants ZAKARIA et MERIEM LAYANE, source de mon bonheur, ma raison d'être en ce monde...

A Toute ma famille ;

A toute ma belle-famille.

A mon binôme ' Tarek ' et à toute sa famille.

A Tous ceux qui me sont chers.

AMINE

Dédicace

A Mes chers parents ;

Pour leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mon existence.

Puis à toute ma famille ;

Pour leurs encouragements permanents et leur soutien moral.

A ma femme, pour la patience et le soutien dont elle a fait preuve pendant ces deux dernières années.

Spéciale dédicace à mes chers enfants YOUCEF et WASSIM, source de mon bonheur,...

A toute ma belle-famille.

A mon binôme ' AMINE ' et à toute sa famille.

A Tous ceux qui me sont chers.

Cordialement TAREK

Liste des tableaux

Liste des tableaux :

Tableau I.	Les différents virus de la famille des <i>Picornaviridae</i> isolés dans l'espèce Humaine	11
Tableau II.	Les différentes pathologies associées aux entérovirus humains	18
Tableau III.	Liste des isolats d'échantillons d'eaux usées sélectionnés	25
Tableau IV.	Programme d'extraction	35
Tableau V.	Les amorces utilisées dans la réaction de la RT-PCR en temps réel	36
Tableau VI.	Les amorces utilisées dans la réaction de la RT-PCR classique	39
Tableau VII.	Sérotypes identifiés par séquençage de la région VP1 à partir de 186 isolats.	42
Tableau VIII.	Amorces spécifiques utilisées pour le séquençage	44
Tableau IX.	Résultats de la RT PCR classique.	50
Tableau X.	Comparaison des résultats obtenus par la RT-PCR classique et par la RT-PCR en temps réel	53
Tableau XI.	Répartition des entérovirus identifiés avant et pendant la pandémie de la COVID 19	54
Tableau XII.	Répartition des échantillons positifs en fonction de la lignée cellulaire	57

Liste des figures

Liste des figures :

Figure 1.	Organisation génomique des entérovirus	7
Figure 2.	Structure tridimensionnelle de la capside des Entérovirus	8
Figure 3.	Arbre phylogénétique des différents genres au sein de la famille des Picornaviridae	10
Figure 4.	Traduction et maturation des protéines virales	13
Figure 5.	Cycle de réplication des entérovirus dans la cellule cible permissive	14
Figure 6.	Un effet cytopathique (ECP) caractéristique des virus coxsackie B sur des cellules rénales d'un singe africain	15
Figure 7.	Physiopathologie des infections à Entérovirus	17
Figure 8.	Lignée cellulaire Véro arrivée au laboratoire dans une grande flask (boite)	26
Figure 9.	Conservation des cellules dans de l'azote liquide à -196°C	26
Figure 10.	Protocole de la Trypsination	27
Figure 11.	Boîtes ou Flasks de culture cellulaire RD et L20B	28
Figure 12.	Incubation des tubes contenant les lignées cellulaires en suspension dans l'étuve à 36°C	28
Figure 13.	Récupération du concentrât à partir de l'ampoule de décantation	30
Figure 14.	Cellules RD et L20B observées sous microscope optique inverse	33
Figure 15.	Le thermocycleur BIO-RAD CFX96 utilisé pour la réaction de la RT-PCR en temps réel	35
Figure 16.	Principe de la RT-PCR en utilisant des sondes d'hydrolyse	36
Figure 17.	Le principe de la Rétro-transcription en utilisant le random hexamère (rH)	37
Figure 18.	Le thermocycleur ProFlex™ PCR System « Applied Biosystems ». RT-PCR classique.	39
Figure 19.	Principe de la PCR	39
Figure 20.	Migration électrophorétique à l'aide d'un générateur sous une tension de 80V	40
Figure 21.	Le protocole de la purification selon le kit Invitrogen	42

Figure 22.	Le séquenceur Applied Biosystems™ SeqStudio™ Genetic Analyze System	44
Figure 23.	Séquençage de l'ADN à l'aide d'électrophorèse capillaire en gel	44
Figure 24.	Résultats obtenus par RT- PCR en temps réel après amplification génique à partir de surnageant de culture	47
Figure 25.	Visualisation de bandes d'ADN sur gel d'agarose (1 à 2%)	50
Figure 26.	Résultats obtenus par RT- PCR en temps réel pour l'échantillon n° 27	51
Figure 27.	Visualisation de bandes d'ADN sur gel d'agarose pour l'échantillon n° 27	51
Figure 28.	Arbre phylogénétique des entérovirus humains (HEV-B)	55

Liste des abréviations

Liste des abréviations :

ADNc :	Acide Désoxyribonucléique complémentaire.
ARNm :	Acide Ribonucléique messenger.
BLAST:	Basic Local Alignment Search Tool.
CAR:	Coxsackievirus-Adenovirus Receptor.
CMK:	Primary Cynomolgus Monkey Kidney cells.
CN :	Contrôle Négatif.
CP :	Contrôle Positif.
CV :	Coxsackievirus.
ddNTP :	di désoxy Nucléotide Triphosphate.
DMEM :	Dulbecco's Modified Eagle Medium.
DMSO :	Di Méthyle Sulfoxyde.
dNTP :	Désoxy-ribonucléotides Triphosphates.
DTT :	Dithiothréitol.
E :	Echovirus.
ECHO	Enteric Cytopathogenic Human Orphan.
ECP	Effet Cytopathique.
EDTA :	Ethylène Diamine Tétra Acétique.
GPEI	Global Polio Eradication Initiative
Hep-2 :	Cellules épithéliales humaines type 2.
HEV :	Entérovirus Humains.
ICAM :	InterCellular Adhesion Molecule.
Ig :	Immunoglobuline.
IPV :	Inactivated Polio Vaccine.
IRES :	Internal Ribosomal Entry Site.
IRM :	Imagerie par Résonance Magnétique.
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean

kDa :	Kilo Dalton.
MEGA :	Molecular Evolutionary Genetics Analysis.
MEM :	Minimal Essential Medium.
MRC5 :	Medical Research Council cell strain five.
NC :	Non Codante.
NCBI :	National Center for Biotechnology Information.
EVNP :	Entérovirus Non Poliomyélitiques.
OPV :	Oral Polio Vaccine.
ORF :	Open Reading Frame.
P1-3 :	Proteins 1-3.
PABP :	Poly-A Binding Protein.
PBS :	Phosphate Buffer Salin.
PCBP :	Poly-C Binding Protein.
Pol :	Polymérase.
PU :	Poly Uridylation.
PV :	Poliovirus.
PVR :	Poliovirus Receptor.
RD :	Rhabdomyosarcoma.
rH:	random Hexamère.
rpm :	rotation par minute.
RT :	Rétro transcription.
RIVM:	National Institute of Public Health and the Environment Protection.
SNC:	Système nerveux central.
SVF:	Sérum de Veau Foetal.
TAE:	Tris Acétate.
Taq:	Thermus aquaticus.
VP1-4:	Virion Proteins 1-4.
VPg:	Virion Protein génome.

Glossaire

Glossaire :

Terme	Définition
Amorces dégénérées (code génétique dégénéré)	Un même acide aminé peut être codé par plusieurs codons différents.
Lignée cellulaire	C'est une population homogène de cellules, stables après des mitoses successives et ayant en théorie une capacité illimitée de division.
Milieu de croissance	C'est un milieu enrichi avec 10% de sérum de veau fœtal permettant une croissance cellulaire rapide.
Milieu de survie	C'est un milieu contenant une faible concentration (2%) de sérum de veau fœtal utilisé pour maintenir les cellules à un faible taux de croissance et maintenir leur métabolisme pendant la période de réplication virale.
SYBR-Safe	C'est un composé à base de cyanine surtout utilisé comme colorant pour acides nucléiques en biologie moléculaire.

Résumé

Résumé

Les entérovirus (EV) humains, membres de la famille des Picornaviridae, comprennent plus de 100 génotypes appartenant à 4 espèces : Entérovirus A, B, C et D. Ces virus sont à l'origine de pathologies très variées et occupent une place importante en santé publique.

L'objectif de cette étude est la détection des EV par amplification génique (RT-PCR) ciblant la région 5' non codante, à partir d'échantillons environnementaux d'eaux usées revenues positifs par culture cellulaire et d'en préciser les sérotypes circulants avant et pendant la période marquée par la pandémie de la Covid 19.

Nous présentons ici une première partie décrivant la concentration des virus selon les recommandations de l'OMS suivi d'inoculation sur lignées cellulaires ; et une deuxième partie présente le typage moléculaire des échantillons environnementaux d'eaux usées.

La totalité des échantillons positifs en culture cellulaires (47), se sont révélés positifs par RT-PCR en temps réel. Un seul prélèvement positif en culture et en RT-PCR en temps réel s'est révélé négatif par RT-PCR classique du fait de la faible charge virale probable.

Le concentrât de ce prélèvement a été ré-inoculé aux cellules et est revenu finalement positif par PCR classique. La culture a servi de ce fait à l'amplification des virus.

Les isolats obtenus ont été identifiés par séquençage ciblant la région VP1 du génome virale.

Cette étude démontre clairement que la culture cellulaire et la RT-PCR, sont deux techniques sensibles, fournissant des résultats fiables.

La RT-PCR reste beaucoup plus rapide, comparativement à la culture cellulaire et à la RT-PCR classique.

Mots clés : Entérovirus, culture cellulaire, RT-PCR, typage moléculaire, VP1, Pandémie.

Abstract

The Human Enterovirus members of the Picornaviridae family are comprised of 100 genotypes pertaining to 4 species: Enteroviruses A, B, C & D. These viruses are the origin of a highly variable set of pathologies and hence occupy an important place within Public Health. The objective of this study is the detection of Human Enteroviruses by Genetic Amplification (RT-PCR) targeting the 5' noncoding region, of waste water samples, confirmed positive by cell culture, collected both before and throughout the ongoing Covid-19 Pandemic. We present here, at first instance, the virus concentrations, in accordance with the World Health Organization recommendations for Inoculation of cell cultures, and secondly, the molecular typing of the waste water samples. The entirety of the samples found positive through cell culture (47) were likewise confirmed positive by qRT-PCR. Only one sample, found positive by cell culture, was found negative by conventional RT-PCR, and this is likely due to the low viral load. This sample concentrate was reinoculated and was later found positive by conventional PCR. Subsequently, the isolates obtained were sequenced, through Sanger Sequencing, targeting the VP1 region of the genome. This study clearly demonstrates the high reliability and sensitivity of both the RT-PCR and cell culture techniques. The qRT-PCR remains, nevertheless, much faster than conventional RT-PCR or cell culture.

Keywords: Enteroviruses; Cell Culture; RT-PCR; Molecular Typing; VP1; Pandemic

ملخص

الفيروسات المعوية البشرية (EV)، أعضاء عائلة Picornaviridae، تشمل أكثر من 100 نمط وراثي ينتمي إلى 4 أنواع: الفيروس المعوي A و B و C و D. هذه الفيروسات هي سبب أمراض متنوعة للغاية وتحتل مكانة مهمة في الصحة العامة. الهدف من هذه الدراسة هو اكتشاف الفيروسات المعوية عن طريق تضخيم الجينات (RT-PCR) التي تستهدف منطقة 5 بوصة غير المشفرة، من العينات البيئية لمياه الصرف الصحي التي تعود إيجابية عن طريق زراعة الخلايا وتحدد الأنماط المصلية المنتشرة قبل وأثناء فترة جائحة كوفيد 19.

ونقدم هنا الجزء الأول الذي يصف تركيز الفيروسات وفقاً لتوصيات منظمة الصحة العالمية يليه التلقيح على خطوط الخلايا؛ ويعرض الجزء الثاني الطباعة الجزيئية لعينات المياه المستعملة البيئية. كانت جميع العينات الإيجابية في زراعة الخلايا (47) إيجابية لـ RT-PCR في الوقت الفعلي. كانت الثقافة الإيجابية الواحدة واختبار RT-PCR في الوقت الفعلي سلبياً لـ RT-PCR التقليدي بسبب الحمل الفيروسي المنخفض المحتمل تم إعادة تلقيح تركيز هذه العينة إلى الخلايا وعاد في النهاية إيجابياً بواسطة PCR التقليدي. لذلك تم استخدام الثقافة لتضخيم الفيروسات.

تم تحديد العزلات التي تم الحصول عليها عن طريق التسلسل الذي يستهدف المنطقة VP1 من المنطقة الجينوم الفيروسي. توضح هذه الدراسة بوضوح أن زراعة الخلايا و RT-PCR هما تقنيتان حساستان، مما يوفر نتائج موثوقة. لا يزال RT-PCR أسرع بكثير من زراعة الخلايا و RT-PCR التقليدي.

الكلمات الرئيسية: الفيروس المعوي، زراعة الخلايا، RT-PCR، الكتابة الجزيئية، VP1، الجائحة.

Sommaire

Remerciements	
Dédicace	
Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Glossaire	
Résumé	
Abstract	
ملخص	
Introduction.....	02
Chapitre I : Synthèse bibliographique	
1. Historique.....	05
2. Caractères des Entérovirus humains.....	06
2.1.Morphologie et propriétés physico-chimiques	06
2.2.Structure des entérovirus	06
2.2.1.Génome et protéines virales.....	06
2.2.2. Capside.....	08
2.3. Classification	09
2.4. Evolution génomique.....	11
2.5. Cycle infectieux des Entérovirus	12
2.5.1. Phase précoce.....	12
2.5.2. Phase répllicative.....	12
2.5.2.1. La traduction.....	12
2.5.2.2. La réplication.....	13
2.5.3. Phase de libération.....	14
2.6. Effet de la multiplication virale sur la cellule hôte.....	15
3. Infections humaines à Entérovirus.....	16
3.1.Epidémiologie et transmission.....	16
3.2. Physiopathologie générale.....	16
3.3. Pathologie humaine à Entérovirus.....	17
4. Diagnostic virologique.....	19
4.1. Prélèvement et conservation des échantillons	19
4.2. Diagnostic direct.....	20
4.2.1. Isolement des virus sur culture cellulaire.....	20
4.2.2. Techniques d'amplification du génome des entérovirus	21
4.3. Diagnostic indirect.....	21
5. Prévention des infections et développement d'un vaccin.....	22
6. Pandémie de la COVID 19.....	23
Chapitre II : Matériel et Méthodes	
1. Echantillonnage.....	25
2. Préparation et entretien de la culture cellulaire.....	25
2.1. Congélation des lignées cellulaires.....	26

2.2. Décongélation des cellules	26
2.3. Trypsination et numération cellulaire	27
2.3.1. Trypsination.....	27
2.3.2. Numération cellulaire	28
3. Préparation des échantillons d'eaux usées.....	28
3.1. Concentration des échantillons en particules virales.....	29
3.2. Traitement du concentrât d'eau usée.....	30
4. Inoculation sur les lignées cellulaire.....	31
5. Amplification génique.....	33
5.1. Extraction de l'ARN viral à partir de surnagent de culture cellulaire.....	33
5.2. Identification des entérovirus par RT-PCR en temps réel.....	34
5.2.1. Préparation du mélange réactionnel	34
5.2.2. Amplification et lecture des résultats.....	35
5.3. Identification des entérovirus par RT-PCR classique.....	37
5.3.1. Transcription inverse.....	37
5.3.2. Amplification.....	38
5.4. Révélation des produits d'amplification.....	40
5.4.1. Préparation du gel d'agarose.....	40
5.4.2. Migration électrophorétique.....	40
5.4.3. Visualisation et interprétation des résultats.....	41
6. Identification moléculaire des isolats.....	41
6.1. Purification des produits d'amplification.....	41
6.2. PCR de séquençage.....	42
6.3. Post-purification de séquençage.....	43
6.4. Analyse phylogénétique.....	45
Chapitre III : Résultats et Discussion	
1. Résultats de la biologie moléculaire.....	47
1.1. Par RT PCR en temps réel.....	47
1.2. Par RT PCR classique.....	49
1.3. Ré-inoculation sur culture cellulaire pour l'échantillon n°27.....	51
1.4. Comparaison des résultats.....	52
1.5. Identification moléculaire des isolats.....	53
2. Résultats de l'isolement sur culture cellulaire.....	54
Conclusion.....	57
Références bibliographiques	
Annexes	

Introduction

Introduction :

Les Entérovirus (EV) sont des petits virus appartenant à la famille des Picornaviridae. Il s'agit de virus à symétrie icosaédrique et d'un diamètre de 20 à 30 nm, non enveloppés à acide ribonucléique (ARN) simple brin de polarité positive (**Fleury, 2002 ; Apostol *et al.*, 2012 ; Grosjean *et al.*, 2016**).

Les EV humains hors rhinovirus sont actuellement classés en quatre espèces (HEV A, B, C, D), regroupant plus de 120 sérotypes (**Affi *et al.*, 2009 ; Renois *et al.*, 2014**). Ces virus sont très résistants dans le milieu extérieur et se transmettent principalement par voie fécale-orale, mais également par voie aérienne (**Mammette, 2002 ; Wells et Coyne, 2019**).

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**).

Afin de déterminer les relations entre les HEV et les différents syndromes cliniques, les méthodes standards de la détection et d'identification des EV sont basées sur l'isolement du virus sur culture cellulaire, suivi du sérotypage des virus isolés par des techniques de séroneutralisation en utilisant des antisérums spécifiques. Néanmoins, 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.*, 2007**). 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, VP3 ou VP4 (**Nasri *et al.*, 2007**). Quelle que soit la région testée, elles donnent dans l'ensemble des résultats équivalents en termes des sérotypes identifiés (**Oberste *et al.*, 2000 ; Nasri *et al.*, 2007 ; Nasri *et al.*, 2007b ; She *et al.*, 2010**).

La surveillance environnementale des EV vient compléter la surveillance des maladies chez les humains et permet la couverture de l'ensemble de la population sans distinction du contexte épidémiologique (cas contacte, symptomatique ou non,...). Plusieurs paramètres sont à prendre en

considération pour le choix des sites de collecte des eaux usées tels que la taille de la population raccordée et le type d'eaux usées drainées (domestique, chimique).

Dans le cadre de la réalisation de notre PFE en master 2 génétique, nous nous sommes proposés d'identifier les EV, des souches isolées à partir de la station d'épuration de Koléa dans la wilaya de Tipaza, durant la période de 2018 à 2019 (avant la pandémie de la Covid 19) et la période de 2020 à 2021 (pendant la crise sanitaire). Nous avons utilisé des techniques de biologie moléculaire pour le typage des EV en se basant sur le séquençage partiel de la région VP1.

Synthèse bibliographique

1. Historique

L'histoire des EV commence avec celle de la poliomyélite (en grec, *polios* : gris et *myelos* : moelle). 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 (**Mammette, 2002**). 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 démontre la nature virale en inoculant l'extrait de la moelle épinière d'un enfant décédé de poliomyélite au singe (**Mammette, 2002**). En 1909, Landsteiner et Popper découvraient que l'agent étiologique de la poliomyélite paralytique aiguë était le Poliovirus (PV) (**Kristensson, 1999**).

En 1936, **Sabin** et **Olitsky** réalisent la première culture in vitro de poliovirus à partir de tissus nerveux embryonnaires humains. Puis en 1949, Enders étend la culture du poliovirus à des tissus non nerveux (**Prescott et al. 2010**). En 1955, un vaccin antipoliomyélique à virus inactivé est mis au point par Salk, puis un second vaccin à virus atténué est développé par Sabin en 1965. Rapidement, avec l'essor des techniques de virologie, il apparaît que le poliovirus fait partie d'un groupe beaucoup plus important de virus. En 1948, **Dallford** et **Sickles**, travaillant sur des souris nouveau-nés comme modèle d'étude de la poliomyélite, isolent les premiers coxsackievirus. Puis, dans le courant des années 50, de nouveaux virus distincts, à la fois des poliovirus et des coxsackievirus, sont isolés sur différents continents, à partir de prélèvements de patients sains ou souffrants de méningites (**Melnick, 1996 ; Hyypia et al, 1997**). Ces nouveaux virus, ne semblant pas être associés à une maladie connue, furent baptisés Echovirus (ECHO : Enteric Cytopathogenic Human Orphan, ci-après echovirus). En 1955, un comité de recherche est formé pour étudier les echovirus. En 1957, comprenant que les ECHO, polio et coxsackievirus forment un seul groupe viral, le comité de recherche définit le genre Enterovirus (**Committee on the Enterovirus, 1957**).

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), 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. Caractère Des Entérovirus humains

2.1. Morphologie et propriétés physicochimiques

Le PV est le prototype du genre Entérovirus dans la famille des Picornaviridae. Il s'agit d'un virion d'environ 25 à 30 nm de diamètre constitué d'une capsidie 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 156 S en gradient du saccharose et une masse moléculaire variant de 8 à 9 10^6 Daltons. Comme tous les virus nus, ils résistent dans le milieu extérieur, à l'alcool à 70°, à l'éther, au déoxycholate de sodium. Ils se conservent plusieurs années à -20°C à -80°C en gardent leur pouvoir infectieux.

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. (Melnick, 1996 ; Mammette, 2002 ; Conrad, 2012).

L'absence d'enveloppe chez les EV les rendent nativement résistants à l'action des agents physico-chimiques. Ils sont détruits par les oxydants (hypochlorite de soude), le formol 0,3 %, la bêta-propional acétone et les ultraviolets(UV). Cette méthode est notamment utilisée pour traiter des surfaces exposées à des produits biologiques contaminés et difficilement nettoyables ou accessibles (Mammette, 2002 ; Renois, 2012).

2.2. Structure des entérovirus

Les EV sont des virus nus c'est-à-dire non enveloppés, de forme sphérique avec un diamètre de 24 à 30 nm. Ce sont des particules simples constituées d'une capsidie protéique qui entoure un ARN génomique monocaténaire non segmenté de polarité positive (Grosjean *et al.* 2016 ; Abbasi *et al.* 2018).

2.2.1. Génome et protéines virales

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 (Thompson et Peersen, 2004) 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 génome) (Figure 1).

L'ARN est dit de polarité positive et donc infectieux par ce qu'il peut être directement traduit en protéines virales nécessaires à la réplication dès sa libération dans la cellule.

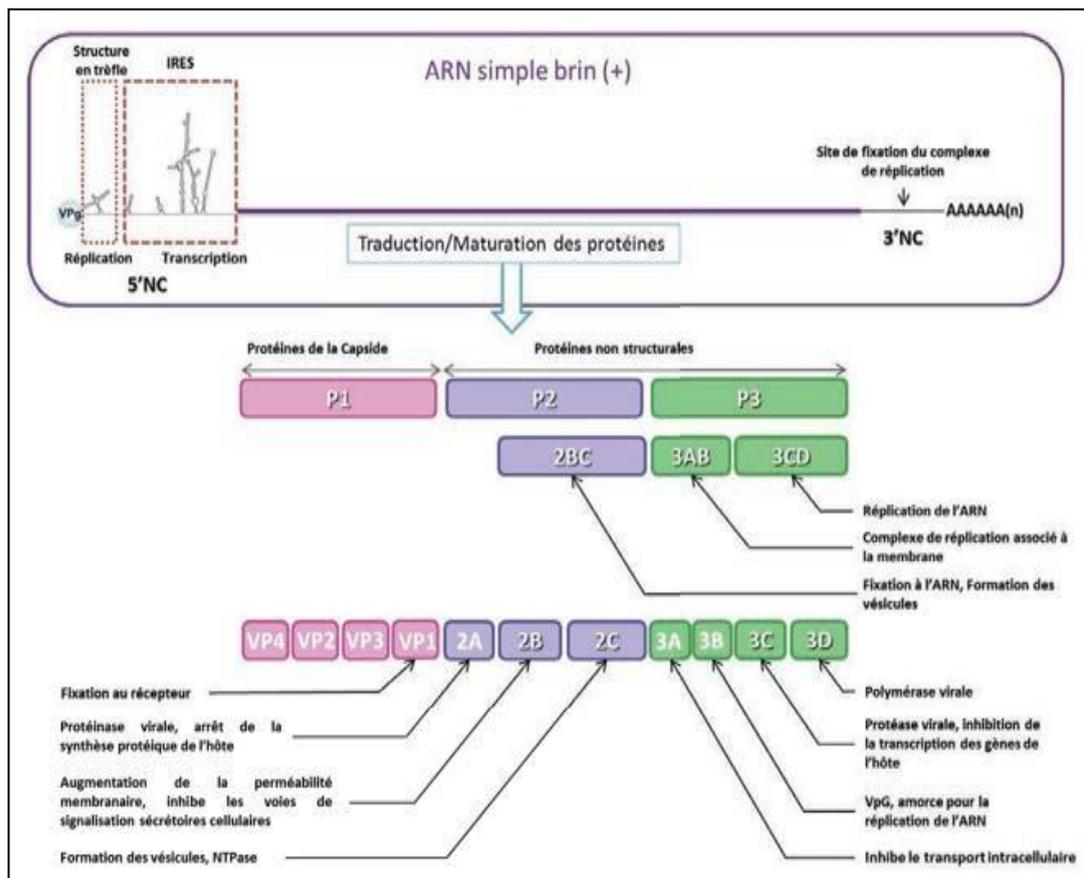


Figure 1 . Organisation génomique des entérovirus (Lin et al., 2009).

L'extrémité 5' est non coiffée et va former une structure secondaire appelée IRES (Internal Ribosome Entry Site). Elle permet de traduire directement l'ARN viral en protéines (**Kempf et Barton, 2008 ; Filbin et Kief, 2009 ; Cameron et al.2010**). Cette région 5'NC régule non seulement la transcription mais également la réplication et contribue au contrôle de la pathogenèse virale et au tropisme tissulaire (**Fernandez-Miragall et al.2009**). Elle est hautement conservée au niveau nucléotidique entre les différentes espèces d'EV et présente un intérêt majeur pour leur détection moléculaire (**Renois et al.2014**).

La région 3'NC possède une structure secondaire impliquée dans le contrôle de l'initiation de la synthèse de l'ARN. Elle possède également une séquence polyadénylée d'environ 75 nucléotides nécessaire à l'infectivité du génome viral. Une fois traduite, la région codante du génome est à l'origine d'une polyprotéine subdivisée en trois régions : P1, P2 et P3, correspondant aux trois précurseurs des protéines virales. La région P1 code les protéines structurales de capsid (VP4, VP2, VP3 et VP1) (**Oberste et al.2004 ; Hassel, 2015**), alors que les régions P2 et P3 codent les protéines non structurales impliquées dans la traduction et la

maturation des protéines

(protéases 2A, 3C, 3CD) et dans la réplication du génome viral (2B, 2C, 3AB, 3B^{VPg}, protéase 3CD, et polymérase 3D) (Renois *et al.* 2014 ; Abbasi *et al.* 2018).

2.2.2. La Capside

La capside des EV présente une structure d'un icosaèdre d'environ 30 nm ; elle 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), ces quatre protéines forment une sous unité ou protomère, 5 protomères se combinent pour former un pentamère et 12 pentamères constituent la capside (Figure 2) (Racaniello et Howley, 2007 ; Conrad, 2012 ; Grosjean *et al.* 2016). Sa structure tridimensionnelle et les interactions qu'elle établit avec des récepteurs cellulaires ont été résolues pour un certain nombre d'EV par cristallographie. Malgré des différences dans les séquences en acides aminés et des subtilités structurales d'un type ou d'un genre, l'architecture de la capside est fondamentalement conservée (Volle, 2014).

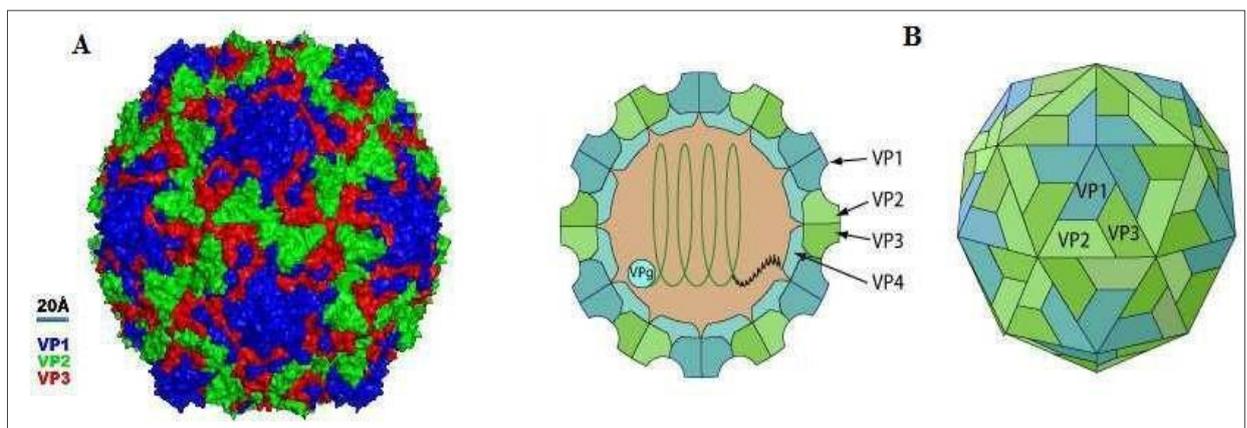


Figure 2. Structure tridimensionnelle de la capside des Entérovirus (Hassel, 2015).

(A) La capside et les protéines de structure VP1-4.

(B) Les protéines VP1, VP2 et VP3 sont exhibés à la surface de la capside et VP4 est en position interne.

2.3. Classification

Les Picornavirus sont la cause de nombreuses pathologies humaines et vétérinaires. Ils sont actuellement classés par la Comité International de Taxonomie Virale (ICTV) en 68 genres distincts et 158 espèces au sein de la famille des Picornaviridae: Aphovirus, Avihepatovirus, Cardiovirus, Erbovirus, Enterovirus, Hepatovirus, Kobuvirus, Parechovirus, Sapelovirus, Senecavirus, Teschovirus, Casovirus, Dicipivirus, Salivirus, Megrivirus et Tremovirus (Adamset al., 2013) mais leur classification évolue très rapidement, en particulier suite à la découverte régulière de nouveaux génotypes, grâce notamment à la méta-génomique (séquençage à haut débit d'échantillons biologiques).

A l'origine, la classification des EV, basée sur les caractères antigéniques et le pouvoir pathogène, distingue les poliovirus (PV- 1 à 3) et les entérovirus non poliomyélitiques : coxsackievirus A (CV-A), coxsackievirus B (CV-B), echovirus et entérovirus (EV-68 à 108). Actuellement, la classification est fondée sur des critères génétiques, comportant quatre groupes d'entérovirus humains (A, B, C et D) (Tableau I). L'espèce Poliovirus n'existe plus et les PV ont été intégrés dans l'espèce EV-C (Afifi et al. 2009 ; Pasquier et al., 2013 ; Ibrahim, 2014 ; Abbasi et al., 2018).

Les recombinaisons potentielles intra- et inter-espèces pendant l'évolution et la découverte de nouveaux virus font que la classification des EV est régulièrement reconsidérée (Bousslama et al. 2007 ; Lauber et Gorbalenya, 2012). La (Figure 3) montre l'arbre phylogénétique des différents genres au sein de la famille des Picornaviridae (Lauber & Gorbalenya, 2012). Le Tableau I réunit les différents virus de la famille des Picornaviridae isolés dans l'espèce humaine.

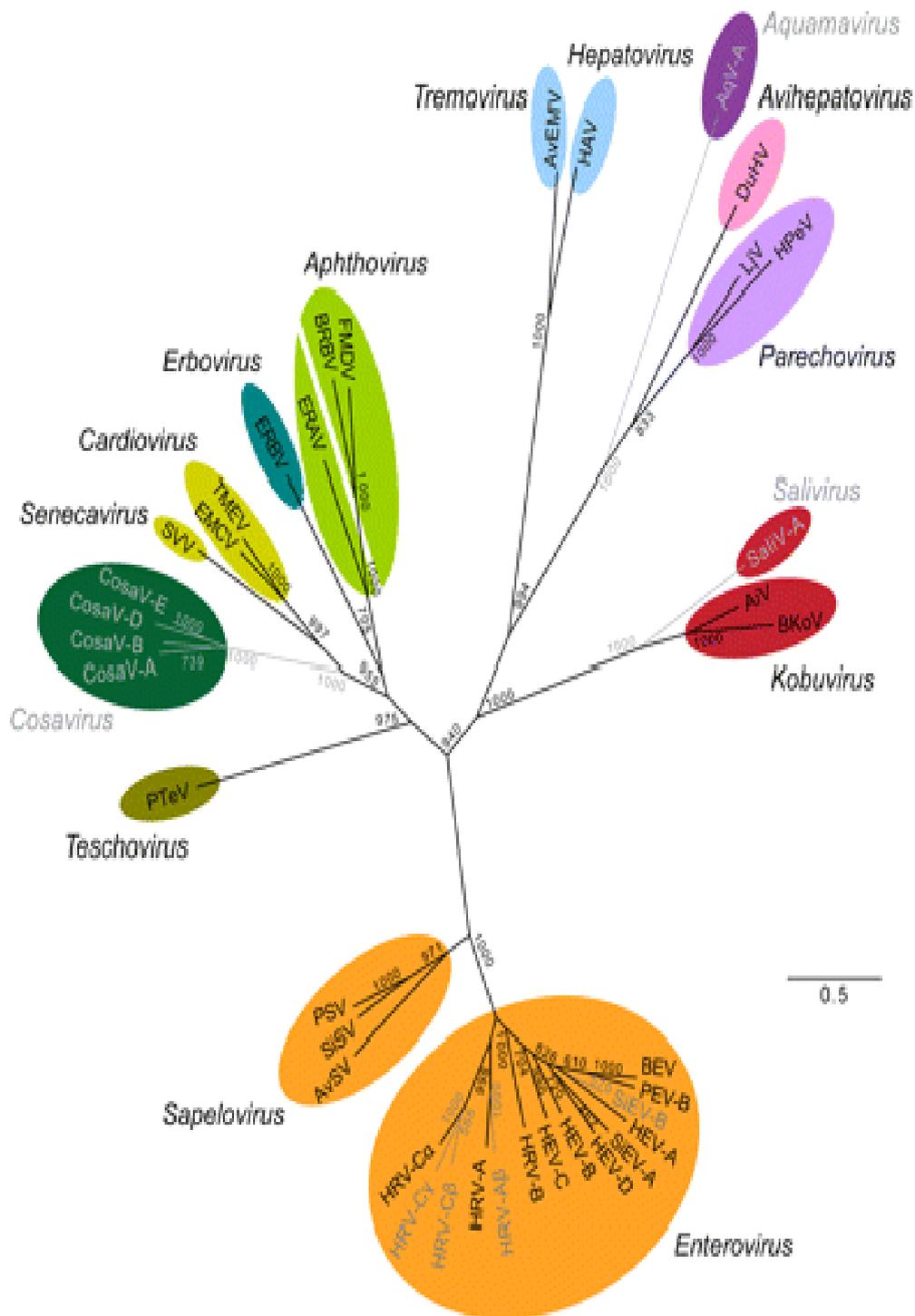


Figure 3 : Arbre phylogénétique des différents genres au sein de la famille des Picornaviridae (Lauber & Gorbalenya, 2012).

Tableau I. Réunit les différents virus de la famille des *Picornaviridae* isolés chez l'espèce humaine <http://www.picornaviridae.com>

Genre Enterovirus	
Espèces	Souches (ancienne dénomination des espèces)
Human enterovirus A (+de 21 sérotypes)	Human coxsackievirus A (CV-A2), 3-8, 10,12,14 et 16 Human enterovirus 71 (EV-71), 76, 89, 90, 91, 92
Human enterovirus B (+de 59 sérotypes)	Human coxsackievirus B1 (CV-B1), 2 à 6 Human coxsackievirus A9 (CV-A9) Human coxsackievirus 1 (EV-1), 2-27, 29-33 Human coxsackievirus 69 (EV-69), 73-75, 77-88, 93, 97, 98, 100,101, 106, 107
Human enterovirus C (+de 19 sérotypes)	Human coxsackievirus A1 (CV-A1), 11, 13, 17, 19-22, 24, 95,96, 99, 102, 104, 105, 109 Human poliovirus 1 (PV-1), 2 et 3
Human enterovirus D (+de 2sérotypes)	Human enterovirus 68 (EV-68), 70, 94

2.4. Evolution génomique

Grace à la grande diversité des EV ; des phénomènes de mutations et de recombinaisons surviennent au cours de leur réplication. Ces mécanismes d'évolution génétique permettent au virus de s'adapter aux modifications de l'environnement et aux diverses pressions de sélection, modifiant ainsi leur capacité infectieuse et répliquative (Renois et al. 2014). Les mutations spontanées apparaissent au cours des étapes de réplication, elles sont dues au fort taux d'erreur de l'ARN polymérase virale ARN dépendante, de plus la longueur de leur génome (7500 bases) augmente la probabilité de cet erreur.

Les phénomènes de recombinaison génétique sont quant à eux plus rares et à l'origine d'échange de matériel génétique entre deux souches entérovirales d'une même espèce au cours de l'infection d'une même cellule cible (Renois et al. 2014).

Cette 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 (Bousslama et al. 2007 ; Bessaoud et al., 2008).

2.5. Cycle infectieux des Entérovirus

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 et Howley, 2007**). Le cycle infectieux peut être décrit en plusieurs phases successives (**Figure 5**).

2.5.1. Phase précoce

La phase précoce correspond à l'attachement du virus à son récepteur cellulaire et la libération du génome dans le cytoplasme. Compte tenu de leur diversité, les EV utilisent une grande variété de récepteurs cellulaires. On peut distinguer trois principaux récepteurs qui appartiennent à la superfamille des immunoglobulines : *Poliovirus receptor* (PVR), ICAM- 1 et CAR.

La spécificité du récepteur et sa distribution cellulaire et tissulaire peuvent moduler le tropisme viral et les manifestations pathologiques (**Fleury, 2009 ; Ibrahim, 2014**).

2.5.2. Phase répllicative :

Au cours de la phase répllicative, le génome viral est traduit, répliqué et de nouvelles particules infectieuses sont assemblées. Cette phase constitue le cœur du cycle viral, elle se traduit par de profondes modifications de la morphologie et de l'organisation intra cellulaire, que l'on nomme effet cytopathique (ECP). Ces modifications, induites par les protéines virales, génèrent un environnement cellulaire propice à la multiplication virale (**Volle, 2014**).

2.5.2.1. La traduction

Une fois le génome est libéré après l'attachement du virus sur les récepteurs de la cellule cible, il peut être traduit en protéines virales, après clivage de la protéine VPg liée à l'extrémité 5' du génome par une protéase cellulaire. Par ailleurs, aucune protéine virale n'est importée dans la cellule via la capsid virale. A la différence de la majorité des ARNm cellulaires, le génome des EV ne contient pas de coiffe pour initier la traduction. A la place, l'élément IRES dans la R5'NC permet l'initiation interne de la traduction (**Pelletier et Sonenberg, 1988 ; Kottaridi et al., 2006 ; Filbin et Kief, 2009**). Les EV, comme tous les picornavirus, synthétisent leurs protéines par traduction d'une longue phase ouverte de lecture ou ORF, suivie de clivages protéolytiques successifs de la polyprotéine virale ainsi produite (**Ibrahim, 2014**). Le premier clivage est réalisé par la protéase 2A_{pro}, qui va libérer la protéine précurseur P1. Le deuxième clivage est réalisé par la protéase 3C_{pro} qui sépare les protéines précurseurs P2 et P3. Les 3 peptides sont secondairement clivés par ces mêmes protéases pour donner les différentes protéines virales (**Figure 4**) (**Volle, 2014**).

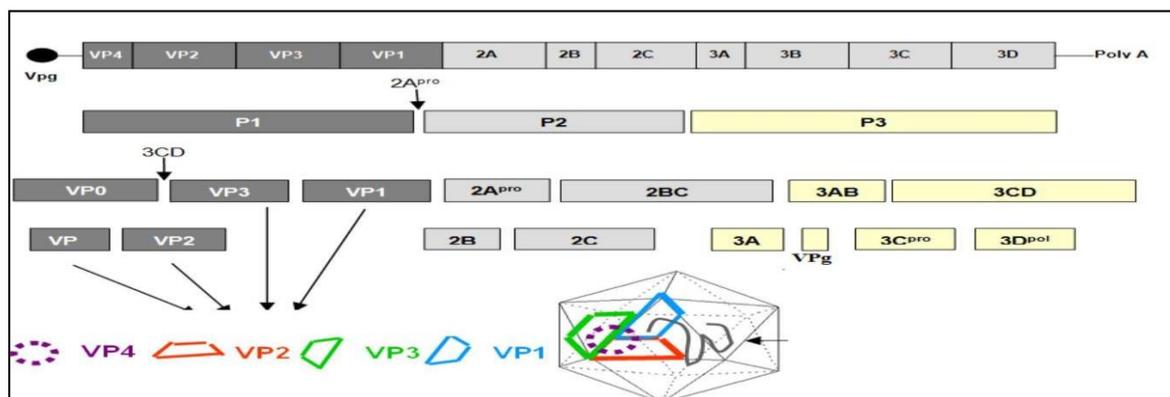


Figure 4 : Traduction et maturation des protéines virales (Hober *et al.* 2013).

La traduction du génome donne une polyprotéine divisée en quatre protéines structurales (gris foncé) et sept protéines non structurales (gris clair et jaune). Les sites de clivage par les protéinases virales sont indiqués par des flèches. Les quatre protéines structurales adoptent une symétrie icosaédrique avec VP1, VP2 et VP3 situées à la surface extérieure de la capsid et VP4 à la surface interne. L'ARN génomique simple brin est situé à l'intérieur de la capsid.

2.5.2.2. La réplication

Lorsque suffisamment de protéines virales sont produites, une bascule de la traduction vers la réplication du génome viral aurait lieu (Gamarnik et Andino, 2000). En effet le génome des EV n'est pas seulement un ARN, c'est aussi la matrice qui permet la synthèse d'un antigénome de polarité négative, lequel servira de matrice pour la réplication du génome viral (Steil et Barton, 2009). Ces deux processus de la réplication et la traduction ne peuvent pas avoir lieu simultanément sur le même brin (+) car la polymérase 3Dpol est incapable de répliquer un ARN en cours de traduction (Ibrahim, 2014).

La synthèse du brin de polarité négative met en jeu des interactions protéines entre le complexe d'initiation PCBP (Poly-C Binding Protein /3CD) lié au premier domaine de la région 5'NC en feuille de trèfle « *Cloverleaf* » et la protéine PABP (*Poly-A Binding Protein*) fixée sur la queue poly-A 3'NC. Ceci permet la circularisation du génome viral et la formation d'un complexe de pré-initiation. Une protéine Vpg (3B) et après poly uridylation (Vpg-pUpU) va s'hybrider sur la queue poly A et servir d'amorce

pour la synthèse de l'antigénome (-) via la polymérase 3Dpol (Paul et al. 1998 ; Renois et al. 2014). Les brins anti-génomiques vont servir de matrices pour la synthèse des ARN viraux de polarité positive par la 3Dpol (Thompson et Peersen, 2004 ; Volle, 2014).

2.5.3. Phase de libération

Cette phase de libération consiste à l'assemblage des sous unités protéiques et à l'encapsulation de l'ARN génomique. Les particules virales s'accumulent ensuite dans le cytoplasme sous forme de vésicules puis sont libérées par lyse cellulaire (**Renois *et al.* 2014**) au cours de laquelle la protéine virale 2B serait impliquée (**Van Kuppeveld *et al.* 1997**).

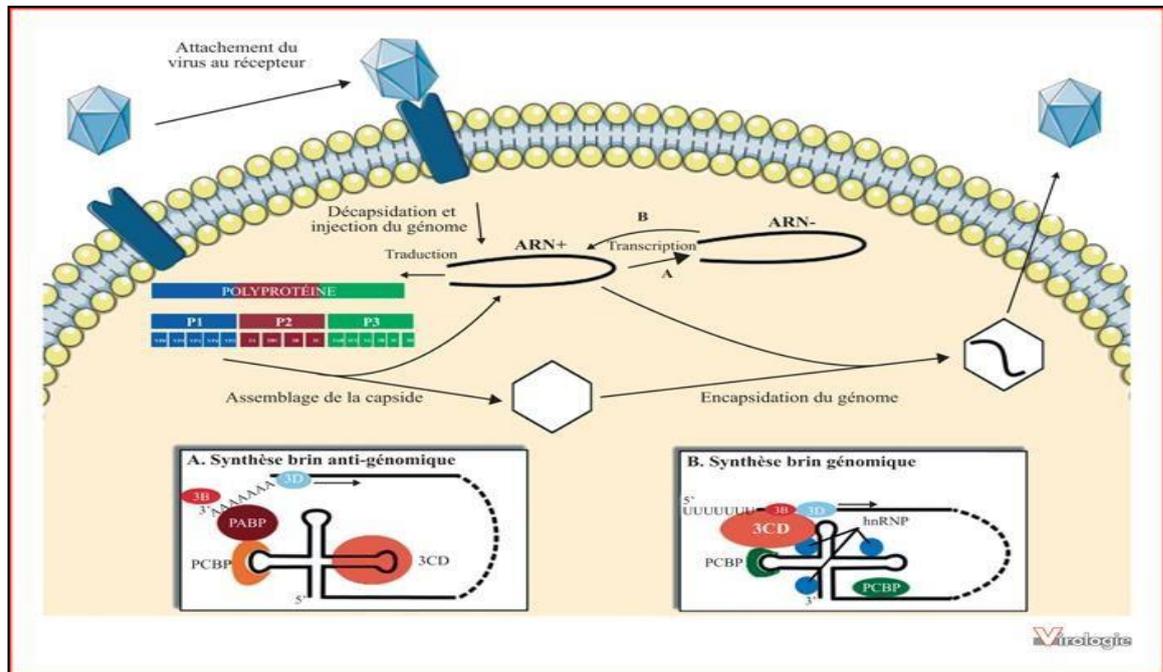


Figure 5 : Cycle de réplication des entérovirus dans la cellule cible permissive

(Renois *et al.* 2014).

Après fixation à ses récepteurs cellulaires, le virus subit une première étape de décapsidation et le matériel génétique est relargué au niveau du cytoplasme cellulaire. C'est là que se dérouleront les étapes de traduction des protéines virales et d'amplification du génome. Les brins d'ARN néo-synthétisés pourront ensuite rentrer à nouveau dans un cycle de réplication ou aboutir à la formation de nouvelles particules virales.

2.6. Effet de la multiplication virale sur la cellule hôte

Les cellules infectées par les EV développent d'importants changements morphologiques caractéristiques appelés effets cytopathiques (ECP) (Fleury, 2009). 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 Ca^{2+} , 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).

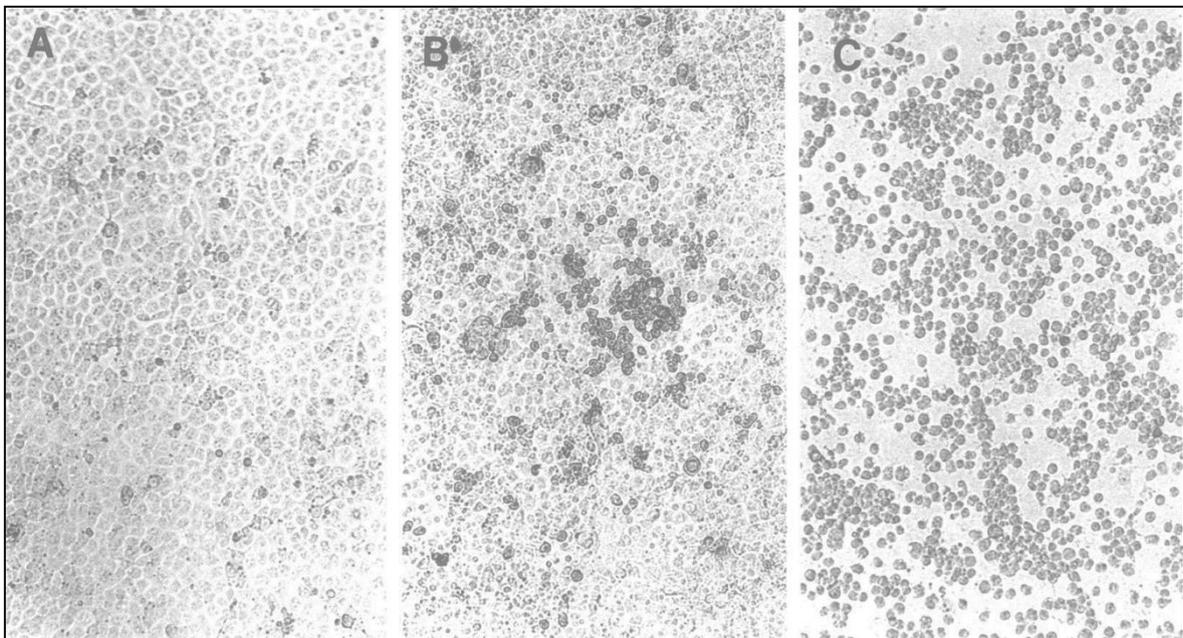


Figure 6 : Effet cytopathique (ECP) caractéristique des virus coxsackie B sur des cellules rénales d'un singe africain (Menegus et Hollick, 1982).

(A) Cellules non infectées par le virus.

(B) Début d'un ECP sur les cellules infectées par le virus.

(C) Un ECP à 100% dû à l'infection de toutes les cellules par le virus.

3. Infections humaines à Entérovirus

3.1. Epidémiologie et transmission

Les EV sont des pathogènes largement ubiquitaires. L'homme est le seul hôte et réservoir naturel des EV impliqués en pathologie humaine (**Fleury, 2002 ; Palacios et Oberste, 2005**). Leur mode de transmission est principalement de type fécal-oral via les mains sales, les objets souillés par la salive ou les matières fécales, ce qui explique une prévalence élevée des infections pendant la petite enfance. La voie aérienne peut également intervenir dans la transmission des EV via la dispersion de gouttelettes rhinopharyngées contaminant l'épithélium respiratoire et conjonctival. Ce mode de transmission pourrait être privilégié par des souches d'EV ayant une prédilection pour le système respiratoire (**Andreoletti et al. 2009 ; Pasquier et al, 2013**).

Dans les pays tempérés où le niveau sanitaire est élevé, les infections à EV peuvent être sporadiques mais elles évoluent volontiers sur un mode épidémique, voire pandémique durant les périodes estivo-automnales. Durant ces phases épidémiques, plusieurs sérotypes d'EV sont amenés à co-circuler. Ces épidémies se manifestent surtout sous forme de méningites chez l'enfant. Dans les pays en voie de développement où les conditions sanitaires sont favorables à une large transmission ; les infections à EV sont endémiques. Enfin, le non-respect des règles d'hygiène universelles (désinfection et lavage des mains en particulier) est à l'origine d'infections nosocomiales, notamment pour les coxsackie virus B (CV-B) et l'échovirus 11 (E-11), particulièrement redoutable chez le nouveau-né (**Mammette, 2002 ; Andreoletti et al.2009 ; Harvala et al.2011**).

3.2. Physiopathologie générale

Les EV contaminent l'organisme au niveau de la bouche et des voies respiratoires, puis, des sites primaires de réplication s'établissent au sein des tissus lymphoïdes des muqueuses intestinales (plaques de Peyer) et de la gorge (amygdales) (**Mammette 2002 ; Smura et al.2010**). A partir de ces sites primaires, les EV se propagent vers les ganglions régionaux, cervicaux et mésentériques (phase lymphatique). Il s'en suit une phase virémique au cours de laquelle le virus se multiplie dans les cellules du système réticulo- endothélial (sites secondaires de réplication), avant de gagner les cellules cibles spécifiques de la pathologie viro-induite (cerveau, méninges, cœur, peau...) (**Melnick, 1996 ; Prescott et al.2010**). L'infection entraîne la sécrétion d'anticorps circulants neutralisants

Protecteurs uniquement contre le sérotype responsable (**Mammette, 2002**). Les atteintes tissulaires consécutives à la virémie nécessitent un franchissement par le virus de l'endothélium

vasculaire irriguant ces tissus (Smura *et al.* 2010).

La période d'incubation recouvrant ces différentes phases est d'environ 7 à 14 jours, avec des extrêmes allant de 2 à 35 jours. La grande diversité des EV les rend responsables de plusieurs syndromes cliniques, il peut s'agir d'une infection inapparente, d'une maladie modérée avec sensation de malaise, fièvre et maux de gorge, ou d'une maladie sévère avec méningites. La guérison peut survenir sans séquelles quel que soit l'aspect clinique (Collier et Oxford, 2000).

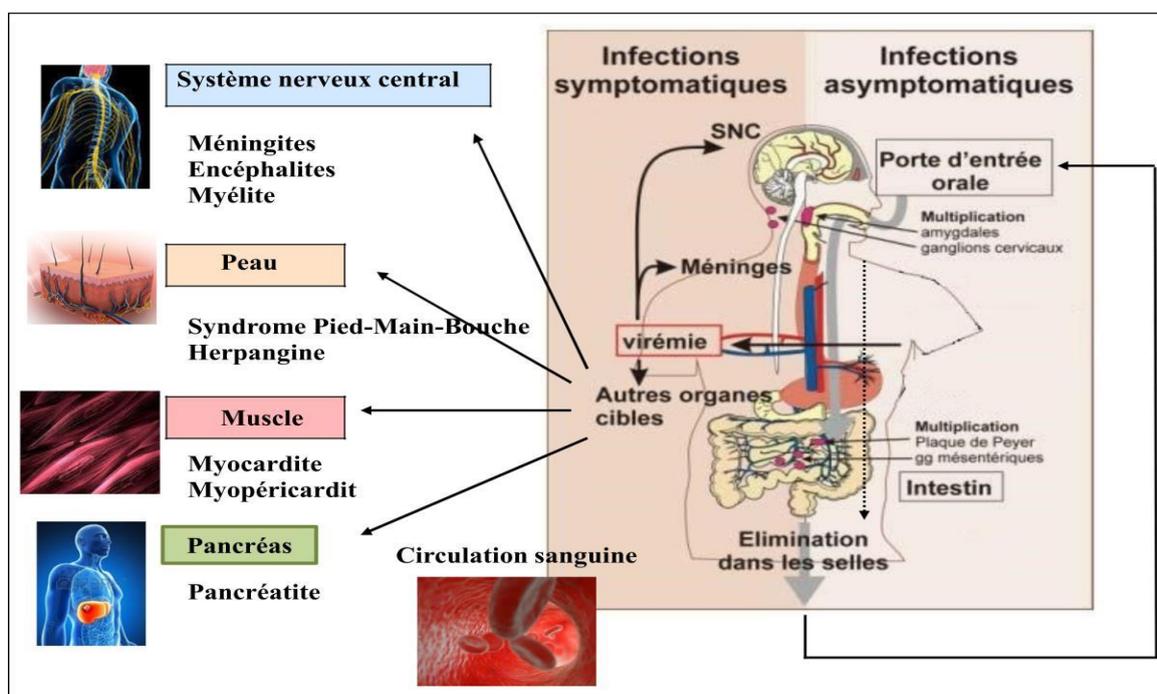


Figure 7 : Physiopathologie des infections à Entérovirus (Hassel, 2015).

L'infection se déroule en quatre phases principales : digestive ou respiratoire, lymphatique, virémique permettant l'atteinte des organes cibles.

3.3. Pathologie humaine à Entérovirus

Les EV sont des agents pathogènes communs responsables d'infections très fréquentes puisque estimées à près de 1 milliard chaque année dans le monde (Palacios et Oberste, 2005 ; Renois, 2012). Ils sont responsables d'un large panel de pathologies humaines allant de l'infection asymptomatique, voire sub-clinique (majorité des cas), jusqu'à des atteintes multi-viscérales mortelles chez le nourrisson ou des infections aiguës fulminantes chez l'adulte. Dans les autres cas, les EV sont responsables d'infections subaiguës ou aiguës dont les séquelles et le pronostic seront variables en fonction des sérotypes, de la dose virale infectieuse, de l'organe cible, de l'âge, du sexe, et du statut immunitaire de l'individu (Julien *et al.* 1999). Le tropisme viral et donc par conséquent les organes cibles infectés, varient en fonction du sous-groupe des EV et des sérotypes viraux (Pasquier *et al.* 2013) (Tableau II)

Tableau II. Les différentes pathologies associées aux entérovirus humains. D'après**Pasquier *et al.* (2013).**

	PV	CV-A	CV-B	E	EV 68-71
Atteintes neurologiques	+	+	+	+	+
Encéphalites			+	+	+
			2	2, 6, 11,19	71
Paralysies	+			+	+
					70-71
Méningites	+	+ 7, 9	+	+	+ 70, 71
			2, 3, 4, 5	4, 6, 7, 9, 11,13, 30, 31	
Atteintes respiratoires		+	+	+	+
Pleurodynie (maladie de Bornholm)			+		
Pneumopathie		+	+		+
		9, 16	4, 5		68
Pharyngite		+	+	+	+
Herpangine		+			
		1-6, 8, 10, 22			
Rhinite		+			
		21, 24			
Atteintes cardiaques			+		
Myocardite			+		
Péricardite			+		
Atteintes digestives		+	+	+	

Diarrhée		+		+	
		18, 20-22,24			
Pancréatite		+	+		
		9	5		
Autres atteintes	+	+	+	+	+
Syndrome mains-pieds-bouche		+ 16			+ 71
Conjonctivite hémorragique		+			+
		24			70
Exanthème de Boston				+	
				16	
Syndrome de fatigue post-virale			+		
Diabète insulino-dépendant			+		

CVA-B : coxsackie A-B ; **E** : echovirus ; **EV** : entérovirus ; **PV** : Poliovirus.

4. Diagnostic virologique

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.

4.1. Prélèvement 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 ont 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 d'eaux usées destinés à la biologie moléculaire doivent être conservés à -20°C pour préserver l'intégrité du génome.

4.1. Diagnostic direct

4.2.1. Isolement des virus 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 et environnementaux tels que les eaux usées. 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 qui se traduit par l'apparition de petites cellules réfringentes se généralisant à l'ensemble du tapis cellulaire 2 à 12 jours après l'inoculation (**Grosjean et al. 2011**).

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 souris aux nouveau-nés (**Lipson et al. 1988**).

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 Rhésus 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'isolements positifs et de raccourcir le délai de positivité (**Racaniello & Howley, 2007**).

4.2.2. Techniques d'amplification du génome des Entérovirus

La technique de Reverse Transcription (RT) PCR est une méthode d'amplification en ciblant des séquences localisées dans la région 5' NC, hautement conservée chez les EV (**Capaul et Gorgievski-Hrisoho, 2005 ; Hymas et al., 2008 ; Pillet et al., 2010 ; Harvala et al., 2018**). Elle permet un diagnostic étiologique rapide (en moins de 48 h) des infections à EV et cela quel que soit le type de prélèvement. C'est donc une technique universelle à variantes selon le type de sondes et le mode de révélation du produit d'amplification. Les amorces les plus souvent choisies sont localisées dans la région 5' non codante (**Nijhuis et al., 2002 ; Zoll et al., 2009 ; Pillet et al., 2010 ; Leveque et al., 2012**).

Récemment, l'amplification et le séquençage moléculaire des séquences codant une partie des gènes des protéines de capsid VP1 ou VP4/VP2, permettent de réaliser une identification génotypique des souches d'EV. Cette approche technique est particulièrement utile quand la souche est non cultivable et elle permet de réaliser des études d'épidémiologie moléculaire (suivi épidémiologique des souches, identifications des infections nosocomiales...) (**Oberste et al., 1999a ; Oberste et al., 1999b ; Bendig et al., 2001 ; Nix et al., 2006 ; Tsai et al., 2011 ; Ibrahim et al., 2014 ; Shabani et al., 2018**).

4.2. Diagnostic indirect

La technique de référence est la réaction de séroneutralisation du pouvoir infectieux viral sur culture cellulaire, en principe spécifique de type, bien que des réactions croisées soient possibles. Les techniques immuno-enzymatiques ou la fixation du complément, d'utilisation plus aisée, sont mal standardisées et donnent de fréquentes réactions croisées. 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. (**Fleury, 2002 ; Agut et al., 2007**).

5. Prévention des infections et développement d'un vaccin

La prévention repose sur le respect des mesures d'hygiène par la désinfection et le lavage des mains mais aussi le traitement convenable de l'eau, de la nourriture et des évacuations des eaux usées, Afin de réduire la transmission oro-fécale (**Weil et al. 2019 ; Collier et Oxford, 2000**).

Aucun EV, y compris le virus polio, n'est sensible aux antiviraux et il n'existe pas de vaccin sauf pour la polio. Le contrôle de ces infections dépend des mesures d'hygiène, tout particulièrement celles permettant de réduire la transmission oro-fécale (**Weil et al.2019**). Ceci implique non seulement de traiter correctement l'eau, la nourriture et les évacuations d'eaux usées, mais aussi les mesures individuelles comme le lavage des mains et la désinfection appropriée de matériels potentiellement contaminé (**Collier et Oxford, 2000**).

La prophylaxie de la poliomyélite grâce à une immunisation active par le vaccin de poliovirus inactivés (**IPV ; « Inactivated Polio Vaccine » ; Salk, 1955**). Ce vaccin contient des poliovirus inactivés des trois sérotypes.

Et par le remplacement du vaccin oral trivalent (OPV) contenant les poliovirus de types 1, 2 et 3 par un vaccin oral bivalent 1-3 (Le poliovirus de type 2 étant éradiqué, son retrait orale permet d'éviter l'apparition du poliovirus virulents dérivés du type 2).

Nouveau ! Dans un communiqué publié le 25 août 2020, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) a certifié que la région Afrique de l'OMS était exempte de poliomyélite causée par les poliovirus sauvages. Il persiste toutefois des cas de poliomyélite causée par le poliovirus de type 2 dérivés du vaccin.

L'OPV n'est plus employé, dans les pays où le Poliovirus ont été complètement éradiqué (souches sauvage et vaccinales), que comme vaccination de protection locale en cas de réintroduction d'un virus sauvage (**Arita et al. 2005 ; OMS, 2006 ; Prescott et al. 2010 ; Kayser et al. 2017**).

6. Pandémie de la Covid 19

La pandémie de **Covid-19** est une pandémie d'une maladie infectieuse émergente, provoquée par le coronavirus SARS-CoV-2. Elle est apparue le 16 novembre 2019 à Wuhan, dans la province de Hubei (en Chine centrale), avant de se propager dans le monde.

Le 11 mars 2020, l'épidémie de Covid-19 est déclarée pandémie par l'OMS qui demande des mesures de protection essentielles et le renforcement des règles familiale et /ou collective (suppression des contacts physiques, fin des attroupements , promotion du lavage des mains, mise en application de la quarantaine, utilisation de gel hydro-alcoolique, port du masque ,etc.).

L'Algérie comme de nombreux pays décide des mesures de confinement, la fermeture des frontières et l'annulation des manifestations sportives et culturelles. Ces décisions ont des conséquences économiques, sociales et environnementales .

Matériel et Méthodes

Le travail a été réalisé au niveau de l'**Institut Pasteur d'Alger (IPA)**, laboratoire des Entérovirus, Laboratoire National de Référence OMS pour la surveillance de la Poliomyélite en Algérie situé à sidi Fredj, du 23/02/2022 au 20/06/2022. Son objectif principal est :

« Génotypage des Entérovirus par isolement sur culture cellulaire et par des techniques de biologie moléculaire, à partir des eaux usées de Koléa avant et pendant la pandémie de la covid19».

Objectifs spécifiques :

Comparer les résultats de la PCR classique et de la PCR en temps réel à la culture cellulaire.

Identifier les souches isolées à partir de la culture cellulaire, par une technique moléculaire de génotypage.

1. Echantillonnage

Un échantillon d'un litre et demi d'eau usée brute est collecté dans un flacon en plastique, propre et hermétique au niveau de l'entrée du tube collecteur de la station d'épuration de KOLEA (W. TIPAZA) après dégrillage à l'aide d'unseau.

Ensuite, les prélèvements ont été transportés dans les 48 heures au laboratoire et dans des conditions réfrigérés (glacière à 4°C). (**GUIDELINES ON ENVIRONMENTAL SURVEILLANCE FOR DETECTION OF POLIOVIRUSES, 2015**).

Ce travail est fait à partir d'une sélection de 47 isolats d'échantillons d'eaux usées contenant des EVNP, durant la période allant du début de l'année 2018 jusqu'à la fin 2021, comme indiqué dans le tableau ci-dessous.

La période est fixée de deux ans avant la pandémie de Covid 19 soit : 2018-2019 et deux ans pendant la pandémie soit : 2020-2021.

Tableau III : Liste des isolats d'échantillons d'eaux usées sélectionnés.

	2018	2019	2020	2021
N° d'échantillon	01-EU 16	15-EU 01	29-EU 02	37-EU 02
	02-EU 20	16-EU 05	30-EU 17	38-EU 06
	03-EU 24	17-EU 25	31-EU 21	39-EU 10
	04-EU 28	18-EU 30	32-EU 25	40-EU 18
	05-EU 32	19-EU 34	33-EU 30	41-EU 22
	06-EU 35	20-EU 38	34-EU 33	42-EU 26
	07-EU 40	21-EU 42	35-EU 44	43-EU 34
	08-EU 48	22-EU 46	36-EU 47	44-EU 38
	09-EU 52	23-EU 62		45-EU 42
	10-EU 60	24-EU 66		46-EU 45

	11-EU 68 12-EU 71 13-EU 76 14- EU 87	25-EU 74 26-EU 89 27-EU 94 28-EU 102		47-EU 50
--	---	---	--	----------

2. Préparation et entretien de la culture cellulaire

L'inoculation des entérovirus sur culture cellulaire, exige la mise en culture de ces derniers, dans 2 lignées cellulaire « RD et L20B » sensible aux entérovirus (**GUIDELINES ON ENVIRONMENTAL SURVEILLANCE FOR DETECTION OF POLIOVIRUSES, 2015**)

Cellules RD : cellules dérivées de Rhabdomyosarcome humain (tumeur maligne développée à partir du tissu musculaire strié squelettique), hautement sensibles aux poliovirus, aux echovirus et certains autres entérovirus tous produisent un ECP caractéristique.

Cellules L20B : cellules murines, transgéniques qui sont modifiées génétiquement pour exprimer le récepteur du poliovirus humain. C'est une lignée en sible et hautement sélectives aux poliovirus qui produisent un ECP caractéristique.

Néanmoins, certains autres virus sont capables de donner un ECP sur les cellules L20B (Adénovirus et Réovirus) mais ce dernier est habituellement différent de celui provoqué par le poliovirus.

2.1. Congélation des lignées cellulaires

Après la réception, les lignées cellulaires sont mises en culture, amplifiées puis conservées dans des cryotubes additionnés d'un cryoconservateur (Démethyl sulphoxyde DMSO) dans de l'azote liquide à -196°C .



Figure 08 : Lignée cellulaire RD
cellules arrivée au laboratoire dans une flasque.

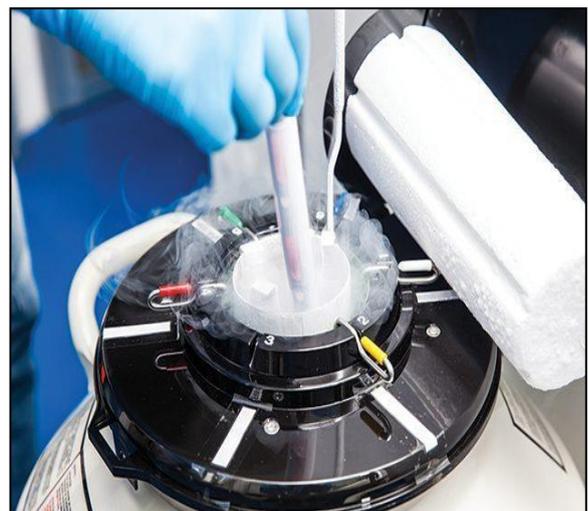


Figure 9 : Conservation des cellules
dans l'azote liquide à -196°C .

2.2. Décongélation des cellules

En vue d'utilisation, la lignée cellulaire est décongelée dans un bain marie à 36°C quelques secondes, puis cultivée dans une boîte en plastique de 25 ml (75 cm²) avec un milieu de croissance complet : Minimum Eagle Media « MEM », supplémenté de 1% pénicilline-streptomycine, 1% de Glutamine, et de 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) (**Annexe 1**). Le milieu est renouvelé 6 à 8 heures après, pour remplacer l'ancien milieu, contenant le DMSO, considéré comme toxique pour les cellules en activité.

2.3. Trypsination et numération cellulaire

2.3.1. La trypsination

La trypsination a pour but de dissocier le tapis cellulaire pour obtenir des cellules individualisées qui, mises en présence d'un milieu de croissance reformeront un tapis. Pour se faire, une solution stérile de trypsine-versène (EDTA) est utilisée. Cette technique est réalisée selon le protocole décrit (**Figure 10**).

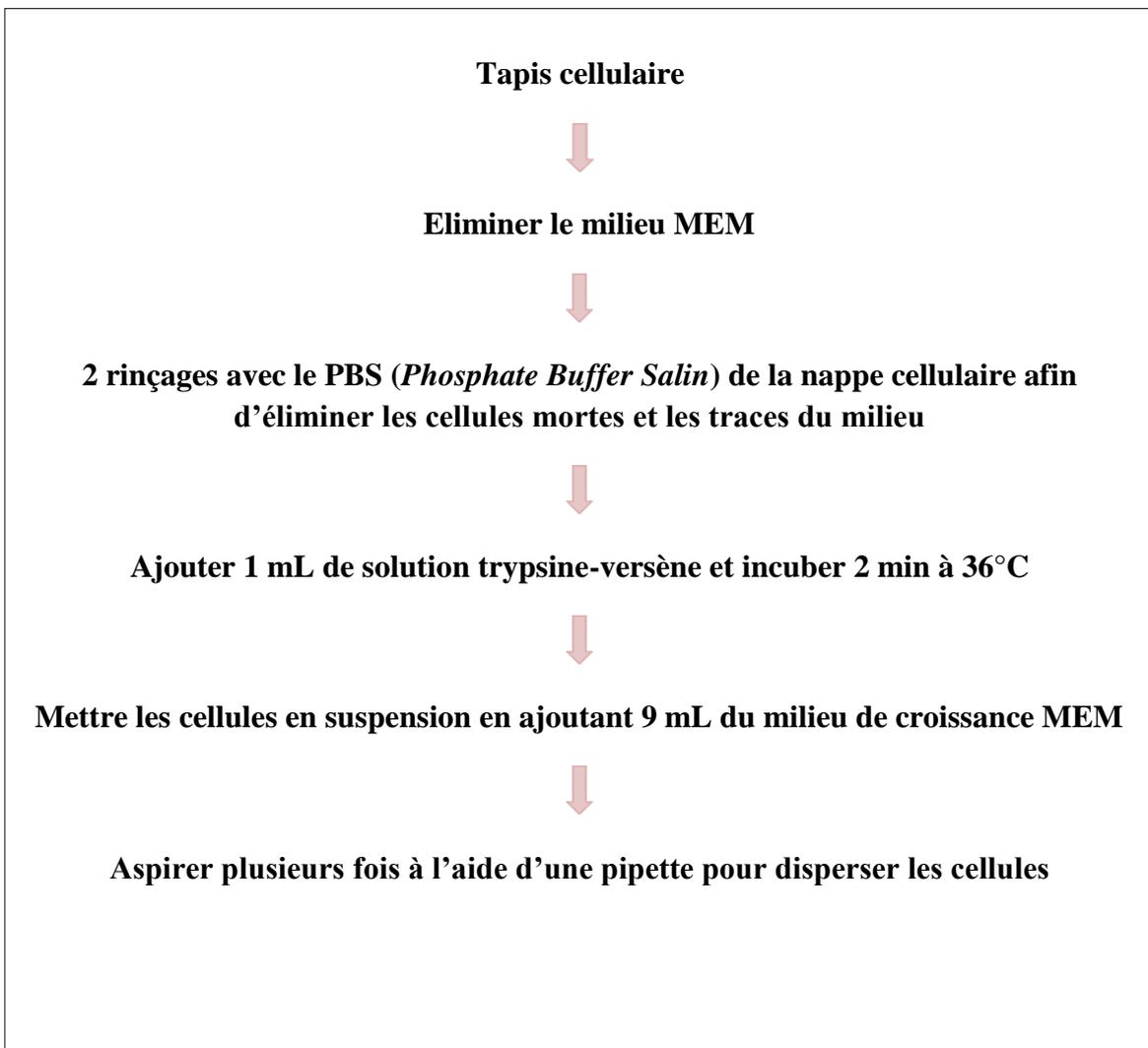


Figure 10 : Protocole de la Trypsination.

2.3.2. La numération cellulaire

La numération permet de connaître le nombre de cellules vivantes dans la suspension en diluant un volume de 0.2 ml de cette suspension avec 0.2 ml de bleu de Trypan (colore les cellules mortes en bleu). Ensuite, la numération est réalisée à l'aide d'un Haemocytomètre (Cellule de Neubauer) sous un microscope optique inversé dont la technique est détaillée (**voir Annexe 2**). Une concentration d'au moins 1.5×10^5 cellules/mL est répartie dans chaque boîte de 25cm². Enfin, les boîtes sont incubées pendant 48 h dans une étuve à 36°C (**Figures 12**).



Figure 11. Boîtes ou Flasks de culture cellulaire RD et L20B.



Figure 12. Incubation des boîtes contenant les lignées cellulaires en suspension dans l'étuve à 36°C.

3. Préparation des échantillons d'eaux usées

- Le traitement d'eau usée a été fait en suivant la méthode de séparation bi-phasique recommandée par OMS, qui permet de rechercher les entérovirus dans de petits volumes d'eaux usées (GUIDELINES ON ENVIRONMENTAL SURVEILLANCE FOR DETECTION OF

POLIOVIRUSES, 2015)

En utilisant :

- Le PEG 6000 à 29% :

Le Poly Ethylène Glycol est un polymère de carbohydate utilisé pour la formation de phase dans la méthode de séparation biphasique des eaux usées, celui-ci est plus hydrophobe que le dextran.

Une solution de PEG est préparée à 29% dans de l'eau distillée est mise sous agitation à température ambiante jusqu'à dissolution complète puis conservé à 4°C.

- Le Dextran 40 à 22% :

Le dextran il a le même rôle que le PEG, est un polymère qui sert à la formation de phase dans la méthode de séparation biphasique des eaux usées, celui-ci est plus hydrophile que le PEG 6000.

Une solution de dextran est préparée à 22% dans de l'eau distillée est mise sous agitation à température ambiante jusqu'à dissolution complète puis conservé à 4°C.

- Le NaCL 5N :

Le NaCl est utilisé pour la stabilité des virus.

- Le Chloroforme :

Le chloroforme (Sigma) est un solvant de lipides, utilisé pour la destruction des membranes bactériennes.

- Les Antibiotiques :

Les antibiotiques (pénicilline G et gentamicine) sont utilisés pour éviter la contamination bactérienne dans les eaux usées.

Le NaCL 1N et le Hcl 1N:

Ils sont utilisés pour l'ajustement du pH des eaux usées.

3.1. Concentration des échantillons en particules virales

La première étape dans la procédure de concentration consiste à bien homogénéiser le prélèvement d'eau usée, ensuite faire verser 500 ml de l'échantillon dans deux tubes de centrifugation de 250 ml et centrifugation à 1500 g pendant 20 min à 4°C. Les 500 ml d'eau usée brut restant sont conservés au congélateur à -20°C jusqu'à l'obtention du résultat final. Après centrifugation, le surnageant est récolté dans un Erlenmeyer d'un litre contenant un barreau aimanté, et les culots sont conservés au réfrigérateur à 4°C.

Mesure du pH et ajustement au besoin à 7-7,4 par l'utilisation de HCl ou NaOH 1N.

- A 500 ml de surnageant on ajoute : 39,5 ml de Dextran à 22%, 287 ml de PEG 6000 à 29% et 35 ml de NaCl 5N. Le contenu de l'erlenmeyer est mis sous agitation magnétique pendant 1h à température ambiante (si celle-ci n'excède pas 25°C sinon l'agitation doit être effectuée dans le

réfrigérateur à 4°C en veillant bien à avoir un effet vortex pendant l'agitation). Le mélange homogène ainsi obtenu est transvasé dans une ampoule de décantation, celle-ci est mise dans l'anneau métallique qui est fixé sur la potence et garder le système toute une nuit au réfrigérateur à 4°C afin qu'il ait formation des phases (GUIDELINES ON ENVIRONMENTAL SURVEILLANCE FOR DETECTION OF POLIOVIRUSES, 2015)

3.2. Traitement du concentrât d'eau usée

Les entérovirus se concentrent généralement dans la phase lourde (inférieur) et dans l'interphase.

- Après 24h, la phase lourde et l'interphase (concentrât) sont récoltés en ouvrant le robinet doucement afin d'avoir une goutte à goutte dans un tube stérile de centrifugation de 50 ml (**Figure 13**). Le culot issu de la centrifugation initiale et conservé au réfrigérateur à 4°C est rajouté dans ce concentrât, qui est ensuite traité avec 20% de chloroforme et environ 6 grammes de billes de verre. Le mélange est mis sous agitation pendant 20 minutes puis centrifugation à 1500 g pendant 20 minutes à 4°C. Le surnageant est récolté dans un nouveau tube de centrifugation de 50 ml avec 20 % de chloroforme, homogénéisé par agitation vigoureuse pendant 20 min puis centrifugé à 1500 g pendant 20 minutes à 4°C. Le surnageant ainsi récolté est répartis dans 2 tubes à raison de 4 ml par tube l'un est congelé à -20°C et l'autre est gardé pour l'inoculation sur lignées cellulaires. Les antibiotiques sont ajoutés au surnageant : pénicilline G et gentamicine, à respectivement 100UI/ml et 50 µg/ml, ce qui correspond à 40 µl d'ATB pour un volume de 4 ml de surnageant (GUIDELINES ON ENVIRONMENTAL SURVEILLANCE FOR DETECTION OF POLIOVIRUSES, 2015)

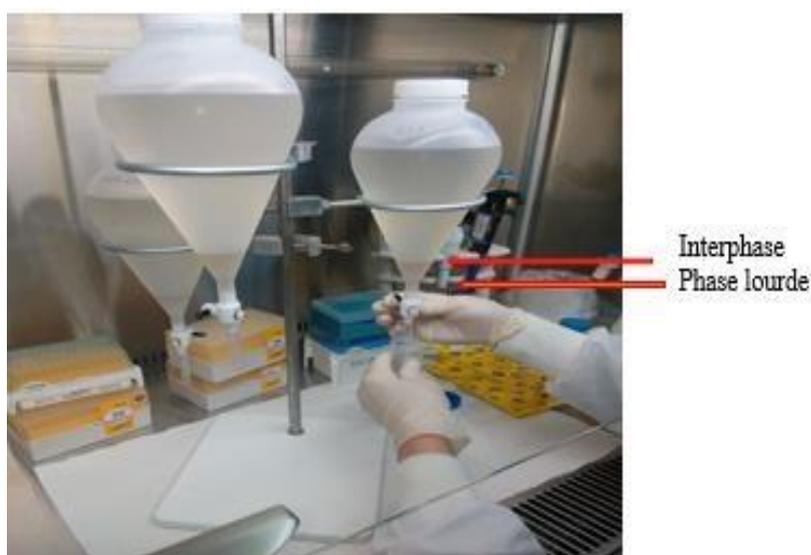


Figure 13 : Récupération du concentrât à partir de l'ampoule de décantation .

4. Inoculation sur les cultures cellulaires

Lors d'inoculation, les cellules RD et L20B doivent être à au moins 70% de confluence et le milieu de croissance est remplacé avec un milieu de survie à 2% SVF. Les inoculations se font sur boîte de 25cm², pour chaque concentrât 5 boîtes de L20B et une boîte de RD sont nécessaires. Une boîte de chaque lignée cellulaire est préparée en plus pour servir de témoin négatif (non inoculée) (**GUIDELINES ON ENVIRONMENTAL SURVEILLANCE FOR DETECTION OF POLIOVIRUSES, 2015**)

Un volume de 0.5 ml de concentrât est inoculé parallèlement sur les deux lignées cellulaires dans les 6 boîtes de cellules et l'algorithme des isolements se fait comme suit (**GUIDELINES ON ENVIRONMENTAL SURVEILLANCE FOR DETECTION OF POLIOVIRUSES, 2015**) :

Passage P0 : (passage du concentrât vers les cellules)

Les concentrât d'eau usée sont inoculés en même temps sur les deux lignées cellulaires. Après avoir libellé les cinq boîtes de cellules L20B et une boîte de cellules RD (numéro du concentrât, date d'inoculation, type de cellules, numéro de la boîte de F1 à F5 pour les L20B et F6 pour RD et numéro de passage). Les boîtes sont inoculés avec 0.5 ml du concentrât puis incubé dans l'étuve à 36°C. Une lecture quotidienne sous microscope optique inversé pendant 5 jours est effectuée pour surveiller l'apparition d'un ECP, dont toutes les lectures pour indiquer les cellules infectées ont été notées comme suit :

+	plus de 25 % de cellules infectées
++	entre 25-50% de cellules infectées
+ + +	entre 50-75% de cellules infectées
+ + + +	entre 75- 100% de cellules infectées

Si aucun ECP n'apparaît pendant 5 jours d'inoculation, un passage à l'aveugle (P0+1) est effectué.

Si un ECP apparaît, on le laisse évoluer jusqu'à 75% (3+) et on réalise un switch.

La première inoculation peut présenter une toxicité ou une contamination exprimée par un détachement du tapis cellulaire vu dès le premier jour.

Dans le cas :

- D'une Toxicité (T) : qui est peut-être dûe à la sensibilité des cellules aux réactifs utilisés (PEG, dextran...). Le concentrât est dilué au un cinquième dans 6 ml du milieu de croissance MEM et ré-inoculé dans une autre boîte de la même lignée cellulaire.
- D'une Contamination : les boîtes sont congelées et décongelées trois fois puis centrifugées,

filtrées et inoculées dans une autre boîte de la même lignée cellulaire.

➤ **Les cellules L20B positifs L+**

Quand l'ECP arrive à au moins 75%, les boîtes sont congelées au congélateur à -20°C puis décongelées. 0,5 ml de suspension L20B est inoculé dans une boîte de la lignée RD sur laquelle est mentionné le numéro du prélèvement de la boîte (F1 à F5), la date d'inoculation et le switch L+R. Après avoir incubé les boîtes dans l'étuve à 36°C une lecture quotidienne pendant 5 jours sera effectué :

Si aucun ECP n'apparaît (L+R-) pendant cinq jours de lecture des switches, les prélèvements sont considérés négatifs.

Si un ECP apparaît (L+R+) les prélèvements sont considérés suspects polio et sont soumis à une RT-PCR.

➤ **Les cellules RD positifs R+**

Quand l'ECP arrive à au moins 75% les boîtes sont congelées au congélateur à -20°C puis décongelées. 0,5ml de suspension RD est inoculé dans une boîte de la lignée L20B dans laquelle est mentionné le numéro du prélèvement, de la boîte (F6), la date d'inoculation et le switch R+L.

Après incuber les boîtes dans l'étuve à 36°C une lecture quotidienne pendant 5 jours sera effectué.

Si aucun ECP apparaît (R+L-) pendant les cinq jours de lecture, les prélèvements sont considérés comme entérovirus non polio(**EVNP**).

- Les boîtes positives (R+L+) sont ré-inoculées dans de nouvelles boîtes de la lignée RD pour permettre l'amplification et l'élévation du titre viral, et pour se faire 0,5 ml de surnageant L20B est inoculé dans la boîte RD puis incubée dans l'étuve à 36°C.

Pendant 5 jours de lecture :

Si aucun ECP n'apparaît (R+L+R-) le prélèvement est considéré négatif aux entérovirus.

Si un ECP apparaît (R+L+R+) le prélèvement est considéré suspect polio, et soumis à une RT-PCR.

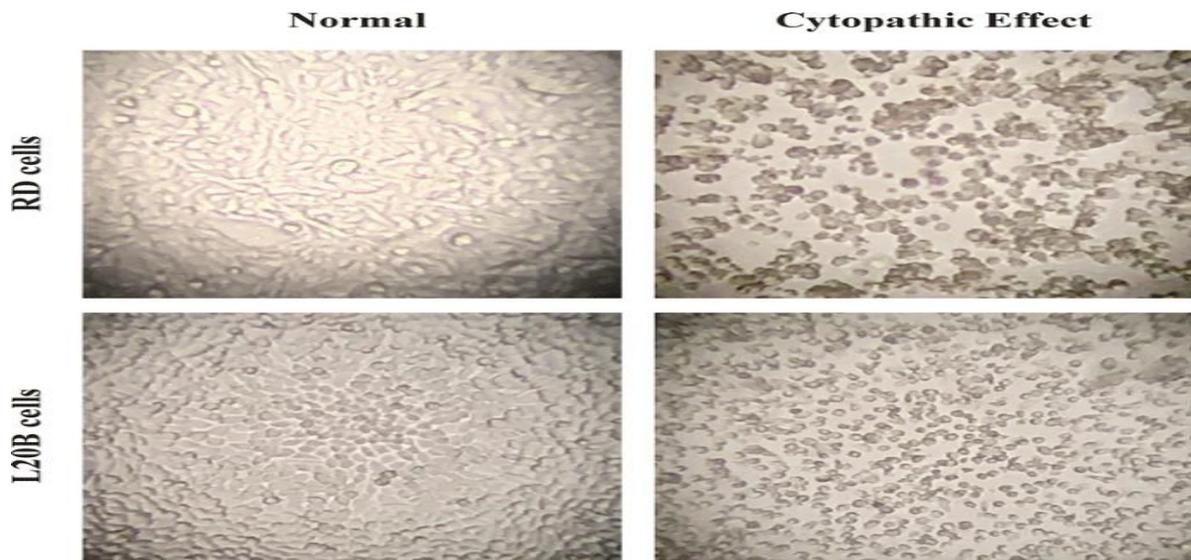


Figure14. Cellules RD et L20B observées sous microscope optique inverse

5. Amplification génique

L'amplification génique est une réaction qui permet d'amplifier *in vitro* une région spécifique d'un acide nucléique donné afin d'obtenir une quantité suffisante pour le détecter et l'étudier.

5.1. Extraction de l'ARN viral à partir de surnageant de culture cellulaire

L'extraction a été réalisée en utilisant une méthode automatisée par adsorption sur billes magnétiques, selon le manuel d'utilisation du fabricant.

L'extraction est faite à l'aide du coffret « NukEx Virus » dont le protocole est comme suit :

- Ajouter 200µl d'échantillon aux 1^{ère} et 7^{ème} colonnes des plaques respectivement .
- Modifier et exécutez le programme comme suit (**Tableau III**)
- Une fois le programme d'expérience terminé, veuillez transférer les produits extraits situés aux 6^e et 12^e colonnes dans les tubes sans nuclease, stocker à $\leq -18^{\circ}\text{C}$.

Tableau IV : programme d'extraction.

No.	Colonne	Nom	Temps d'attente (sec)	mélange (sec)	Magnét (sec)	vitesse	Volume (µl)	Etat de chauffage	Temp (°C)
1	1	Lyse	0	300	90	8	800	lyse	0
2	2	Lavage1	0	60	60	8	700	Elution	90
3	3	Lavage2	0	60	60	8	800	Elution	90
4	6	Elution	60	300	120	8	80	Elution	90
5	2	Billes magnétique	0	60	0	8	600	Fin	0

L'ARN ainsi extrait peut être conservé à -20°C ou être immédiatement transcrit en ADN complémentaire (ADNc) par rétro transcription (RT).

5.2. Identification des entérovirus par RT-PCR en temps réel

Afin de confirmer le genre entérovirus, une RT-PCR en temps réel a été réalisées avec le thermocycleur BIO-RAD CFX96 (**Figure 21**). Le coffret « One-step RT-PCR (Quanta) » a été utilisé pour la réalisation des réactions de RT-PCR à l'aide des amorces complémentaires à la région 5'NC (**Tableau IV**). Ceci permet la synthèse d'ADNc et son amplification en une seule étape.

5.2.1. Préparation de mélange réactionnel

Dans chaque tube, le mélange réactionnel est composé de :

Master Mix One-step RT-PCR: 10µL;

Amorce sens : 0.6 µL ;

Amorce anti-sens : 1.7 µL (concentration 10µM)

Sonde : 0.4 µL (concentration 10µM)

H₂O : 2.3µL.

Le mélange réactionnel est distribué à raison de 15 µL par tube, auquel est rajouté 5µL de l'extrait pour un volume total de 20 µL.

Tableau V. Amorces utilisées dans la réaction de la RT-PCR en temps réel (Verstrepen *et al.* 2001).

Amorce	Séquence
Sens	5'-CCCTGAATGCGGCTAATCC-3'
Anti-sens	5'-ATTGTCACCATAAGCAGCCA-3'



Figure 15. Thermocycleur BIO-RAD CFX96 utilisé pour la réaction de la RT-PCR en temps réel.

5.2.2. Amplification et lecture des résultats

La RT-PCR en temps réel se fait comme suit : transcription inverse de 30 mn à 50°C, suivie d'une étape de dénaturation de 5 mn à 95°C. L'étape d'amplification est réalisée en 40 cycles de dénaturation de 10 s à 95°C, et d'hybridation de 30 s à 60°C.

Si le gène cible existe dans le milieu, les amorces et les sondes s'y fixent ; la polymérase, par ses activités polymérasique et 5'-exonucléasique, permet l'élongation du néo-brin et l'hydrolyse de la sonde. La sonde hydrolysée, du fait de l'éloignement du fluorochrome émetteur (reporter) (ex : 6-carboxyfluorocein) fixé à l'extrémité 5' de la sonde et du second fluorochrome suppresseur (quencher) présent à l'extrémité 3', émet une fluorescence captée et traduite en signal électrique par les photomultiplicateurs (**Figure 16**).

La quantité de fluorescence est proportionnelle à la quantité des produits de PCR dans le milieu.

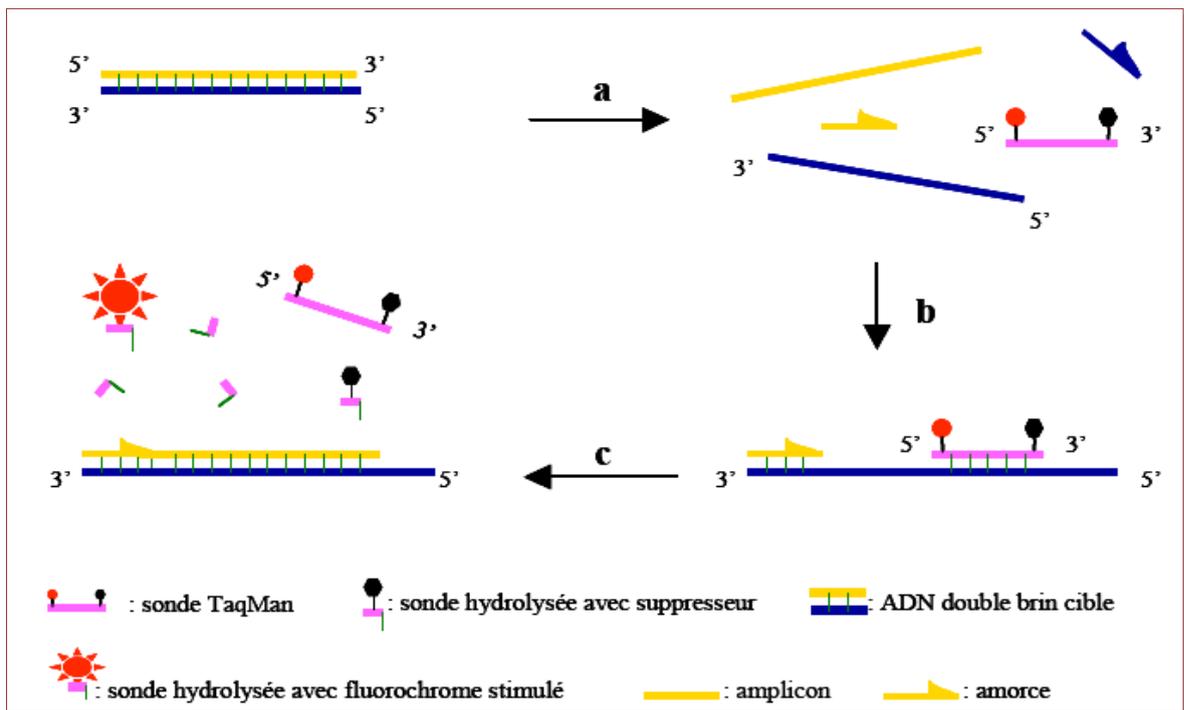


Figure 16 : Principe de la RT-PCR en utilisant des sondes d'hydrolyse (Poitras et Houde, 2002).

- (a) Durant l'étape de dénaturation, la sonde est libre en solution.
- (b) À la température d'appariement, la sonde et les amorces s'hybrident à leurs séquences cibles respectives et la proximité des fluorochromes permet l'inhibition de la fluorescence. La polymérisation débute.
- (c) La polymérase déplace et hydrolyse la sonde. Le fluorochrome émetteur est libéré de l'environnement du suppresseur permettant ainsi l'émission de la fluorescence.

5.3. Identification des entérovirus par RT- PCR classique

L'amplification des échantillons extraits a été réalisée en deux étapes : une étape de transcription inverse, puis une étape d'amplification PCR. Au préalable, il a été nécessaire d'établir un protocole expérimental, c'est à dire :

- ✓ Choisir le gène à amplifier et les amorces permettant cette amplification ;
- ✓ Déterminer les conditions expérimentales de la RT/PCR (température, durée, mélange réactionnel).

5.3.1. Transcription inverse

Le but de cette étape est de transcrire l'ARN viral en ADNc après une étape de dénaturation qui se fait en 5 min à 97°C. L'ADNc est synthétisé à partir de l'ARN extrait à l'aide d'un random hexamère (rH) à 15 mM (**Figure 17**).

Le volume réactionnel : 20 µL. Contient : 3.5 µL de tampon (x10) ; 3.5 µL de MgCl₂ (50mM) ; 1.25 µL de rH ; 1µL de dNTP (10mM) ; 1 µL de SSII (200 U/µL) transcriptase inverse(invitrogen) ; 4.75 µL d'H₂O stérile (RNase free) et 20 µL d'ARN extrait dénaturé. La rétro-transcription s'effectue à 42°C pendant 1 h.

La reverse transcriptase est inactivée par un choc thermique (2 min dans la glace). Le produit final est un ADNc monocaténaire néosynthétisé (à la substitution de U par T). Il peut être conservé à -20°C ou être directement amplifié par PCR.

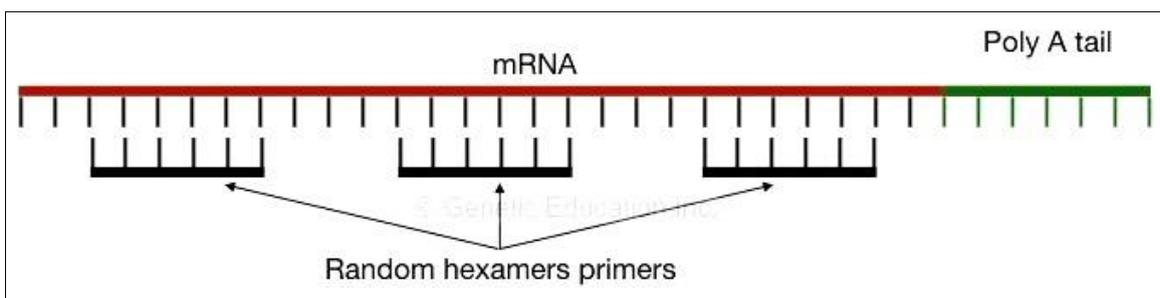


Figure 17 : Le principe de la Rétro-transcription en utilisant le random hexamère (rH).

3.2. Amplification

La PCR permet d'amplifier le fragment d'ADNc. Pour réaliser cette PCR, 5 µL d'ADNc sont ajoutés à 20 µL du mélange réactionnel contenant : 12.5 µL de Taq polymérase ; 1 µL de chaque amorce (amorce sens + amorce anti-sens)

(concentration 0.8µM) et 5.5 µL d'H₂O. L'amplification est effectuée durant 35 cycles de : 30 seconde à 95°C pour la dénaturation, 30 secondes à 60°C pour l'hybridation et 30 secondes à 72°C pour l'élongation suivie d'une longue élongation de 5mn, dans un thermocycleur ProFlex™ PCR System ProFlex™ PCR System « Applied Biosystems » **(Figure 18)**.

Trois couples d'amorces ont été testées (**tableau V**). Les amorces AN88 et AN89 s'hybrident dans la région VP1 du génome des EV, ce qui permet d'obtenir un fragment d'environ 375 nucléotides.

Tableau VI. Amorces utilisées dans la réaction de la RT-PCR classique (**Nix W. J Clin Microbiol 2006, 44, 2698-2709**)

Couple d'amorces	Amorce dégénérée	Séquence	Taille (pb)	Spécificité
1	Sens (AN89)	5'-CCA GCA CTG ACA GCA GYN GAR AYN GG-3'	348-393	Tous les EV
	Anti-sens (AN88)	5'-TAC TGG ACC ACC TGG NGG NAY RWA CAT-3'		
2	Sens (490)	TGIGTIYTITGYRTICCTGGAT	727	HEV B
	Anti-sens (492)	GGRTTIGTIGWYTGCCA		
3	Sens (491)	ATGTAYRTICCCICGGNGG	758	HEV B
	Anti-sens (493)	TCNACIANICCGGICCYTC		

N : G ou A ou T ou C ; **R** : G ou A ; **W** : A ou T ; **Y** : T ou C.

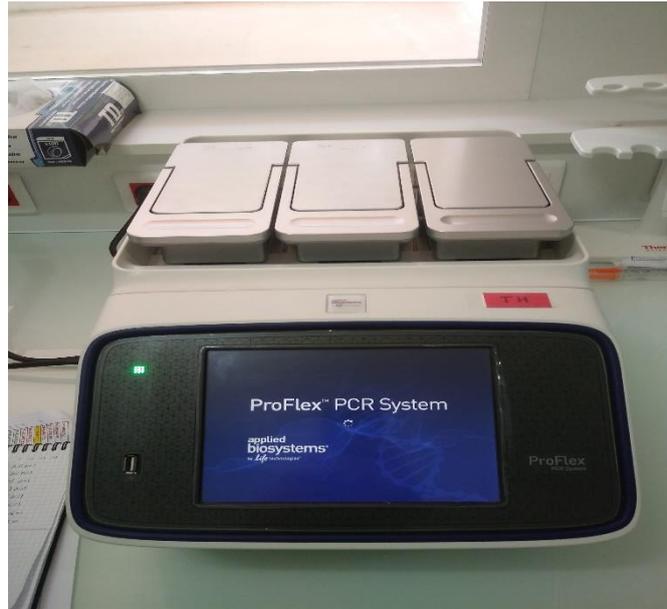


Figure 18 : Le thermocycleur ProFlex™ PCR System « Applied Biosystems » utilisé pour la RT-PCR classique.

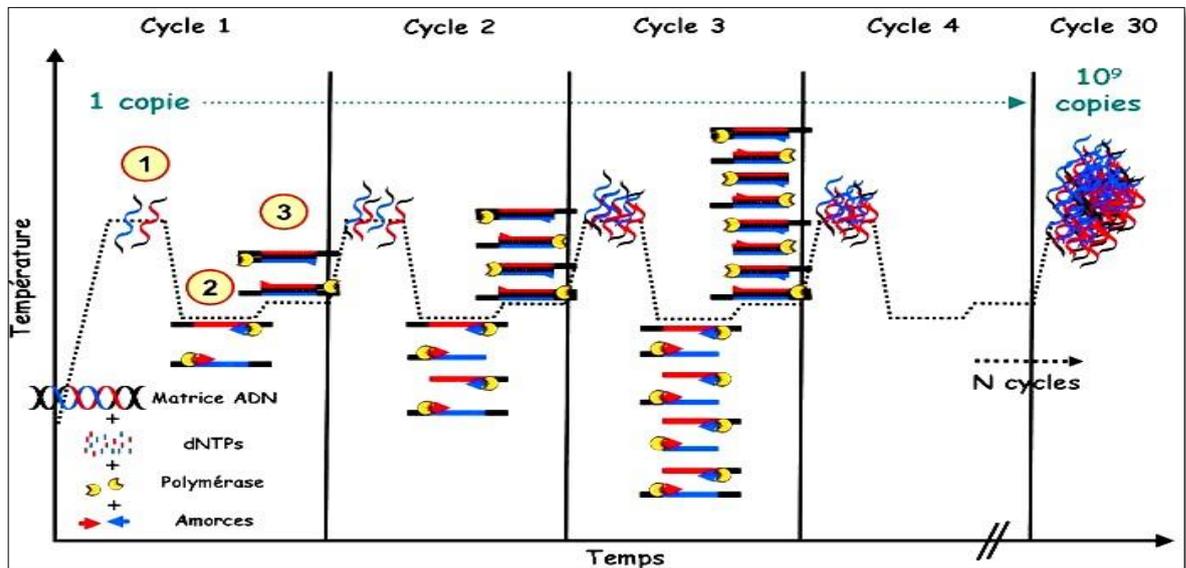


Figure 19 : Principe de la PCR.

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

conséquence des séquences d'intérêt.

5.3.2. Révélation des produits d'amplification

5.3.2.1. Préparation du gel d'agarose

La préparation du gel d'agarose entre 1 et 2% est faite dans un flacon en ajoutant une (1) comprimé d'agarose (Invitrogen®) dans 35.5 mL du tampon Tris-Acétate-EDTA (TAE) généralement au pH 8,0. Le mélange est chauffé au four micro-onde jusqu'à dissolution complète de l'agarose après quoi, on le laisse refroidit. Ensuite, nous ajoutons 1.5 μ L d'un révélateur SYBR-Safe*. Dans une cuve, les peignes séparateurs (08 ou 12 dents) sont alignés, le gel est coulé et laissé à température ambiante pour son refroidissement. Après refroidissement les peignes sont retirés.

5.3.2.2. Migration électrophorétique

La migration électrophorétique est effectuée comme suit :

- ✓ Dans le premier puits, déposer le marqueur de poids préparé (1 μ L tampon de charge ; 1 μ L de marqueur de poids pour permettre d'estimer la taille du fragment amplifié et 4 μ L de TAE) ;
- ✓ Les autres puits contiendront 5 μ L de chaque échantillon amplifier et dans l'ordre de numérotation ;
- ✓ Le témoin négatif est déposé dans les deux derniers puits ;
- ✓ La migration électrophorétique a été effectuée pendant 40-50 mn sous une tension de 80 V ;
- ✓ Observer la migration du colorant de charge de la cathode vers l'anode.



Figure 20. Migration électrophorétique à l'aide d'un générateur sous une tension de

80V.

5.3.2.3. Visualisation et interprétation des résultats

Les différents fragments amplifiés sont ensuite visualisés en fin de migration à l'aide d'un transilluminateur. La lecture des résultats se fait sous UV en comparant la taille des bandes de différents échantillons à celle des bandes du marqueur du poids moléculaire et de témoin négatif. Le contrôle négatif est dit négatif si aucune bande ne migre. Un échantillon est considéré positif si la bande apparaît à la bonne taille. Un échantillon est considéré négatif si aucune bande n'apparaît et si seulement des bandes parasites apparaissent.

N.B. Les produits de PCR sont révélés par migration sur gel d'agarose avant d'être purifiés.

6. Identification moléculaire des isolats

La méthode de typage moléculaire utilisée pour identifier les isolats obtenus en culture cellulaire repose sur l'amplification des séquences situées dans une région variable des entérovirus VP1. Elles sont utilisées pour détecter spécifiquement le génome d'un EV (**Oberste et al.2010**). Le séquençage enzymatique des fragments d'ADN amplifiés est effectué selon la méthode de Sanger.

Tableau VII. Sérotypes identifiés par séquençage de la région VP1 à partir de 186 isolats.

Espèce	Nombre d'isolats	Sérotypes
HEV B	127	CVA9 (3), CVB3 (1), CVB4 (11), CVB5 (4), CVB6 (1), E1 (6), E2 (2), E3 (4), E5 (3), E6 (3), E7 (2), E9 (2), E11 (8), E12 (10), E13 (7), E14 (4), E15 (1), E17 (2), E18 (4), E19 (2), E20 (3), E21 (3), E25 (1), E26 (7), E27 (4), E29 (5), E30 (2), E31 (1), E33 (2), EV69 (2), EV73 (4), EV75 (1), EV79 (1), EV81 (1), EV82 (1), EV83 (3), EV85 (1), EV86 (2), EV97 (1), EV100 (1), CVB4+E12 (1)

Utilisation des amorces HEV-B (voir tableau V) **MS. Oberste Journal of General Virology (2006), 87, 119–128**

6.1. Purification des produits d'amplification

Une première purification des fragments d'ADN amplifiés est réalisée par un traitement enzymatique, dont le protocole est décrit dans la figure suivante, dégradant les amorces et les dNTP restants en première PCR (**Figure 21**).

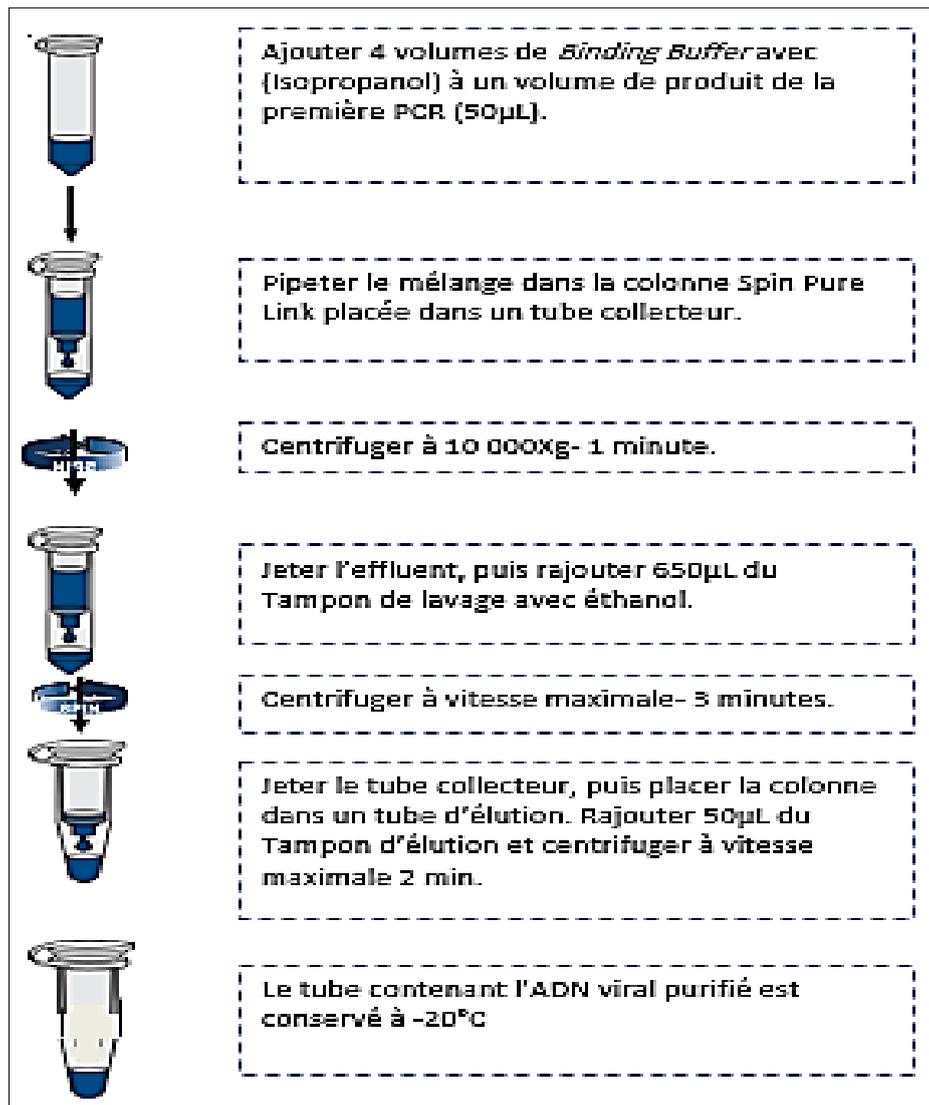


Figure 21. Protocole de la purification selon le kit Invitrogen.

6.2. PCR de Séquençage

Les échantillons sont amplifiés à nouveau en utilisant des amorces non dégénérées (des amorces spécifiques) et marqués en utilisant un kit de marquage « *Big Dye Terminator Cycle Sequencing* » (Applied Biosystems). Les amorces utilisées sont représentées dans le **tableau VIII**.

Le milieu réactionnel de 10 µL est composé de :

- ✓ Des ddNTP marqués par un composé fluorescent « Dye » :1µL
- ✓ Amorce sens ou anti-sens (10mM) : 0.4µL ;
- ✓ Tampon : 2µL ;
- ✓ H2O ultra-pure : 5.1 µL ;
- ✓ ADN pure : 1.5µL.

L'amplification s'effectue dans un thermocycleur selon le programme suivant : 1mn à 96°C, puis 15 cycles de : 10 s à 96°C, 5 s à 50°C, 1 mn-15 s à 60°C, 5 cycles de : 10 s à 96°C, 5 s à 50°C, 1 mn-30 s à 60°C, 5 cycles de : 10 s à 96°C, 5 s à 50°C, 2 mn à 60°C et un cycle à 4°C (refroidissement).

Tableau VIII. Amorces spécifiques utilisées pour le séquençage (**Nix et al, 2006**)

Amorce	Séquence	Spécificité
Sens (AN232)	5'-CCAGCACTGACAGCA-3'	HEV
Anti-sens (AN233)	5'-TACTGGACCACCTGG-3'	HEV
Sens (490)	TGIGTIYTITGYRTICCTGGAT	HEV B
Anti-sens (492)	GGRTTIGTIGWYTGCCA	HEV B
Sens (491)	ATGTAYRTICCCICGNGG	HEV B
Anti-sens (493)	TCNACIANICCGICCYTC	HEV B

*AN 232 est la partie « non dégénérée de l'amorce AN89.

*AN 233 est la partie « non dégénérée de l'amorce AN88.

6.3. Post-purification de séquençage

L'ADN obtenu après la PCR de séquence subit une purification par gel-filtration sur résine Sephadex®G-50 super fine, afin d'éliminer les ddNTP non utilisés et les amorces de PCR en excès avant injection sur séquenceur capillaire.

La purification se fait sur colonnes de résine Sephadex® G50 dans les plaques Multi Screen, dont le protocole est décrit comme suit :

- Superposer une plaque Multiscreen HV et une plaque collectrice (MicroAmp).
- Déposer 400µl de sephadex sur le dispositif, centrifuger 1 min à 500g 4°C et jeter l'effluent.
- Ajouter 200µl de Sephadex 5% sur le dispositif, centrifuger 2min à 1200 g 4°C et jeter la plaque collectrice.
- Mettre une nouvelle plaque collectrice.
- Ajouter 10 µl d'eau distillée dans la barrette PCR contenant la réaction Big Dye (Mix).
- Transférer les 20 µl (10µleau +10 µl réaction Big Dye) sur la plaque Sephadex (Multiscreen).
- Centrifuger 2 min à 1200 g 4°C.
- La plaque collectrice est prête à être mise sur le séquenceur.

Le séquenceur utilisé : Applied Biosystems™ SeqStudio™ Genetic Analyzer System. (**Figure 22**)

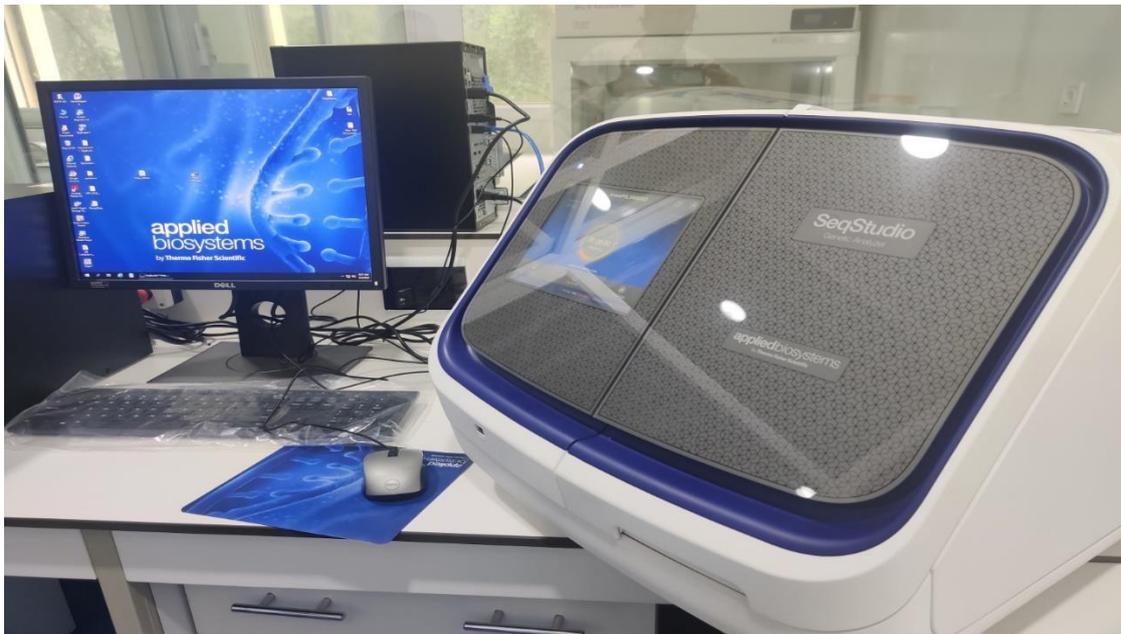


Figure 22. Séquenceur Applied Biosystems™ SeqStudio™ Genetic Analyzer System.

Le principe du séquençage selon la Méthode de Sanger est décrit dans la figure suivante :

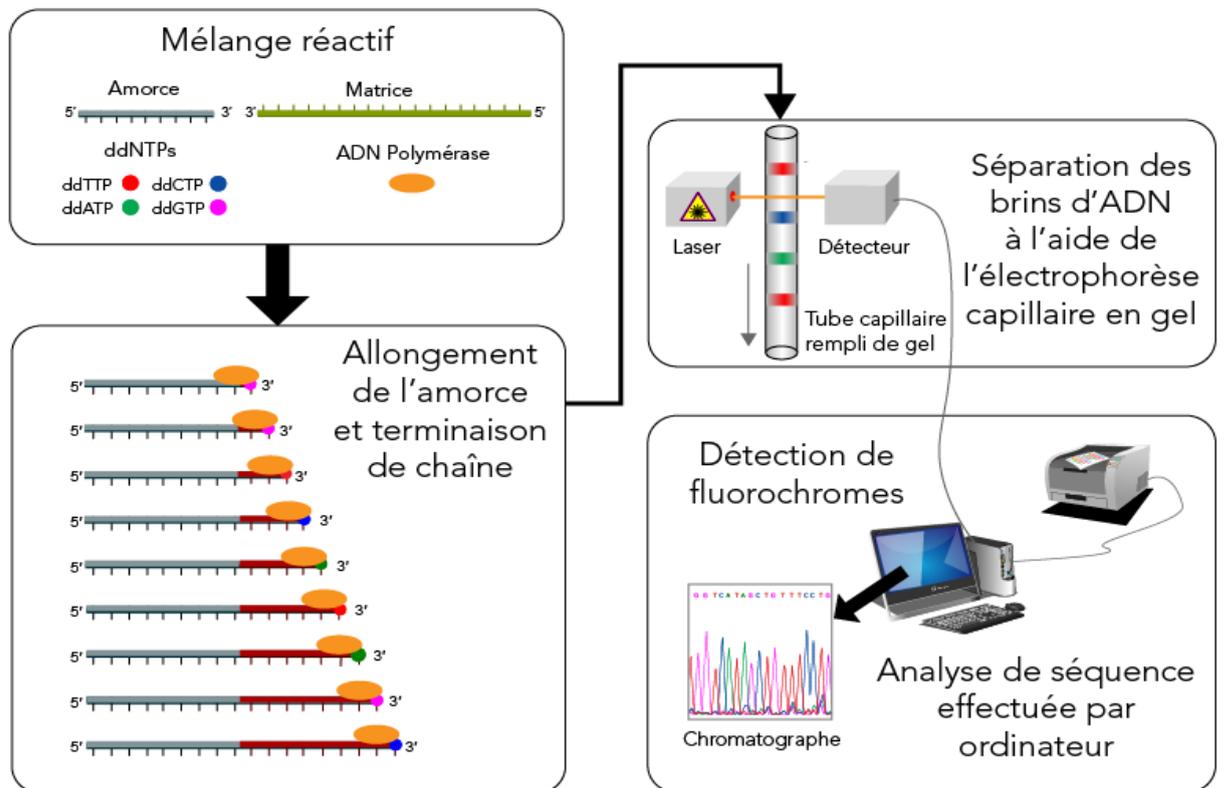


Figure 23. Séquençage de l'ADN à l'aide d'électrophorèse capillaire en gel

Le principe se base sur l'ADN polymérase et les di-déoxyribonucléotides (ddNTP). Les échantillons d'ADN à séquencer sont mélangés avec des amorces spécifiques, de l'ADN polymérase, des déoxyribonucléotides (dATP, dCTP, dGTP et dTTP) et des di-déoxyribonucléotides (sans groupement hydroxyle en position 3') (ddATP, ddCTP, ddGTP et ddTTP). L'incorporation de ces ddNTP empêche la formation de la liaison phospho-diester, et donc la poursuite de l'élongation du brin d'ADN². Des fragments d'ADN de tailles variables se terminant par un ddNTP sont ainsi obtenus. Dans la première version de cette méthode³, les amorces étaient marquées radioactivement et les bouts d'ADN migraient sur un gel dénaturant permettant l'obtention d'un profil de migration³. Actuellement, une amplification par PCR est réalisée en amont, et la méthode employée utilise l'électrophorèse capillaire et la fluorescence. L'électrophorèse permet de classer les fragments selon leur taille et ainsi obtenir la séquence nucléotidique. De plus, chaque ddNTP est marqué par un fluorochrome différent. Un rayonnement laser excite la molécule fluorescente qui réémet une longueur d'onde spécifique. Cette dernière est détectée par une caméra. A la fin du séquençage, cela permet d'obtenir un électrophorégramme.

6.4. Analyse phylogénétique

Les séquences obtenues sont alignées en utilisant le MEGA-11 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11), puis comparées aux séquences disponibles auprès du National Center for Biotechnology Information (NCBI : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) et dans la plateforme de RIVM/OMS en utilisant l'algorithme BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

Résultats et Discussion

1. Résultat de la biologie moléculaire

1.1. Par RT PCR en temps réel

La RT-PCR en temps réel a permis de détecter le génome viral dans les 47 prélèvements d'eaux usées (**100%**) en utilisant toujours des amorces ciblant la région 5'NC. Dans la PCR en temps réel, l'évolution de la fluorescence émise est suivie pendant la réaction d'amplification à l'aide d'un indicateur de la production des amplicons durant chaque cycle.

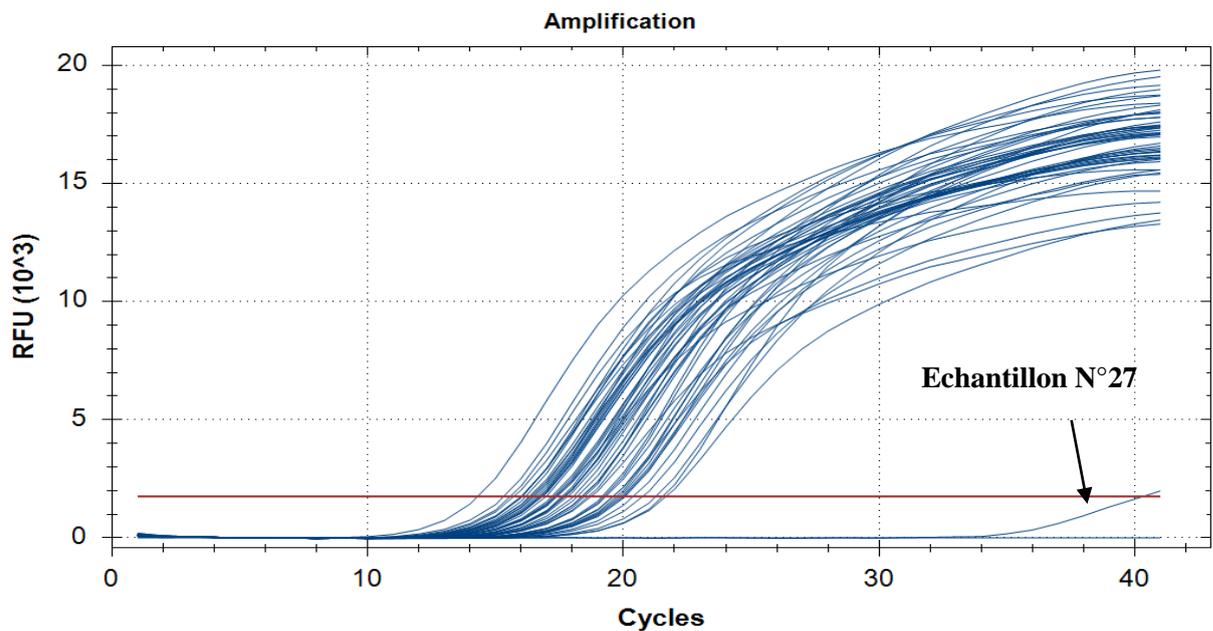


Figure 24. Résultats obtenus par RT- PCR en temps réel à partir des isolats.

Dans la PCR en temps réel, la fluorescence augmente de manière exponentielle à chaque cycle. Les échantillons sont devenus positifs. Le seuil de détection est estimé entre 12 et 20 cycles.

L'échantillon 27 présente une courbe tardive dû à une charge virale faible.

(Une ré-inoculation sue culture cellulaire est décrite ci-dessous).

Contrôle positif est positif, contrôle négatif est négatif (aucune fluorescence détectée).

Tous les résultats se sont révélés positifs par la RT-PCR en temps réel et la détection après le 10^{ème} cycle d'amplification (sur les 40 cycles de la réaction), ceci peut être expliqué par la forte charge virale en EV (sauf pour l'échantillon n°27) dans les isolats de cultures positives des prélèvements environnementaux et la sensibilité de cette technique.

Au total, la RT-PCR a permis la détection des EV dans 47 sur 47 échantillons d'eaux usées dans un délai de moins de 24 h. Ces résultats viennent confirmer le travail qui a été fait précédemment sur culture cellulaire par l'équipe de laboratoire des entérovirus de l'IPA.

Ce qui confirme la grande sensibilité de cette technique vis-à-vis du génome viral à partir des isolats de culture positives.

D'après les résultats présentés dans la figure 27, nous pouvons déduire que la RT-PCR en temps réel est hautement sensible pour la détection des EV à partir des échantillons des eaux usées préalablement isolés par culture cellulaire. Plusieurs raisons peuvent expliquer cette sensibilité :

L'utilisation de différentes amorces, qui ciblent des séquences de la même région (5'NC). Selon **Rotbart et al. (1994)** ; **Heim (2005)** ; **Piqueur et al. (2009)**, les différences entre les séquences d'amorces et/ou de sondes et des types d'EV donnent parfois des résultats faussement négatifs.

Le système de détection dans la RT-PCR en temps réel est doté de sondes spécifiques s'hybridant en même temps que les amorces et permettant une détection plus sensible même d'un faible taux d'amplicons.

Aussi, l'absence d'étape post-PCR en PCR en temps réel accélère considérablement le rendu des résultats tout en limitant le risque de contamination, de décantation et de perte des particules virales (**Kares et al. 2004**).

De même, dans l'étude de (**Verstrepen et al., 2001**) où un total de 70 échantillons de LCR ont été testés en parallèle par RT-PCR en temps réel et par culture cellulaire. Les résultats démontrent que la sensibilité de la RT-PCR en temps réel était de 100%.

1.2. Par RT- PCR Classique

Pour la RT-PCR classique, les résultats sont illustrés dans le **tableau** suivant :

Tableau IX. Résultats de la RT PCR classique

	Amorces AN88/AN89 Taille (375 pb)	Amorces HEV B (490/492) Taille (727 pb)	Amorces HEV B (491/493) Taille (758 pb)
Positif	46 (98%)	35 (74%)	14 (30%)
Négatif	01	12 (26%)	33 (70%)
Total	47	47	47

46 résultats positifs sur 47 échantillons d'eaux usées (**98%**) ont été obtenus sur gel d'agarose.

L'échantillon n°27 est révélé négatif.

Les meilleurs résultats pour l'amplification du génome viral par cette technique ont été obtenus en utilisant le couple d'amorces 490-492 (HEV B). Il a permis d'obtenir un fragment amplifié de 727 pb avec une température d'hybridation de 60°C.

L'autre couple d'amorces 491-493(HEV B) n'ont pas donné de résultats satisfaisants vu le pourcentage élevée de résultats négatifs (70%).

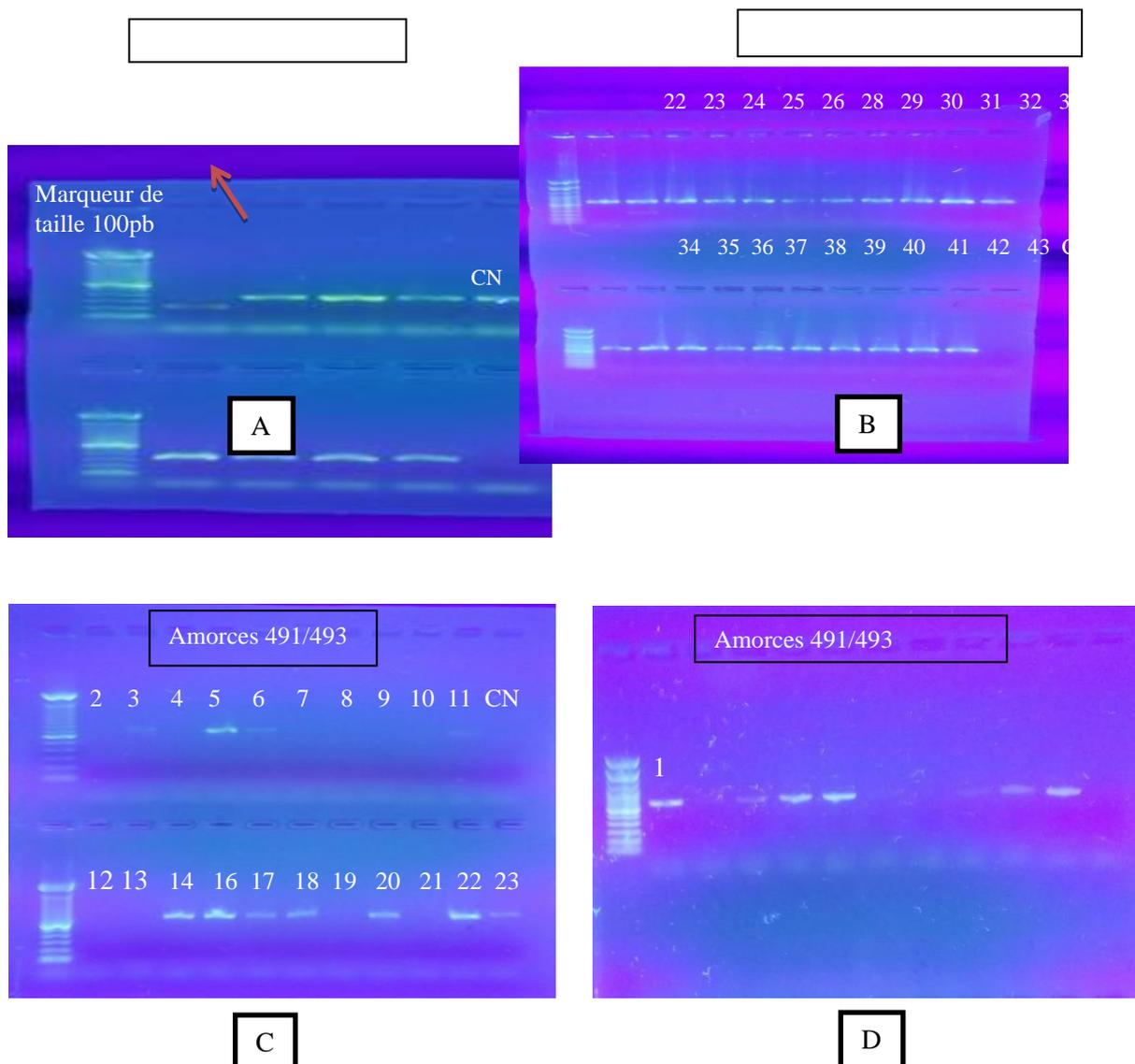


Figure 25. Visualisation de bandes d'ADN sur gel d'agarose (1 à 2%).

Les figures montrent les résultats de l'amplification d'une séquence des EV par RT-PCR classique.

(A) : Dans cet exemple, apparition des bandes électrophorétiques de 375 pb (Amorces AN88/AN89) pour 09 échantillons.

N.B : La flèche rouge indique la présence d'une bande non spécifique pour l'échantillon n°1 (200pb).

(B) : Dans cet exemple, apparition des bandes électrophorétiques de 727 pb (Amorces 490/492) pour les échantillons positifs 22 à 43.

(C) : Apparition des bandes électrophorétiques de 758 pb (Amorces 491/493) pour les échantillons 3,5,6,11,14,16,17,18,20,22 et 23 et pas de migration pour les échantillons 2,4,7,8,9,10,12,13,19 et 21.

(D) : L'échantillon n° 1 est relancé avec des amorces spécifiques (491-493) ; l'observation d'une

bande de 758 pb.

Contrôle négatif (CN) : validé

1.3. Ré-inoculation sur culture cellulaire pour l'échantillon n°27

En ce qui concerne l'échantillon qui n'a pas donné de résultats satisfaisants et afin d'augmenter la charge virale, une autre tentative d'isolement des EV consiste à une ré-inoculation sur la lignée cellulaire RD à partir de concentrât de prélèvement d'eau usée, suivi d'une RT-PCR.

Les figures suivantes présentent les résultats obtenus par RT PCR en temps réel et RT PCR classique.

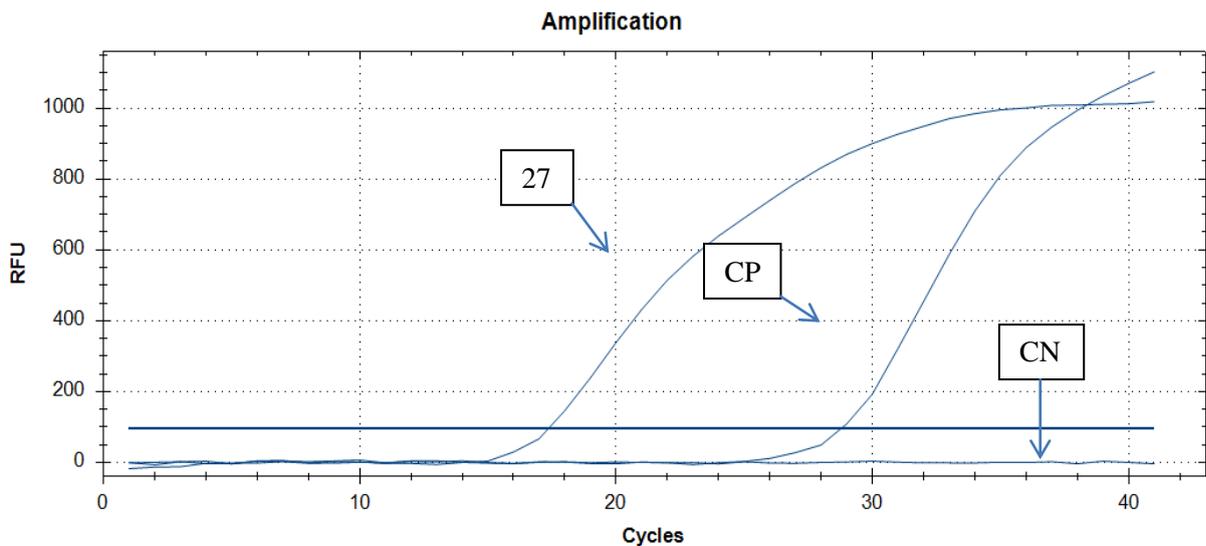


Figure 26. Résultats obtenus par RT- PCR en temps réel à partir de l'isolat de l'échantillon 27.

L'échantillon est devenu hautement positif. Le seuil de détection est estimé à 17,33 cycles.

CP : Contrôle positif est positif.

CN : Contrôle négatif est négatif.

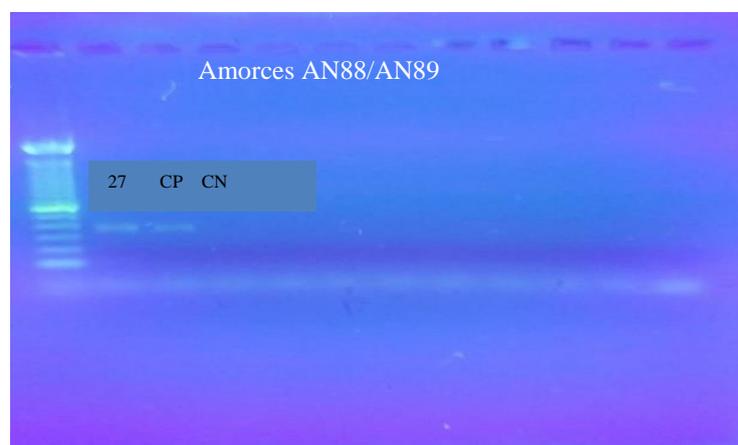


Figure 27. Visualisation de bandes d'ADN sur gel d'agarose (1 à 2%) pour l'échantillon n° 27.

Apparition des bandes électrophorétiques de 375 pb (Amorces AN88/AN89).

2. Comparaison des résultats

Tableau X. Comparaison des résultats finaux obtenus par la RT-PCR classique et par la RT-PCR en temps réel.

RT-PCR	Echantillons positifs	Taux de détection
Classique	47	100%
En temps réel	47	

La RT-PCR est une méthode rapide et précise pour diagnostiquer les EV. Elle a amélioré la capacité de détecter les EV dans les 24 heures (**Oberste et al.2003**). Pour cela, la PCR s'est révélée être une alternative rapide et sensible à la culture cellulaire pour le diagnostic des infections du système nerveux central causées par les EV (**Rotbart et al.1994**).

La PCR classique quant à elle, permet une détection visuelle après migration électrophorétique, une faible concentration d'amplicons sera donc peu ou pas visible.

Dans des études précédentes, La PCR en temps réel s'est avérée hautement sensible pour la détection des EV. A titre d'exemple, **Archimbaud et al. (2004)** ont comparé les deux techniques de RT-PCR pour la détection des EV dans des LCR de patients présentant des signes cliniques de méningite virale. Les résultats ont démontré que la RT-PCR en temps réel était aussi sensible que la RT-PCR classique.

Cependant, il est primordial de signaler que l'échantillon 27 détecté par culture cellulaire et par PCR en temps réel n'a pas donné un résultat positif en utilisant la PCR classique que lorsqu'une deuxième amplification du virus en culture cellulaire a été faite. Ce résultat faux négatif peut également être dû à une faible concentration de virus.

Le résultat incompréhensible de la PCR classique dans l'échantillon 1 (bande non spécifique), d'une culture virale positive, peut être dû à un appariement non spécifique des amorces.

L'échantillon 1 est re-testé avec le couple d'amorces (491/493) ; le résultat est révélé clairement positif.

3. Identification moléculaire des isolats

Dans notre étude, nous avons identifié 33 souches isolées en culture cellulaire par séquençage de la région VP1. Pour déterminer les génotypes, les séquences ont été comparées à toutes les séquences EV correspondantes disponibles dans la base de données NCBI et RIVM/OMS en utilisant le logiciel BLAST (Altschul et al. 1990). Une homologie de séquence nucléotidique d'au moins 75 % était requise pour l'attribution au même génotype (Oberste et al., 2000, 2004).

Tableau XI. Répartition des entérovirus identifiés avant et pendant la pandémie de la COVID 19.

Période/ Covid 19	Année	Nombre d'échantillons avec détection + de l'EV	N° d'échantillons	Entérovirus identifiés
Avant	2018	06	EU32,EU35, EU40, EU60 EU71, EU87	E11, E19
	2019	08	EU05, EU30 EU38, EU46 EU62, EU74 EU89, EU102	E6, E7, E11, E12, E19, E25, E29, COX B4
Pendant	2020	08	EU02, EU17 EU21, EU25 EU30, EU33 EU44, EU47	E3, E7, E11
	2021	11	EU02, EU06 EU10, EU18 EU22, EU26 EU34, EU38 EU42, EU45 EU50	E3, E7, E11, E20, COX B4, COX B5

L'analyse des séquences a révélé que tous les isolats sont des HEV-B.

Les années de la pandémie de Covid 19 est marquée par trois sérotypes majoritaires (E3, E7 et E11) c'est-à-dire représentant plus de 50% des sérotypes identifiés, sont détectés. A l'inverse, avant l'arrivée de la Covid 19, il circulait plusieurs sérotypes représentant chacun moins de 20% des sérotypes identifiés.

Ces souches appartiennent aux EVNP ; 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**).

Le CV-B4, très fréquemment isolé dans les cas d'infections des voies respiratoires (5à7%). 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**).

D'autres études africaines, notamment en Afrique du Sud, celle de **Grabow et al.1995** ont rapporté que parmi les 11,9 % d'EVNP identifiés, 10,5 % sont des Cocksackievirus.

En Côte d'Ivoire, (**Momou et al,2012**) ont rapportés que les sérotypes identifiés

(55 % d'EVNP) comprenaient 8 % de Cocksackievirus B, 15 % des Echovirus (E7 et E30).

Le typage des EV a été effectué à partir des souches isolées en culture à partir de prélèvements environnementaux. De même, (**Ibrahim et al. 2014**), rapporte qu'en raison de la forte variabilité de la région sélectionnée (VP1) pour le séquençage et par conséquent de l'emploi d'amorces non dégénérées (AN232/233) dans la deuxième amplification, la sensibilité de cette technique a été suffisante pour permettre la caractérisation des souches, directement à partir de prélèvements d'eaux usées.

La même technique d'identification moléculaire des EV a été utilisée en **1999** par le groupe de **Steven Oberste** qui a développé cette technique ciblant une région codante pour la partie centrale de la protéine VP1. Cette technique a permis l'identification de 55 isolats cliniques correspondant à des souches non typables par des techniques sérologiques.

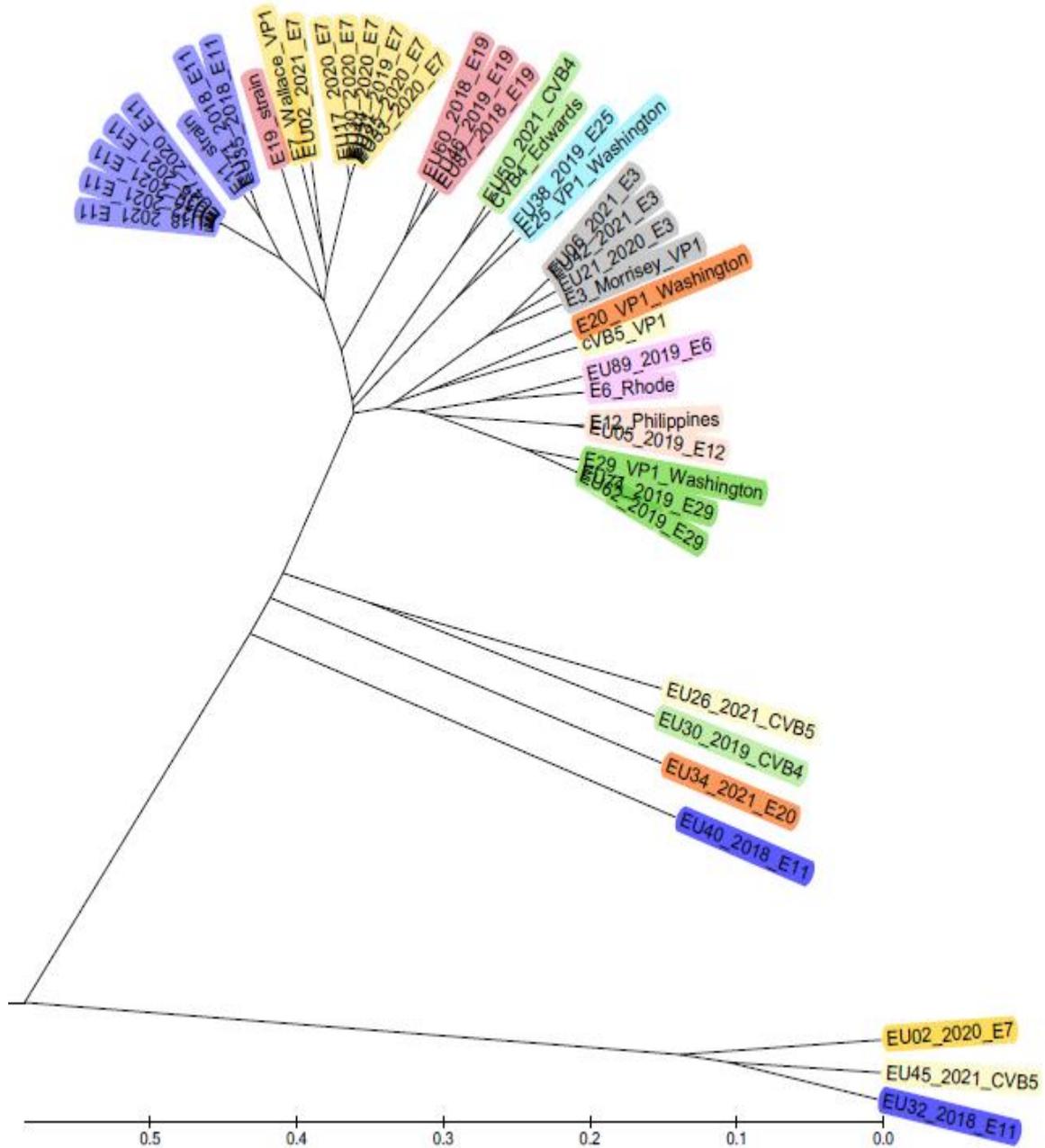


Figure 28. Arbre phylogénétique des entérovirus humains (HEV-B) obtenu par l’analyse comparée des séquences nucléotidiques du gène VP1, construit avec le logiciel Mega 11 selon la méthode de UPGMA.

4. Résultats de l'isolement sur culture cellulaire

Deux lignées cellulaires ont été utilisées dont l'intérêt est d'augmenter la chance d'isoler le virus car il n'y a pas de lignée cellulaire permettant l'isolement de tous les EV (**Hamza et al.2011**).

Plusieurs études ont montrées que les EV se développent bien sur les cellules RD.

Selon **Johnston et Siegel, (1990)** ; **Affi et al. (2009)** ; la lignée cellulaire RD s'est avérée être la lignée cellulaire la plus sensible pour l'isolement des EV.

Tableau XII. Répartition des échantillons positifs en fonction de la lignée cellulaire.

Lignées cellulaires et combinaisons	Nombre d'échantillons positifs avant la Covid 19	Nombre d'échantillons positifs pendant la Covid19	Observations
L20B (seul)	0/28	0/19	-
RD (seul)	28/28	19/19	Suspect Entérovirus
RD + L20B-	28/28	19/19	Suspect Entérovirus
Total	47 (100%)		

Les résultats de cette partie démontrent un haut taux de détection des EV à partir des prélèvements environnementaux (**100%**). Des résultats similaires ont été observés précédemment dans l'étude de **Momou et al. (2012)** Pathologie Biologie 60 (2012), où 43 échantillons sur 68 (63.23%) ont donné un résultat positif. Cette forte sensibilité de détection serait due à plusieurs raisons telles que :

Les EV sont susceptibles de reconnaître une large gamme de récepteurs membranaires. Certains sont spécifiques à un petit nombre d'EV, d'autres à l'inverse semblent ubiquitaires et sont utilisés par de nombreux génotypes (**Volle, 2014**). Dans ce contexte, une étude d'isolement des EV sur culture cellulaire a été effectuée par **Johnston et Siegel, (1990)** dont ils ont utilisé 2 lignées cellulaires (RD et Hep-2), leurs résultats ont démontré que les cellules RD sont plus sensibles pour les Echovirus et les coxsackie virus A. Par contre, la lignée cellulaire Hep-2 est remarquablement sensible aux coxsackie virus B. Une autre étude de **Menegus et Hollick, (1982)** a démontré que les cellules Vero sont plus sensibles aux coxsackie-virus B par rapport aux cellules CMK (Primary cynomolgus monkey kidney cells) et que d'autres prélèvements contenant des Echovirus et des coxsackie virus A ont été tous positifs sur les cellules CMK, mais seulement 35% l'ont été sur les cellules Véro.

Conclusion

Conclusion

Les EV sont de petits virus à ARN qui représentent un excellent marqueur de pollution fécale et sont très fréquemment retrouvés dans les eaux usées. 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 structurales (VP1). 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 environnementaux.

Dans ce travail, la comparaison des résultats de détection par les deux techniques de la RT-PCR a montré que la PCR en temps réel détecte plus de cas positifs que la PCR classique et souvent plus sensible, précise et beaucoup plus rapide que la culture virale pour la détection des EV.

D'autre part, la culture cellulaire se montre irremplaçable et, selon les résultats obtenus, elle peut être utilisée comme outil d'enrichissement de l'échantillon en matière de charge virale initiale. Ceci peut permettre, sans doute, d'augmenter les chances de réussite des techniques d'amplification génique.

L'identification et la caractérisation rapides des sérotypes d'entérovirus sont nécessaires pour étudier leur transmission et leur évolution dans différentes régions géographiques afin de prévenir une future épidémie.

En pratique, en raison des mesures de prévention mises en place vis-à-vis de la COVID-19, qui se poursuit au cours de l'année 2021, les EV ont circulé à bas-bruit, mais la levée du confinement, le relâchement de l'application des mesures barrières pourrait entraîner une reprise d'activité des EV.

Références bibliographiques

Références Bibliographiques

Abbasi, S., Makvandi, M., Teimoori, A., Samarbaf-Zadeh, A. (2018). Complete genome sequence of a multi-recombinant echovirus 6 strain isolated from CSF in Ahvaz, Southwestern Iran. *Journal of the Chinese Medical Association.* 81 : 340-347.

Affi, S.S., Zaki, S.A., Mohamed, A.F. et El-Hosseiny, H. (2009). Isolation and Identification of Non-Polio Enteroviruses from Children in Different Egyptian Governorates. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences.* 3(4): 3230-3238.

Agut, H., Buffet-Janveresse, C., Le Faou, A., Peigue-Lafeuille, H., Seigneurin, J.M. (2007). Révir : Référentiel en virologie médicale. 2^{ème} édition. 17, rue Jean Daudin 75015, Paris. Chapitre32 : Entérovirus. P 107-109.

Andreoletti, L., Renois, F., Jacques, J., Leveque, N. (2009). Entérovirus non poliomyélitiques et pathologies respiratoires. *Medecine sciences.* 25 : 921-923. doi : 10.1051/medsci/20092511921.

Apostol, L.N., Suzuki, A., Bautista, A., Galang, H., Paladin, F.J., Fuji, N., Lupisan, S., Olveda, R. et Oshitani, H. (2012). Detection of Non-Polio Enteroviruses From 17 Years of Virological Surveillance of Acute Flaccid Paralysis in the Philippines. *Journal of Medical Virology.* 84 : 624-626. doi : 10.1002/jmv.23242.

Archimbaud, C., Mirand, A., Chambon, M., Regagnon, C., Bailly, J.L., Lafeuille, H.P. et Henquell, C. (2004). Improved Diagnosis on a Daily Basis of Enterovirus Meningitis Using a One-Step Real-Time RT-PCR Assay. *Journal of Medical Virology.* 74:604–610. doi : 10.1002/jmv.20217.

Arita, M., Zhu, S.L., Yoshida, H., Yoneyama, T., Miyamura, T. et Shimizu, H. (2005). A Sabin 3-Derived Poliovirus Recombinant Contained a Sequence Homologous with Indigenous Human Enterovirus Species C in the Viral Polymerase Coding Region. *Journal Of Virology.* 79 (20) : 12650. doi:10.1128/JVI.79.20.12650–12657.

Bahri, O., Rezig, D., Ben Nejma-Oueslati, B., Ben Yahia, A., Ben Sassi, J., Hogga, N., Sadraoui, A. et Triki, H. (2005). Enteroviruses in Tunisia: virological surveillance over 12 years (1992–2003). *J. of Medical Microbiology*. 54 : 63–66. doi: 10.1099/jmm.0.45695-0.

Bendig, J.W.A., Brien, P.S.O. et Mui, P. (2001). Serotype-specific detection of Coxsackievirus A16 in clinical specimens by Reverse Transcription-Nested PCR. *Journal Of Clinical Microbiology*. 39 (10) : 3690. doi: 10.1128/JCM.39.10.3690–3692.2001.

Bessaud, M., Jegouic, S., Joffret, M.L., Barge, C., Balanant, J., Gouandjika-Vasilache, I. et Delpeyroux, F. (2008). Characterization of the genome of human enteroviruses: design of generic primers for amplification and sequencing of different regions of the viral genome. *Journal of Virological Methods*. 149(2): 277-281. doi: 10.1016/j.jviromet.2008.01.027.

Blomqvist, S., Paananen, A., Kopra, C.S., Hovi, T. et Roivainen, M. (2008). Eight Years of Experience with Molecular Identification of Human Enteroviruses. *Journal Of Clinical Microbiology*. 46 (7) : 2410–2412. doi:10.1128/JCM.00313-08.

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(3): 204-9.

Bousslama, L., Nasri, D., Chollet, L., Belguith, K., Bourlet, T., Aouni, M., Pozzetto, B. et 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. doi: 10.1128/JVI.00180-07.

Cameron, C.E., Suk-Oh, H. et Moustafa, I.M. (2010). Expanding knowledge of P3 proteins in the poliovirus lifecycle. *Future Microbiology*. 5 : 867–868.

Capaul, S.E. et Gorgievski-Hrisoho, M. (2005). Detection of Enterovirus RNA in cerebrospinal fluid (CSF) using NucliSens EasyQ Enterovirus assay. *Journal of Clinical Virology*. 32 : 237-238. doi:10.1016/j.jcv.2004.08.006.

Caro, V., Guillot, S., Delpeyroux, F. et Crainic, R. (2001). Molecular strategy for ‘serotyping’ of human enteroviruses. *J. Gen. Virol.* 82 : 88–89. doi: 10.1099/0022-1317-82-1-79.

Casas, I., Powell, L., Klapper, P.E., Cleator, G.M. (1995). New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebro spinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. *J. Virol. Methods.* 53: 25–36.

Collier, L. et Oxford J. (2000). Virologie Humaine. 2^{ème} édition. 4, rue Casimir-Delavigne, 75006 Paris : Flammarion Médecines- Sciences. Chapitre 16, Poliomyélite et autres infections à picornavirus, p. 123-129.

Committee on the enteroviruses, National Foundation For Infantile Paralysis. (1957). The Enteroviruses. *American Journal of public health.* 47(12): 1556-58.

Conrad, C. (2012). Evaluation des propriétés en culture de nouvelles souches atténuées de Poliovirus candidates à un nouveau vaccin inactivé. Thèse de Doctorat. Université de Lorraine : Sciences pharmaceutiques. P 22-27.

Dahee, J., Heo, T.H., Byeon, J.H., Kim, J.H., Kim, MK., Eun, S.H. et Eun, B.L. (2015). Analysis of clinical information and rRT-PCR for early diagnosis of enteroviral meningitis. *Korean J. Pediatr.* 58(11) :446. doi : 10.3345/kjp.2015.58.11.446.

Dalwai, A., Ahmad, S., Al-Nakib, W. (2010). Echoviruses are a major cause of aseptic meningitis in infants and young children in Kuwait. *Virology Journal.* 7: 236.

De Crom, S.C.M., Obihara, C.C., Van Loon, A.M., Argilagos-Alvarez, A.A., Peeters, M.F., Van Furth, A.M. et Rossen, J.W.A. (2011). Detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid : comparaison of two molecular assays. *Journal of Virological Methods.* 11675 : 1-4. doi:10.1016/j.jviromet.2011.10.007.

Doedens, J., Maynell, L.A., Klymkowsky, M.W. et Kirkegaard, K. (1994). Secretory pathway function, but not cytoskeletal integrity, is required in poliovirus infection. In : Ibrahim, W. (ed). *Arch. Virol. Supp.* 19 : 159–172.

Fernandez-Miragall O., Quinto S.L., Martínez-Salas E. (2009). Relevance of RNA structure for the activity of Picornavirus IRES elements. *Virus Res.* 139:172-182.

Filbin, M.E. et Kief, J.S. (2009). Towards a structural understanding of IRES RNA function. *Struct. Biol.* 19(3): 267–272. doi:10.1016/j.sbi.2009.03.005.

Fleury, H.J.A. (2002). *Virologie humaine*. 4^{ème} édition. 120, bd Saint-Germain. 75280 Paris Cedex 06 : Masson. Chapitre 10 : Les Picornaviridae. P 91-94.

Fleury, H.J.A. (2009). *Virologie humaine*. 5^{ème} édition. 62, rue Camille Desmoulins. 92442 Issy-les-Moulineaux Cedex. Elsevier Masson. Chapitre3 : Réplication des virus à ARN. P 19-20.

Gamarnik, AV et 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.

Graham, A.K. et Murdoch, D.R. (2005). Association between Cerebrospinal Fluid Pleocytosis and Enteroviral Meningitis. *Journal Of Clinical Microbiology.* 43 (03) : 1491. doi:10.1128/JCM.43.3.1491.2005.

Grosjean, J., Clavé, D., Archambaud, M., Pasquier, C. (2011). *Bactériologie et virologie pratique*. 2^{ème} édition, Rue des Minimes 39, B-1000 Bruxelles. P66-68.

Grosjean, J., Clavé, D., Archambaud, M., Pasquier, C. (2016). *Bactériologie et virologie pratique*. 3^{ème} édition, Rue du Bosquet 7, B-1348 Louvain-la-Neuve. P 254.

Hamza, I.A., Jurzik, L., Uberla, K., Wilhelm, M. (2011). Methods to detect infectious human enteric viruses in environmental water samples. *International Journal of Hygiene and Environmental Health.* 214 : 226. doi:10.1016/j.ijheh.2011.07.014.

Harvala, H., Kondracka, J., McIntyre, CL, Leitch, ECM., Templeton, KE et al. (2011) Comparison of human parechovirus and enterovirus detection frequencies in cerebrospinal fluid samples collected over a 5-year period in Edinburgh- HPeV type 3 identified as the most common picornavirus type. *Journal of Medical Virology.* 83 (5): 20- 21.

Harvala, H., Broberg, E., Benschop, K., Bergin, N., Ladhani, S., Susif, P., Christianseng, C., McKenna, J., Allene, D., Makiellok, P., McAllister, G., Carmen, M. et al. (2018). Recommendations for enterovirus diagnostics and characterisation within and beyond Europe. *J. of Clinical Virology*. 101: 11–17. doi : 10.1016/j.jcv.2018.01.008.

Hassel, C. (2015). Epidémiologie moléculaire et évolution de l'entérovirus A71 et interactions génétiques avec les autres entérovirus de l'espèce A responsables de la maladie pied-main-bouche. Thèse de Doctorat. Université d'Auvergne- Clermont-Ferrand : Médecine humaine et pathologie. P20-31.

Heim, A. (2005). From poliovirus surveillance to enterovirus surveillance : A complete picture ? *J. Med. Microbiol.* 54: 1-2.

Hober, D., Sané, F., Riedweg, K., Moumna, I., Goffard, A., Choteau, L., Alidjinou, E.K. et Desailoud, R. (2013). Viruses and Type 1 Diabetes: Focus on the Enteroviruses. *Intech Open Science*. P35. doi : 10.5772/52087.

Huang, H.I. et Shih, S.R. (2015). Neurotropic Enterovirus Infections in the Central Nervous System. *J. Viruses*. 7 : 6051–6053. doi : 10.3390/v7112920.

Hymas, W.C., Aldous, W.K., Taggart, E.W., Stevenson, J.B. et Hillyard, D.R. (2008). Description and Validation of a Novel Real-Time RT-PCR Enterovirus Assay. *Clinical Chemistry*. 54(2) : 406- 411. doi: 10.1373/clinchem.2007.095414.

Hyypia, T., Hovi, T., Knowles, N.J. et Stanway, G. (1997). Classification of enteroviruses based on molecular and biological properties. *Journal of General Virology*. 78 : 1-2.

Johnston, S.L.G. et Siegel, C.S. (1990). Presumptive Identification of Enteroviruses with RD, HEp-2, and RMK Cell Lines. *Journal Of Clinical Microbiology*. 28 (05) : 1049- 1050. doi : 0095-1137/90/051049-02\$02.00/0.

Ibrahim, W., Boukhadra, N., Nasri-Zoghalmi, N., Berthelot, P., Omar, S., Bourlet, T., Pozzetto, B., Pillet, S. (2014). Partial sequencing of the VP2 capsid gene for direct enterovirus genotyping in clinical specimens. *Clinical Microbiology and Infection*. 20 :

558-564. doi :10.1111/469-0691.12520.

Ibrahim, W. (2014). 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. Thèse de Doctorat. Université Jean Monnet de Saint- Etienne : Faculté de Médecine Jacques Lisfranc. P76- 104.

Julien, J., Leparc-Goffart, I., Lina, B., et al. (1999). Postpolio syndrome: polio- virus persistence is involved in the pathogenesis. *J. Neurol.* 246 : 472-476.

Kayser, FH., Bottger, EC., Deplazes, P., Roers, HA. (2017). Manuel De Poche De Microbiologie Médicale. 2eme édition. Lavoisier, Paris. P 496.

Kempf, B.J. et Barton, D.J. (2008). Poly (rC) Binding Proteins and the 5' Cloverleaf of Uncapped Poliovirus mRNA Function during De Novo Assembly of Polysomes. In : Volle, R. (ed). *Journal of Virology.* 82(12) :5835-5846.

Kondrashova, A., Hyöty, H. (2014). Role of viruses and other microbes in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Int. Rev. Immunol.* 33(4) : 284-95.

Kottaridi, C., Bolanaki, E., Mamuris, Z., Stathopoulos, C., Markoulatos, P.(2006).Molecular phylogeny of VP1, 2A, and 2B genes of echovirus isolates: epidemiological linkage and observations on genetic variation. *Arch. Virol.* 151: 1117–18

Kristensson, K. (1999). The discovery of the poliovirus. *Brain Research Bulletin.* 50 : 461.

Lamoril, J., Ameziane, N., Deybach, J.C., Bouizegarene, P., Bogard, M. (2008). Les techniques de séquençage de l'ARN : une révolution en marche. Première partie. *J. Immuno-analyse et biologie spécialisée.* 23 : 262-263. doi:10.1016/j.immbio.2008.07.016.

Lauber, C. et Gorbalenya, A. E. (2012). Toward genetics-based virus taxonomy : comparative analysis of a genetics-based classification and the taxonomy of picornaviruses. *J. Virol.* 86 : 3907–3913. doi : 10.1128/JVI.07174-11.

Leveque, N, Renois, F, Talmud, D, Nguyen, Y, Lesaffre, F, Boulagnon, C, Bruneval, P, Fornes, P. et Andreoletti, L. (2012). Quantitative genomic and antigenomic enterovirus RNA detection in explanted heart tissue samples from patients with end-stage idiopathic

dilated cardiomyopathy. *J. Clin. Microbiol* 50 :3378–3380. Doi 10.1128/JCM.01612-12

Mammette, A. (2002). Virologie médicale. 80 Boulevard de la Croix-Rousse, BP 4371, 69242 LYON 04, P 265- 280.

Manukyan, H., Zagorodnyaya, T., Ruttimann, R., Manor, Y., Bandyopadhyay, A., Shulman, L., Chumakov, K. et Laassri, M. (2018). Quantitative multiplex one-step RT-PCR assay for identification and quantitation of Sabin strains of poliovirus in clinical and environmental specimens. *J. Virol. Methods.* 259 :74-80. doi :10.1016/j.jviromet.2018.06.009.

Michos., A.G, Syriopoulou., V.P, Hadjichristodoulou., C, Daikos., G.L, Lagona., E. et al. (2007). Aseptic Meningitis in Children : Analysis of 506 Cases. *PLoS ONE.* 2(8): 674. doi:10.1371/journal.pone.0000674.

Melnick, J.L. (1996). My role in the discovery and classification of the enteroviruses. *Annu. Rev. Microbiol.* 50: 2–18.

Menegus, M.A. et Hollick, G.E. (1982). Increased Efficiency of Group B Coxsackievirus Isolation from Clinical Specimens by Use of BGM Cells. *Journal of Clinical Microbiology.* 15 : 946- 948.

Meri, G.H., Schumacher, J.D., Vilimonovic, N., Germann, D. et Matter, L. (1998). Detection by PCR of Enteroviruses in Cerebrospinal Fluid during a Summer Outbreak of Aseptic Meningitis in Switzerland. *J. Clin. Microbiol.* 36 (9): 2408–2412.

Mulford, W.S., Buller, R.S., Arens, M.Q. et Storch, G.A. (2004). Correlation of cerebrospinal fluid (CSF) cell counts and elevated CSF protein levels with enterovirus reverse transcription-PCR results in pediatric and adult patients. *J. Clin. Microbiol.* 42:4199–4203. doi : 10.1128/JCM.42.9.4199–4203.2004.

Nix, W.A., Oberste, M.S. et 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. doi:10.1128/JCM.00542- 06.

Nijhuis, M., Van Maarseveen, N., Shuuman, R., Verkuijden, S., De Vos, M., Hendriksen, K., Van Loon, A.M. (2002). Rapid and Sensitive Routine Detection of All

Members of the Genus *Enterovirus* in different Clinical specimens by Real- Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 40(10) : 3666-3670. doi : 10.1128/JCM.40.10.3666-3670.2002.

Norder, H., Bjerregaard, L., Magnius, L., Lina, B., Aymard, M. et Chomel, J.J. (2003). Sequencing of 'untypable' enteroviruses reveals two new types, EV-77 and EV-78, within human enterovirus type B and substitutions in the BC loop of the VP1 protein for known types. *Gen. Virol.* 84: 827-36. doi : 10.1099/vir.0.18647-0.

Oberste, M.S., Maher, K., Kilpatrick, D.R., Flemister, M.R., Brown, B.A. et Pallansch, M.A. (1999a). Typing of Human Enteroviruses by Partial Sequencing of VP1. *Journal Of Clinical Microbiology*. 73 (5) : 1288–1292.

Oberste, M.S., Maher, K., Kilpatrick, D.R. et Pallansch, M.A. (1999b). Molecular Evolution of the Human Enteroviruses : Correlation of Serotype with VP1 Sequence and Application to Picornavirus Classification. *Journal Of Virology*. 73 (3): 1941–1948.

Oberste, M.S., Maher, K., Flemister, M.R., Marchetti, G., Kilpatrick, D.R. et 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., Schnurr, D., Maher, K., al-Busaidy, S. et Pallansch, M.A. (2001). Molecular identification of new picornaviruses and characterization of a proposed enterovirus 73 serotype. *Journal of General Virology*. 82 : 409–416.

Oberste, M.S., Nix, W.A., Maher, K., Pallansch, M.A. (2003). Improved molecular identification of enteroviruses by RT-PCR and amplicon sequencing. *Journal of Clinical Virology*. 26 : 375- 376. doi :10.1016/S1386-6532(03)00004-0.

Oberste, M.S., Maher, K. et Pallansch, M.A. (2004). Evidence for Frequent Recombination within Species Human Enterovirus B Based on Complete Genomic Sequences of All Thirty-Seven Serotypes. *Journal of Virology*. 78 : 855-876. doi : 10.1128/JVI.78.2.855–867.2004.

Oberste, M.S., Penaranda, 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. *Journal of Clinical Virology*. 49 : 73-74. doi : 10.1016/j.jcv.2010.06.022

Opanda, S.M., Wamunyokoli, F., Khamadi, S., Coldren, R. et Bulimo, W.D. (2016). Genotyping of enteroviruses isolated in Kenya from pediatric patients using partial VP1 region. *Springer Plus*. 5 :158. doi : 10.1186/s40064-016-1834-0.

Organisation mondiale de la Santé. (2005). Manuel de la sécurité biologique en laboratoire. 3^{ème} édition. OMS, 20 avenue Appia, 1211 Genève 27 (Suisse), P 75-105.

Organisation mondiale de la Santé. (2006). Passage au vaccin antipoliomyélitique inactivé suite à l'abandon du vaccin antipoliomyélitique oral-Supplément à la note d'information de l'OMS. *Weekly Epidemiol. Record*. 81 : 137-44.

Owino, C.W. et Chu, J.J.H. (2019). Recent advances on the role of host factors during non poliovirus enteroviral infections. *Journal of Biomedical Science*. 26 : 27. doi : 10.1186/s12929-019-0540-y.

Palacios, G. et Oberste M.S. (2005). Enteroviruses as agents of emerging infectious diseases. *J. Neurovirol*. 11 : 424.

Pasquier, C., Bertagnoli, S., Dunia, D., Izopet, J. (2013). Virologie humaine et zoonoses. 120, Boulevard Saint-Germain, 75280 Paris cedex 06, P 176-179.

Paul, A. V., van Boom, J. H., Filippov, D. et Wimmer, E. (1998). Protein-primed RNA synthesis by purified poliovirus RNA polymerase. In : Renois, F. (ed). *Nature* .393 : 280–284.

Pelletier, J. et Sonenberg, N. (1988). Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature*. 334 : 320.

Pillet, S., Billaud, G., Omar, S., Lina, B., Pozzetto, B. et 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.

Piqueur, M.A.C., Verstrepen, W.A., Bruynseels, P. et Mertens A.H. (2009). Improvement of a real time RT-PCR assay for the detection of enterovirus RNA. *Virology Journal*. 95 (6) : 1-3. doi : 10.1186/1743-422X-6-95.

Poitras, E. et Houde, A. (2002). La PCR en temps réel : principes et applications.

Reviews in Biology and Biotechnology. 02: 2-4.

Prescott, L., Harley, J., Klein, D., Wiley, Sherwood, Woolverton, C. (2010).

Microbiologie, 3^{ème} édition. Rue des Minimes, 39 B-1000 Bruxelles, P 940-41.

Racaniello, V. et Howley, P.M. (2007). Picornaviridae : the viruses and their replication.

In Fields VIROLOGY, 5^{ème} édition, Philadelphia, pp. 795–838.

Read, S.V., Jeffery, K.J.M. et Bangham, C.R.M. (1997). Aseptic Meningitis and

Encephalitis : the Role of PCR in the Diagnostic Laboratory. *Journal of Clinical*

Microbiology. 35 (3) : 691-695.

Renois, F. (2012). Etude des caractéristiques virologiques, cliniques et de la réponse

inflammatoire au cours de l'infection de l'arbre respiratoire par les entérovirus humains.

Thèse de Doctorat. Université de Reims Champagne-Ardenne : UFR Médecine. pp37-72.

Renois, F., Bouin, A., Wehbe, M., Leveque, N., Andreoletti, L. (2014). Infections

persistantes à entérovirus et pathologies humaines. *Virologie.* 18(6) : 306-311.

doi: 10.1684/vir.2014.0582

Rotbart, H.A., Sawyer, M.H., Fast, S., Lewinski, C., Murphy, N., Keyser, E.F.,

Spadoro, J., Kao, S.Y. et Loeffelholz, M. (1994). Diagnosis of Enteroviral Meningitis by

Using PCR with a Colorimetric Microwell Detection Assay. *Journal Of Clinical*

Microbiology. 32 (10) : 2590-2591.

Rotbart, H.A. et Hayden, FG. (2000). Picornavirus infections : a primer for the

practitioner. *Arch Farm Med.* 9(9) : 913-20.

Saeedinia, A., Shamsara, M., Zeinoddini, M., Sadeghi, V. et Maghsoudi, N. (2008).

Evaluation of nucleic acid sequence based amplification (NASBA) and Reverse

Transcription Polymerase Chain Reaction for detection of coxsackievirus B3 in cell culture

and animal tissue samples. *Iranian Journal Of Biotechnology.* 6 (4) : 228.

Samuelson, A., Skoog, A., Forsgren, M. (1990). Aspects on the serodiagnosis of enterovirus infections by ELISA. In : Ibrahim, W. (ed). *Serodiagn. Immunother.Infect.* 4 : 395–406.

Shabani, A., Makvandi, M., Samarbafzadeh, A., Teimoori, A., Rasti, M., Karami, C., Rastegarvand, N., Nikfar, R., Shamsizadeh, A., Salehi, A. et Angali, K.A. (2018). Echovirus 30 and coxsackievirus A9 infection among young neonates with sepsis in Iran. *Iranian Journal of Microbiology.* 10 :259-263.

Smura, T., Ylipaasto, P., Klemola, P., Kaijalainen, S., Kyllönen, L., Sordi, V., Piemonti, L., Roivainen, M. (2010). Cellular tropism of human enterovirus D species serotypes EV-94, EV-70, and EV-68 in vitro : implications for pathogenesis. *Journal of Medical Virology.* 82(11) : 1940.

Steil, B.P. et Barton, D.J. (2009). Conversion of VPg into VPgpUpUOH before and during Poliovirus Negative-Strand RNA Synthesis. *Journal of Virology.* 83(24) : 12660-12670. doi : 10.1128/JVI.01676-08.

Thompson, A. et Peersen, O.B. (2004). Structural basis for proteolysis-dependent activation of the poliovirus RNA-dependent RNA polymerase. *EMBO J.* 23 : 3462-66.

Tsai, H.P., Huang, S.W., Wu, F.L., Kuo, P.H., Wang, S.M., Liu, C.C., Su, I.J. et

Wang, J.R. (2011). An echovirus 18-associated outbreak of aseptic meningitis in Taiwan: epidemiology and diagnostic and genetic aspect. *J. of Medical Microbiology.* 60: 1362-1364. doi : 10.1099/jmm.0.027698-0.

Van kuppeveld F.J, Melchers, W.J., Kirkegaard, K. et Doedens, J. R. (1997).

Structure-function analysis of coxsackie B3 virus protein 2B. *Virology.* 227 : 111–118.

Verstrepen, W.A., Kuhn, S., Kockx, M.M., Van De Vyvere, M.E., Mertens, A.H.(2001). Rapid detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid specimens with a novel single-tube real-time reverse transcription-PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 39(11): 4093-6. doi : 10.1128/JCM.39.11.4093–4096.2001.

Volle, R., Bailly, J.L., Mirand, A., Pereira, B., Marque, J.S., Chambon, M., Regagnon, C., Brebion, A., Henquell, C., Peigue, L.H., Archimbaud, C. (2014). Variations In Cerebrospinal Fluid Viral Loads Among Enterovirus Genotypes In Patients

Hospitalized With Laboratory-Confirmed Meningitis Due To Enterovirus. *J. Infect. Dis.* 210(4) : 576-84. doi : 10.1093/infdis/jiu178.

Volle, R. (2014). Pathogénie des entérovirus : étude de la charge virale au cours de méningites et de la permissivité des cellules endothéliales microvasculaires cérébrales humaines. Thèse de Doctorat. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand : Biologie cellulaire. P 20-27.

Wang, L., Dong, C., Chen, D.E., Song, Z. (2014). Coxsackievirus-induced acute neonatal central nervous system disease model, *J. Clin. Exp. Pathol.* 7(3): 858-866.

Weil, M., Rahav, G., Somech, R., Stauber, T., Alfandari, J., Weiss, L., Silberstein, I., Indenbaum, V., Or, I.B., Mendelson, E., Sofer, D. et Shulman, L.M. (2019). First report of a persistent oropharyngeal infection of type 2 vaccine-derived poliovirus (iVDPV2) in a primary immune deficient (PID) patient after eradication of wild type 2 poliovirus. *International Journal of Infectious Diseases.* 83 : 40-42. doi :10.1016/j.ijid.2019.03.037.

Wells, A.I. et Coyne, C.B. (2019). Enteroviruses : A Gut-Wrenching Game of Entry, Detection, and Evasion. *Viruses.* 11, 460. doi :10.3390/v11050460.

Yerly, S., Gervaix, A., Simonet, V., Caflisch, M., Perrin, L. et Wunderli, W. (1996). Rapid and Sensitive Detection of Enteroviruses in Specimens from Patients with Aseptic Meningitis. *Journal Of Clinical Microbiology.* 34 (1) : 199–201.

Yin-Murphy, M. (1984). Acute hemorrhagic conjunctivitis. *Prog. Med. Virol.* 29: 23-44.

Zhou., F, Kong., F, McPhi., K, Ratnamohan., M, Donovan., L, Zeng., F, Gilbert., G.L, Dwyer, D.E. (2009). Identification of 20 common human enterovirus serotypes by use of a reverse transcription-PCR-based reverse line blot hybridization assay. *J. Clin. Microbiol.* 47(9) : 2737-43. doi:10.1128/JCM.00823-09.

Zoll, J., Heus, H. A., Van Kuppeveld, F. J., Melchers, W. J. (2009). The structure-function relationship of the enterovirus 3'-UTR. In : Volle, 2014. *Virus Research.* 139(2):209–216.

K.J. Momou; C. Akoua-Koffi; D.S. Akré; E.V. Adjogoua; L. Tiéoulou; M. Dosso (2012). Détection d'entérovirus dans les eaux usées urbaines à Yopougon, Abidjan. , 60(3), 0-. doi:10.1016/j.patbio.2011.05.004

Annexes

Annexes :

Annexe 1 :

La composition de milieu de croissance complet (Milieu MEM + Suppléments) et le rôle de ces constituants :

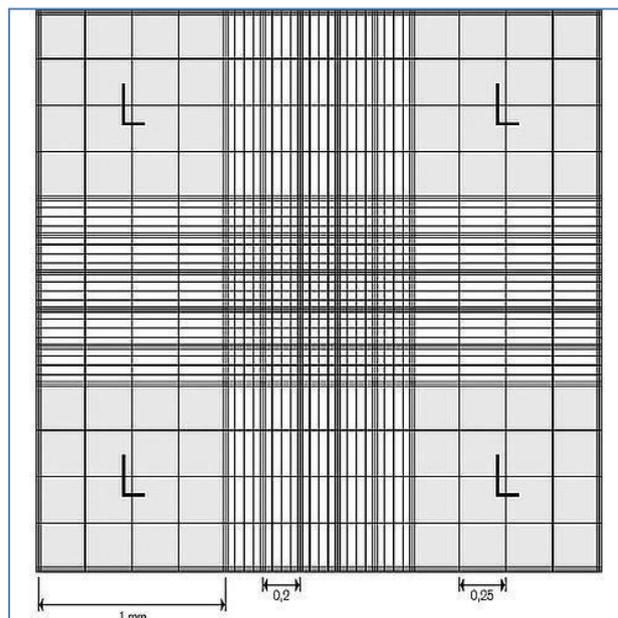
	Constituants	Rôles
MEM (Minimum Essential Medium)	Sels minéraux	Maintien de l'isotonicité du milieu
	Glucose	Source de carbone et d'énergie
	Acides aminés essentiels et non essentiels	Source d'azote et facteurs de croissance
	Vitamines	Facteurs de croissance
	Bicarbonate de sodium	Tampon
	Rouge de phénol	Indicateur coloré de pH révélant la culture de champignons ou bactéries
Additifs	Sérum de veau fœtal (SVF)	Apporte : - facteurs de croissance - fibrinolyse qui permet l'ancrage des cellules au flacon - des éléments tampon.
	L-glutamine	Facteur de croissance
	Antibiotiques (pénicilline G et streptomycine)	Evitent la contamination bactérienne
	Antifongique (fungizone ou amphotéricine B)	Evite la contamination fongique

Annexe 2 :

La numération cellulaire :

La quantité exacte de cellules est calculée par numération cellulaire à l'aide d'un Haemocytomètre (cellule de Neubauer), comme suit :

- ✓ Diluer 0.2 mL de la suspension cellulaire dans 0.2 mL de bleu de Trypan, les cellules mortes seront colorées en bleu.
- ✓ Bien mélanger la suspension cellulaire additionnée de bleu de Trypan et pipeter un volume suffisant pour remplir les deux chambres de la cellule Neubauer.
- ✓ Mettre le volume de la suspension nécessaire entre la lame de Neubauer et la lamelle.
- ✓ Compter les cellules viables dans la première chambre de la cellule Neubauer puis dans la deuxième chambre (les 4 grands carreaux de la chambre (voir ci-après le schéma)).



- ✓ Les cellules mortes colorées en bleu par le bleu de Trypan ne sont pas pris en considération.
- ✓ Pour un test valide, les résultats de la numération des deux chambres doivent donner moins de 20% de différence.
- ✓ Calculer la concentration par mL des cellules viables selon la formule suivante:

$$C_I = m \times \frac{1}{4} \times f \times 10^4$$

C_i : concentration cellulaire initiale par mL.

m : moyenne des cellules viables comptées dans les deux chambres de la cellule Neubauer.

$\frac{1}{4}$: la moyenne des cellules par carreau.

f : 2 facteurs de dilution (dilution au $\frac{1}{2}$: un volume de bleu de Trypan + un volume de suspension cellulaire).

10^4 : conversion du mm^3 au mL.

Annexe 3 :

Formulaire de lecture des isollements des eaux usées.

ANNEXE 22 : FICHE DE LECTURE DES ISOLEMENTS DES EAUX USÉES

Kotea
Date de réception : 06.12.21
Ew.050
EPID : ENV-ALG-TP7-BS.11-KLA-21-13

Institut Pasteur d'Algérie
Médecin Microbiologiste
Dr S.A SELKAMI
19.12.21

L20B																								
Passage P0					P0+1					L+R+					Résultat		Date	Résultat final	Date finale					
Date : 09.12.21					Date : 14.12.21					Date :														
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5										
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Négatif	Suspect polio	19.12.21	Négatif EVNP Suspect polio Suspect polio+EVNP	19.12.21					
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Négatif	Suspect polio	19.12.21							
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Négatif	Suspect polio	19.12.21							
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Négatif	Suspect polio	19.12.21							
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Négatif	Suspect polio	19.12.21							
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Négatif	Suspect polio	19.12.21							
RD																								
Passage P0					P0+1					R+L+					R+L+R+					Résultat	Date			
Date : 09.12.21					Date :					Date : 14.12.21					Date :					Négatif	19.12.21			
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5					
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
-	-	-	+	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					