

Remerciements

Tout d'abord, nous remercions Dieu, notre créateur de nos avoir donné la force, la volonté et le courage afin d'accomplir ce modeste travail.

Nous tenant à remercier sincèrement notre promotrice Dr. ANES-BOULAHBAL Dahbia Leila, responsable du LNR OMS pour la surveillance de la poliomyélite en Algérie, pour son accueil chaleureux au sein du laboratoire, pour ses bonnes explications qui nous ont éclairé le chemin de la recherche et sa collaboration afin d'accomplir de ce modeste travail.

Nos remerciements s'étendent également à Dr. BENHOUNA Inssaf de nous avoir dirigée, formé et surtout pour sa patience, sa disponibilité et ses judicieux conseils.

Nous voudrions adresser toute notre gratitude à Mme SAADI LEILA, ainsi que tous les professeurs qui nous ont enseigné et qui par leurs compétences nous ont soutenu dans la poursuite de nos études.

Nos remerciements les plus chaleureux aux membres du jury Mme Meklat et Mme Matmoura qui nous ont fait l'honneur d'accepter de juger notre travail de fin d'étude.

Je remercie également tous les membres du laboratoire, messieurs SELLAMI Sid Ali, madame CHIKHAOUI Souhila, madame Amel et madame Amina pour leurs encouragements, leur soutien et leurs orientations toute au long de notre stage.

Enfin, nous remercions tous ceux qui ont contribué de loin ou de près à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Je dédie ce travail en premier lieu à mes parents qui m'ont toujours soutenu dans mes choix et m'ont encouragé dans mes études, leurs soutiens dans les moments d'euphorie comme dans les moments de quiétude. Que dieu les bénissent et leur accorde une longue vie pleine de satisfaction.

Sans pour autant oublier mes grands-parents pour leurs encouragements, leurs soutiens et leurs conseils. Que dieu leur accorde une longue vie.

A monsieur Guetarni professeur à l'université de Blida.

Mes sœurs Djazia , Imene, Mounira et Khadidja de m'avoir écouté aussi patiemment.

Je tiens à remercier mes copines, pour leur amitié, leur soutien inconditionnel et leur encouragement.

Ainsi que, Mes cousines, toute ma famille et tous ceux qui ont participé et m'ont encouragé de près ou de loin.

Chahinez

Dédicaces

À mes très chers parents ;

Aucune dédicace, aucun mot, ne saurait exprimer réellement mon profond amour, mon respect et ma vive gratitude. Veuillez trouver dans ce manuscrit le fruit de toutes vos peines et vos sacrifices.

À mes chères sœurs Linda et Sarah ;

À mes chers grands parents, que dieu les garde ;

À tous mes Oncles et Tantes ;

À mes chères amies Aymen, Feriel et chahinez ;

À tous mes collègues de ma Promotion en « Biologie Moléculaire et Cellulaire ».

Amina

Résumé :

Les entérovirus humains (HEV) sont des agents pathogènes très communs en médecine humaine. Ils sont responsables d'infections variées parmi lesquels la poliomyélite causée par le poliovirus, ce virus circule dans l'environnement où il peut persister longtemps. L'objectif du présent travail consiste à la surveillance de la circulation des entérovirus et plus particulièrement les poliovirus dans la région du centre de l'Algérie dans les prélèvements environnementaux afin de surveiller toute circulation silencieuse des souches sauvages de poliovirus et de souches modifiées VDPV dans la communauté. Plusieurs échantillons d'eaux-usées provenant de quatre stations d'épuration de la région centre ont été ciblés pour la recherche des poliovirus : Chenoua, Hadjout, Benimessous et Kolea, une démarche qui entre dans l'initiative mondiale d'éradication de poliovirus sous l'égide de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) afin d'établir un bilan précis sur la présence et la propagation de ces virus en Algérie. Pour ce faire, les échantillons d'eaux usées ont été traités en suivant la méthode de séparation bi-phasique par l'utilisation de deux polymères de carbohydrate le PEG 600 et le Dextran T40, suivi d'une inoculation sur culture cellulaire en utilisant deux lignées cellulaires recommandées par l'OMS pour l'isolement viral : les cellules RD sensibles aux entérovirus et L20B exprimant le récepteur cellulaire CD155 et donc sélectives pour les poliovirus. Enfin, la différenciation intratypique par RT-PCR en temps réel est réalisée afin d'identifier et de différencier les sérotypes de poliovirus en deux étapes : une première RT-PCR en temps réel pour confirmer l'espèce poliovirus, les sérotype, et la nature sauvage ou vaccinal, et une deuxième RT-PCR en temps réel pour confirmer l'origine vaccinale ou non (souches modifiées VDPV) du poliovirus. Nos résultats de l'inoculation des cinq échantillons sur les différentes lignées cellulaires témoignent de la présence d'entérovirus non polio et de poliovirus et que toutes les souches isolées polio sont d'origine vaccinale avec absence des souches polio sauvages et des souches modifiés VDPV dans les échantillons traités.

Mots clés : Entérovirus, Poliovirus, Eaux usées, rRT-PCR.

Abstract:

Human enteroviruses (HEVs) are very common pathogens in human medicine. They are responsible for a variety of infections including poliomyelitis caused by poliovirus, which circulates in the environment where it can persist for long periods of time. The objective of this work is to monitor the circulation of enteroviruses and more particularly polioviruses in the central region of Algeria in environmental samples in order to monitor any silent circulation of wild strains of poliovirus and modified VDPV strains in the community. Several samples of waste-water from four wastewater treatment plants in the central region have been targeted for research poliovirus: Chenoua, Hadjout, Benimessous and Kolea, a process that enters the global initiative to eradicate polio virus in the aegis of the World Health Organization (WHO) in order to establish a precise assessment of the presence and spread of these viruses in Algeria. For this purpose, the wastewater samples were treated following the two-phase separation method using two types of carbohydrates, PEG 600 and Dextran T40 followed by inoculation on cell culture using two cell lines recommended by WHO for the viral isolation: RD cells sensitive to enteroviruses and L20B expressing the cell receptor CD155 and therefore selective for polioviruses. Finally, intratypic differentiation by real-time RT-PCR is carried out in order to identify and differentiate the poliovirus serotypes in two steps: a first real-time RT-PCR to confirm the poliovirus species, the serotypes, and the nature wild-type or vaccine, and a second real-time RT-PCR to confirm the vaccine origin or not (modified VDPV strains) of the poliovirus. Our results of inoculation of the five samples on the different cell lines testify to the presence of non-polio enterovirus and of poliovirus and that all the polio strains isolated are of vaccine origin with the absence of wild-type polio strains and modified VDPV strains in the treated samples.

Key words: Enterovirus, Poliovirus, wastewater, rRT-PCR.

الملخص

تعد الفيروسات المعوية البشرية من مسببات الأمراض الشائعة جدًا في الطب البشري. هم مسؤولون عن مجموعة متنوعة من الحالات، بما في ذلك شلل الأطفال الناجم عن فيروس شلل الأطفال، ينتشر الفيروس في البيئة حيث يمكن أن يستمر لفترة طويلة .

الهدف من هذا العمل هو مراقبة انتشار الفيروسات المعوية وبشكل خاص فيروسات شلل الأطفال في المنطقة الوسطى من الجزائر في عينات بيئية من أجل مراقبة أي تداول صامت للسلاطات البرية لفيروس شلل الأطفال وسلاطات VDPV المعدلة في المجتمع . تم استهداف عدة عينات من مياه الصرف الصحي من 4 محطات معالجة في المنطقة الوسطى للبحث عن فيروسات شلل الأطفال: شنوا، وحجوت، بني مسوس والقليلة، وهو جزء من المبادرة العالمية للقضاء على الفيروس شلل الأطفال تحت رعاية منظمة الصحة العالمية من أجل إجراء تقييم دقيق لوجود وانتشار هذه الفيروسات في الجزائر. للقيام بذلك، تمت معالجة عينات مياه الصرف الصحي باتباع طريقة الفصل على مرحلتين باستخدام نوعين من بوليمرين كربوهيدرات متبوعًا بالتلقيح على زراعة الخلايا باستخدام سطرين خلويين أوصت بهما منظمة الصحة العالمية للعزل الفيروسي: خلايا RD حساسة للفيروسات المعوية وL20B التي تعبر عن مستقبل الخلية وبالتالي انتقائية لفيروسات شلل الأطفال. أخيرًا، تم إجراء التمايز الداخلي عن طريق RT-PCR من أجل تحديد الأنماط المصلية لفيروس شلل الأطفال وتمييزها في خطوتين: أول rRT-PCR لتأكيد أنواع فيروس شلل الأطفال والأنماط المصلية والطبيعة البرية أو اللقاح، والثاني لتأكيد أصل اللقاح أو لا (سلاطات VDPV المعدلة لفيروس شلل الأطفال). تشير نتائجنا لتلقيح خمسة عينات على خطوط الخلايا المختلفة إلى وجود فيروس معوي غير شلل الأطفال وفيروس شلل الأطفال وأن جميع سلاطات شلل الأطفال المعزولة من أصل لقاح مع عدم وجود سلاطات شلل الأطفال من النوع البري والسلاطة المعدلة VDPV في العينات المعالجة.

الكلمات المفتاحية: الفيروس المعوي، فيروس شلل الأطفال، مياه الصرف الصحي لأطفال، rRT-PCR

Acronyme	Description
ADNc :	Acide Désoxyribonucléique complémentaire
ARN :	Acide ribonucléique
AVS :	Activités de vaccination supplémentaire
CAR :	Coxsackievirus-Adenovirus Receptor
CV-A :	Coxsackievirus A
CV-B :	Coxsackievirus B
DAF :	Decay-Accelerating Factor
DIT :	Différenciation intratypique
DMSO :	Démethyl sulphoxyde
E :	Echovirus
ECP :	Effet cytopathique
EDTA:	Acide éthylènediaminotétracétique
ELISA :	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EMEM :	Minimal Essential Medium en sel de earl
EVNP :	Entérovirus non polio
GPEI :	Global Polio Eradication Initiative
EV :	Entérovirus
Ig :	Immunoglobulines
IRES :	Internal Ribosomal Entry Site.
IRF :	Interferon Regulatory Factor
LCR :	Liquide Céphalo-Rachidien
NC :	Non Codantes
NF-kB:	Nuclear factor-kappa B
NLR :	NOD-like receptors
NSL :	Non sabin like
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
ORF:	Open Reading Frame
P1-3:	Peptide précurseur 1-3
PABP:	Poly-A Binding Protein
PBS:	Phosphate Buffer Salin

Acronyme	Description
PCBP:	Poly-C Binding Protein
PEG:	Poluéthylèneglycol
PFA :	Pralysie flasque aigue
PRRs :	Pattern Recognition Receptors
PV :	Poliovirus
PV1-3 :	Poliovirus 1-3
PVR :	Poliovirus Receptor
RD :	Rhabdomyosarcoma
RLR :	RIG-I-like receptors
rRT PCR :	Real time Reverse Transcription Polymérase Chain réaction
SL :	Sabin Like
SNC :	Système Nerveux Central
TLR:	Toll-Like receptors
UV:	Ultra-Violet
VDPV :	Polio virus dérivé du vaccin
VP1-4 :	Virion Proteins 1-4
VPg :	Virion protein genom
VPI :	Vaccin Poliomyélitique Inactivé
VPO :	Vaccin Poliomyélitique Oral

Tableau 1 : Espèce d'entérovirus humain et leur sérotypes	4
Tableau 2 : Les différents pathologies associées aux poliovirus et aux entérovirus non polio.....	17
Tableau 3 : Programme de la RT-PCR en temps réel.....	33
Tableau 4 : Résultats finaux d'inoculation	37
Tableau 5 : Résultats finaux de la RT-PCR en temps réel.....	41

Figure 1 : Stèle égyptienne représentant une victime de poliomyélite	3
Figure 2 : Représentation schématique du génome d'un EV.....	6
Figure 3 : Structure de la capsid d'un entérovirus	6
Figure 4 : Maturation de la polyprotéine virale par clivage successif	9
Figure 5 : Réplication du génome d'un entérovirus	10
Figure 6 : Cycle de multiplication d'un entérovirus.....	11
Figure 7 : Le parcours du virus dans l'organisme	14
Figure 8 : Protocole de la trypsination	24
Figure 9 : Comptage de cellules à l'aide d'un hémodécomètre (Neubauer).....	25
Figure 10 : Récupération du concentrat à partir de l'ampoule de décantation	27
Figure 11 : Génome du poliovirus.....	31
Figure 12 : Principe des sondes d'hydrolyse " Taq Man "	32
Figure 13 : Cellules RD témoin sous microscope optique.....	34
Figure 14 : Cellules L20B témoin sous microscope optique	34
Figure 15 : ECP à 25% sur lignée L20B	35
Figure 16 : ECP à 75% sur lignée RD.....	36
Figure 17 : ECP à 100% sur lignées L20B	36
Figure 18 : Résultats de la rRT-PCR pour DIT des échantillon positifs Sabin 1.....	38
Figure 19 : Résultats de la rRT-PCR pour DIT des échantillon positif sabin 3.....	38
Figure 20 : Contrôle positif de la réaction rRT-PCR pour DIT	39
Figure 21 : Contrôle négatif de la réaction rRT-PCR pour DIT	39
Figure 22 : Résultats de la rRT-PCR pour VDPV des échantillons positifs sabin 1 et sabin 3	40
Figure 23 : Contrôle positif de la réaction rRT-PCR pour VDPV	40
Figure 24 : Contrôle négatif de la réaction rRT-PCR pour VDPV	41

Terme	Définition
Poliovirus sauvage	Ce sont des souches qui apparaissent de manière naturelle
Poliovirus vaccinal	Ce sont des souches de virus du vaccin antipoliomyélitique orale (VPO) atténuée
Souche modifiées VDPV	Ce sont des souches de virus du VPO présentant une divergence $>1\%$ (ou ≥ 10 différences nucléotidiques, pour les types 1 et 3) ou une divergence $>0,6\%$ (≥ 6 différence nucléotidiques pour le type 2) par rapport à la souche correspondante du VPO dans la région génomique VP1 complète

Remerciements**Dédicaces****Résumés****Abstract****الملخص****Liste des abréviations****Liste des tableaux****Liste des figures****Glossaire**

Introduction 1

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Les Entérovirus

I. Historique..... 3

II. Généralités 4

II.1. Classification 4

II.2. Structure..... 5

II.2.1. Génome et protéines virales 5

II.2.2. La capside 6

II.3. Propriétés physico chimiques 6

II.4. Evolution génomique..... 7

II.5. Epidémiologie et transmission..... 7

III. Relations des entérovirus humains avec leur hôte 8

III.1. Cycle de multiplication 8

III.1.1. La phase précoce 8

III.1.2. La phase répllicative..... 8

III.1.3. La phase de libération 11

III.2. Effet de la multiplication virale sur la cellule hôte 11

III.3. Réponse immunitaire..... 12

III.3.1. Immunité innée ou naturelle.....	12
III.3.2. Immunité adaptative ou acquise.....	12
Chapitre II : Pouvoir pathogène des EV	
II. Le poliovirus.....	13
II.1. Parcours du virus dans l'organisme	13
II.2. Signes cliniques	14
III. Entérovirus non polio	15
III.1. Manifestations cliniques.....	15
IV. Prévention et vaccination	18
V. diagnostic virologique	19
V.1. Diagnostic direct.....	20
V.2. Diagnostic indirect	21
Matériel et méthodes	
I. Echantillonnage.....	22
II. Préparation et entretien de la culture cellulaire	22
II.1. Congélation des lignées cellulaires.....	23
II.2. Décongélation des cellules	23
II 3. Trypsination et numération cellulaire.....	23
II 3.2. La trypsination.....	24
II 3.3. La numération cellulaire	24
III. Préparation des échantillons d'eaux usées	25
III.1. Concentrations des échantillons en particules virales	26
III.2. Traitement du concentrât d'eau usée	27
IV. Inoculation sur lignées cellulaires.....	28
V. Identification moléculaire des poliovirus par RT-PCR en temps réel.....	31
V.1. La différenciation intratypique et le screening VDPV	32

Résultats

I. Résultats de la culture cellulaire	34
I.1. Cellules non inoculées	34
I.2. Inoculation sur RD et L20B	35
I.2.1. Passage P0.....	35
I.2.2. Passage P0+1	36
I.2.3. Passage des prélèvements positifs	37
II. Identification moléculaires par RT-PCR en temps réel.....	37
II.1. La différenciation intratypique	37
II.2. Le screening VDPV	39
Discussion.....	42
Conclusion.....	44
Références bibliographiques	
Annexes	

Introduction

Introduction :

Les Entérovirus humains (HEV) sont des agents pathogènes très communs en médecine humaine et vraisemblablement responsables d'infections très fréquentes puisqu'estimées à près de 1 milliard chaque année dans le monde (**Andreoletti et al., 2009**).

Les Entérovirus humains appartiennent à la famille Picornaviridae, genre Entérovirus, ils sont divisés en quatre groupes : HEV A, HEV B, HEV C, HEV D (**Renois et al., 2014**). Ces virus à ARN (acide ribonucléique) simple brin de polarité positive sont entourés d'une capside icosaédrique composée de 60 protomères, chaque protomère est composé de quatre protéines virales (VP1 à VP4).

La transmission du virus est interhumaine et se fait principalement par voie fécale-orale, mais également par voie aérienne. Ces derniers survivent relativement longtemps dans le milieu extérieur et particulièrement dans l'environnement, (**Coyne, 2019**).

Les entérovirus sont responsables d'affections variées, parmi lesquelles figure la poliomyélite, une maladie infectieuse et contagieuse causée par l'un des trois sérotypes de poliovirus (PV1, PV2, PV3), il en résulte une paralysie flasque, une atteinte musculaire causant une amyotrophie, et dans la forme la plus grave une atteinte du centre respiratoire bulbaire qui met en jeu le pronostic vital (**Mehndiratta et al., 2014**).

En 1988, Le programme mondial d'éradication de la poliomyélite (GPEI) a été lancé par l'organisation mondiale de la santé. Celui-ci consistait en une couverture vaccinale de routine élevée avec au moins 3 doses de VPO en plus de la dose à la naissance, l'organisation de "journées nationales de vaccination" particulièrement pour les enfants de moins de cinq ans, la surveillance virologique de tous les cas de paralysie flasque aiguë (PFA) chez les enfants de moins de quinze ans par des laboratoires accrédités, et par les activités de vaccination supplémentaire AVS pour interrompre les dernières chaînes de transmission du poliovirus sauvage. (**WHO 2004**).

Cette stratégie a permis d'enregistrer un recul important de nombre de cas de poliomyélite dans tous les pays, seuls deux pays restent endémiques (Afghanistan et Pakistan).

Ce programme est complété d'une surveillance systémique de l'environnement « eaux usées » qui a pour principaux objectifs :

- La Détection des PV circulant afin de soutenir la surveillance des PFA.

- De donner des indications précoces de nouvelle importation de PV dans les zones exemptes de polio et l'identification de poliovirus sauvage dans les zones d'endémie.
- Fournir des preuves sur la disparition des poliovirus dérivées du vaccin VDPV, suite à l'utilisation du vaccin poliomyélitique orale, ce qui permet d'établir le statut de zone exemptes polio (**GPEI 2015**).

Cette surveillance a été initiée 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 afin de surveiller la circulation silencieuse des entérovirus et plus particulièrement les poliovirus.

Le but de notre présent travail est la surveillance de la circulation des entérovirus et plus particulièrement les poliovirus dans les prélèvements environnementaux afin de surveiller toute circulation silencieuse des souches sauvages de poliovirus et de souches modifiées VDPV dans la communauté en suivant la méthode de concentration biphasique par le PEG 6000 et le dextran T40 qui permet de rechercher les entérovirus dans un petit volume (500 ml d'eau usée), ces virus sont inoculés sur deux lignées cellulaires différentes RD sensible aux entérovirus et L20B hautement sélectives aux poliovirus, ensuite des régions spécifiques du génome viral des souches isolées seront amplifiées par RT-PCR en temps réel pour déterminer leurs origines : vaccinale ou sauvage.

Synthèse bibliographique

I. Historique

L'histoire des EV commence avec celle de la poliomyélite. Cette maladie est connue en Egypte depuis environ 4000 ans comme l'atteste cette stèle égyptienne représentant un individu avec une atrophie du membre inférieur droit typique de séquelle d'une poliomyélite.

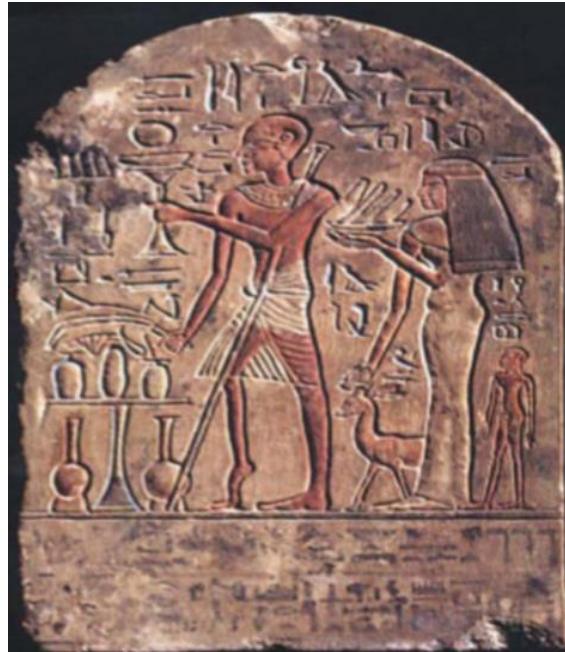


Figure 1 : Stèle égyptienne représentant une victime de poliomyélite (www.microbes-edu.org).

En 1800 les premiers symptômes de la poliomyélite ont été décrits 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 prouve 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 révèlent que l'agent étiologique de la poliomyélite paralytique aiguë était le Poliovirus (**Kristensson, 1999**). En 1936, la culture de poliovirus est réalisée in vitro à partir de tissus nerveux embryonnaires humains, par Sabin et Olitsky. En 1948, Dallford et Sickles, utilisent des souriceaux nouveau-nés comme modèle d'étude de la poliomyélite, isolent les premiers coxsackievirus. Un an après, Enders étend la culture du poliovirus à des tissus non nerveux (**Prescott et al., 2010**). Dans les années cinquante, sont apparues les premiers vaccins contre la poliomyélite : un Injectable à virus inactivés IPV (Jonas Salk 1955), l'autre orale à virus atténués VPO (Sabin 1963). 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, également dans les années 50 (**Melnick, 1996 ; Hyypia et al,**

1997). Ces nouveaux virus, n'appartenant à aucune des maladies connues, furent baptisés Echovirus.

En 1955, l'étude des Echovirus débute par une équipe de recherche. En 1957, comprenant que les echovirus, les poliovirus et les coxsackievirus forment un seul groupe viral, cette équipe de recherche définit le genre Entérovirus (**Committee on the Enteroviruses 1957**).

II. Généralités sur les Entérovirus humains

II.1. Classification

Les entérovirus humains appartiennent à la famille des Picornaviridae, qui sont associés aux rhinovirus dans le genre Entérovirus.

La classification d'origine se base en grande partie sur les caractères antigéniques et le pouvoir pathogène (**Hyypia et al.1997**), on distingue les poliovirus et les entérovirus non poliomyélitiques : coxsackievirus A, coxsackievirus B, Echovirus et Entérovirus (EV-68 à 108).

Actuellement, cette classification qui est fondée sur des critères génétiques, comportant quatre groupes d'entérovirus humains (A, B, C et D) (**tableau 1**). Les sérotypes de poliovirus qui formaient auparavant une espèce à part, sont désormais inclus dans l'espèce entérovirus C (**Abbasi et al., 2018**).

Tableau 1 : Espèce d'entérovirus humain et leur sérotypes (www.picornaviridae.com)

Espèces d'entérovirus humain	Sérotypes
Entérovirus humain type A	25 sérotypes Coxsackievirus A2-A8, A10, A12, A14, A16 Entérovirus 71, 76, 89-92, 114, 119, 120,121, 122 (SV19), 124 (SV46), 125 (BA13)
Entérovirus humain type B	63 sérotypes Coxsackievirus A9, B1-6 Echovirus 1-9, 11-27, 29-33 Entérovirus 69, 73-75,77-88, 93, 97,98,100,101,106 , 107, 110-114

Espèces d'entérovirus humain	Sérotypes
Entérovirus humain type C	23 sérotypes Coxsackievirus A1, A11, A13, A17, A19-A22, A24 Poliovirus 1-3 Entérovirus 95, 96, 99, 102, 104, 105, 109, 113, 116-117-118
entérovirus humain type D	5 sérotypes Entérovirus 68, 70, 94, 111, 120

II.2. Structure des entérovirus

Les entérovirus sont de petites particules simples constituées d'une capsidie protéique qui entoure un ARN génomique monocaténaire non segmenté de polarité positive (**Grosjean et al., 2017 ; Abbasi et al., 2018**). Ils sont non enveloppés, d'un diamètre d'environ 30 nm, ils ont été parmi les premiers virus humains à être étudiés en détail.

II.2.1. Génome et protéines virales

Le génome des EV est un ARN simple brin de polarité positive contient environ 7500 nucléotides (**Thompson et Peersen, 2004**). Il se compose d'un seul cadre ouvert de lecture (ORF) flanqué de deux régions non codantes (5'NC et 3'NC). La région située en 5' comprend environ 750 nucléotides et dépourvue de coiffe, une structure secondaire appelée IRES et associée à une petite protéine virale VPg. Elle permet de traduire l'ARN viral en protéines (**Cameron et al., 2010**). Sa conservation est au niveau nucléotidique entre les différentes espèces d'EV et possède un intérêt majeur pour leur détection moléculaire (**Renois et al., 2014**). La région en 3' d'environ 300 nucléotides se termine par une queue poly adénylée (**Raccianello et al., 2007**). Elle est impliquée dans le début de la réplication du brin de polarité négative.

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 capsidie (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, 3BVPg, protéase 3CD, et polymérase 3D) (**Figure 2**) (**Renois et al., 2014 ; Abbasi et al., 2018**).

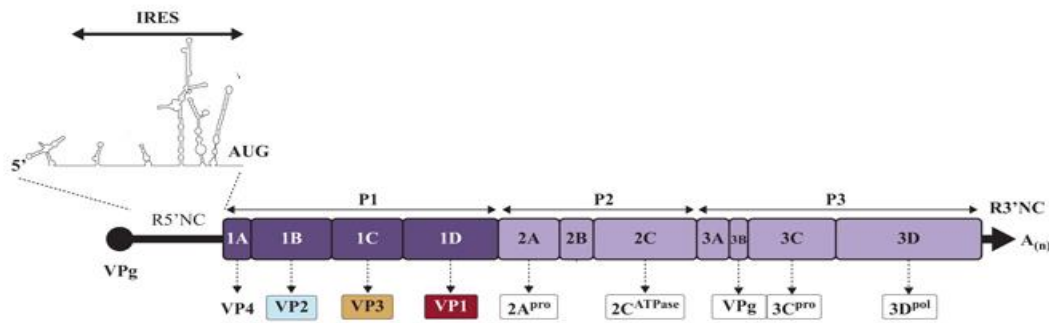


Figure 2 : Représentation schématique du génome d'un EV (Mirand *et al* 2018)

II.2.2. La capside

La capside des EV présente une structure d'un icosaèdre d'environ 30nm de diamètre, constituée de 60 copies de protéines structurales : VP1 (34 kDa), VP2 (30 kDa), VP3 (26 kDa) et VP4 (7 kDa). Ces quatre protéines constituent une sous unité ou protomère, 5 protomères s'associer pour former un pentamère et 12 pentamères constituent la capside (**Figure 3**) (Racaniello *et al.*, 2007 ; Conrad 2012 ; Grosjean *et al.*, 2016). Les protéines VP1, VP2 et VP3 forment entre elles une dépression, appelée canyon, décrite comme le site d'attachement au récepteur cellulaire humain du PV.

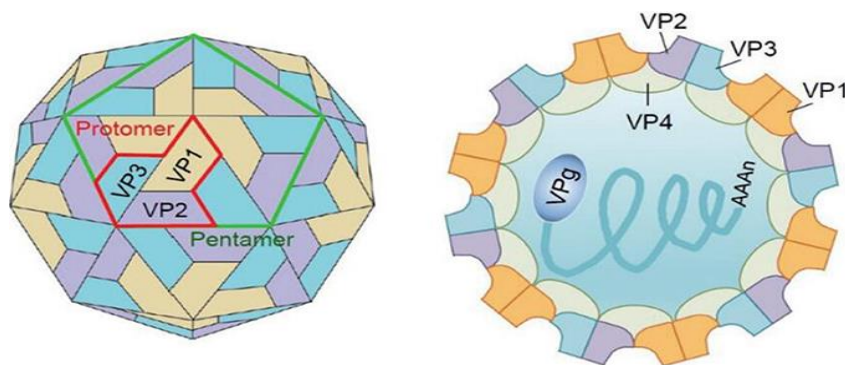


Figure 3 : Structure de la capside d'un entérovirus (Yuan *et al* 2018)

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

II.3. Propriétés physico chimiques :

Les EV résistent à beaucoup de désinfectants communs de laboratoire, y compris l'éthanol de 70 %, l'isopropanol de 5% et le Lysol dilué. Ils sont insensibles aux solvants de lipide, y

compris l'éther et le chloroforme, il est stable dans plusieurs détergents à une température ambiante. Ces virus sont inactivés par le Formaldéhyde 0,3%, glutaraldehyde, l'acide fort, le sodium hypochlorite et le chlore résiduel. Ils peuvent aussi résister quelques jours dans l'environnement, ils seront stockés jusqu'à une semaine à + 4°C, à -20°C pour une longue période et à -70°C pendant des années avec une perte mineure de leur pouvoir infectieux, mais ce dernier est détruit à une température supérieure ou égale à + 50°C. Les entérovirus sont stables à pH 3 pendant 1 à 3h d'incubation, à un pH plus bas leur pouvoir pathogène est détruit et sont aussi sensibles à l'exposition à la lumière ultra-violet (UV) (**Miriam et al 2007**).

II.4. Evolution génomique :

Au moment de réplication des EV des phénomènes de mutations et de recombinaisons surviennent à cause de la grande variété des EV. Ces processus d'évolution génétique permettent au virus de s'habituer aux modifications de l'environnement et aux diverses pressions de sélection, en changeant aussi leur capacité infectieuse et répliquative (**Renois et al. 2014**).

Les mutations ponctuelles sont provoquées par des substitutions nucléotidiques réalisées par la polymérase virale 3Dpol, enzyme dépourvue d'activité éditrice. C'est le principal processus de la diversité génétique des EV au sein d'un même génotype. Les taux de mutations ponctuelles varient selon la pression de sélection exercée sur un locus.

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 variété du génome des EV est une propriété nécessaire 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 ; Bessaud et al., 2008**).

II.5. Epidémiologie et transmission :

L'homme est le seul hôte et réservoir naturel des EVs humains (**Fleury, 2002 ; Palacios et Oberste, 2005**), ils ont été retrouvés tout le long du tube digestif, ils se transmettent particulièrement par la voie fécale-orale, indirectement par la consommation d'eau contaminée, des aliments préparés avec de l'eau contaminée ou directement par des personnes contaminées. La voie aérienne peut également intervenir dans la transmission des EV via la dispersion de gouttelettes rhinopharyngées contaminant l'épithélium respiratoire et conjonctival. C'est le

principal mode de transmission des agents de conjonctivite hémorragique aiguë, d'EV-D70 et de variant de CV-A24 (Lévêque et al., 2012). Ils sont aussi régulièrement trouvés dans les eaux usées, dans les coquillages, sur des végétaux contaminés par des aérosols, dans les eaux de surface (Fuhrman., 2005). La transmission des entérovirus est favorisée par le non-respect des règles d'hygiène universelles (la désinfection et le lavage des mains) particulièrement chez les enfants.

Les EVs peuvent suivre un profil endémique ou épidémique en fonction du génotype, du climat, de la localisation géographique, de la maladie associée et du statut immunitaire. Des cas d'infections nosocomiales à EV ont également été rapportés, principalement au sein d'unités pédiatriques (Bailly., 2000a ; Civardi., 2013).

III. Relations des entérovirus humains avec leur hôte :

III.1. Cycle de multiplication :

Un modèle de reproduction des entérovirus a été développé, c'est celui de poliovirus qui se produit dans le cytoplasme, avec une durée entre 5 et 10 heures. Il se déroule en 3 phases successives : Une phase précoce, répllicative et une phase de libération (Racaniello et al 2007).

III.1.1. La phase précoce :

La phase précoce comprend l'attachement du virus à la surface d'une cellule hôte, son entrée et la libération du génome dans le cytoplasme. La fixation du virus sur la cellule cible se produit lors de l'interférence des structures de la capsid virale avec les récepteurs spécifiques de la cellule.

Le récepteur CD155 ou PVR est spécifique au 3 génotypes de poliovirus et se compose de 3 domaines extracellulaires de type immunoglobulines, un domaine transmembranaire et d'un domaine C terminal cytoplasmique (Hafenstein et al., 2007 ; Ibrahim,W. 2014).

L'interaction entre la capsid et le récepteur PVR cause l'insertion de VP4 et de l'extrémité N-terminale de VP1 dans la membrane plasmique. Ce qui va permettre la formation d'un pore et la libération du génome viral dans le cytosol (Volle 2014).

III.1.2. La phase répllicative :

Une fois que le génome viral est libéré dans le cytoplasme il va être traduit et répliqué, et de nouvelles particules infectieuses sont assemblées.

- L'étape de Traduction :

Le génome viral est directement traduit en protéines virales, après clivage de 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 (Newman et Brown, 1997 ; Ibrahim Wafa 2014).

L'ARN viral n'étant pas coiffé à son extrémité 5', Une traduction génomique alternative sera initiée par le recrutement interne de la sous-unité 40S du ribosome au niveau de la séquence IRES située dans la région 5'NC (Pelletier et Sonenberg, 1988).

Le génome entéro-viral code pour une seule polyprotéine qui subit une série de clivages pour donner naissance à toutes les protéines structurales et non-structurales. La polyprotéine est d'abord coupée pour donner 3 peptides immatures : P1, P2 et P3.

P1 va être clivé en VP0, VP3 et VP1 par la protéase 3CD, ces protéines formeront la procapside. VP0 sera plus tard clivée en VP2 et VP4 pour donner la capsid du virion infectieux. D'autres clivages donneront : la VPg, une ATPase et l'ARN polymérase, nécessaires à la réplication.

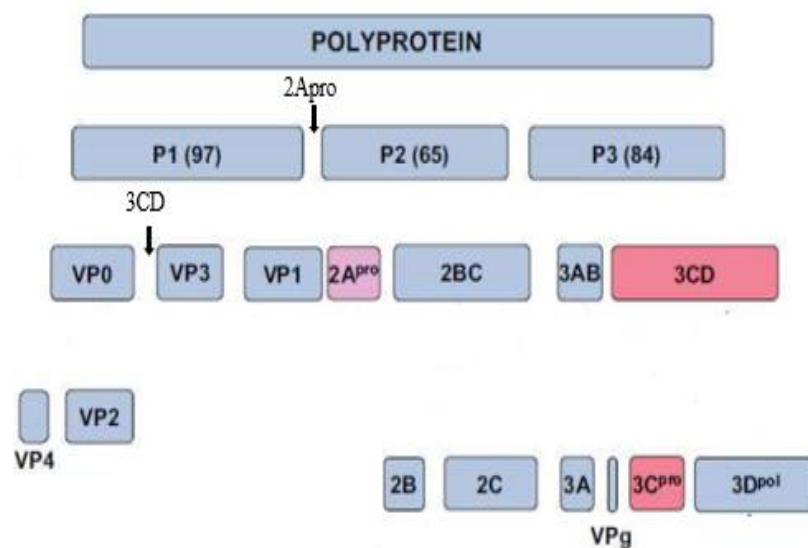


Figure 4 : Maturation de la polyprotéine virale par clivage successif (Lataud, 2015).

- L'étape de Réplication :

De nombreux travaux sur le poliovirus ont permis de concevoir un modèle des mécanismes moléculaires de la réplication génomique des EVs (Vogt et Andino., 2010). Une bascule de la traduction vers la réplication du génome viral aurait lieu, Lorsque les protéines virales sont produites en quantité suffisante.

En effet Le génome des EVs n'est pas seulement un ARNm, mais il sert aussi comme 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 mécanismes 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.

La synthèse du brin de polarité négative met en jeu des interactions protéines 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 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 préinitiation. 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**).

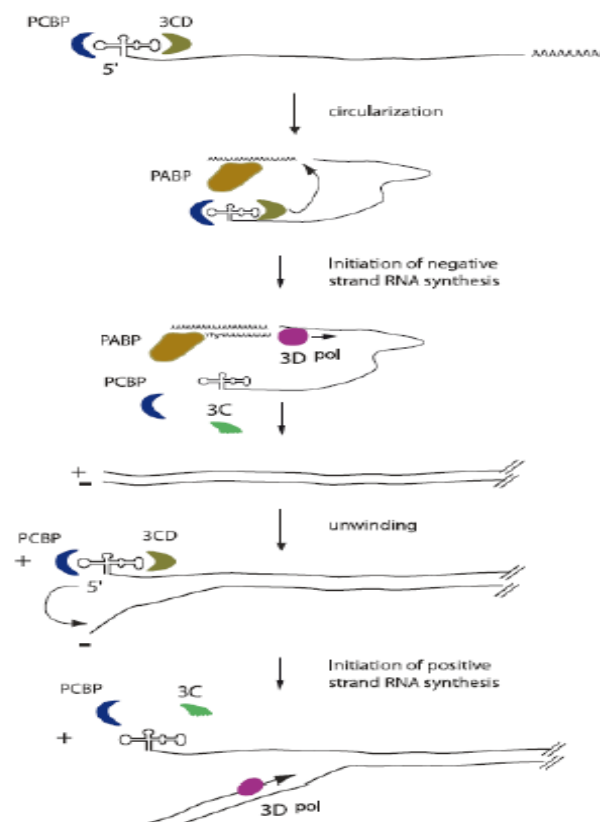


Figure 5 : Réplication du génome d'un entérovirus (**Vogt et Andino, 2010**).

III.1.3. La phase de libération :

Dans la phase de libération les unités protéiques sont assemblées et l'ARN génomique est encapsidé. Il en résulte des provirions accumulés dans le cytoplasme et qui sont ensuite libérés via deux modes : lytique et non lytique (Van Kuppeveld *et al.*, 1997 ; Volle 2014).

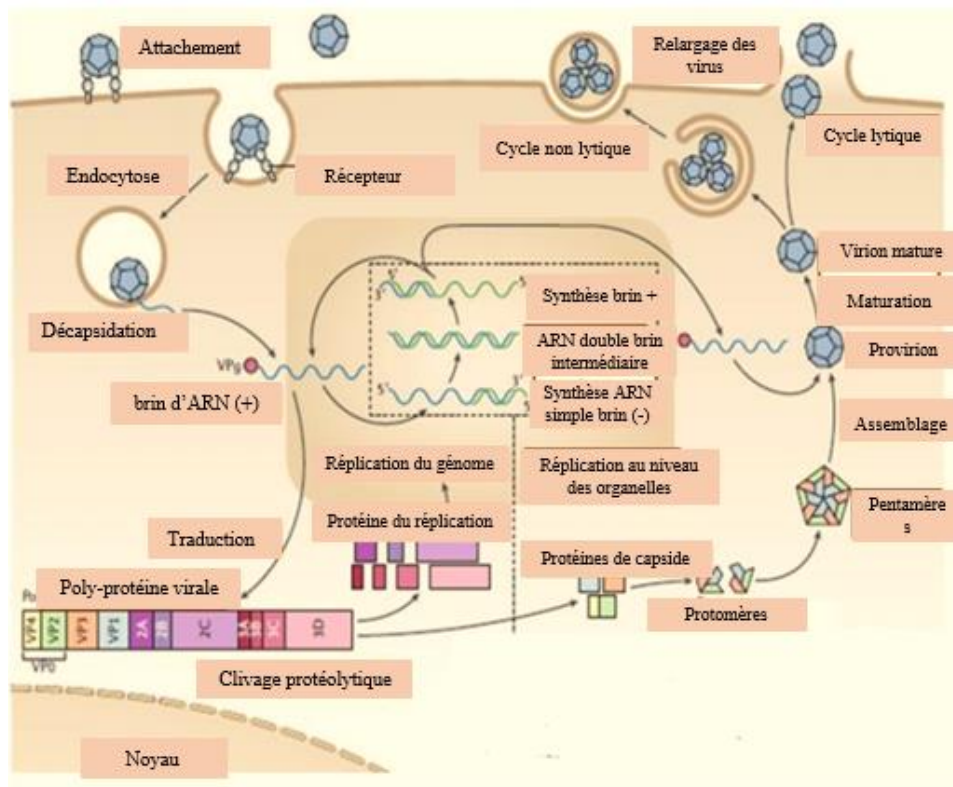


Figure 6 : Cycle de multiplication d'un entérovirus (Baggen *et al.*, 2018)

III.2. Effet de la multiplication virale sur la cellule hôte :

Les cellules infectées par les EV subissent d'importants changements morphologiques caractéristiques appelés effets cytopathiques, qui comprennent dès les premières heures de l'infection la condensation de la chromatine, une déformation du noyau, 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 observés 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 ; Ibrahim, W. 2014).

III.3. Réponse immunitaire :

III.3.1. Immunité innée ou naturelle :

La réponse immunitaire innée n'est pas suffisante pour éradiquer les EV, elle est particulièrement importante car elle représente la première défense en attendant que l'immunité humorale prenne le relais. La réponse innée est stimulée par des senseurs moléculaires, les PRRs qui existe en 3 grandes familles : les Toll-Like receptors , les RIG-I-like receptors et les NOD-like receptors (Harris et Coyne, 2013). Ces derniers vont reconnaître des motifs moléculaires hautement conservés chez les agents pathogènes (PAMPs). Ces senseurs moléculaires modifient l'expression de nombreux gènes par l'activation des facteurs de transcription Interferon Regulatory Factor et Nuclear factor-kappa B, qui vont respectivement stimuler une réponse interféron et la production de cytokines pro inflammatoires (Volle 2014).

III.3.2. Immunité adaptative ou acquise

La réponse immunitaire humorale déclenchée suite à une infection par un EV joue un rôle très important, en permettant une protection et une immunité sur une longue durée. Cette réponse humorale est basée sur la production rapide d'immunoglobulines (Ig) antivirales d'isotypes IgM, IgG et IgA.

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

II. Le poliovirus

Le poliovirus est l'agent infectieux responsable de « la Poliomyélite » qui signifie « polios » (gris) « myelos » (moelle), et du suffixe « ite » (inflammation), reflète la propension de ce virus à s'attaquer à la substance grise de la moelle épinière.

II.1. Parcours du virus dans l'organisme

Les poliovirus contaminent l'organisme au niveau de la bouche et des voies respiratoires et vont suivre un parcours, ce dernier lorsqu'il est complet, comporte quatre phases successives :

1. La Phase digestive : Dans laquelle le virus, inhalé ou plus souvent ingéré, se multiplie dans la muqueuse pharyngée et intestinale, de telle sorte qu'il soit présent dans la gorge et dans les selles.

2. La Phase de multiplication lymphatique, dans les formations lymphatiques, les amygdales, les ganglions cervicaux profonds pour la gorge, et pour le tube digestif dans les plaques de Peyer et les ganglions mésentériques (**Jean-marie Huraux et al.,2007**).

3. La Phase de virémie : Chez certains sujets, à partir des ganglions lymphatiques, le virus gagne par virémie, le système monocytes-macrophages (système réticuloendothélial et graisse brune). Il s'y multiplie, et alimente la virémie (**Jean-marie Huraux et al.,2007**).

4. La quatrième phase ne concerne que 1 à 2 % des sujets infectés : c'est l'atteinte du système nerveux central après la virémie. Cette atteinte du système nerveux central donne les paralysies flasques aiguës par l'infection et la destruction des neurones moteurs de la moelle épinière ou une méningite lymphocytaire, ou ces deux manifestations associées. Selon les cellules nerveuses atteintes, neurones ou cellules gliales, les paralysies seront définitives ou régressives (**Jean-marie Huraux et al.,2007**).

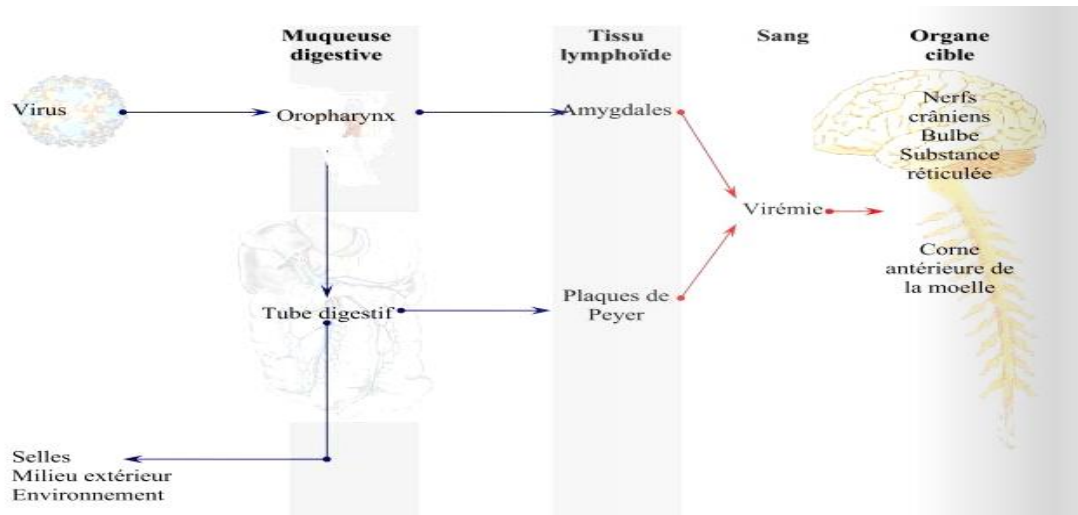


Figure 7 : Le parcours du virus dans l'organisme (Thefenne.,2008)

II.2. Signes cliniques :

Lors de l'exposition au poliovirus, l'une des réactions suivantes peut se produire : 1) infection inapparente sans symptômes, 2) maladie légère (poliomyélite abortive), 3) méningite aseptique (poliomyélite non paralysante), et 4) poliomyélite paralysante.

La durée d'incubation varie entre 3 à 21 jours, quand à la période la plus contagieuse elle s'étend de 7 à 10 jours avant ou après l'apparition de symptôme.

- Infection asymptomatique

La forme d'infection la plus courante, qui touche environ 90 % des patients est asymptomatique ou n'est marquée que par un malaise mineur (Mehndiratta et al., 2014).

- Poliomyélite abortive

La poliomyélite abortive, qui est une forme virémique légère, représente environ 4 à 8 % des infections. Il peut s'agir de gastro-entérites, de maladies de type grippal et d'infections légères des voies respiratoires, Se caractérise par de la fièvre, des malaises, de la somnolence, des maux de tête, des nausées, des vomissements, de la constipation et des maux de gorge dans diverses combinaisons, qui disparaissent généralement en une semaine (Mehndiratta et al., 2014).

- Poliomyélite non-paralytique

A ce stade le virus traverse la barrière hémato encéphalique. L'infection prend alors la forme d'un syndrome méningé dans lequel le patient présente des céphalées, photophobie, une raideur

de la nuque et des douleurs dans le dos et le cou. On observe parfois une légère faiblesse musculaire ou une paralysie transitoire.

La maladie dure de 2 à 10 jours, et la guérison est presque toujours complet. Environ 1 ou 2 % des infections suivent cette voie pendant les épidémies (**Thefenne.,2008 ; Mehndiratta et al., 2014**).

- Poliomyélite paralysante

La forme la plus grave, la poliomyélite paralytique, qui touche moins de 1 % des patients, se présente sous la forme d'épisodes atroces de douleur dans le dos et les membres inférieurs. La paralysie flasque est la marque distinctive de la maladie, avec une perte des réflexes tendineux profonds à terme. La guérison peut être complète chez certains patients, mais si la perte des fonctions motrices persiste au-delà de 12 mois, il s'ensuit une invalidité à vie. Les 3 formes de poliomyélite paralytique sont la poliomyélite spinale qui est la plus courante, marquée par une atteinte des muscles des membres inférieurs et l'apparition d'une amyotrophie, la poliomyélite bulbaire est la plus meurtrière car les neurones du tronc cérébral sont impliqués entraînant une atteinte du centre respiratoire et enfin la poliomyélite bulbo-spinale. (**Mehndiratta et al., 2014**)

Un syndrome de post-poliomyélite qui se caractérise par une faiblesse musculaire progressive, une détérioration des articulations et une augmentation des déformations du squelette. La fatigue, suite à une activité physique même minime, peut entraîner un grave handicap du fonctionnement quotidien, peut se développer chez les adultes qui ont contracté le poliovirus paralytique au cours de l'enfance.

III. Entérovirus non polio

III.1. Manifestations cliniques

Les entérovirus non poliomyélitiques peuvent être à l'origine de nombreuses maladies. Ils ont atteint plusieurs tissus comme le système nerveux central, la peau, les yeux, le cœur, le foie, le pancréas ou les muscles.

- **Système nerveux centrale :**

La méningite lymphocytaire à liquide clair à EV. Elle touche particulièrement les enfants et les adolescents et se traduit par un syndrome méningé, parfois accompagné de fièvre, de

céphalées ou de raideur de la nuque. Les virus les plus fréquemment en cause sont les coxsackievirus A, B2 et B5, les échovirus 4, 6, 9, 11,16, 30 (**Bégné et Astruc 1999**).

Les encéphalites correspondent à des cas sporadiques. L'entérovirus 71 est une cause connue d'infection du SNC, induisant des encéphalites. Elles peuvent être fatales ou laisse de graves séquelles neurologique, contrairement aux méningites (**Collier et Oxford 2004**).

- **Peau et muqueuse :**

Les infections de la peau et des muqueuses provoquent l'herpangine, le syndrome pied-main-bouche et La conjonctivite hémorragique.

L'herprangie peut être causée par une infection à EV-D70 et CV-A24 (**Pallansch & Roos., 2007**).

Le syndrome pied-main-bouche qui apparait surtout chez les jeunes enfants est dû essentiellement aux virus coxsackie A-16 et L'EV-71. Plus récemment, l'émergence d'infections à CV-A6 et CV-A10, avec notamment des formes atypiques a été rapportée dans plusieurs pays (**Montes et al., 2013 ; Feder et al., 2014**).

La conjonctivite aigue hémorragique est l'atteinte oculaire la plus fréquente et là plus spécifique, due à une infection par l'EV-D70 ou le CV-A24. Caractérisée cliniquement par une rougeur de la conjonctive, des douleurs oculaires, une tuméfaction de la paupière et une augmentation extrême de larmoiement (**Yin-Murphy, 1984**).

- **Tractus respiratoire :**

Les coxsackies virus et les echovirus A sont impliqués dans les infections respiratoires hautes (rhinite, laryngite, pharyngite) et basses (bronchite, pneumonie, bronchiolite), mais il n'est pas toujours facile de prouver leur responsabilité. La pneumopathie peut être causé par une infection à l'EV-D68, ces derniers sont aussi la cause de myélite paralytique aigue.

- **Cœur :**

Les virus coxsackies B sont tout particulièrement responsables de myocardite aigues et les myopéricardites chez l'enfant et l'adulte jeune. Elles surviennent chez les enfants et les adultes et peuvent être mortelles les symptômes sont fièvre, douleurs musculaires, essoufflement, tachycardie et troubles de rythmes. A l'aide des techniques de biologie moléculaire, une détection plus rapide et spécifique d'EV à partir de prélèvements de liquide péricardique ou de biopsies endomyocardiques a été faite (**Pallansch & Roos., 2007**).

Tableau 2 : Les différents pathologies associées aux poliovirus et aux entérovirus non polio (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	2,3,4,5	4,6,7,9, 11,13,30,31	70-71
Atteintes respiratoires		+	+	+	+
Pleurodynie (maladie bornhom)	-	-	+	-	-
Pneumopathie	-	9,16	4,5	-	68
Pharyngite	-	+	+	+	+
Herpangine	-	1-6,8,10,22	-	-	-
Rhinite	-	21,24	-	-	-
Myocardite	-	-	+	-	-
Péricardite	-	-	+	-	-
Atteintes cardiaques			+		
Atteintes digestives		+	+	+	

	PV	CV-A	CV-B	E	EV-68-71
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 viral	-	-	+	-	-

CVA-B : coxsakie A-B ; E : echovirus ; EV : enterovirus ; PV : poliovirus ; chiffre : sérotype ; - : négatif

IV. Prévention et vaccination :

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 d'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 donc le seul traitement reste préventif et repose sur la vaccination par les deux types de vaccins : inactivé injectable (SALK), vivant atténué orale (SABIN) très efficaces.

- Un Vaccin Poliomyélitique Inactivé Injectable développé par Jonas Salk, contenant les trois sérotypes de virus inactivés et qui induit une protection due à une bonne immunité générale. Ce vaccin doit être utilisé dans des conditions d'asepsie contrôlées.

- Un Vaccin Poliomyélitique Oral a été développé par Albert Sabin contient deux sérotypes de virus vivants à l'heure actuelle, atténués à la suite de mutations. Ce vaccin possède de multiples avantages ce qui explique qu'il ait été jusqu'à maintenant l'outil privilégié du programme d'éradication : il est facile à utiliser car il ne nécessite pas d'injection, il confère

rapidement une bonne immunité générale et une immunité locale au niveau de l'intestin, réduisant par conséquent la transmission du poliovirus sauvage. Ses principaux inconvénients sont sa mauvaise conservation aux températures ambiantes et son instabilité génétique, cause possible de cas extrêmement rares de « poliomyélite paralytique associée au vaccin » (www.pasteur.fr).

- Stratégie vaccinale en Algérie :

Le VPO nécessite 5 doses successives, la première dose de VPO est administrée à la naissance, pour obtenir une immunisation de base, suivie de rappels aux âges de 2 mois ; 4 mois ; 12 mois ; 6ans et entre 11-13 ans, pour obtenir une vaccination complète et une immunité durable. Une seule dose de PVI à l'âge de 3 mois, conformément au nouveau calendrier national de vaccination.

V. Diagnostic virologique :

Le diagnostic virologique définit un ensemble de principes, méthodes et stratégies visant à détecter, quantifier, suivre et identifier précisément les infections virales humaines. Les infections virales fréquentes chez les sujets immunodéprimés nécessitent tout particulièrement des diagnostics rapides et le suivi des traitements antiviraux.

Le diagnostic virologique fait appel à deux groupes de techniques réalisant soit :

- 1- La mise en évidence du virus ou de ses constituants (diagnostic virologique direct)
- 2- La réponse immunitaire spécifique (diagnostic virologique indirect)

A cause de la variété antigénique des EV et de la capacité de réactions croisées, le diagnostic indirect à un intérêt limité dans le cas des infections à EV. Au contraire, une meilleure compréhension de la structure du génome des EV a permis le développement des techniques directes par détection du génome viral.

Les prélèvements des échantillons doivent être effectués à partir d'un prélèvement de gorge (au tout début de l'infection), de selles (où la présence virale est prolongée) et, selon le tableau clinique constaté, de liquide céphalo-rachidien (LCR), de vésicules ou d'un prélèvement conjonctival (**Fleury, 2002**).

Au laboratoire les échantillons biologiques destinés à la biologie moléculaire doivent être conservés à -80°C pour préserver l'intégrité du génome. Les autres prélèvements peuvent être conservés à -20°C (**Agut et al., 2007**).

V.1. Diagnostic direct :

- Isolement sur culture cellulaire :

La majorité des isolements sont retirés après inoculation de cellules cultivées en monocouche ou en suspension.

D'une manière générale les cellules cultivées sont de 3 types : cellules hétéropléides en lignée continue à partir de cellules cancéreuses, cellules diploïdes à partir de cellules embryonnaires, cellules obtenues directement d'un tissu (primoexplantation).

Après incubation, la mise en évidence de la multiplication virale est possible. Elle se fait par un examen en contraste de phase de nappe cellulaire à la recherche d'un effet cytopathique (ECP) caractéristique des EV. Ces ECP se traduisant par l'apparition de grandes cellules réfringentes se généralisant à l'ensemble du tapis cellulaire 2 à 12 jours après l'inoculation (**Grosjean et al., 2011**). Pour assurer que le virus isolé dans des cultures cellulaires est un EV, il est possible d'effectuer un test rapide à l'aide d'un antigène spécifique de groupe partagé par la plupart des sérotypes d'EV et situé dans la protéine VP1 (**Apostol et al., 2012**)

- Détection Moléculaire :

L'application des techniques de biologie moléculaire à la virologie clinique a changé significativement les approches du diagnostic des entérovirus, beaucoup de ces procédures ont déjà supposé les méthodes traditionnelles de détection et de caractérisation.

La première procédure est basée sur la technique Reverse Transcription Polymérase chain réaction en temps réel, qui est une technique d'amplification en ciblant des séquences localisées dans la région 5' NC, hautement conservée chez les EV (**Pillet et al., 2010 ; Harvala et al., 2018**). Elle permet un diagnostic étiologique rapide des infections à EV et cela quel que soit le type de prélèvement. C'est donc une technique générale 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 (**Zoll et al., 2009 ; Leveque et al., 2012**).

Nouvellement, l'amplification et le séquençage moléculaire des séquences codant une partie des gènes des protéines de capsid VP1 ou VP4/VP2, permettent de faire une identification génotypique des souches d'EV. Cette approche technique est particulièrement importante quand la souche est non cultivable et elle permet de réaliser des études d'épidémiologie moléculaire (suivi épidémiologique des souches, identifications des infections nosocomiales...) (**Shabani et al., 2018**).

V.2. Diagnostic indirect :

Les techniques indirectes ou sérologiques sont basées sur la recherche des anticorps anti-EV dans le sérum. Ces méthodes ont connu une progression limitée à cause de la multiplicité des sérotypes et de l'absence d'antigène de groupe pour les EV. La séroneutralisation, bien qu'elle soit lourde et coûteuse, reste la méthode sérologique la plus utilisée. Elle est basée sur l'inhibition du pouvoir infectieux du virus avec un antisérum donné. Deux sérums correspondant aux périodes aiguë et convalescente sont testés en parallèle à la recherche d'une séroconversion ou d'une variation significative du titre d'anticorps dans la phase tardive par rapport à celui de la phase précoce.

D'autres techniques indirectes telle que la fixation du complément et l'inhibition de l'hémagglutination ont également été développées mais sont rarement appliquées par manque de sensibilité. En effet, les anticorps qui fixent le complément présentent de nombreuses réactions croisées hétérotypiques. De même, tous les EV n'agglutinent pas les érythrocytes. Des tests ELISA détectant les IgM et les IgG sont également disponibles mais les réactions croisées entre sérotypes rendent l'interprétation des résultats très complexe (**ibrahim, w. 2014**).

Matériel et Méthodes

Ce travail a été réalisé à l'Institut Pasteur d'Alger, Laboratoire des Entérovirus, Laboratoire National de Référence OMS pour la surveillance de la Poliomyélite en Algérie, pour une durée de stage de 1 mois du 16 Février 2020 au 17 Mars 2020 au lieu des 3 mois prévus pour cause de COVID19.

L'objectif de la présente étude est la surveillance de la circulation des entérovirus et plus particulièrement les poliovirus dans les prélèvements environnementaux afin de surveiller toute circulation silencieuse des souches sauvages de poliovirus et de souches modifiées VDPV dans la communauté.

I. Echantillonnage (prélèvement par la techniques GRAB) :

L'échantillonnage a été réalisé en récoltant des échantillons d'eaux usées à partir de cinq stations d'épuration : Chenoua, Hadjout, Beni-Messous et Kolea.

Nous avons pu traiter que cinq échantillons d'eaux usées au lieu de quinze programmés au départ à cause de l'interruption de notre stage par la pandémie COVID-19 et le confinement qui s'en est suivi.

- Un échantillon d'un litre de liquide d'eau usée brute est collecté dans un flacon en plastique, propre et hermétique au niveau de l'entrée du tube collecteur après dégrillage à l'aide d'un seau. L'échantillon est conservé à une température réfrigérée de 4°C avant et pendant son transport vers le laboratoire (**GPEI 2015**). La récolte des échantillons d'eaux usées se fait à deux horaires pour la stations de Beni-Messous.

Les entérovirus sont isolés sur culture cellulaire et identifiés par RT-PCR en temps réel conformément aux recommandations de l'OMS.

II. Préparation et entretien de la culture cellulaire :

L'inoculation des entérovirus (particulièrement les poliovirus) sur culture cellulaire, exige la mise en culture de ces derniers, dans 2 lignées cellulaire « RD et L20B » sensible aux entérovirus (**GPEI 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 sensible et hautement sélectives

aux poliovirus qui produisent un ECP caractéristique. Néanmoins, certains virus non polio 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.

II.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.

II.2. Décongélation des cellules :

Les deux lignées cellulaires vont être décongelées avant trypsination. Cela se fait dans un bain marie à 36°C quelques secondes. La suspension cellulaire sera immédiatement transférée dans une boîte de 75cm² avec du milieu de culture Minimum Essential Medium en sel de Earl « MEM », supplémenté de 10 % de sérum de veau fœtal (SVF), 1% de Glutamine, et de 1% pénicilline-streptomycine. 6 à 8 heures après le milieu est changé afin d'éliminer toute trace du DMSO présent dans l'ancien milieu, celui-ci étant toxique pour les cellules en culture.

II.3. Trypsination et numération cellulaire

Après avoir examiné l'état de cellules, la confluence, présence ou absence de contamination ou d'une toxicité, une trypsination et numération cellulaires sont effectuées trois fois par semaine (WHO 2004).

❖ Le milieu de culture :

Le milieu de culture utilisé est le MEM (Minimum Essential Medium) en sel de Earl, est constitué des acides aminés, des sels minéraux, du glucose, vitamines, bicarbonate de sodium, rouge de phénol.

Le milieu complet est constitué de sérum veau fœtal (SVF) et des additifs qui sont filtrés avant d'être ajoutés au milieu :

- Le milieu à 2% SVF est appelé milieu de survie « MS »
- Le milieu à 10% est appelé milieu de croissance « MC »

- Les additifs :

- Sérum de veau fœtal (2% ou 10%)
- Acide aminé (L-glutamine à 1%)

- bicarbonate à 7,5% à une concentration de 1% dans la solution.
- Antibiotiques (100UI/ml Pénicilline G et 100µg/ml streptomycine) (WHO 2004).

II.3.1. La trypsination :

La trypsination est une étape importante dans l'entretien des cellules en culture, elle permet :

- Le détachement des cellules adhérentes de leur support de culture et de les dissocier entre elles.
- La digestion enzymatique par une solution stérile de trypsine-versène (EDTA) des protéines de la matrice extracellulaire formant les jonctions entre les cellules créant un tapis cellulaire.
- Lors des passages ou trypsination des cellules arrivées à confluence, la dissociation des cellules par action de la trypsine-EDTA permet de les compter afin de pouvoir les répartir à la bonne concentration dans de nouvelles boites avec un milieu de culture frais.

Ci-dessous le protocole recommandé par l'OMS pour une boîte de 75cm² (Figure 8) :

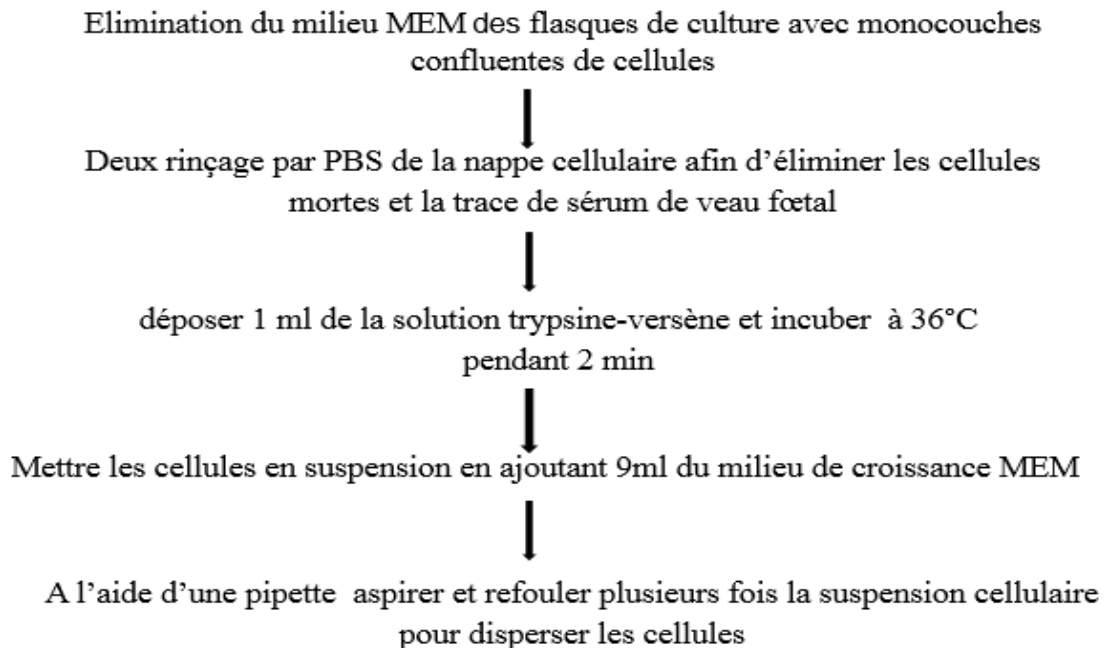


Figure 8 : Protocole de la trypsination (WHO 2004)

II.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). Les cellules sont comptées à l'aide d'un haemocytomètre (Neubauer) (**Figure 9**). Après homogénéisation à l'aide d'une pipette, cette suspension remplit les deux chambres de la cellule Neubauer. Les cellules viables sont comptées sous microscope optique pour les deux chambres (les résultats de la numération des deux chambres doivent donner au plus 20% de différence) (**WHO 2004**).

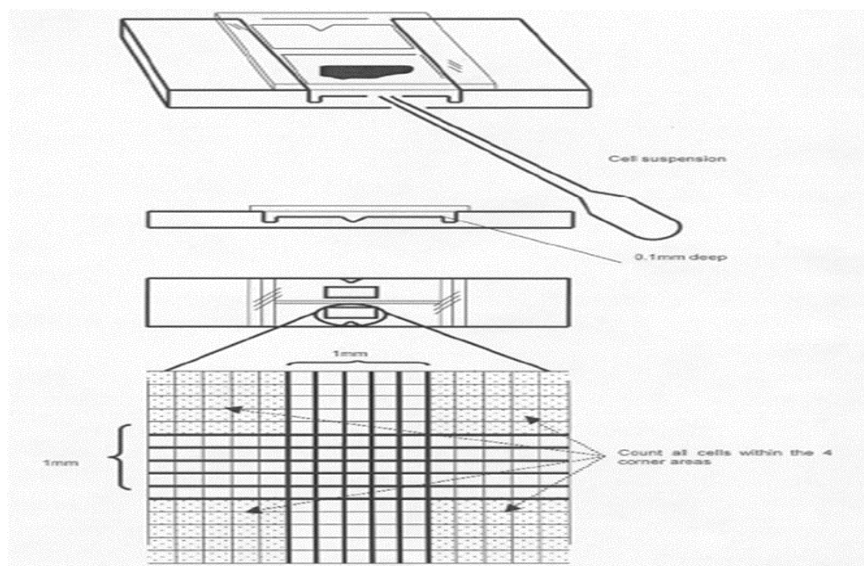


Figure 9 : Comptage de cellules à l'aide d'un hémocytomètre (Neubauer) (**WHO 2004**)

- En fonction de la concentration cellulaire calculée, en suivant la formule présentée dans **l'annexe 1**. La solution est diluée avec du milieu de culture complet à la concentration voulue avant d'ensemencer des cellules dans de nouvelles flasques, sur lesquelles sont écrit le type cellulaire, le passage, la date et le nom du milieu de culture puis incubées dans une étuve pendant 48 h à 36°C (**WHO 2004**).

III. 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 (**GPEI 2015**). En utilisant :

- Le PEG 6000 à 29% :

Le PolyEthylène Glycol est un polymère de carbohydrate 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

III.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 (GPEI 2015).

III.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 10). 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 (GPEI 2015).

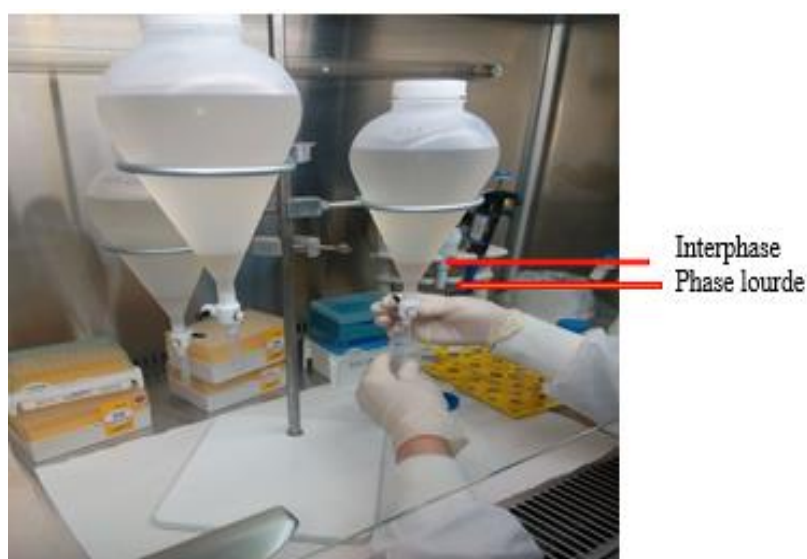


Figure 10 : Récupération du concentrât à partir de l'ampoule de décantation

IV. 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) (GPEI 2015 ; WHO 2004).

- 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 (GPEI 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 toute les lectures ont été noté comme suit : de (+ à +++) pour indiquer les cellules infectées

+ : plus de 25 % de cellules infectées ; ++ : entre 25-50% ; +++ : entre 50-75% et + + + + : entre 75- 100%.

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

- Si un ECP apparait, 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 dû suit 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 boites sont congelées et décongelées trois fois puis centrifuger, filtrées et inoculées dans une autre boite de la même lignée cellulaire.

❖ **Passage des prélèvements négatifs P0+1 (passage aveugle)**

Ça consiste au passage des suspensions cellulaires négatives en P0 vers des cellules fraîches de la même lignée.

Les boites P0 sont congelées puis décongelées, 0,5ml de la boite Fx P0 sont inoculés dans la boite Fx P0+1 Fraichement préparée puis incubée dans l'étuve à 36°C. Une lecture quotidienne au microscope pendant 5 jours est effectuée pour surveiller l'apparition d'ECP.

- Si aucun ECP n'apparaît après cinq jours de lecture des boites, l'échantillon est considéré négatif aux entérovirus et sera éliminé.
- Si un ECP apparaît noter les lectures et laisser évoluer jusqu'à apparition d'un ECP d'au moins 75% (3+) et on réalise un switch.

❖ **Passage des prélèvements positifs (Switch)**

Tous les échantillons P0 ou P0+1 positifs sont inoculés vers des cellules fraîches de l'autre lignée c'est ce qu'on appelle un switch.

➤ **Les cellules L20B positifs L+**

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

- 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 suspect polio et sont soumis à une rRT-PCR.

➤ **Les cellules RD positifs R+**

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

switch R+L. Après avoir incubé les boîtes dans l'étuve à 36°C une lecture quotidienne pendant 5 jours sera effectuée

- 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 rRT-PCR.

V. Identification des poliovirus par RT-PCR en temps réel :

- Une différenciation intra-typique (DIT) des isolats suspects de contenir du poliovirus a été réalisée par RT-PCR en temps réel, afin de confirmer l'espèce poliovirus, le type vaccinal ou sauvage et les sérotypes. Quand un virus de type vaccinale est identifié par DIT, l'échantillon fait l'objet d'une RT-PCR en temps réel pour la recherche des VDPV afin de confirmer l'origine vaccinal ou non (modifiée VDPV), conformément aux recommandations de l'OMS (**GPEI 2015**).

Nous avons amplifié deux régions du génome :

- La région 5' non codante pour le genre Entérovirus, partie très conservée.
- La région VP1 codant les protéines structurales de la capsid.

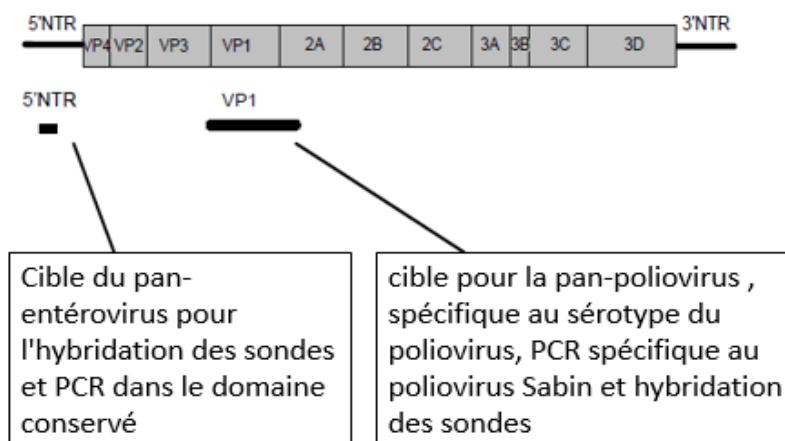


Figure 11 : génome du poliovirus (WHO 2004).

❖ Principe de la RT-PCR en temps réel :

La RT-PCR en temps réel est une technique dans laquelle les enzymes de la transcriptase inverse catalysent la synthèse de l'ADNc à partir de l'ARN, qui sert ensuite de matrice pour la réaction PCR en temps réel qui s'ensuit. La PCR en temps réel repose sur la détection et la quantification d'un émetteur fluorescent qui s'accumulent pendant la réaction d'amplification de manière directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produite.

La détection des produits d'amplification, suit le principe d'un marquage des produits de la PCR par des sondes d'hydrolyse (sondes Taq Man). Le principe de la sonde TaqMan repose sur l'activité exonucléase 5'-3' de la Taq polymérase qui clive une sonde marquée lors de son hybridation à la séquence cible complémentaire permettant l'émission d'une fluorescence. La sonde TaqMan consiste en un fluorophore (reporter) attaché de manière covalente à l'extrémité 5' (**ex** : FAM : 6-carboxyfluorescéine, TET : tétrachlorofluorescéine) et en un désactivateur (quencher) à l'extrémité 3' (**ex** : TAMRA : tétraméthylrhodamine, MGB : minor groove binder, NFQ : nonfluorescent quencher).

Si le gène cible existe dans le milieu, la sonde et les amorces s'y fixent, durant l'étape de dénaturation. La Taq polymérase débute l'élongation du nouveau brin d'ADN à partir de l'amorce jusqu'à ce qu'elle rencontre sur son passage la sonde hybridée qu'elle déplace et hydrolyse avec son activité 5'-exonucléasique. Le reporter est alors libéré de l'environnement du suppresseur permettant ainsi l'émission de fluorescence qui augmente à chaque cycle proportionnellement au taux d'hydrolyse de la sonde (**Figure 12**).

En observant la quantité de fluorescence émise à chaque cycle, il devient possible de suivre la réaction de PCR durant sa phase exponentielle où la première augmentation significative dans la quantité d'amplicons est en corrélation avec la quantité initiale de la matrice.

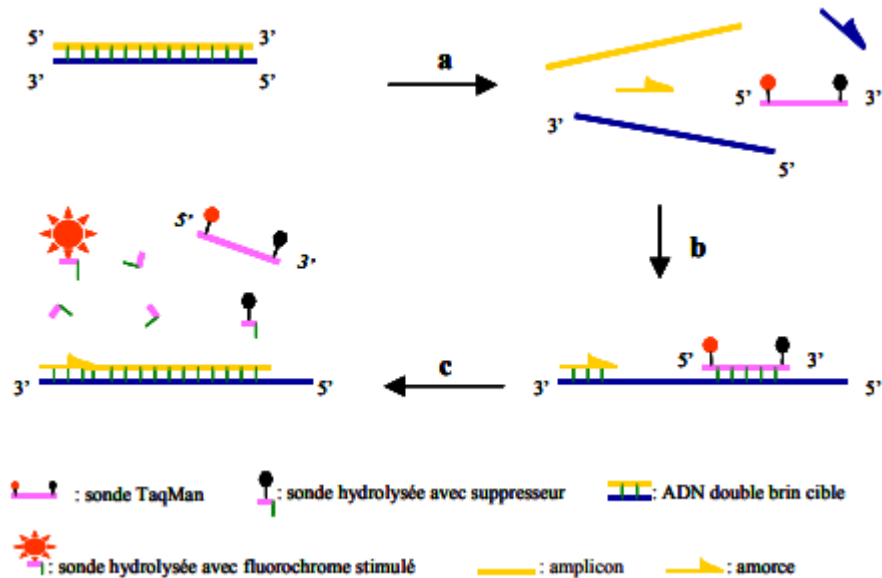


Figure 12 : Principe des sondes d'hydrolyse " Taq Man " (Poitras et Houde 2002)

Dans l'étude, nous avons procédé à une rRT-PCR en une étape « One-step rRT-PCR » qui permet en une seule étape la transcription inverse et l'amplification du génome, dans un thermocycleur ABI 7500 « Applied Biosystems ».

V.1. La différenciation intratypique (DIT) et le screening VDPV :

Avant de commencer la manipulation, les isolats L+R+ et R+L+R+ ont été congelés au congélateur à -20°C puis décongelés à température ambiante pour permettre l'éclatement des cellules et la libération des virus.

- Un mélange réactionnel a été préparé pour chacune des amorces + sondes **présenté dans l'annexe 2**. Il se compose de : Mix one-step, amorces et sondes, d'eau pure.

Les quantités correspondantes à un échantillon sont :

- 10 µL Mix one-step (qui contient les d NTPs, la transcriptase inverse, taq polymérase, MgCl₂⁺)
- 1 µL d'amorces et sondes
- 8 µL d'eau

- La quantité de master mix est déposée dans toutes les cupules de la barrette de tubes correspondant aux isolats et aux contrôles positifs.

- 1 µL de l'isolat est déposé dans les cupules correspondantes.
- Les contrôles positifs sont déposés dans les cupules correspondantes, pour :

➤ **La différenciation intra typique :**

- 1 µL de contrôles positif sabin est déposée dans les cupules contenant les amorces+sondes quadruplex, Panpolio et poliovirus 2.

- 1 µL de contrôles positif WPV1 est déposée dans la cupule contenant les amorces+sondes WPV1.

- 1 µL de contrôles positif WPV3 est déposée dans la cupule contenant les amorces+sondes WPV3-I et WPV3-II.

- Nous ne déposons aucun autre volume dans les cupules des contrôles négatives.

➤ **Le screening VDPV :**

- 1 µL de contrôles positif PV1 est déposée dans la cupule contenant les amorces+sondes PV1.

- 1 µL de contrôles positif PV3 est déposée dans la cupule contenant les amorces+sondes PV3.

- Après une centrifugation, la RT-PCR en temps réel est effectuée dans le thermocycleur ABI 7500 « Applied Biosystems », selon le programme suivant (**Tableau3**) :

Tableau 3 : Programme de la RT-PCR en temps réel (GPLN GP2 Appendix)

Etapes	Température et durée de cycle
Transcription inverse (RT)	50°C pendant 30min
Inactivation de la transcription inverse	95°C pendant 1min
Dénaturation	95°C pendant 15 secondes
Hybridation	50°C pendant 45 secondes
Elongation	50°C-72°C pendant 5 secondes

} 30
Cycles

- La Sélection d'un filtre fluorescent adéquat pour chaque sonde permet la lecture des courbes obtenues (**GPLN GP2 Appendix**).

Résultats

I. Résultats de la culture cellulaire :

I.1. Cellules non Inoculées :

❖ **Les cellules RD :**

Les cellules de la lignée RD témoin se présentent sous microscope optique inversé comme une monocouche de cellules adhérentes à morphologie fusiforme (**Figure 13**).

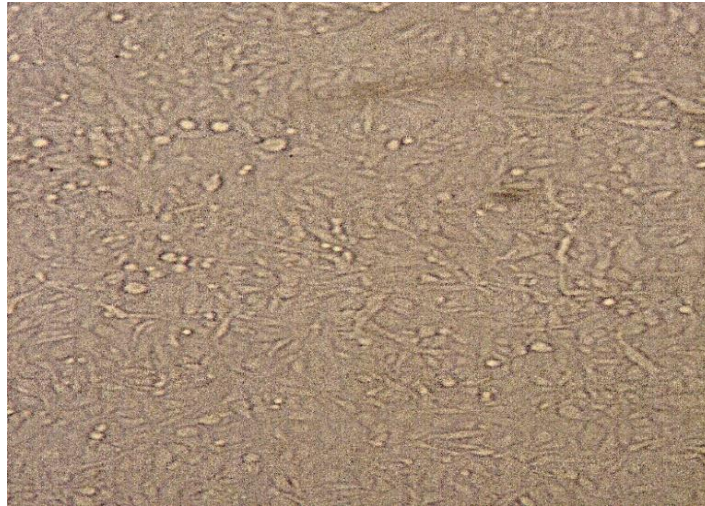


Figure 13 : Cellules RD témoin sous microscope optique

❖ **Les cellules L20B :**

Les cellules de la lignée L20B témoin se présentent sous microscope optique inversé comme des cellules adhérentes à morphologie polymorphe (**Figure 14**).

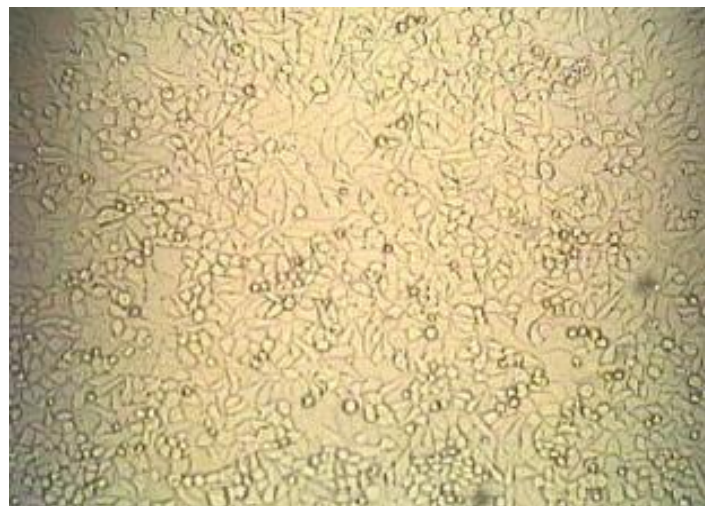


Figure 14 : Cellules L20B témoin sous microscope optique

I.2. Inoculation sur RD et L20B :

I.2.1. Passage P0 :

L'inoculation sur les cellules RD et L20B montrent un changement morphologique (ECP) caractéristique des entérovirus : cellules arrondies, réfringentes, se détachant du tapis cellulaire et se regroupant en amas, par cause de présence d'entérovirus dans échantillon d'eau usée. L'ECP peut atteindre 25%, 50 à 75% ou 75 à 100% des cellules.

- Les premiers foyers d'ECP apparaît après environ 24 à 48 d'inoculation, se manifeste par des cellules arrondies, réfringentes, se détachant du tapis cellulaire et se regroupant en amas. (**Figure 15**)

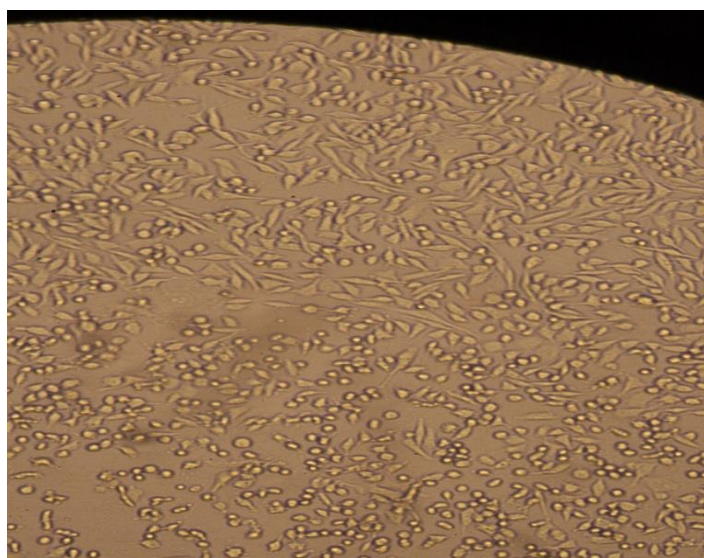


Figure 15 : ECP à 25% sur lignée L20B

- Les échantillons présentant un ECP à 25%-50 % sont suivis pendant 5 jours jusqu'à ce que l'infection atteigne 75% à 100% des cellules suite à l'amplification des virus (**Figure 16,17**)

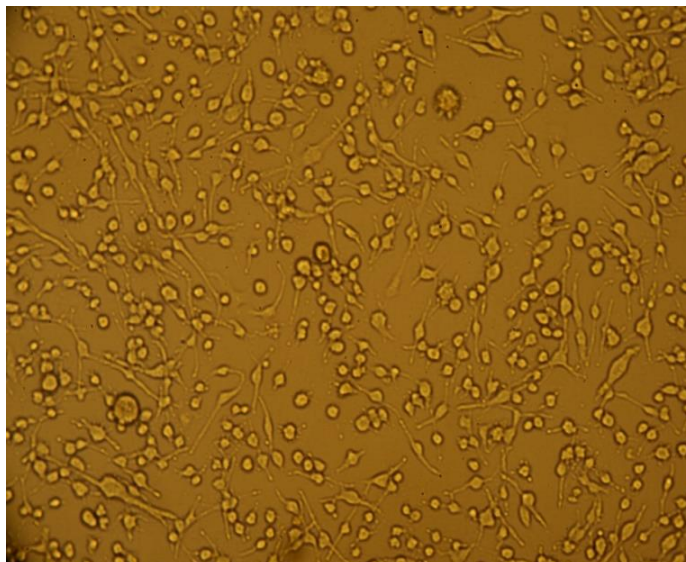


Figure 16 : ECP à 75% sur lignée RD

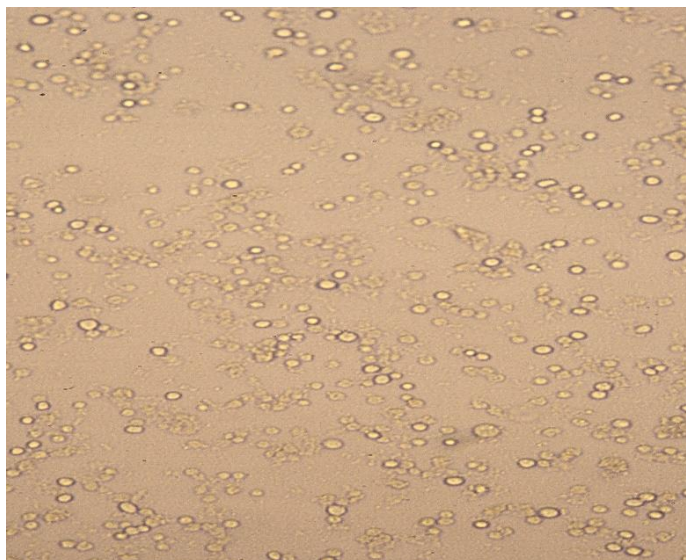


Figure 17 : ECP à 100% sur lignées L20B

I.2.2. Passage P0+1 :

- Les échantillons qui ne présentent pas d'ECP, ré-inoculés sur la même lignée cellulaire fraîche, ont donné un ECP à 25%-50% confirmant la présence d'entérovirus dans l'échantillon.
- Les échantillons qui ne présentent pas d'ECP après le passage P0+1 sont considérées comme entérovirus non polio (**EVNP**).

I.2.3. Passage des prélèvements positifs :

Les échantillons P0 et P0+1 positif, ré-inoculer sur lignée opposée présentent un ECP sont considéré suspect polio, pour les échantillons qui ne présentent pas d'ECP sont considérées comme entérovirus non polio (EVNP)

- Parmi les cinq échantillons qu'on a étudiés, quatre échantillons ont présenté un ECP. (Tableau 4)

Tableau 4 : Résultats finaux d'inoculation

Echantillons	EU001	EU002	EU003	EU004	EU005
Résultats sur L20B	++++	++++	++++	++++	----
Interprétation	PV	PV	PV	PV	EVNP

EU001 : Chenoua ; EU002 : Hadjout ; EU003 : Benimessous ; EU004 : Benimessous ; EU005 : Kolea.

II. Identification moléculaires par RT-PCR en temps réel

II.1. La différenciation intratypique

Une différenciation intratypique a été réalisée par rRT-PCR sur les quatre échantillons positifs aux poliovirus, isolés sur culture cellulaire, à l'aide des sondes :

- Pan EV ciblant la région 5' non codante
- Sabin 1, Sabin 2, Sabin 3, Pan PV, WPV3-I, WPV3-II, PV2 ciblant la région VP1, pour permettent d'identifier le poliovirus sauvage de poliovirus vaccinal.

Quatre échantillons on donner un résultat positif au poliovirus vaccinale (Sabin Like **SL**), aucun poliovirus de type sauvage (Non Sabin like **NSL**) a été détecter. Les sérotypes vaccinales obtenu sont le SL1 et SL3 (**Figure 18, 19**).

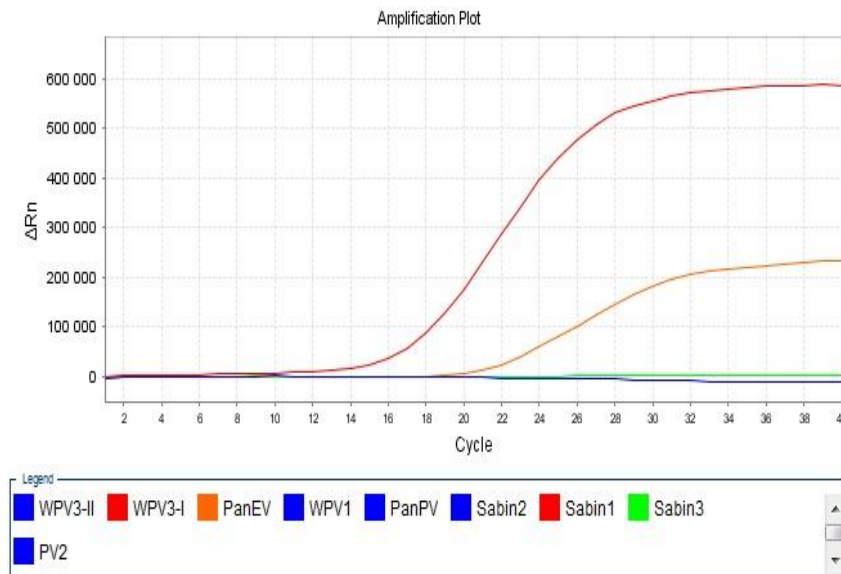


Figure 18 : Résultats de la rRT-PCR pour DIT des échantillons positifs Sabin 1

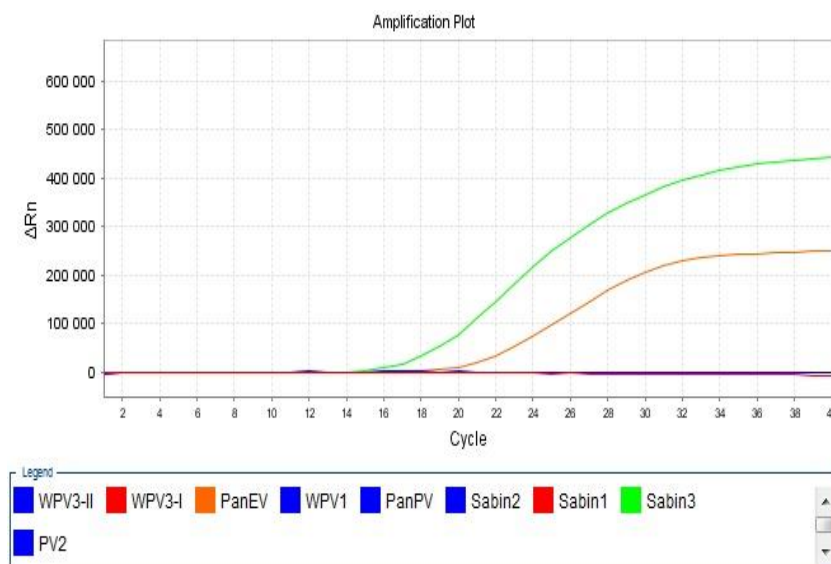


Figure 19 : Résultats de la rRT-PCR pour DIT des échantillons positifs sabin 3

- Les courbes sont lus on les comparant avec les courbes du control positif et négatif (Figure 20,21)

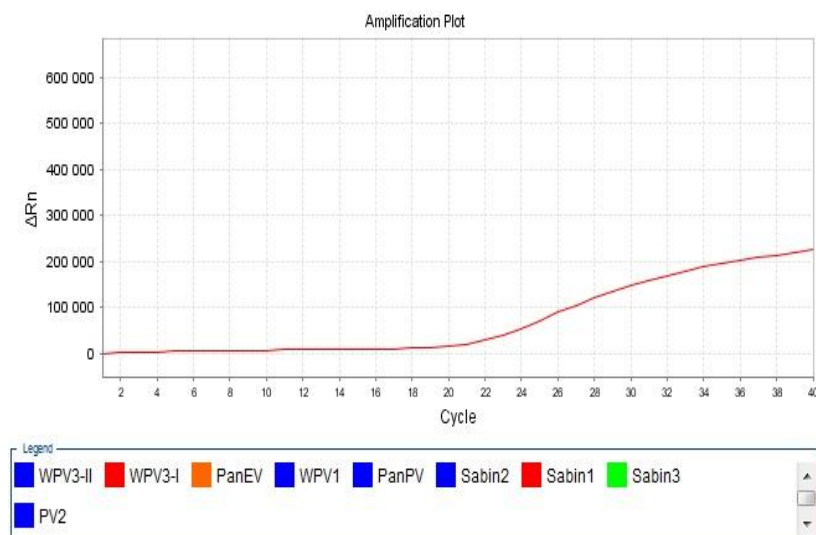


Figure 20 : Contrôle positif de la réaction rRT-PCR pour DIT

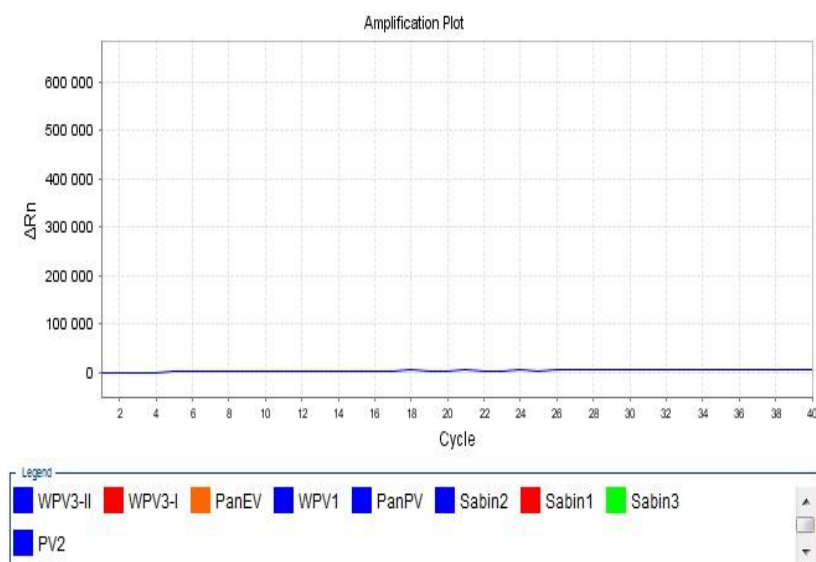


Figure 21 : Contrôle négatif de la réaction rRT-PCR pour DIT

II.2. Le screening VDPV :

Le screening VDPV est réalisé pour les quatre échantillons positifs pour le poliovirus de type vaccinale 1 et 3 à l'aide des sondes Sabin 1 VDPV VP1 et Sabin 3 VDPV VP1.

La RT-PCR nous a permis, donc, de confirmer les échantillons contiennent le poliovirus vaccinal 1 et 3 (**Figure 22**).

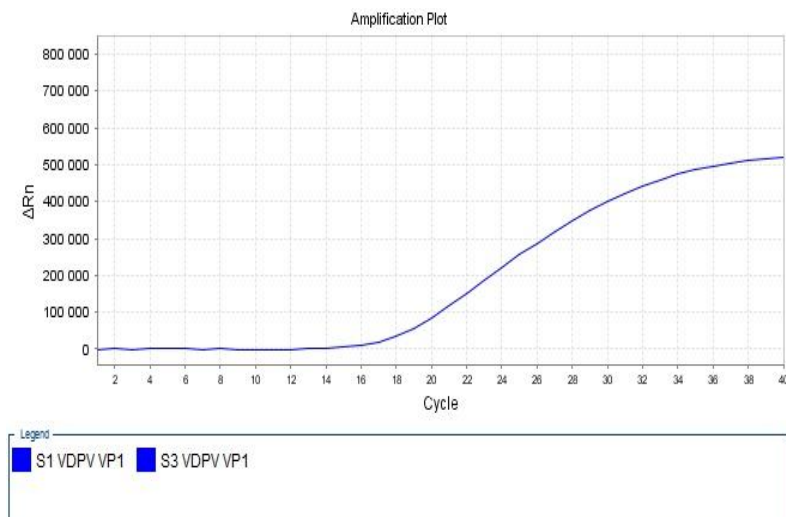


Figure 22 : Résultats de la rRT-PCR pour VDPV des échantillons positifs sabin 1 et sabin 3

- Les courbes sont lues on les comparant avec les courbes du control négatif et Positif

(Figure 23,24)

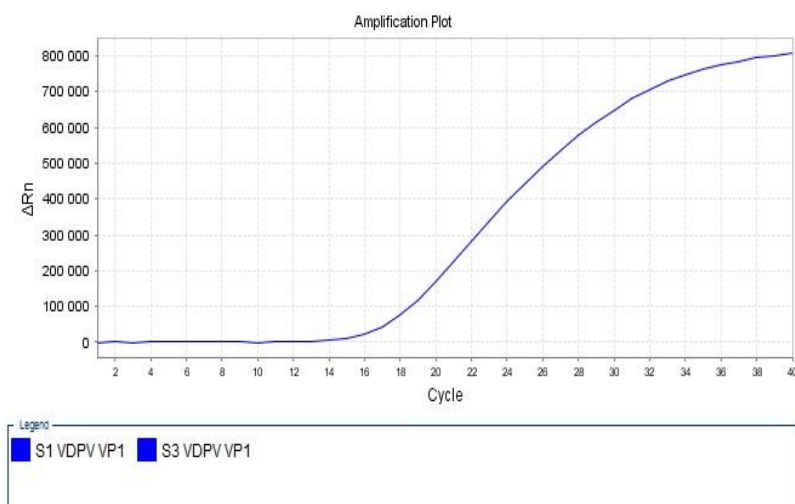


Figure 23 : Contrôle positif de la rRT-PCR pour VDPV

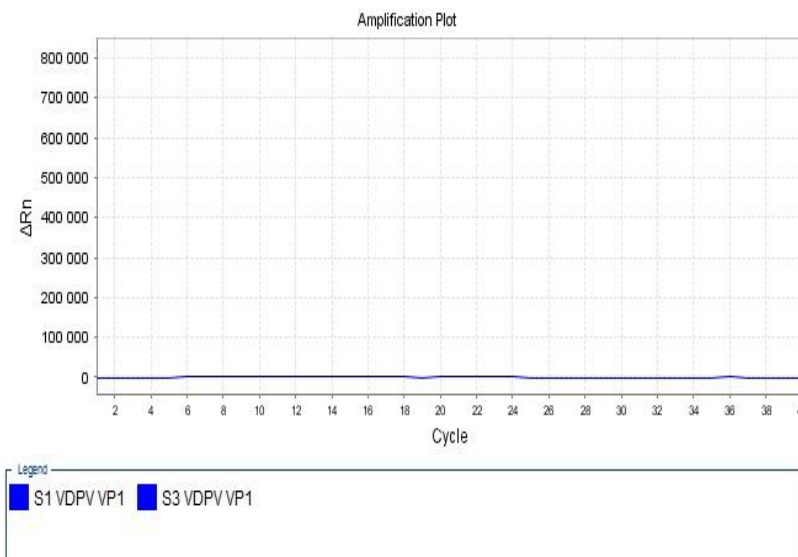


Figure 24 : Contrôle négatif de la rRT-PCR pour VDPV

- Les résultats finaux de la rRT-PCR sont présentés dans le tableau 5 :

Tableau 5 : Résultats finaux de la RT-PCR en temps réel

Echantillons	EU001	EU002	EU003	EU004
Résultats DIT	SL1+SL3	SL1+SL3	SL3	SL1+SL3
Résultats VDPV	SL1+SL3	SL1+SL3	SL3	SL1+SL3

Nos résultats démontrent que :

- Après inoculation, 80% des échantillons présentent un ECP caractéristique, qui révèle la présence de poliovirus et que 20% des échantillons étaient des EVNP.
- L'identification des souches de poliovirus isolées par RT-PCR en temps réel, révèle que parmi les 80% des échantillons qui ont présenté un ECP, 80% étaient de souches vaccinales sabin 1 (SL1) et sabin 3(SL3) et 20% de souches vaccinales sabin 3 (SL3). Avec absence de souches sauvages et de souches modifiées VDPV dans les échantillons.

Discussion

Discussion :

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à la recherche des entérovirus et principalement le poliovirus dans les prélèvements hydriques de quatre stations d'épuration, afin de surveiller toute circulation silencieuse de poliovirus dans la communauté et de déterminer l'origine sauvage ou vaccinal de la souche. Une démarche qui entre dans l'initiative mondiale d'éradication de poliovirus sous l'égide de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) afin d'établir un bilan précis sur la présence et la propagation de ces virus en Algérie.

L'étude qu'on a effectuée a porté sur cinq échantillons d'eaux usées, la récolte des échantillons réalisée par la technique GRAB, permet la détection des poliovirus et des entérovirus non poliomyélitiques plus souvent que ceux utilisant l'échantillonnage par la technique TRAP (GPEI 2015).

Les échantillons ont été traités et concentrés par la méthode de séparation bi-phasique recommandée par l'OMS, une méthode pratique qui permet l'isolement d'une quantité importante du virus à partir de petite quantité d'eau usée.

Les isollements des virus ont été réalisés en inoculant les concentrats dans des lignées cellulaires RD sensibles aux EVs et L20B exprimant le récepteur CD155, donc sélectives aux poliovirus.

Nos résultats témoignent que 80% des échantillons présentent un ECP caractéristique, qui révèle la présence de poliovirus et que 20% des échantillons étaient des EVNP.

L'identification des souches poliovirus isolées par RT-PCR révèle la présence de souches vaccinales : sabin 1 (SL1) et sabin 3 dans 80% des échantillons et 20% de souches vaccinales sabin 3 (SL3). Avec aucune souche sauvage et aucune souche modifiée VDPV détectée. Lorsque la couverture vaccinale contre le poliovirus est faible, le risque de circulation des souches modifiés VDPV sera plus élevé.

Des résultats similaires ont également été rapportés par l'étude faite par l'**Institut Pasteur d'Algérie** de 2008 à 2013 dans le cadre de la surveillance des entérovirus dans les eaux usées, qui avait montré la présence des entérovirus polio de type vaccinal avec absence de souches sauvages. La détection de souche vaccinal est expliquée par le taux élevé de vaccination dans le pays par le vaccin polio oral atténué qui est excrété dans les selles des personnes vaccinées et ensuite dans l'environnement (eaux usées). Le bilan de surveillance est propre à chaque pays et diffère d'une région à une autre vu qu'il dépend de plusieurs facteurs, l'étude menée par **Delogu et al (2018)** en Italie de 2009 à 2015 a étudié 2880 échantillons d'eaux usées provenant

des stations d'épuration de huit villes en Italie, 1479 échantillons se sont révélés positifs pour les entérovirus avec aucun poliovirus de type sauvage trouvé, bien que quatre poliovirus de type vaccinal sabin (deux SL3, un SL2 et un SL1) ont été détectés et une autre étude menée par **Momou et al (2012)** à Yopougon, Abidjan a rapporté des prévalences de 81,39 % d'EV, dont 97,14 % étaient des ENPV et 5,71 % des Poliovirus de type vaccinal sabin 2.

Conclusion

Conclusion :

Les entérovirus sont de petits virus à ARN qui représentent un excellent marqueur de pollution fécale et sont très fréquemment retrouvés dans les eaux contaminées par des excréments. De plus, ces virus sont responsables de nombreuses infections dans l'espèce humaine, allant de formes inapparentes à des pathologies mortelles.

Les maladies dues aux Entérovirus constituent un important problème de santé publique. Pour lutter contre ces maladies provoquées par ces virus, il est donc nécessaire de déterminer une méthodologie qui comporte le contrôle et la surveillance virologique des milieux hydriques.

Notre travail a pour objectif la détection des entérovirus plus particulièrement le poliovirus dans les échantillons environnementaux et la surveillance de la circulation silencieuse de souches sauvages de poliovirus et de souche modifiées dans la communauté.

L'échantillonnage a été réalisé à partir des stations d'épuration présentes dans les quatre villes suivantes : Chenoua, Hadjout, Beni-Mesous et Kolea. Tous les échantillons ont été concentrés puis précipités par le Polyéthylène glycol 6000 et le dextran T40, puis inoculé sur système cellulaire (RD, L20B). Les ARN des souches polio positives ont été extraits et amplifiés par RT-PCR en utilisant des amorces spécifiques.

Cette étude démontre que toutes les souches polio isolées étaient d'origine vaccinal, avec absence de souche polio sauvage et de souches modifiées VDPV, ce qui reflète le taux important de vaccination en Algérie, qui est supérieur à 90% dans ces dernières années.

Pour enrichir ce modeste travail, nous proposons comme perspective :

Faire une étude plus étendue sur tout le territoire algérien afin d'avoir un bilan précis et global sur la présence et la propagation de ces virus en Algérie.

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.
- **Agut, H., Buffet-Janveresse, C., Le Faou, A., Peigue-Lafeuille, H., Seigneurin, J.M., 2007.** Chapitre 32 : Entérovirus. In : Révir-Référentiel en virologie médicale. 2ème édition. ALINEA PLUS. 17, rue Jean Daudin 75015, Paris. pp 107-109.
- **Andreoletti, L., Renois, F., Jacques, J., Leveque, N., 2009.** Entérovirus non poliomyélitiques et pathologies respiratoires. *Médecine sciences* 25, 921-930.
- **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, 624-631.
- **Bailly, J. L., Béguet, A., Chambon, M., Henquell, C., Peigue-Lafeuille, H., 2000a.** Nosocomial transmission of echovirus 30 : molecular evidence by phylogenetic analysis of the VP1 encoding sequence. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 2889-2892.
- **Baggen, J., Thibaut, H.J., Strating, J.R.P.M., Van Kuppeveld, F.J.M., 2018.** The life cycle of non-polio enteroviruses and how to target it. *Nature Reviews microbiology* 16, 368-381.
- **Bessaud, M., Jegouic, S., Joffret, M.L., Barge, C., Balanant, J., Gouandjika Vasilache, I., 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, 1-29.
- **Bégné.P., Astruc. J., 1999.** Infection à entérovirus, In: Pathologie infectieuse chez l'enfant; E.Grimprel, 2eme éd : Masson, Paris. 269-271p.
- **Bousslama, L., Nasri, D., Chollet, L., Belguith, K., Bourlet, T., Aouni, M., Pozzetto, B., Pillet, S., 2007.** Natural recombination event within the capsid genomic region leading to a chimeric strain of human enterovirus B. *Journal of Virology* 81, 8944–8952.
- **Cameron, C.E., Suk-Oh, H., Moustafa, I.M., 2010.** Expanding knowledge of P3 proteins in the poliovirus lifecycle. *Future Microbiology* 5, 867–81.
- **Civardi, E., Tzialla, C., Baldanti, F., Strocchio, L., Manzoni, P., Stronati, M., 2013.** Viral outbreaks in neonatal intensive care units: What we do not know. *American Journal of Infection Control*. 41,854-6.

- **Collier,L et Oxford.J ., 2004 .** Virologie humaine. 2ème édition. Médecine science Flammarion, Paris, 271p.
- **Collier, L. et Oxford J., 2000.** Chapitre 16, Poliomyélite et autres infections à picornavirus. In : Virologie Humaine, 2ème édition, Flammarion Médecines Sciences , 4, rue Casimir- Delavigne, 75006 Paris ,pp. 123-129.
- **Commitee on the enteroviruses, National Foundation for Infantile Paralysis.,1957.** The Enteroviruses. American Journal of public health. 47, 1556-66.
- **Conrad, C., 2012.** Evaluation des propriétés en culture de nouvelles souches atténuées de Poliovirus candidates à un nouveau vaccin inactivé. Thèse de Doctorat : Sciences pharmaceutiques, Université de Lorraine, 102p.
- **Delogu, R et al., 2018.** Poliovirus and Other Enteroviruses from Environmental Surveillance in Italy, 2009–2015. Food and Environmental Virology. 10, 333–342.
- **Doedens, J., Maynell, L. A., Klymkowsky, M. W., Kirkegaard, K., 1994.** Secretory pathway function, but not cytoskeletal integrity, is required in poliovirus infection. Archives Virology Supplementum 9, 159–172.
- **Feder, HM Jr., Bennett, N., Modlin, JF., 2014.** Atypical hand, foot, and mouth disease: a vesiculobullous eruption caused by Coxsackie virus A6. Lancet Infect Dis 14, 83-6.
- **Fleury, H.J.A., 2002.** Virologie humaine. 4ème édition. 120, bd Saint-Germain. 75280 Paris Cedex 06 : Masson. 91-94.
- **Fuhrman, J. A., Liang, X., Noble, R. T., 2005.** Rapid detection of enteroviruses in small volumes of natural waters by real-time quantitative reverse transcriptase PCR. Applied and Environmental Microbiology 71, 4523-30.
- **GPEI (2015).** Guidelines on environmental surveillance for detection of polioviruses.
- GPLN GP2 Appendix.
- **Grosjean, J., Clavé, D., Archambaud, M., Pasquier, C. 2017.** Bactériologie et virologie pratique. 3ème édition.de boeck supérieur, Rue du Bosquet 7, B-1348 Louvain-la-Neuve. 296 p.
- **Hafenstein S, Bowman VD, Chipman PR, Kelly CMB, Lin F, Medof ME, Rossmann MG., 2007.** Interaction of Decay-Accelerating Factor with Coxsackievirus B3. Journal of Virology 81, 12927–12935.
- **Harvala, H., Brobergb, E., Benschopc,K., Bergincd, N., Ladhania, S., Susif, P., Christianseng, C., McKennah, J., Allene, D., Makiellok, P., McAllisterl, G.,**

- Carmenm, M. et al., 2018.** Recommendations for enterovirus diagnostics and characterisation within and beyond Europe. *Journal of Clinical Virology* 101,11–17.
- **Harris, K. G., Coyne, C. B., 2013.** Enter at your own risk: how enteroviruses navigate the dangerous world of pattern recognition receptor signaling. *Cytokine* 63, 230-6.
 - **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 : Médecine humaine et pathologie. Université d'Auvergne- Clermont-Ferrand 18-35 p.
 - **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 ,1-11.
 - **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 : Virologie. Faculté de Médecine Jacques Lisfranc, Université Jean Monnet de Saint Etienne, 216p.
 - Institut pasteur.https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches_maladies/poliomyelite/ (Consulté le 10 mars 2020).
 - **Jean-Marie Huraux, Henri Agut, Anne-Marie, Fillet Vincent Calvez, Vincent Thibault, Agnès Gautheret-Dejean, Anne-Geneviève Marcelin et Claire De Back (2007)** Cours de virologie de la faculté de Médecine Pierre et Marie Curie, Paris, 307p.
 - **Kristensson, K., 1999.** The discovery of the poliovirus. *Brain Research Bulletin* 50, 461.
 - **Lataud, E.,2015.** Etude de la permissivité du kératinocyte aux entérovirus responsables du syndrome Pieds-Mains-Bouche (Coxsackievirus A 16 et Entérovirus 71), Thèse de docteur en médecine. Université de Poitiers.
 - **Leveque, N., Renois, F., Talmud, D., Nguyen, Y., Lesaffre, F., Boulagnon, C., Bruneval, P., Fornes, P., Andreoletti, L., 2012.** Quantitative genomic and antigenomic enterovirus RNA detection in explanted heart tissue samples from patients with end-stage idiopathic dilated cardiomyopathy. *Journal of Clinical Microbiology* 50 , 3378–3380.
 - **Mammette, A., 2002.** Virologie médicale. Presses Universitaires Lyon,80 Boulevard de la Croix-Rousse, 798 p.
 - **Mehndiratta, M., Mehndiratta, P., Pande R., 2014.** Historical Facts, Epidemiology, and Current Challenges in Eradication. *Neurohospitalist* 4, 223–229.
 - **Melnick, J.L., 1996.** My role in the discovery and classification of the enteroviruses. *Annual Review Microbiology*. 50 , 1–24.

- **Mirand, A., Baily, J.L, Peigue-Lafeuille, H., Henquell, C., 2018.** Entérovirus : Un virus à haut potentiel pathogène et épidémique. 30-43 .
- **Miriam, J et al., 2007.** Fields virology. 5^{ème} édition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 3091 p.
- **Momou, K.J., Akoua-Koffi, C., Akré, D.S., Adjogoua, E.V., Tiéoulou, L., Dosso, M., 2012.** Détection d'entérovirus dans les eaux usées urbaines à Yopougon, Abidjan. Pathologie Biologie 60 : e21–e26.
- **Montes, M., Artieda, J., Piñeiro, LD., Gastesi, M., Diez-Nieves, I., Cilla, G ., 2013.** Hand, foot, and mouth disease outbreak and coxsackievirus A6, northern Spain, 2011. Emerg Infect Dis 19, 676–678.
- **Newman, J. F. & Brown, F., 1997.** Foot-and-mouth disease virus and poliovirus particles contain proteins of the replication complex. Journal of Virology 71, 7657–62.
- **Oberste, M.S., Maher, K., 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, 855-867.
- **Pallansch, M. A., Roos, R., 2007.** Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses, and newer enteroviruses. In Picornaviridae, Fields Virology. 5^{ème} édition. D. M. Knipe and P. M. Howley, Philadelphia , 839–93.
- **Palacios, G., Oberste M.S., 2005.** Enteroviruses as agents of emerging infectious diseases. Journal of Neurovirology 11, 424-33 .
- **Pasquier, C., Bertagnoli, S., Dunia, D., Izopet, J., 2013 .** Virologie humaine et zoonoses. 120, Boulevard Saint-Germain, 75280 Paris cedex 06, 176-179 .
- **Paul, A. V., van Boom, J. H., Filippov, D., Wimmer, E., 1998 .** Protein-primed RNA synthesis by purified poliovirus RNA polymerase. Nature 393 , 280–4p .
- **Pelletier, J., Sonenberg, N., 1988.** Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. Nature 334, 320–325.
- **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. Journal Clinique Virologie. 47. 54-59.
- **Poitras, E., Houde, A., 2002.** La PCR en temps réel : principes et applications in Reviews in Biology and Biotechnology. 2-11.
- Pothier. Picornaviridae. <http://www.microbes-edu.org/> (consulter le 27mars 2020).

- **Prescott, L., Harley, J., Klein, D., Wiley., Sherwood., Woolverton, C., 2010.** Microbiologie. 3ème édition. de boeck superieur. Rue des Minimes, 39 B-1000 Bruxelles, P 940-41.
- **Racaniello, V et al ., 2007.** Picornaviridae: the viruses and their replication. 5ème édition. In Fields virology, Philadelphia, 795–838 p.
- **Renois, F., Bouin, A., Wehbe, M., Leveque, N., Andreoletti, L., 2014.** Infections persistantes à entérovirus et pathologies humaines. Virologie. 18, 306-324.
- **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.
- **Steil, B.P., Barton, D.J., 2009.** Conversion of VPg into VPgpUpUOH before and during Poliovirus Negative-Stand RNA Synthensis. Journal of Virology 83 ,12660-12670p.
- The Picornavirus. <https://www.picornaviridae.com/enterovirus/enterovirus.htm/> (consulté le 12 avril 2020).
- **Thefenne, L., 2008.** Post poliomyélite mythe ou réalité. Mémoire du diplôme d'études spécialisées de médecine Physique et Réadaptation. Thèse de doctorat : Médecine Physique et de Réadaptation, Université Paris Descartes, 157p.
- **Thompson, A. et Peersen, O.B., 2004.** Structural basis for proteolysis-dependent activation of the poliovirus RNA-dependent RNA polymerase. The EMBO Journal 23, 3462-71p.
- **Van kuppeveld F J, Melchers, W. J., Kirkegaard, K., Doedens, J. R., 1997.** Structure-function analysis of coxsackie B3 virus protein 2B. Virology 227, 111–118.
- **Vogt, D. A., Andino, R. 2010.** An RNA Element at the 5'-End of the Poliovirus Genome Functions as a General Promoter for RNA Synthesis. PLoS Pathogens 6 .
- **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 : Biologie cellulaire. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand. P 134.
- **Weil, M., Rahav, G., Somech, R., Stauber, T., Alfandari, J., Weiss, L., Silberstein, I., Indenbaum, V., Or, I.B., Mendelson, E., Sofer, D., 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.

- **Wells, A.I. et Coyne, C.B. (2019).** Enteroviruses: A Gut-Wrenching Game of Entry, Detection, and Evasion. *Viruses* 11, 460-471.
- **WHO (2004).** Polio Laboratory Manual. WHO/IVB/04.10. Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- **Yin-Murphy, M. (1984).** Acute hemorrhagic conjunctivitis. *Prog. Med. Virol* 29, 23-44.
- **Yuan, J., Shen, L., Wu, J., Zou, X., Gu, J., Chen, J., Mao, L., 2018.** Enterovirus A71 Proteins : Structure and Function 139.
- **Zoll, J., Heus, H. A., Van Kuppeveld, F. J., Melchers, W. J. (2009).** The structurefunction relationship of the enterovirus 3'-UTR. In: Volle, 2014. *Virus Research*. 209–216p.

Annexes

Annexe 1 :

La formule pour calculer la concentration cellulaire par ml :

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

CI : 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).

10⁴ : conversion du mm³ au ml sachant que le volume de chaque carreau est de 0.1 mm³.

Annexe 2 :

Les amorces et sondes utilisées pour la RT-PCR en temps réel de la DIT et VDPV (**GPLN GP2 Appendix**)

Sonde et amorces de la DIT		
Q U A D R U P	Pan-Entérovirus	Anti-sens GCGATTGTCACCATWAGCAGYCAGYCA
		Sens GGCCCCTGAATGCGGCTAATCC
		Sonde VIC-CCGACTACTTTGGGWTCCGTGT-TAMRA
	Sabin 1	Anti-sens CCACTGGCTTCAGTGTTT
		Sens AGGTCAGATGCTTGAAAGC
		Sonde CY5-CGCCCCCACCCTTTCACGGA-BHQ3
Sabin 2	Anti-sens CGGCTTTGTGTCAGGCA	
	Sens CCGTTGAAGGGATTACTAAA	
	Sonde FAM- ATTGGTTCCCCCGACTTCCACCAAT -BHQ1	

L E X	Sabin 3	Anti-sens TTAGTATCAGGTAAGCTATC Sens AGGGCGCCCTAACTTT Sonde Rox- TCA CTC CCG AAG CAA CAG – BHQ2
	Pan-Poliavirus	Anti-sens GGA GCT CCG GGT GGG AYR TAC ATI ATY TGR TAI AC Sens TTG GAG TTC TTC ACI TAI TCI MGI TTY GAY ATG Sonde FAM- TGR TTN ARI GCR TGI CCR TTR TT- BHQ1
	WPV1	AFR-WPV1 Sens GTA CAA ACC AGT CAY GTN AT SOAS-WPV1 Sens CGT ACA GAC TAG RCA YGT NAT Anti-sens GAG AAT AAY TTG TCY TTK GAY GT Sonde FAM- CAT WAT GGT TAC RCA MGC ACC T- BHQ1
	AFR WPV3	AFR-WPV3 Sens CAG GGA GTA GAT GAY CTN AT SOAS-WPV3 Sens CAG GGG GTT GAT GAY TTR AT Anti-sens ACK GTG TCT GAY GGN AC Sonde CY5- CNC ARA ACA GYC TTC CGG ATA CC- BHQ3
	SOAS WPV3	Anti-sens TCY TTR TAI GTR ATG CGC CAA G Sens GTY RTA CAR CGR CGY AGY AGR A Sonde FAM- TTC TTY GCA AGI GGR GCR TGY GT- BHQ1
	Poliovirus type 2	Sens GAT GCA AAY AAC GGI CAT GC Anti-sens TCA TAA AAG TGG GAR TAC GCR TT Anti-sens 1C TCG TAA AAA TGA GAA TAT GCA TT Sonde FAM- ATG ACT ATA CGT GGC AGA C Sonde 1D CRC CKA TIC CTG GYA
		Sonde et amorce de la VDPV
	S1 VDPV VP1	Sens CATGCGTGGCCATTATA Anti-Sens TAAATTCCATATCAAATCTA Sonde FAM- CACCAAGAATAAGGATAAG - BHQ1
	S3 VDPV VP1	Sens CATTACATGAAACCCAAAC Anti-Sens TGGTCAAACCTTTCTCAGA Sonde FAM- AGGAACAACCTTGGAC- BHQ1