Réémergence virale épidémique : coxsackievirus A6 et entérovirus A71, de la maladie pied-main-bouche aux atteintes neurologiques

Stéphanie Tomba Ngangas

▶ **To cite this version:**

Stéphanie Tomba Ngangas. Réémergence virale épidémique : coxsackievirus A6 et entérovirus A71, de la maladie pied-main-bouche aux atteintes neurologiques. Médecine humaine et pathologie. Université Clermont Auvergne, 2021. Français. NNT : 2021UCFAC043 . tel-03714852

HAL Id: tel-03714852
https://theses.hal.science/tel-03714852

Submitted on 6 Jul 2022

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

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

UNIVERSITÉ CLERMONT AUVERGNE

Année 2021 N° d'ordre

ECOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE, SANTE, AGRONOMIE & ENVIRONNEMENT

Thèse

Présentée à l'Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand
pour l'obtention du grade de (Décret du 5 juillet 1984)

DOCTEUR D'UNIVERSITE

Spécialité : Biologie Santé - Virologie

Le **05 février 2021** par

Stéphanie TOMBA

REEMERGENCE VIRALE EPIDEMIQUE : COXSACKIEVIRUS A6 ET ENTEROVIRUS A71, DE LA MALADIE PIED-MAIN-BOUCHE AUX ATTEINTES NEUROLOGIQUES

Co-directeurs de Thèse : Docteur Jean-Luc BAILLY, Docteur Audrey MIRAND

Devant la commission d'examen composée de :

Rapporteur : Professeure Evelyne SCHVOERER,

Rapporteur : Professeur Alexis de ROUGEMONT,

Invité : Docteur Maël BESSAUD,

Co-directeur de Thèse : Docteur Audrey MIRAND, LMGE

Co-directeur de Thèse : Docteur Jean-Luc BAILLY, LMGE

Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement (CNRS UMR 6023)
Equipe Epidémiologie et Physiopathologie des Infections à Entérovirus

A Brunille,

A Will,

A Frederique,

A Manvie,

REMERCIEMENTS

Ce travail n'aurait pu voir le jour sans le soutien et l'implication de plusieurs personnes que je souhaiterais remercier ici.

En premier lieu, je tiens à adresser mes remerciements aux membres du jury, au Professeur **Evelyne Schvoerer**, directrice du laboratoire de virologie CHU Nancy et au Professeur **Alexis de Rougemont**, directeur du Centre National de Référence des virus des gastro-entérites, pour avoir accepté de consacrer de leur précieux temps à l'évaluation de ce travail et de participer au jury de ma thèse.

Je voudrais exprimer toute ma gratitude à mon directeur de thèse, **Jean-Luc Bailly**, j'ai eu la chance d'intégrer son équipe en 2017, sans réellement savoir ce qui m'attendait. J'imagine que le questionnement était aussi présent de son côté. Au final, j'ai beaucoup appris de lui et je lui en suis entièrement reconnaissante, ses qualités humaines et son érudition dans plusieurs domaines ont été appréciables durant ces années de thèse. Merci aussi à lui de m'avoir ouvert la voie de la recherche avec pédagogie, écoute et patience et je me doute que ça n'a pas toujours été chose facile. Merci de m'avoir guidée et encouragée à donner le meilleur de moi-même.

Je voudrais également exprimer ma reconnaissance à ma co-directrice de thèse **Audrey Mirand**. Durant cette thèse j'ai pu apprécier la disponibilité d'Audrey qui a toujours eu la porte de son bureau ouverte pour moi, malgré qu'elle soit très occupée du fait de ses différentes fonctions. Merci pour son implication, son aide, ses critiques constructives et conseils tout au long de ces années. Je la remercie également pour ses encouragements dans les moments de doute et de frustration. Enfin, sa curiosité scientifique, sa spontanéité et son savoir ont été et sont toujours une source d'admiration pour moi.

Je souhaite également remercier **Maël Bessaud** et enfin **Catherine Sarret** pour leur accompagnement et leurs précieux conseils au cours des comités de suivi de thèse.

Un grand merci à **Maxime Bisseux**, ta présence au sein de l'équipe a vraiment été un bénéfice pour moi. Merci pour le partage et la transmission des techniques que tu maitrises parfaitement. Merci également pour ton implication sur la partie bio-informatique de ma thèse. Tu as réussi à venir à bout de Nextstrain et de SMRT !

C'est à toutes les personnes de l'équipe d'accueil EPIE que j'adresse toute ma reconnaissance. Je tiens donc à remercier **Cécile Henquell** et **Christine Archimbaud** pour leur participation à la discussion entourant les travaux de cette thèse.

J'adresse mes chaleureux remerciements à l'ensemble du personnel du laboratoire de virologie hospitalier sans qui les prélèvements cliniques analysés dans ce travail ne seraient pas exploitables. Grand merci à **Gwendoline Jugie**, à **Nathalie Rodde**, à **Adeline Duard** et avec une mention spéciale à **Isabelle Simon** ta réactivité mais aussi ta gentillesse hors norme sont un plaisir au quotidien. Vous avez toujours été là, pour m'accompagner et m'aider dans les expérimentations.

Aux doctorants de l'équipe, **Maxime Duval**, **Mahya Hosseini** et **Igor Coqueiro**, que la force reste soit avec nous. Merci pour ces discussions scientifiques, votre bonne humeur et nos fous rires. C'est tellement agréable d'évoluer dans cette ambiance entre étudiants !

Merci aux pédiatres volontaires de la surveillance ambulatoire de la maladie pied-main-bouche.

Au Club des “amies devenues sœurs” & Associés. Des études supérieures sont un long parcours, avec des passages désagréables mais aussi une multitude d'occasions de rire et de s'amuser. Vous avez rendu les mauvais moments surmontables et les bons, inoubliables. Je souhaite donc vous remercier sans ordre précis : **Cornélia, Audrey, Corinne, Félicité, Méliane, Falone, Shamcya, Débora, Claudia** et **Luce**, merci d’avoir été là et “Nounouille” a de la chance de vous avoir comme tatas. Merci à Claude qui a toujours été là, tu es formidable !

A tous les autres amis et relations que je ne mentionne pas et qui ont croisés mon chemin et chacun à leur manière a contribué à mon épanouissement socioprofessionnel, je vous dis merci.

Une profonde reconnaissance à ma maman, qui m’a donné tous les moyens pour poursuivre mes études. Sans son amour et soutien, je n’aurais jamais soutenu une thèse en virologie et j’espère qu’elle en serait heureuse et fière.

Tout mon amour va à **Brunille** et **Will**, merci infiniment pour votre soutien indéfectible à tous les niveaux durant cette thèse...les mots ne suffiront pas.

La fin d’une chose vaut mieux que son commencement, c’est la fin mais tu n’es plus là Papa....

Résumé

Les entérovirus (EV) sont des virus entériques (famille des Picornaviridae) classés parmi quatre espèces taxonomiques (A à D). Les infections à EV symptomatiques sont associées à des atteintes neurologiques, respiratoires, cardiaques, musculaires, cutanéomuqueuses. La maladie pieds-mains-bouche (PMB) se caractérise par une éruption cutanée et des ulcérations buccales chez les enfants de moins 5 ans. L'EVA71 (EVA71) et le coxsackievirus A6 (CVA6) sont parmi les types d'EV de l'espèce A, les plus fréquemment associés à la maladie PMB. En France, l'EVA71 est associé à la recrudescence d'atteintes neurologiques depuis 2016, et le CVA6 est relié à la survenue d'épidémies régulières de maladie PMB. L'objectif de la thèse est de comparer les réémergences épidémiques de ces deux virus par l'analyse comparative des génomes. L'épidémie d'atteintes neurologiques sévères en 2016 a été associée au variant C1v2015 classé dans le sous-génogroupe C1 d'EVA71 et dont l'émergence a été datée en 2010. Le génome de ce virus présente une structure chimérique caractéristique de multiples évènements de recombinaison. Le génome du virus C1v2015 montre des variations notables par rapport à celui des virus antérieurs dans des segments codant des épitopes exposés à la surface des protéines de capside. Nous avons daté en 2013 la survenue d'un évènement de recombinaison qui a remplacé le gène de la polymérase 3Dpol précédant de peu la propagation épidémique du virus en Europe à partir de 2015. Pour étudier le CVA6, nous avons mis au point une méthode de séquençage NGS que nous avons appliquée à des échantillons cliniques recueillis en France entre 2010 et 2018. En France, depuis 2014, les épidémies sont liées au sous-génogroupe D4 qui a émergé globalement en 2004. L'étude du gène 3Dpol permet d'identifier 5 nouvelles formes recombinantes. Les caractéristiques épidémio-cliniques des cas de maladie PMB rapportés en France montrent que l'émergence du CVA6 a été contemporaine de l'augmentation de formes atypiques de la maladie, une tendance aussi observée à l'échelle mondiale. En conclusion, nos travaux montrent l'intérêt de l'analyse des génomes complets d'EV pour comparer les variations moléculaires et retracer l'histoire évolutive et épidémique des virus réémergents.

Mots clés : Entérovirus A, maladie PMB, séquençage du génome complet par NGS, recombinaison génétique, réémergence virale

Abstract

Enteroviruses (EVs) are enteric viruses assigned to the Picornaviridae family and classified into four taxonomic species (A to D). Symptomatic EV infections can be associated with diseases of the nervous system, lung, heart, muscle, and skin. Hand-foot-and-mouth disease (HFMD) is characterized by a rash and oral ulcerations in children under 5 years. Enterovirus A71 (EVA71) and coxsackievirus A6 (CVA6) are the two most frequent EV types of species A reported in HFMD cases. In France, EVA71 was associated with an increasing number of neurological diseases since 2016, and CVA6 was associated with regular HFMD outbreaks. The main aim of the thesis is to investigate and compare the epidemic reemergences of these two viruses by using whole-genome analysis. The outbreak of neurological diseases in 2016 was associated with the virus C1v2015 assigned to the EVA71 subgenogroup C1, which emerged in 2010. This virus has a chimeric genome characterized by multiple recombination events. Compared with the genomes of the earlier C1 viruses, the C1v2015 genome displays characteristic changes within epitopes exposed at the capsid surface. The recombination event that changed in 2013 the 3Dpol gene occurred shortly before the epidemic spread in Europe in 2015. To investigate CVA6, we designed a whole-genome amplification technique and used high throughput sequencing to determine viral genomes in buccal specimens collected in France between 2010 and 2018. We did not find major variations in structural genes, but we identified five recombinant forms not previously reported by the study of the 3Dpol gene. Paralleling the worldwide shifts, the clinical and epidemiological features of HFMD cases reported in France indicated the epidemic reemergence of CVA6 was contemporaneous of the increasing frequency of an atypical disease. To conclude, our data highlight the value of whole-genome analysis to compare molecular variations and trace the evolutionary and epidemic histories of reemerging enteroviruses.

Keywords : Enterovirus species A, whole genome sequencing by NGS, genetic recombination, viral reemergence

ABREVIATIONS

3Dpol : Polymérase 3D
ADN : Acide désoxyribonucléique
AIC : critère d'information d'Akaike
ARN : Acide ribonucléique
BEAST : Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees
BLAST : Basic local alignment search tool
CDC : Centers for Disease Control and Prevention
CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CNR : Centre National de Référence
CV : Coxsackievirus
CVA: Coxsackievirus de l'espèce A
CVA6 : Coxsackievirus A6
E : echovirus
ECP : effet cytopathogène
EVA71 : Entérovirus A71
EV-A : Entérovirus de l'espèce A
GTR : General time reversible
HA : Herpangine
ICAM-3 : Intercellular adhesion molecule
IRES : Internal ribosome entry site (Site d'initiation interne de la traduction)
JDD : Jeux de données
LCR : Liquide céphalo rachidien (liquide cérébro-spinal)
MCMC : Markov Chain Monte-Carlo
ML : Maximum likelihood
MRC-5 : Medical Research Council 5 (cellules de type fibroblastique)
NC : Non Codante
NCBI : National Center for Biotechnology Information
NLS : Nuclear localization site
ORF : Open reading frame (cadre de lecture ouvert)
PAMP : pathogen associated molecular pattern
PI4KIII : phosphatidyl inositol-4 phosphate kinase III
PI4P: phosphatidyl inositol-4 phosphate
Pb : Paire de bases
PCR : Polymerase chain reaction
pH : Potentiel hydrogène
PMB : Pied-main-bouche
PSGL-1 : P-selectin glycoprotein ligand-1
PV : Poliovirus
RD : Rhabdomyosarcome
RD : Rhabdomysarcome (lignée de cellules de type épithélial)
RE : Réticulum endoplasmique
RF : Formes réplicatives
RNC : Région non codante
RSE : Réseau de surveillance des entérovirus
RT-PCR : Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
SCARB2 : Scavenger receptor class B, member 2
SNC : Système Nerveux Central
TMRCA : Time to the most recent common ancestor
UTR : Untranslated region

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

Figure 1. Classification générale des entérovirus
Figure 2 : Structure et organisation de la capside de l'EVA71 et du CVA6
Figure 3 : Organisation structurale et fonctionnelle du génome des entérovirus
Figure 4: Vue d'ensemble de la structure de la RdRp (3Dpol) de l'EVA71
Figure 5 : Cycle de multiplication virale des Picornavirus
Figure 6 : Voies d'entrée du génome des entérovirus dans la cellule hôte
Figure 7 : Récepteurs cellulaires de l'EVA71 et du CVA6
Figure 8 : Mécanisme de l'initiation de la traduction du génome viral des entérovirus
Figure 9 : Modèle du processus de régulation de la traduction et de la réplication du génome viral des entérovirus
Figure 10 : Modèle du mécanisme de la réplication du génome viral des entérovirus
Figure 11 : Modèle du processus de morphogenèse des entérovirus
Figure 12 : Altérations du complexe des pores nucléaires (NPC) induites par les picornavirus
Figure 13 : Mécanismes de mort cellulaire et leur modulation par les entérovirus
Figure 14 : Remodelage cytoplasmique, formation d'organites de réplication
Figure 15 : Physiopathologie générale des infections à entérovirus
Figure 16 : Tropisme cellulaire et tissulaire de l'EVA71 et du CVA6
Figure 17 : Modulation des réponses immunitaires innées et adaptatives par l'EVA71 et le CVA6
Figure 18 : Caractéristiques cliniques de la maladie PMB associée aux infections à EV- A71 et CVA6
Figure 19 : Algorithme de gestion de la maladie PMB selon L'OMS
Figure 20 : Surveillance de la maladie PMB en France
Figure 21 : Mécanismes de recombinaison génétique des EV
Figure 22 : Mise en évidence de la recombinaison génétique
Figure 23: Relations phylogénétiques entre les séquences VP1 complètes d'EVA71 déduites à l'aide de la méthode de Neighbor-Joining
Figure 24 : Répartition géographique et temporelle des génotypes et sous-génotypes de l'EVA71 lors des épidémies de 1960 à 2016
Figure 25 : Relations phylogénétiques entre les séquences VP1 complètes du CVA6 déduites à l'aide de la méthode de Neighbor-Joining.
Figure 26 : Représentation schématique du génome d'un entérovirus et localisation des oligonucléotides servant d'amorces d'amplification génique
Figure 27 : Principe général de la technologie SMRT (Single-molecule real-time sequencing).
Figure 28 : Algorithme de préparation d'une librairie multiplexée pour le séquençage SMRT, PacBio
Figure 29 : Algorithme du pipeline de traitements des données de séquençage
Figure 30 : Amplification du génome viral en un seul amplicon en fonction de la nature du prélèvement clinique analysé.
Figure 31 : Amplification du génome viral en un seul amplicon en fonction de la valeur Ct du test PCR réalisé pour le diagnostic virologique (détection du virus dans l'échantillon clinique).
Figure 32 : Arbre phylogénétique inféré avec des séquences 1DVP1 représentant chaque génogroupe de l'EVA71
Figure 33 : Structure génomique en mosaïque de l'EVA71 C1v2015
Figure 34 : Régression linéaire de la distance feuille-racine par rapport à l'année d'obtention des prélèvements biologiques dans lesquels les séquences ont été déterminées
Figure 35 : Chronogramme inféré avec les séquences de la région génomique P1 du sous-génogroupe C1 de l'EVA71

Figure 36 : Chronogramme inféré avec les séquences 3Dpol du variant C1v2015 et des partenaires potentiels de recombinaison génétique
Figure 37 : (A) Localisation des différentes variations moléculaires identifiées pour les souches d'EVA71 C1v2015. (B) Représentation de la configuration d'un protomère au sein de la capside icosaédrique
Figure 38A : Distribution annuelle des infections à CVA6, France, 2010-2018
Figure 39 : Diversité phylogénétique des souches de type CVA6 détectées en France entre 2010 et 2018
Figure 40. Diversité nucléotidique globale dans les génomes CVA6 complets déterminés dans notre étude et assignés aux sous-clades D2 et D4
Figure 41. Identification des formes recombinantes par l'analyse des séquences $3D^{pol}$ extraites de 760 génomes CVA6
Figure 42. Distribution des formes recombinantes parmi les lignées de la phylogénie établie avec les séquences de la région génomique P1
Figure 43 : Chronogramme inféré avec les séquences de la région génomique P1 du CVA6
Figure 44 : Chronogramme et distribution géographique des souches de CVA6

Tableau 1: Les protéines virales et leurs fonctions
Tableau 2: les récepteurs cellulaires de l'EVA71 et du CVA6
Tableau 3 : Présentation de la biothèque utilisée pour l'étude
Tableau 4 : Souches d'EVA71 et de CVA6 choisies pour étudier le neurotropisme
Tableau 5 : Structure des oligonucléotides et conditions d'amplification génique selon les amorces utilisées
Tableau 6 : Conditions d'amplification génique selon la région génomique cible
Tableau 7 : Conditions d'amplification du génome complet en un seul amplicon
Tableau 8 : Jeux de données constitués pour différentes régions génomiques d'intérêt en fonction de l'objectif des analyses
Tableau 9 : Résultats de l'amplification du génome complet (en un seul amplicon) par type d'entérovirus
Tableau 10 : Résultats de trois séries (96 échantillons chacune) de séquençage réalisé par la technologie Pacific Biosciences (PacBio).
Tableau 11 : Analyse statistique des sites potentiels de recombinaison dans les génomes de l'EVA71 C1v2015
Tableau 12. Variations moléculaires dans les protéines de capside du virus C1v2015 par rapport aux séquences protéiques des virus C1 circulant antérieurement.
Tableau 13 : Données démographiques et cliniques des patients hospitalisés et infectés par un CVA6
Tableau 14 : Séquences de références pour la classification des génogroupes et sous-génogroupes du CVA6
Tableau 15 : Distribution des formes recombinantes selon les années
Tableau 16. Variations moléculaires dans les protéines de capside du CVA6 par rapport aux séquences protéiques des lignées du génogroupe D

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS 5
LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX 6
INTRODUCTION GENERALE 13
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE 16
I. Caractéristiques virologiques de l'EVA71 et du CVA6 17
A. Classification des entérovirus 17
B. Structure de la capside virale de l'EVA71 et du CVA6 18
1. Caractéristiques communes à tous les entérovirus 18
2. Caractéristiques spécifiques à l'EVA71 et au CVA6 19
C. Structure et organisation fonctionnelle du génome de l'EVA71 et du CVA6 19
1. Les régions non codantes 19
2. Les protéines virales non structurales et leurs principales fonctions 21
D. Cycle de multiplication intracellulaire des entérovirus 23
1. Les récepteurs d'entrée dans la cellule hôte et la décapsidation 23
2. Récepteurs cellulaires 24
3. La traduction du génome viral 30
4. La réplication du génome viral 31
E. L'assemblage et la libération des virions 32
F. Conséquences de la multiplication virale sur les cellules hôtes 33
1. Inhibition de la traduction des ARNm cellulaires 33
2. Inhibition des activités transcriptionnelles cellulaires 33
3. Altération du transport des protéines nucléaires 34
4. Modulation de la mort cellulaire 35
II. Caractéristiques physiopathologiques générales des infections à EVA71 et CVA6 42
A. Portes d'entrée et dissémination des virus dans l'organisme 42
B. Tropisme cellulaire et tissulaire 43
C. Réponse immunitaire de l'hôte contre les infections à l'EVA71 et au CVA6 45
1. La réponse immunitaire innée 45
2. La réponse immunitaire adaptative 47
3. Facteurs viraux associés à la virulence 48
4. Modèles animaux des infections aux EV A 50
III. Caractéristiques cliniques et évolution de la maladie pied-main-bouche associée aux infections à EVA71 et CVA6 52
A. Les manifestations communes au CVA6 et à l'EVA71 52
1. Herpangine 52

2. La maladie pied-main-bouche 53
B. Les formes atypiques de la maladie pied-main-bouche associées à l'infection au CVA6 53
1. Formes atypiques et/ou extensives 54
2. Manifestations tardives : onychomadèse et desquamation 55
3. Infections chez les adultes 55
C. Les complications neurologiques associées à l'infection à EVA71 55
1. Méningite aseptique 56
2. Encéphalite du tronc cérébral 56
3. Paralysie flasque aiguë 57
IV. Diagnostic de la maladie pied-main-bouche 58
A. Diagnostic clinique 58
B. Diagnostic virologique 59
1. Prélèvements cliniques 59
2. Détection du génome viral et génotypage 59
3. Isolement par culture cellulaire 60
4. Sérotypage 60
5. Tests sérologiques 61
V. Traitement et prévention de la maladie PMB 61
A. Traitement 61
B. Prévention non spécifique de la maladie PMB 62
C. Vaccins contre la maladie PMB 63
1. Vaccins contre l'EVA71 63
2. Vaccin bivalent EVA71/CVA16 63
3. Vaccin polyvalent contre la maladie PMB : entre rêve et réalité 64
VI. Epidémiologie générale de la maladie pieds-mains-bouche 64
A. Surveillance de la maladie pieds-mains-bouche 64
1. Les pays de la région Asie-Pacifique 64
2. Les États-Unis 65
3. L'Europe 66
4. La France 66
B. Les épidémies d'infections à EVA71 dans le monde 67
1. Premières épidémies d'infections à EVA71, 1972-1990 67
2. Réémergence épidémique de l'EVA71 en Asie Pacifique (1990 – 2000) 68
3. Circulation sporadique en Europe au début des années 2000 72
4. Autres régions 73

C. Les épidémies d'infections à CVA6 dans le monde 74
1. Découverte du CVA6 74
2. Réémergence épidémique du CVA6 en Europe 74
3. Epidémies et circulation du CVA6 en Asie 75
4. Epidémies et circulation du CVA6 en Amérique 78
D. Prévalence et incidence de la maladie pieds-mains-bouche 79
1. Facteurs démographiques 79
2. Facteurs socio-économiques 81
3. Facteurs liés à l'environnement 81
VII. Evolution et épidémiologie moléculaire de l'EVA71 et du CVA6 82
A. Mécanismes d'évolution des entérovirus 82
1. Mutations ponctuelles 83
2. Recombinaison génétique 84
B. Caractérisation moléculaire des entérovirus 87
1. Identification des types d'EV et étude de la diversité intratypique 87
2. Identification moléculaire à partir des régions non codantes des entérovirus 89
3. Méthodes d'analyse de l'épidémiologie moléculaire des EV 90
C. Diversité génétique et épidémiologie moléculaire de l'EVA71 94
D. Diversité génétique et épidémiologie moléculaire du CVA6 96
E. Conséquences de la recombinaison génétique pour l'EVA71 et le CVA6 96
OBJECTIFS DE LA THESE 99
MATERIELS ET METHODES 101
I. Souches et échantillons cliniques 102
A. Systèmes de surveillance des infections à entérovirus 102
B. Souches et échantillons cliniques 103
1. Origine et analyse du nouveau variant d'EVA71 C1 variant 2015 103
2. Epidémiologie moléculaire du CVA6 en France 103
3. Etude du pouvoir infectieux 103
C. Désignation des souches 103
II. Diagnostic et génotypage des EV 104
A. Amplification du génome complet 104
1. Amplification du génome viral en 2 fragments subgénomiques 104
2. Amplification du génome complet en un seul amplicon 105
B. Contrôle et purification des produits d'amplification 105
C. Séquençage 105
III. Analyses moléculaires des séquences d'EVA71 et de CVA6 108

A. Constitution des jeux de séquences d'intérêt 108
1. Jeu des séquences 1D de l'EVA71 109
2. Jeu des séquences 1D du CVA6 109
3. Jeu des génomes complets de l'EVA71 109
4. Jeu des génomes complets de CVA6 109
B. Analyse de la diversité génétique virale avec le gène 1D 110
C. Exploration des événements de recombinaison génétique dans les génomes complets 110
1. Analyse comparative de la topologie des arbres phylogénétiques reconstruits pour deux locus distants : VP1 et 3D 110
2. Analyse du polymorphisme dans les génomes de CVA6 110
3. Analyse de la similitude nucléotidique des génomes complets 111
4. Analyse des signaux moléculaires de recombinaison 111
D. Datation moléculaire par une approche phylogénétique Bayésienne 111
1. Evaluation de l'horloge moléculaire dans les jeux de séquences 111
2. Analyse phylogénétique par une méthode bayésienne 112
3. Numéros d'accessions des séquences nucléotidiques 113
IV. Etude du pouvoir infectieux de l'EVA71 et du CVA6 à partir d'un modèle cellulaire de neurones humains *in vitro* 113
A. SH-SY5Y, cellules de neuroblastome humain 113
B. Sensibilité des cellules SH-SY5Y aux souches d'EVA71 et de CVA6 113
1. Isolement viral et préparation de stocks viraux 113
2. Test de cinétique de multiplication virale 114
3. Détermination du titre infectieux 114
4. Détermination de la charge virale 115
5. Mise au point d'un modèle cellulaire neuronal différencié (SH-SY5Y) 115
DESCRIPTION DES TRAVAUX PERSONNELS 116
I. Optimisation de la méthodologie pour déterminer le génome complet des EV de l'espèce A à partir des prélèvements cliniques 117
A. Mise au point d'une nouvelle méthode d'amplification du génome complet 117
B. Constitution de l'échantillon des prélèvements cliniques pour le séquençage des génomes complets de CVA6 118
C. Application de la méthode SMRT PacBio au séquençage du génome complet des EV 118
II. Origine et analyse du nouveau variant d'EVA71 C1 variant 2015 119
A. Recrudescence des infections à EVA71 en France en 2016 119
B. Emergence du virus C1v2015, un nouveau variant de l'EVA71 120
C. Structure génomique recombinante du virus C1v2015 120

D. Histoire évolutive du virus variant C1v2015 122
1. Estimation de l'horloge moléculaire pour le jeu des séquences de la région P1 122
2. Taux d'évolution de la région génomique P1 123
3. Datation de l'évènement de recombinaison du gène 3D^{pol} 124
E. Variations moléculaires structurales du variant C1v2015 125
III. Epidémiologie et histoire évolutive du CVA6 125
A. Caractéristiques épidémiologiques et cliniques des infections à CVA6 125
B. Analyse moléculaire des souches de CVA6 126
1. Diversité intratypique établie à partir des séquences codant la protéine VP1 126
2. Recherche des génomes recombinants en circulation à l'échelle mondiale 127
C. Histoire évolutive et diffusion géographique du CVA6 130
1. Evaluation de l'horloge moléculaire dans les séquences structurales P1 130
2. Histoire évolutive des clades D2 et D4 130
3. Diffusion géographique des lignées de CVA6 131
D. Variations moléculaires structurales des lignées du génogroupe D du CVA6 131
DISCUSSION 132
I. Optimisation de l'amplification du génome complet des EV A 133
II. Impact clinique de la réémergence de l'EVA71 et du CVA6 135
III. Intérêt de la phylogénie moléculaire pour étudier l'émergence et la diffusion virale 137
IV. Variations de la capside et dynamique épidémiologique des lignées 139
V. Dynamique des populations virales et recombinaison génétique 141
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 144
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 148
ANNEXES 170

INTRODUCTION GENERALE

L'étude qui fait l'objet de cette thèse s'intègre dans deux programmes de recherche du laboratoire. L'un concerne la surveillance de la maladie pieds-mains-bouche et l'autre, l'étude de l'épidémiologie moléculaire et de l'évolution des entérovirus. Sans entrer dans les détails qui seront évoqués plus loin (cf. **Surveillance de la maladie pieds-mains-bouche**), la surveillance de la maladie pieds-mains-bouche grâce à un réseau sentinelle a été développée progressivement jusqu'à l'échelle nationale. Cette surveillance initiée d'abord localement en 2010 reste pionnière en France et en Europe. A l'origine, le projet avait comme principal objectif de mettre en place une surveillance de l'EVA71. Partant de la constatation que cet EV était impliqué dans des épidémies de maladie pieds-mains-bouche de grande ampleur dans de nombreux pays asiatiques (Lin et al., 2002 ; Ooi et al., 2007 ; Wu et al., 2010), il avait semblé nécessaire de mieux comprendre l'état de la circulation de l'EVA71 en France. En effet, toutes les études d'épidémiologie clinique montraient déjà que cet EV était associé à des manifestations sévères en raison notamment d'un neurotropisme marqué et d'atteintes cardio-pulmonaires (Ooi et al., 2007). Les résultats de la surveillance en France ont montré que les cas pédiatriques de la maladie pieds-mains-bouche étaient associés à la circulation de nombreux types d'entérovirus, ceux classés dans l'espèce A mais aussi de l'espèce B et que l'EVA71 était très peu fréquent. Contrairement aux épidémies rapportées par exemple en Chine (Xing et al., 2014), à Taiwan (Chen et al., 2007 ; Wu et al., 2013), ou en Malaisie (Solomon et al., 2010), les épidémies saisonnières identifiées par la surveillance en France pendant la période 2010 – 2016 ont toutes été causées par le CVA6, un type d'EV de l'espèce A, apparenté à l'EVA71. La réémergence épidémique brutale du CVA6 avait été rapportée en 2008 pour la première fois dans le monde en Finlande et avait été associée à une épidémie caractérisée par des formes atypiques de la maladie pieds-mains-bouche (Osterback et al., 2009).

Le laboratoire avait par ailleurs engagé des travaux d'épidémiologie moléculaire et entrepris d'étudier les souches d'EVA71 isolées à partir des cas cliniques rapportés de façon sporadique en France depuis le début des années 2000. Ces travaux avaient montré que ce virus était associé dans une majorité de cas à une méningite aseptique et que sur le plan génétique, les souches étaient différentes de celles rapportées dans les épidémies en Asie (Hassel et al., 2015 ; Mirand et al., 2012). Une autre étude du laboratoire comparant des souches isolées dans plusieurs pays européens avait aussi permis de décrire la dissémination du virus entre les pays, y compris avec l'Asie (Hassel et al., 2017). Les résultats avaient aussi confirmé que l'épidémiologie des infections à EVA71 évoluait sur des modes différents en Europe et en Asie : une alternance de souches de génogroupes C1 et C2 en Europe et des épidémies causées par des souches du génogroupe C4 en Asie.

En 2016, le Centre européen des maladies infectieuses lance une alerte épidémiologique annonçant une recrudescence de cas sévères d'infections à EVA71 dans plusieurs pays européens dont la France (European Centre for Disease Prevention and Control, 2016). Quelques mois après cette alerte, Böttcher et collaborateurs rapportent l'émergence d'une souche d'EVA71 C1 en

Allemagne l'année précédente et suggèrent qu'il s'agit d'un virus d'origine recombinante (Böttcher et al., 2016). Les résultats de typage moléculaire effectué dans les prélèvements cliniques en France montrent que l'épidémie en 2016 est liée à la circulation de la nouvelle souche C1 rapportée en Allemagne. Ceci sera aussi confirmé pour l'épidémie en Espagne (Gonzalez-Sanz et al., 2019). C'est dans ce contexte épidémiologique qu'est née l'idée de cette thèse dont l'objectif est de comparer les réémergences épidémiques du CVA6 et de l'EVA71 en faisant l'hypothèse qu'il existait peut-être un lien entre les deux. Par ailleurs, nous avons aussi fait le choix de l'analyse génomique afin d'étudier les caractéristiques évolutives des génomes complets. La grande majorité des travaux d'épidémiologie moléculaire concernant les EV sont basées sur l'analyse comparative des séquences codant la protéine de capside VP1 qui porte les principaux épitopes viraux neutralisants. Cette approche présente l'intérêt de permettre la comparaison de grands jeux de données – ce qui est fondamental en épidémiologie moléculaire – car les séquences VP1 sont déterminées dans le cadre du typage moléculaire réalisé après le diagnostic virologique. Mais cette approche présente une limite évidente car elle ne permet pas d'étudier l'évolution génétique virale dans son intégralité. C'est la raison pour laquelle nous avons opté pour l'épidémiologie génomique qui présente un plus large champ d'applications. Ce choix a donc impliqué de mettre au point une technique de séquençage haut débit applicable aux prélèvements cliniques. Nous avons choisi la technologie développée par la société Pacific Biosciences et nous avons pu l'appliquer pour comparer les génomes de CVA6.

Dans la première partie de la thèse, nous présentons une synthèse bibliographique sur les caractéristiques (structure, cycle infectieux, épidémiologie, physiopathologie) de l'EVA71 et du CVA6. Ensuite, nous présentons successivement la méthodologie employée pour les travaux puis les résultats. Enfin, nous discutons les résultats, leurs limites et présentons les perspectives à ce travail.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

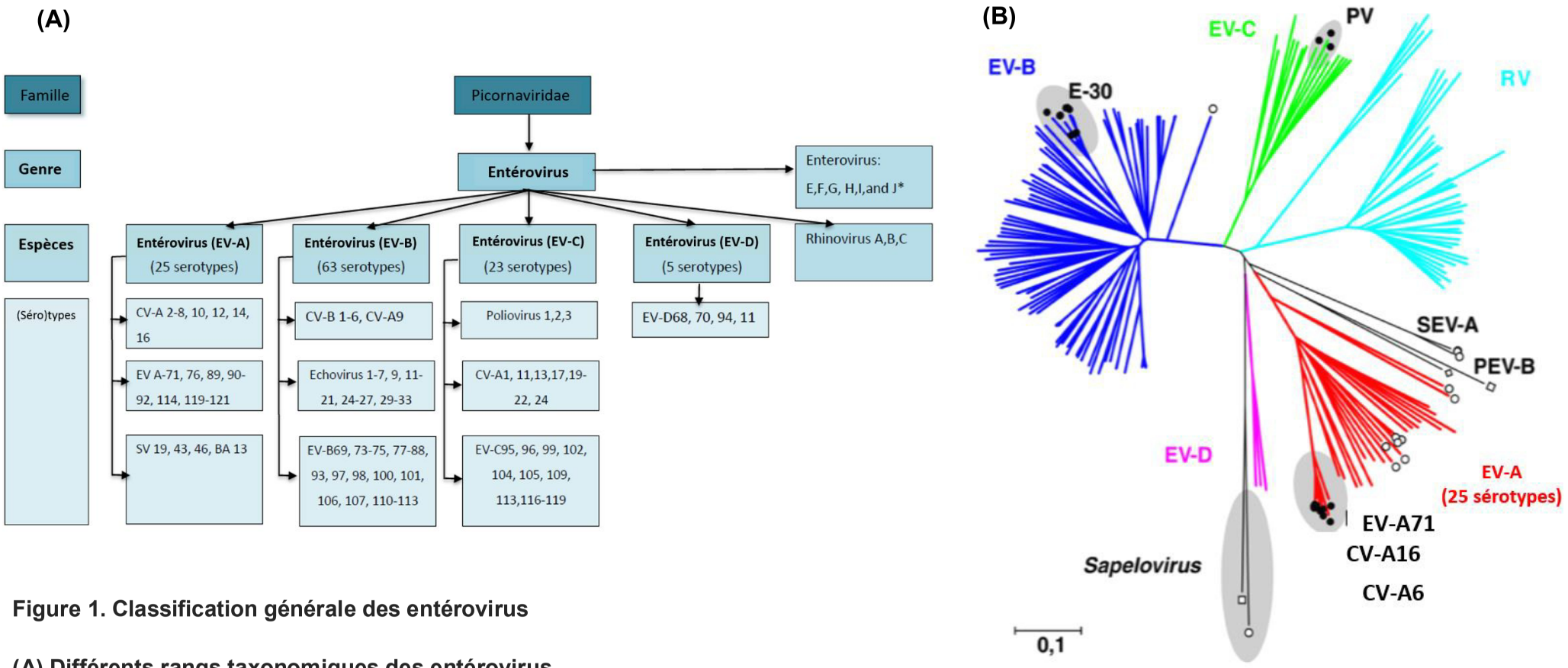


Figure 1. Classification générale des entérovirus

(A) Différents rangs taxonomiques des entérovirus.

(B) Classification phylogénétique des entérovirus humains : Les relations phylogénétiques humains ont été déterminées par l'analyse comparative de la séquence génique complète 1D (codant pour la protéine de capside VP1). Les distances génétiques ont été estimées par la méthode de maximum de vraisemblance et l'arbre phylogénétique a été construit par la méthode de neighbor-joining. Les entérovirus de l'espèce A (EV-A) sont représentés en rouge, l'espèce B (EV-B) en bleu, l'espèce C (EV-C) en vert et l'espèce D (EV-D) en violet. Les rhinovirus (RV) sont représentés en cyan. Abréviations : poliovirus (PV), EV-A71 (EV-A71), coxsackievirus A16 (CV-A16), CVA6 (CV-A6), echovirus 30 (E-30), simian enterovirus (SEV), porcine enterovirus (PEV). Le Sapelovirus a été utilisé comme groupe externe. **(D'après Bailly et al., 2008).**

I. Caractéristiques virologiques de l'EVA71 et du CVA6

A. Classification des entérovirus

Sur le plan taxonomique, les EV appartiennent à la famille des *Picornaviridae,* dérivé de « pico » signifiant petit et ARN se référant à la nature physico-chimique du génome (Melnick et al., 1963). Le nom vernaculaire est picornavirus. Cette famille comprend 63 genres dont la majorité infectent les invertébrés (*Apthovirus, Avihepatovirus, Cardiovirus, Enterovirus, Erbovirus, Hépatovirus, Kobuvirus, Parechovirus, Sapelovirus, Senecavirus, Tremovirus, Teschovirus)* (Adams et al., 2015; Racaniello & Denison, 2013; Walker et al., 2019).

À l'origine, les différents types d'EV étaient classés en sous-groupes : poliovirus (PV), CVA (CVA), CVB (CVB) et échovirus (E), sur la base de leur pouvoir pathogène chez l'homme et les animaux de laboratoire, de l'effet cytopathique observé *in vitro*, et de similitudes antigéniques (Ho, 2000; Solomon et al., 2010; Yi et al., 2011).

Actuellement, la classification des EV est basée sur l'identification moléculaire à partir du gène 1D qui code pour la protéine de capside VP1 (Oberste et al., 1999). Le comité international de la classification des picornavirus (Virus Taxonomy: 2014 Release ; Comité international sur la taxonomie des virus ; http://www.ictvonline.org/taxonomy ; consulté en Juillet 2020) a établi la taxonomie des EV sur la base de caractéristiques phylogénétiques et de propriétés biologiques en introduisant la notion d'espèce (taxonomique). Le genre Entérovirus comprend 15 espèces notées A – H et J et les espèces rhinovirus A à C **(Figure 1A)**. Le type d'un nouvel isolat est ainsi déterminé par une analyse comparative avec la méthode Blast (Basic Local Alignment Search Tool) et par phylogénie moléculaire de la séquence VP1 en utilisant une base de données contenant les séquences des souches de référence et des variants de tous les (séro)types connus (Palacios et al., 2002). Les types d'EV rapportés dans les infections humaines font partie de 4 espèces : EV-A, B, C et D dans lesquelles sont répartis environ 107 sérotypes ou génotypes d'EV identifiés sur la base d'un seuil de 25 % de divergence nucléotidique établi pour la séquence codant la protéine de capside VP1 **(Figure 1B)** (Oberste et al., 1999).

Parmi les 25 types d'EV de l'espèce A, l'EVA71 et le CVA6 appartiennent à un ensemble de (séro)types principalement associés à la maladie PMB (Bian et al., 2015; Liu et al., 2020; McMinn, 2002).

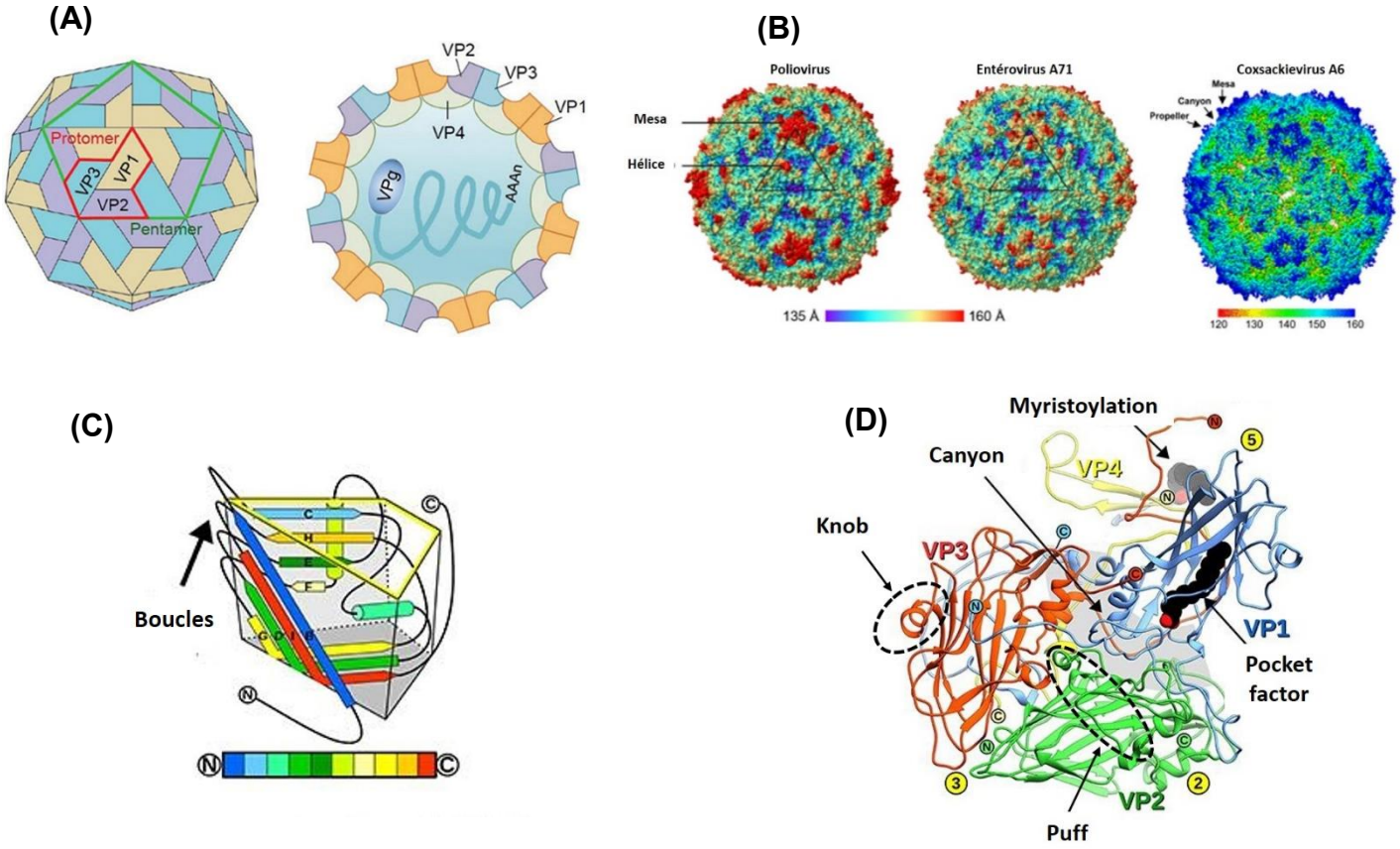


Figure 2 : Structure et organisation de la capside de l'EV-A71 et du CVA6

(A) La capside des entérovirus se compose de 60 protomères comportant chacun un seul exemplaire des quatre protéines structurales VP1, VP2, VP3 et VP4

(B) Surface de la capside du poliovirus, de l'EV-A71 et du CVA6 (d'après Baggen et al., 2018 ; Chen et al., 2018). Les surfaces sont colorées en fonction de leur distance par rapport au centre du virion, comme indiqué dans la barre de couleur. Les références de la banque de données de protéines PDB : poliovirus (PDB ID 2PLV), EV-A71 (PDB ID 3VBS), CVA6 (PDB ID 5YHQ).

(C) Représentation schématique de l'organisation structurale en 8 feuillets β anti-parallèles dite « jelly-roll », commune aux protéines de capside (Hogle, 2002).

(D) Représentation de la configuration d'un protomère au sein de la capside icosaédrique.

B. Structure de la capside virale de l'EVA71 et du CVA6

1. Caractéristiques communes à tous les entérovirus

Les particules virales d'EV sont petites (30 nm de diamètre) et constituées d'une capside protéique non enveloppée. Cette structure résiste aux détergents non ioniques et reste stable à un pH entre 3 et 10 (Committee on the Enteroviruses, 1957). L'infectiosité des virions peut être inactivée par la lumière ultraviolette, le chlore et les molécules aldéhydiques : formaldéhyde ou glutaraldéhyde (Bailly et al., 1991).

La structure tridimensionnelle de la capside de plusieurs EV a été déterminée par cristallographie aux rayons X. La capside est composée de quatre protéines structurales virales VP1 (1D), VP2 (1B), VP3 (1C) et VP4 (1A) disposées en 60 sous-unités (protomères) dont la répétition confère la forme icosaédrique aux virions **(Figure 2A)** (Hogle et al., 1985; Plevka et al., 2012; Racaniello, 2006; Rossmann et al., 1985). La structure générale des particules virales est conservée, bien qu'il existe des variations (mutations, insertions, délétions) dans les protéines structurales propres à chaque type d'EV (Racaniello & Denison, 2013). Les protéines VP1, VP2 et VP3 constituent la surface de la capside **(Figure 2B)**. La structure tridimensionnelle, commune à ces trois protéines, est organisée en 8 feuillets β antiparallèles, appelé « jelly-roll » **(Figure 2C)** (Rossmann et al., 1985). Les trois protéines interagissent avec la protéine VP4, interne, via leurs extrémités N-terminale. Au niveau de la jonction de la protéine VP1 avec les protéines VP2 et VP3, une dépression ou « canyon » fait le tour de l'axe de symétrie d'ordre 5 défini par la jonction des protéines VP1 de cinq protomères. La zone de jonction des protomères forme une "mesa" ou plateau, très exposée à la surface (Hogle et al., 1985; Rossmann et al., 1985). La région du "canyon" sert de site de liaison des récepteurs hôtes (Rossmann et al., 2002). Le fond du canyon constitue une poche hydrophobe, souvent occupée par un acide gras dérivé de l'hôte (Bergelson & Coyne, 2013; Hogle, 2002). La liaison du virus à son récepteur entraîne l'expulsion de cette molécule d'acide gras « pocket factor », suivie du processus de décapsidation, qui conduit à la libération du génome viral dans le cytosol (Plevka et al., 2012). Au niveau des protéines VP2 et VP3, les boucles de surface nommées "puff" et "knob", respectivement sont impliquées dans la liaison aux récepteurs non-immunoglobulines de certains picornavirus **(Figure 2D)** (Bergelson & Coyne, 2013).

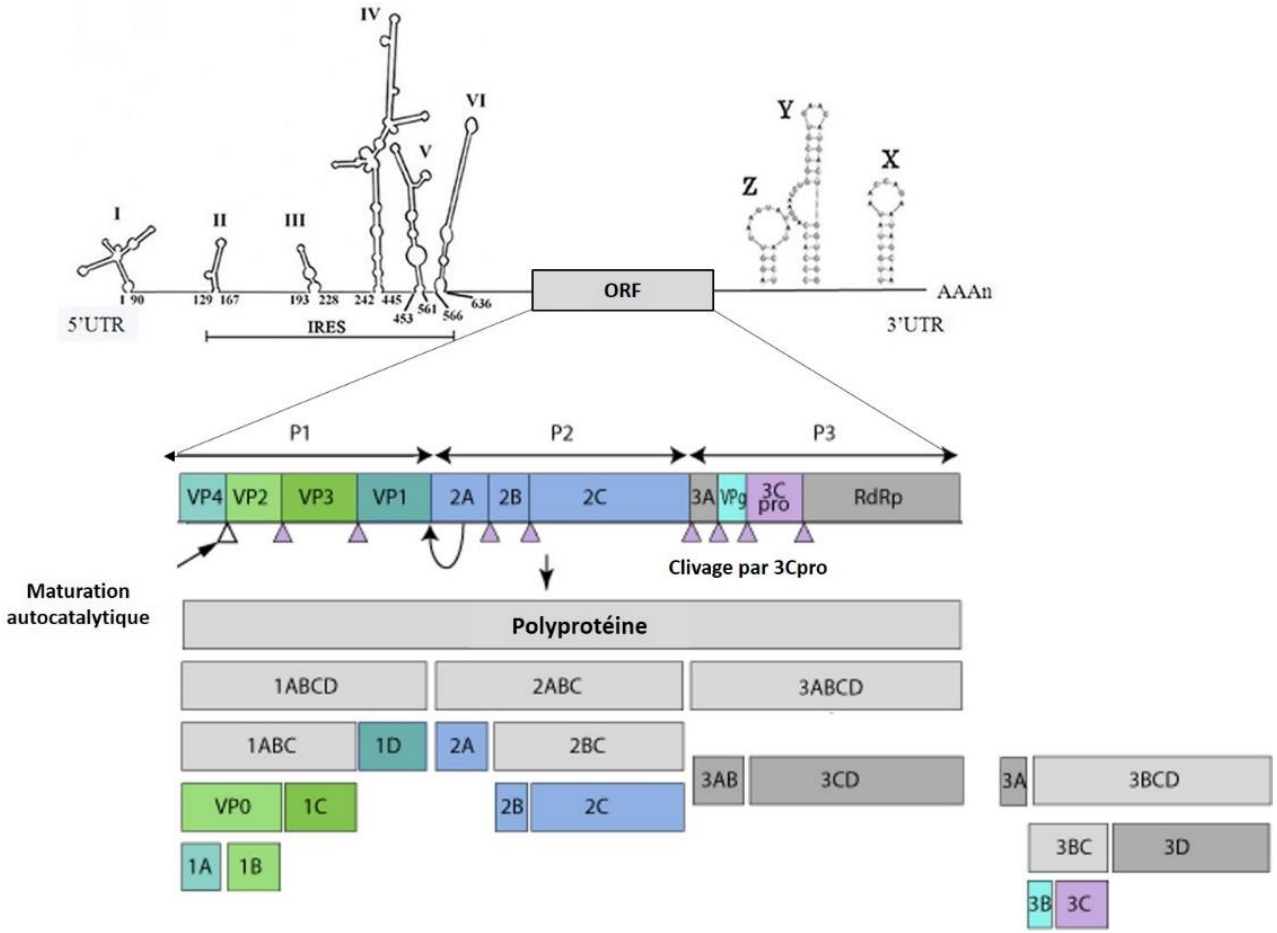


Figure 3 : Organisation structurale et fonctionnelle du génome des entérovirus

La région 5' NC contient six structures tige-boucle (I-VI). Les domaines II-VI forment l'élément IRES de type I. L'ORF code une polyprotéine qui est clivée en 11 protéines virales dont 4 protéines structurales et 7 protéines non structurales. La région 3′ NC de l'EV-A71 contient trois structures tiges-boucles (X, Y et Z) qui sont associées à la réplication de l'ARN viral **(D'après Yuan et al., 2018 ; Viralzone).**

2. Caractéristiques spécifiques à l'EVA71 et au CVA6

Les protéines VP1, VP2, VP3 et VP4 de l'EVA71 sont constituées de 297 (32 kDa), 254 (28 kDa), 245 (27 kDa) et 23 (8 kDa) acides aminés, respectivement (Plevka et al., 2012; Wang et al., 2012).

La structure cristallographique de la capside de l'EVA71 révèle que VP1 présente six boucles de surface (BC, DE, BE/aB, GF, GH et HI) situées autour des cinq axes de l'icosaèdre et qui représentent les régions les plus variables de l'EVA71 (Cordey et al., 2012; Foo et al., 2007; Ku et al., 2015; Liu et al., 2011). Le canyon de l'EVA71 est moins profond que celui de la plupart des autres EV car les boucles à la surface de VP1 sont plus petites. Le «pocket factor» de l'EVA71 est accessible aux solvants contrairement à celui des autres EV (Plevka et al., 2012).

Les protéines VP1, VP2, VP3 et VP4 du CVA6 sont constituées de 305 (33,85 kDa), 256 (28,41 kDa), 240 (26,64 kDa) et 69 (7,65 kDa) acides aminés, respectivement. La structure cryoEM de la capside du CVA6 révèle des caractéristiques structurelles communes avec les autres picornavirus. Les différences observées entre les capsides des CVA6, EVA71 et CVA16 portent sur les boucles BC, DE, EF et HI de VP1. La disposition distincte de ces quatre boucles entre les différents types d'EV crée de nombreuses surfaces de capsides uniques et explique probablement pourquoi le CVA6 ne partage pas les mêmes récepteurs que l'EVA71 ou le CVA16 (Ren et al., 2013; Xu et al., 2017).

C. Structure et organisation fonctionnelle du génome de l'EVA71 et du CVA6

Le génome des EV est un acide ribonucléique (ARN) simple brin de polarité positive dont la taille est d'environ 7,4 kb. Il comprend un seul cadre de lecture ouvert (ORF : Open Reading Frame) flanqué de deux régions non-codantes (UTR : untranslated region) en 5' et 3' (Brown & Pallansch, 1995). Comme le montre la **Figure 3**, la polyprotéine produite à partir de l'ORF est clivée en précurseurs à partir desquels sont générées quatre protéines structurales (VP1, VP2, VP3 et VP4) et sept protéines non structurales (2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C et 3D) **(Tableau 1)** (Brown et Pallansch, 1995).

1. Les régions non codantes

a) La région 5' non codante (5'NC)

La taille de la région 5'NC varie selon les types d'EV et représente environ 1/10ème du génome ; la région 5'NC du CVA6 et de l'EVA71 comprend respectivement 745 et 743 nucléotides.

Tableau 1: Les protéines virales et leurs fonctions

Région	Fonctions et caractéristiques générales décrites chez les entérovirus		Etudes spécifiques réalisées pour l'EV-A71 ou le CVA6	Mutations associées	Publications associées
Région 5'NC	• Synthèse du brin négatif au niveau du domaine I • Site d'initiation interne de la traduction du génome viral (domaine II à VI) • Rôle dans le tropisme cellulaire et la virulence	**EV-A71**	Régulation de la traduction du génome viral et la virulence chez la souris par un changement d'un nucléotide dans le domaine II de la région 5'NC	**158C :** Favorise la traduction du génome et la virulence des souches d'EV-A71 chez la souris	(Yeh et al., 2011)
			Détection des variations génétiques corrélées à des cas mortels de l'infection à EV-A71	**272G, 488U, 700A/U C241U, A571U, C579U U494C** Associées à une prévalence plus élevée dans les cas graves de l'infection à EV-A71	(R. Li et al., 2011) (Wen et al., 2013) (Chang et al., 2018)
Région 3'NC	Poly-uridylylation de la VPg	**EV-A71**	Réduction de la réplication virale en ciblant la région 3'NC par transfection des ARN interférents dans les cellules de rhabdomyosarcome Détection des variations génétiques corrélées à des cas mortels de l'infection à EV-A71	**U7335C** Associée à une prévalence plus élevée dans les cas graves de l'infection à EV-A71	(Sim et al., 2005) (Wen et al., 2013)
		CVA6	Détection des variations génétiques corrélées à différents phénotype de la maladie PMB de l'infection à CVA6	**A7357G, G7356A, C7364U, G7391C, C7360U, U7361A, C7370G, A7381G** Associées à une prévalence plus élevée dans les cas graves de l'infection au CVA6	(Chen et al., 2012)

VP1	• **Assemblage des particules virales** • **Reconnaissance des récepteurs cellulaires** • **Plus exposée à la surface de la capside virale** • **Contient la majorité des marqueurs antigéniques**	EV-A71	**Mise en évidence d'une adaptation et d'une sélection des souches d'EV-A71 au cours de la dissémination virale dans l'organisme**	31G : **Améliore l'entrée de l'EV-A71 dans les cellules de neuroblastome** **Favorise la réplication virale dans cellules neuronales humaines** **Peut faciliter l'infection du SNC chez l'homme** 31 D : **Favorise la réplication virale dans les cellules colorectales** **Augmente la stabilité du virion**	(Huang et al., 2017)
			Identification d'une adaptation spécifique à un site localisé dans la région de la boucle BC de VP1 et contribuant au neurotropisme des souches d'EV-A71	**L97R**	(Cordey et al., 2012)
			Régulation de la maturation par le clivage du précurseur VP0 de la région structurale de l'entérovirus 71 par un acide aminé très conservé chez les souches d'EV-A71	**107A :** Module la flexibilité de la boucle BC de VP1 Régule le clivage de VP0 Augmente l'efficacité de la décapsidation	(Zhang et al., 2017)
			Augmentation de la réplication virale et de la virulence dans les cellules neuronales des souris et *in vivo* chez les souris en induisant des mutations sur la protéine VP1 de la capside virale d'une souche associée à une forme bénigne	**Q145E :** Améliore la fixation de l'EV-A71 aux cellules de neuroblastome de la souris Augmente la réplication virale Accroit la virulence d'une souche EV-A71 chez la souris i*n vivo* en association à la mutation K149M de la protéine virale VP2	(Huang et al., 2012)
			Mise en évidence d'un effet coopératif des déterminants de l'atténuation de PV1(Sabin) est essentiel pour réduire la neurovirulence d'une souche d'EV-A71 adaptée à la souris	**G145E** Associé à une augmentation de la virulence chez la souris	(Arita et al., 2008; Chua et al., 2008)
			Mise en évidence du rôle du résidu d'acide aminé 145 dans la protéine virale VP1 comme déterminant potentiel de la neurovirulence dans un modèle de singe expérimental ; comme décrits chez les humains et les modèles murins expérimentaux	**145E, 98 K/E** Associées au développement de la virémie et de l'invasion du SNC par l'EV-A71, Augmentation du niveau de cytokines dans le modèle de singe Cynomolgus	(Kataoka et al., 2015)
			Caractérisation génétique des souches d'EV-A71 isolées Chez des patients atteints de formes graves de la maladie PMB par analyse comparative des génomes complets	**E145Q** Détectée majoritairement dans le génome des souches associées aux formes sévères de l'infection à EV-A71	(Chang et al., 2012)
			Etude de la sensibilité d'un nouveau modèle organoïde des voies respiratoires humaines à l'infection par l'EV-A71	**98 K, 104D, 145Q :** Déterminant majeur et marqueurs potentiels de l'infectiosité des organoïdes des voies respiratoires humaines	(Van der Sanden et al., 2018)

			Démonstration du rôle déterminant du résidu 145 de la protéine de la capside virale (VP1-145) dans l'interaction virus-récepteur et le tropisme de l'EV-A71 pour les leucocytes exprimant la PSGL-1.	**145Q/G, 244 K** La combinaison de ces deux mutations permet à la souche d'EV-A71 de se fixer au récepteur cellulaire PSGL-1	(Nishimura et al., 2013)
			Caractérisation génétique des souches d'EV-A71 isolées Chez des patients atteints de formes graves de la maladie PMB par analyse comparative des génomes complets	**145G/Q/R, 164^{E}** Détectée majoritairement dans le génome des souches associées aux formes sévères de l'infection à EV-A71	(Li et al., 2011)
VP2	• Assemblage des particules virales • Contient le « puff »	**EV-A71**	Augmentation de la réplication virale et de la virulence dans les cellules neuronales des souris et *in vivo* chez les souris en induisant des mutations sur la protéine VP1 de la capside virale d'une souche associée à une forme bénigne	**K149M** Accroit la virulence d'une souche EV-A71 chez la souris i*n vivo* en association à la mutation Q145E de la protéine virale VP1	(Huang et al., 2012)
VP3	• Assemblage des particules virales • Contient une région très conservée chez les EV désignée « knob »	**EV-A71**	Mise en évidence d'un épitope au niveau du «knob » reconnu comme déterminant antigénique conformationnel et cible de l'anticorps neutralisant IgG désigné « 5H7 » en bloquant la fixation au récepteur cellulaire	**74S** Augmente la capacité de neutralisation de la souche d'EV-A71 par un anticorps dans le modèle murin expérimental	(Jia et al., 2017)
VP4	• Assemblage des particules virales • Formation de pores dans la membrane cellulaire pour faciliter la libération du génome viral • Plus interne et conservée de la capside virale	**EV-A71**	Identification d'un épitope de neutralisation au niveau des résidus 1-20 de l'extrémité N-terminale de la protéine virale VP4 de l'EV-A71 produisant des réponses anticorps de protection croisée		(Zhao et al., 2013)
2A - Protéase	• Inhibition de la synthèse des protéines cellulaires • Activation de la traduction du génome virale par le clivage de l'extrémité C-terminale de VP1, l'extrémité N-terminale de P2 et du précurseur 3CD	**EV-A71**	Modulation de la réplication et de la pathogénèse dans les cellules neuronales en remplaçant la 2A d'une souche virulente par une souche associées à une forme bénigne	**68K** Détecté majoritairement dans le génome des souches associées aux formes sévères de l'infection à EV-A71	(Li et al., 2018)
			2Apro module l'apoptose en clivant le facteur d'initiation de la traduction de l'hôte (eIF4G1)		(Kuo et al., 2002)
			2Apro participe à l'altération le transport nucléaire de l'hôte et la perméabilité nucléaire en clivant la glycoprotéine des pores nucléaires 62 (Nup62)		(Zhang et al., 2013)
			2Apro participe à l'inhibition de la réponse de l'IFN antiviral de type I en clivant la MDA5 dans les cellules infectées, empêchant ainsi son interaction avec une MAVS		(Feng et al., 2014)

	• Modulation de la réponse antivirale		2Apro participe à l'inhibition de la réponse immunitaire innée antivirale induite par le récepteur cytoplasmique de type RIG-I en clivant les protéines de signalisation antivirale mitochondriale (MAVS), réduisant ainsi la production d'IFN de type I		(Wang et al., 2013)
2B	Altération de la perméabilité de la membrane cellulaire	**EV-A71**	2B interagit et active la protéine Bax dans les mitochondries en induisant l'apoptose cellulaire et affecte la voie apoptotique mitochondriale		(Cong et al., 2016)
2C	• Modulation de la réplication virale • Evasion de la réponse antivirale innée	**EV-A71**	2C s'associe principalement à la protéine 3 du réticulum endoplasmique (RTN3) de la cellule hôte et se combine avec l'ARN double brin viral, formant ainsi un complexe de réplication virale		(Tang et al., 2007)
			2C détourne le complexe protéique COPI assurant les transports protéiques entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi pour assurer une réplication virale efficace	**K216R** Favorise la multiplication virale dans les cellules CHO et sans aucun impact sur la virulence de la souche virale dans un modèle expérimental de souris	(Wang et al., 2012)
			2C peut interagir avec le domaine IPT du RelA(p65) et inhiber l'activation de NF-κB		(Du et al., 2015)
			2C peut inhiber l'activation de IKKβ, bloquant ainsi l'activation de NF-κB		(Li et al., 2016)
		CVA6	Modulation de l'apoptose des cellules RD transfectées avec des vecteurs exprimant la protéine virale VP2 de souches létales et bénignes chez la souris	**324A, 339Y, 556V** Associées à des souches létales chez le modèle expérimental de souris	(Wang et al., 2018)
3A	▪ Modulation de la réplication virale ▪ Evasion de la réponse immunitaire antivirale	**EV-A71**	3A interagit avec un facteur hôte contenant un domaine de liaison acyl-coenzyme A (ACBD3) pour recruter la PI4KB (phosphatidylinositol-4-kinase IIIβ) sur les sites de réplication du génome, ce qui facilite la réplication de l'ARN viral	**I44A ou H54Y** Inhibition de l'interaction de protéine 3A avec la PI4KB et l'ACBD3	(Xiao et al., 2017)
			3A peut inhiber l'expression de cytokines, telles que l'IL-1b, l'IL-6 et l'IL-8 pour échapper à la réponse immunitaire antivirale		(Choe et al., 2005)
			3A peut réduire l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité I et du récepteur du facteur de nécrose tumorale (TNF) dans les cellules infectées		(Choe et al., 2005)
3B (VPg)	Amorce de la réplication du génome viral	**EV-A71**	L'uridylylation du VPg est essentielle pour la réplication de l'ARN des entérovirus	Les mutations qui pourraient survenir pendant le processus d'uridylylation de la VPg empêchent la réplication du génome de l'EV	(Chen et al., 2013)
3C - Protéase	• Inhibition de la synthèse des protéines cellulaires	**EV-A71**	3Cpro intervient dans l'inhibition de la polyadénylation des ARNm cellulaires par le clivage du facteur nucléaire CstF64	**N69D :** Diminution de la réplication virale et de la virulence dans les cellules RD **3C-79 :**	(Weng et al., 2009)

	• Activation de la traduction du génome virale par le clivage de la protéine précurseur P3 et le clivage de P2 et P3 pour former les différentes protéines virales non-structurales • Modulation de la réponse antivirale		3Cpro inhibe la production des cytokines par le clivage du complexe TAK1/TAB1/TAB2/TAB3 qui est essentiel pour l'activation de NF-κB.	Associé à la gravité des manifestations cliniques et à la réplication virale	(Lei et al., 2014)
			3Cpro inhibe la réponse immunitaire de l'hôte en clivant la protéine d'adaptation TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β) et le facteur de régulation IFN 7 (IRF7)		(Lei et al., 2011, 2013)
			3Cpro déclenche l'apoptose dans les cellules SF268 par un mécanisme impliquant l'activation de la caspase, ce qui pourrait jouer un rôle important dans la pathogénie de l'infection par l'EV-A71		(Li et al., 2002)
			3Cpro peut subir une ubiquitination qui va entrainer sa dégradation et ralentir la réplication virale et l'apoptose cellulaire		(Chen et al., 2011)
			3Cpro inhibe l'immunité antivirale dans les cellules 293T infectées en inhibant l'activation du récepteur cytoplasmique de type RIG-I		(Xiaobo Lei et al., 2010)
		CVA6	3Cpro inhibe l'activation de IFN-β induite par MDA5, en désactivant l'interaction de MDA5 entre les MAVS		(Rui et al., 2017)
			3Cpro inhibe l'activation de NF-κB, une réponse de l'hôte également critique pour la signalisation médiée par le récepteur Toll-like (TLR) par le clivage du facteur de croissance β-activated kinase 1 (TAK1)		
3D polymérase	• ARN polymérase ARN dépendante • Uridylationde la VPg • Liaison à l'ARN viral et à des facteurs viraux et cellulaires • Activation de la réponse inflammatoire		3Dpol induit l'arrêt de la phase S du cycle cellulaire	**I251T** Contribue à une forte sensibilité à la température et diminue la virulence chez les souris néonatales	(Yu et al., 2015)
			3D interagit avec NLRP3 pour faciliter l'assemblage du complexe inflammasome et forme une structure en anneau 3D-NLRP3-ASC, entraînant l'activation de l'IL-1β		(Wang et al., 2017)
			3Dpol atténue la signalisation de l'IFN-γ accompagnée d'une diminution de l'expression du facteur de transcription STAT1, sans interférer avec l'expression du récepteur de l'IFN-γ		(Wang et al., 2015)

La région 5'NC est composée de six domaines de structure secondaire nommés I, II, III, IV, V et VI **(Figure 3)**, conservés chez tous les EV (Blondel et al., 2008; Zell & Stelzner, 1997).

La structure secondaire est constituée par les repliements de l'ARN (doubles hélices) qui génèrent des boucles de taille variable. Ces domaines constituent des éléments qui agissent en cis pour la traduction et la réplication du génome viral. Le domaine I de la région 5'NC, aussi appelé ORI L, présente une conformation en « feuille de trèfle » et est impliqué dans la synthèse du brin d'ARN négatif (Luo et al., 2014; Thompson et Sarnow, 2003). Les domaines II à VI forment le site d'initiation interne de la traduction (IRES) et sont nécessaires pour initier la traduction du génome viral (Lin et al., 2008; Thompson et Sarnow, 2003). Sur le plan fonctionnel, l'IRES permet de médier l'initiation de la traduction de l'ARN viral par un mécanisme indépendant de la coiffe, l'ARN de l'EVA71 et du CVA6 ne possédant pas de structure-coiffe à l'extrémité 5', comme tous les autres EV (Mueller et al., 2005). En plus des facteurs canoniques d'initiation de la traduction (eIF1 eIF4G, eIF4A, eIF2, eIF3), les domaines I à VI interagissent avec des facteurs cellulaires agissant en trans qui régulent l'efficacité de la réplication et de la traduction du génome viral et et qui pourraient expliquer le tropisme des EV en rendant certains types cellulaires plus ou moins permissifs à l'infection. Pour l'EVA71, les facteurs cellulaires interagissant avec l'IRES sont présentés dans le paragraphe (**La traduction du génome viral**). L'IRES joue également un rôle important dans la virulence des entérovirus : certaines mutations sont les principaux déterminants de l'atténuation des souches vaccinales de poliovirus. L'IRES (en particulier le domaine V) contribue notamment au neurotropisme des poliovirus (Blondel et al., 1995).

b) La région non codante 3' (3'NC)

La région 3'NC est de taille variable selon les types d'entérovirus, elle précède une queue poly A, qui est très importante pour la réplication des EV (Yogo et Wimmer, 1972). Elle se compose de deux domaines communs tige-boucle X et Y associés en une structure tertiaire de l'ARN qui forme un élément Ori R, cis régulateur **(Figure 3).** Cet élément intervient dans la réplication du génome viral (Zoll et al., 2009).

En particulier, il sert de plateforme pour recruter les facteurs protéiques nécessaires à l'initiation de la synthèse du brin d'ARN négatif. Le modèle de réplication du génome du poliovirus suggère que le complexe nucléoprotéique ainsi formé interagit avec l'élément Ori L de la région 5'NC, ce qui produit une circularisation du génome viral (Blondel et al., 1995). Une structure supplémentaire tige-boucle désignée (Z) a été mise en évidence par la comparaison des séquences et la prédiction de la structure secondaire de la région 3′ NC de plusieurs souches d'EVA71.

Initialement considéré comme une particularité des EV-B, l'existence du domaine Z a été démontrée chez l'ensemble des EV-A (Kok et al., 2012; Kok & Au, 2013). La taille du domaine Z permet de classer les EV-A en 2 groupes I et II , l'EVA71 (tous les génotypes sauf B3 et C4) et le CVA6 appartenant au groupe II possédant le domaine Z le plus petit (Kok & Au, 2013).

Le domaine Z étant une région conservée parmi les EV de l'espèce A, l'identification de son mécanisme d'action contribuerait à une meilleure compréhension du rôle fonctionnel de la région 3'NC dans la traduction et la réplication du génome viral.

2. Les protéines virales non structurales et leurs principales fonctions

Les fonctions des protéines générées à partir des régions P2 et P3 ont été bien décrites pour les poliovirus et d'autres types comme le CVB3 (Brown et Pallansch, 1995). Il s'agit de protéines impliquées dans la traduction, la maturation de la polyprotéine et des précurseurs (protéases 2A, 3C, précurseur 3CD) et dans la réplication du génome viral (2B, 2C, 3AB, 3B, précurseur 3CD, et polymérase 3D).

- **Protéase 2A (2Apro)**

La protéase 2A est essentielle pour la morphogenèse virale car elle est responsable du premier clivage de la polyprotéine pendant la traduction. L'activité protéasique de 2A intervient dans le clivage entre l'extrémité C-terminale de VP1 et l'extrémité N-terminale de P2, c'est-à-dire de la protéine 2A elle-même. 2Apro peut également cliver 3CD pour produire 3C et 3D. 2Apro joue également un rôle important dans la réplication virale (Yang et al., 2010).

- **Protéine 2B**

La protéine 2B appartient à la famille des viroporines (Xie et al., 2011). La structure de la protéine 2B comprend deux hélices hydrophobes transmembranaires permettant la formation d'un pore transmembranaire qui entraîne des changements dans la perméabilité de la membrane cellulaire. Lorsqu'un EV infecte la cellule hôte, la protéine 2B crée des pores dans le réticulum endoplasmique de la cellule hôte, ce qui libère des ions Ca^{2+} dans le cytoplasme de la cellule et peut déclencher le trafic membranaire et le transport des protéines virales (Xie et al., 2011).

- **Protéine 2C**

La protéine 2C est une protéine multifonctionnelle. Elle se compose de trois sous-domaines : un domaine ATPase, un doigt de zinc et une longue hélice C-terminale α- (Références PDB : 5GRB) (Guan et al., 2017). Elle possède des activités ATPase et GTPase (Rodriguez et Carrasco, 1993).

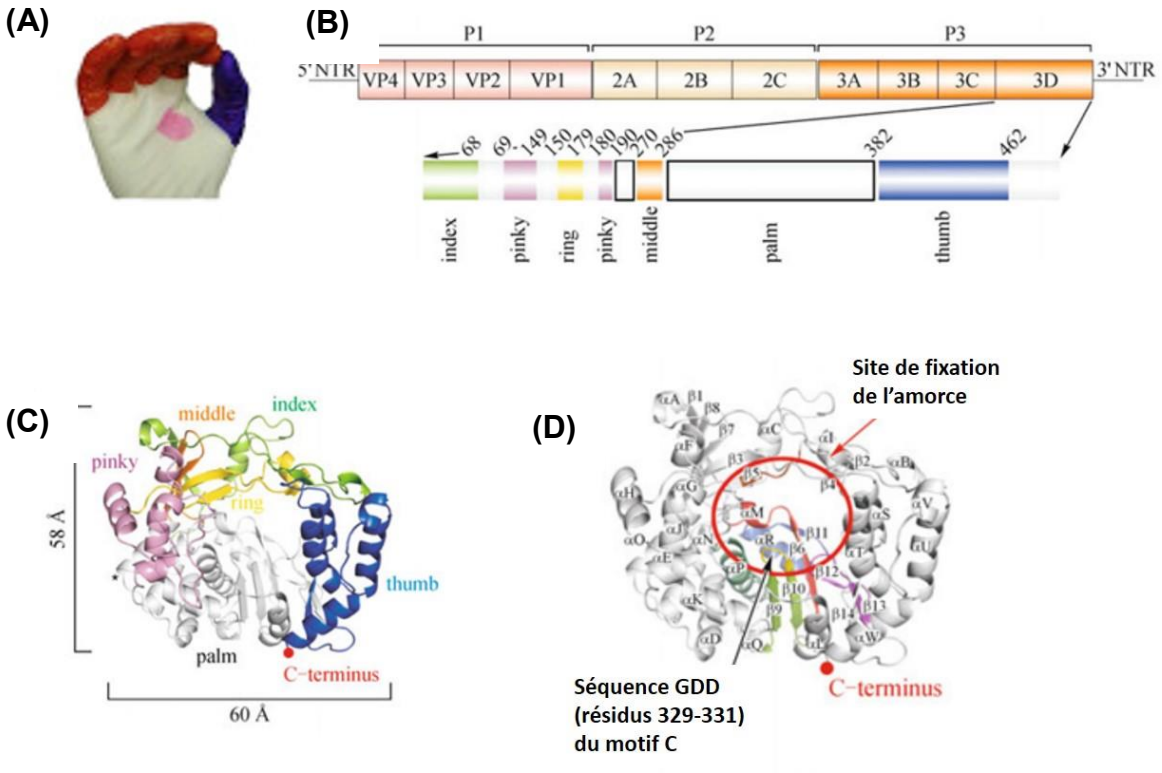


Figure 4: Vue d'ensemble de la structure de la RdRp (3Dpol) de l'EV-A71

(A) Configuration en « poing droit fermé » de la polymérase 3D des entérovirus.

(B) Localisation des différents domaines de la polymérase 3D sur le génome de l'EV-A71.

(C) Représentation de la configuration des différents domaines au sein de la polymérase 3D.

(D) Motifs de polymérase conservés de la RdRp (3Dpol) de l'EV-A71 : motif A (rouge ; 229-241), motif B (cyan ; 293-310), motif C (vert ; 321-336), motif D (bleu ; 340-357), le motif E (magenta ; 370-380), le motif F (brun ; 172-176) et la séquence GDD du motif C (jaune ; 328-320).

- **Précurseur 3AB et protéine 3A**

La protéine 3A s'associe aux membranes du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi, générant une restructuration de leurs membranes en structures pseudo-vésiculaires (voir § **Rôle des organites de réplication « usine virale »**. Le précurseur 3AB associé aux membranes sert de co-facteur à la polymérase 3D lors de la réplication du génome viral. La protéine 3A inhibe le transport vésiculaire depuis le réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi dans les cellules hôtes.

- **Protéine 3B (ou aussi VPg)**

La protéine 3B, également connue sous le nom de VPg (Viral Protein genome-linked) (Wimmer, 1982), agit comme une amorce pour la réplication du génome viral et du brin d'ARN négatif (Andino et al., 1999). Pour cela, la protéine 3B subit d'abord une poly-uridylylation (VPg-pU-pU). Cette étape utilise une structure tige-boucle de l'ARN viral, appelée élément CRE « cis-acting replication element », qui se forme dans la séquence codant la protéine 2C des EV (exception faite des rhinovirus). L'élément CRE agit comme un support de la protéine 3Dpol (ou 3CD) pendant la phase d'uridylylation de VPg (Steil & Barton, 2009). Le complexe 3Dpol/VPg-pU-pU est transféré à l'extrémité 3'NC et la structure poly-U s'hybride à la queue poly A, servant d'amorce à la synthèse de l'ARN négatif (Ambros et Baltimore, 1978; Sun et al., 2012). L'uridylylation de la VPg étant essentielle pour la réplication de l'ARN génomique des entérovirus, les mutations qui pourraient survenir pendant le processus d'uridylylation de la VPg empêchent la réplication du génome de l'EVA71 (Chen et al., 2013).

- **Protéase 3C (3Cpro)**

La protéase 3C est une cystéine protéase appartenant à la famille des chymotrypsines protéases, qui est responsable de la majeure partie du clivage des sites de jonction au sein de la polyprotéine, en particulier dans la région non structurale (Lu et al., 2011). Le précurseur 3CD agit également dans le cadre du complexe de réplication en se liant au domaine I de la 5'NC de l'ARN génomique viral (Shih et al., 2004). 3Cpro induit le clivage de facteurs de transcription et de PABP (Poly-A Binding Protein), ce qui provoque une diminution de la transcription des ARNm cellulaires et par conséquent la production de protéines cellulaires (Joachims et al., 1999).

- **Polymérase 3D (3Dpol)**

La protéine 3D est une ARN polymérase ARN dépendante (RdRp, RNA-dependent RNA polymerase) qui permet la réplication de l'ARN génomique viral (Wu et al., 2010). Après l'infection d'une cellule hôte, elle amorce la synthèse du brin d'ARN négatif, lequel est ensuite utilisé comme modèle pour produire l'ARN de polarité positive. La concentration de ce dernier est environ 10 fois supérieure à celle de l'ARN négatif, ce qui permet de produire des protéines virales en grande quantité dans la cellule hôte (Bedard & Semler, 2004).

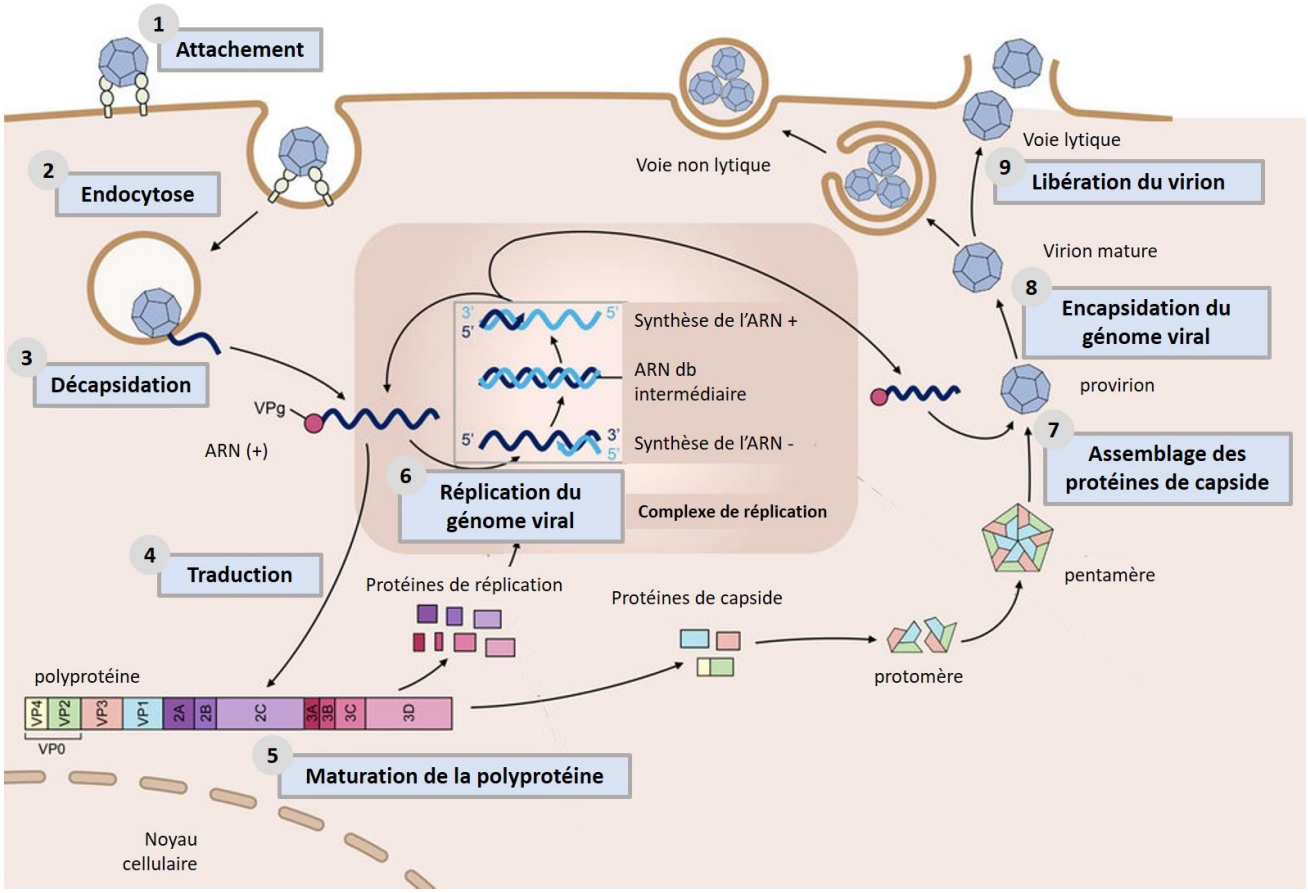


Figure 5 : Cycle de multiplication virale des Picornavirus

L'infection est initiée par l'attachement de la capside virale au récepteur cellulaire **(1)** entrainant l'internalisation par endocytose dans la cellule **(2)** suivie de la décapsidation où le virion libère son génome (ARN (+) **(3)**. La traduction du génome produit une polyprotéine unique qui est clivée de manière protéolytique en protéines de capside (VP1-VP4) et en protéines de réplication (2A-2C et 3A-3D) **(4, 5)**. Simultanément, Le génome viral se lie de manière covalente à la protéine virale VPg (3B), qui est nécessaire comme amorce pour la réplication. La réplication du génome par l'ARN polymérase virale dépendante de l'ARN (3Dpol) commence par la synthèse d'un ARN (-) qui sert de modèle pour la synthèse de nouvelles molécules d'ARN (+) avec un ARN intermédiaire double brin (ds), au niveau des complexes de réplication **(6)**. Les molécules d'ARN (+) synthétisées peuvent soit entrer dans un nouveau cycle de réplication, soit être conditionnées dans des virions de la progéniture. Les protéines de la capside s'auto-organisent en protomères et pentamères **(7)** et, de concert avec la machinerie de réplication et l'ARN génomique, s'assemblent en provirions qui sont convertis en virions infectieux **(8)**. Les virions matures sont libérés de la cellule hôte par voie non lytique dans des vésicules extracellulaires ou par lyse cellulaire **(9). (Modifié d'après Baggen et al., 2018)**

Comme beaucoup d'enzymes RdRp n'ayant pas de fonction de relecture (activité exonucléasique 3'>5'), la polymérase 3D des EV présente un taux de mutation élevé (1.2×10^{-4} à 1.0×10^{-6} substitutions nucléotidiques par site), à l'origine de la diversité des EV et plus largement des picornavirus (Drake, 1993; Hicks & Duffy, 2011; S Duffy, 2008).

La structure de la 3Dpol de l'EVA71 adopte la conformation "poing droit fermé" habituellement observée pour les autres RdRps (**Figure 4A)**. La structure tridimensionnelle globale de 3Dpol a été déterminée pour plusieurs EV et a révélé des caractéristiques communes : trois domaines appelés « index: fingers», «paume : palm» et «pouce : thumb» **(Figures 4B et 4C) (Kerkvliet et al., 2010)**. La RdRp (3Dpol) de l'EVA71 a conservé six séquences de quatre acides aminés chacune, qui sont appelées motifs A, B, C, D, E et F. Au sein du motif C, une séquence de résidus 329G-330D-331D (Glycine (G) ; Acide aspartique (D)) correspond au site actif de la polymérase 3D de l'EVA71. Les motifs A, B, C et D, situés dans le domaine de la "paume", sont définis dans toutes les classes de polymérases, tandis que le motif E dans le domaine de la "paume" et le motif F dans le domaine des doigts sont uniques à la fois aux RdRp et aux reverses transcriptases **(Figure 4D) (Ferrer-Orta et al., 2006; Yang Wu et al., 2010)**. Le domaine « index » traverse la paume de la main pour entrer en contact avec le haut du pouce « thumb », créant ainsi un canal à l'arrière de la 3Dpol par lequel les NTPs accèdent au site actif (Peersen, 2017).

D. Cycle de multiplication intracellulaire des entérovirus

La réplication des EV se produit dans le cytoplasme de la cellule hôte **(Figure 5)**. L'étape initiale est l'attachement du virion à un récepteur cellulaire puis le génome viral est internalisé. L'ARN pénètre dans le cytoplasme et peut être traduit immédiatement s'il échappe aux facteurs médiateurs de l'immunité intracellulaire.

1. Les récepteurs d'entrée dans la cellule hôte et la décapsidation

La liaison au récepteur induit des changements conformationnels irréversibles du virion et provoque l'expulsion de la protéine VP4. Le virion mature dont le taux de sédimentation est de 160S est transformé en une particule dite altérée ou "A" de 135S (de Sena & Mandel, 1977 ; Fenwick & Cooper, 1962). Au cours de ce processus, le site de liaison du canyon est ouvert, libérant l'acide myristique (acide gras saturé à 14 atomes de carbone lié à l'extrémité N-terminale de VP1) de l'anfractuosité dans laquelle il se trouve, sous le plancher du canyon. Ceci permet la liaison à des co-récepteurs, ce qui déstabilisera encore plus le virion et facilitera le processus de décapsidation.

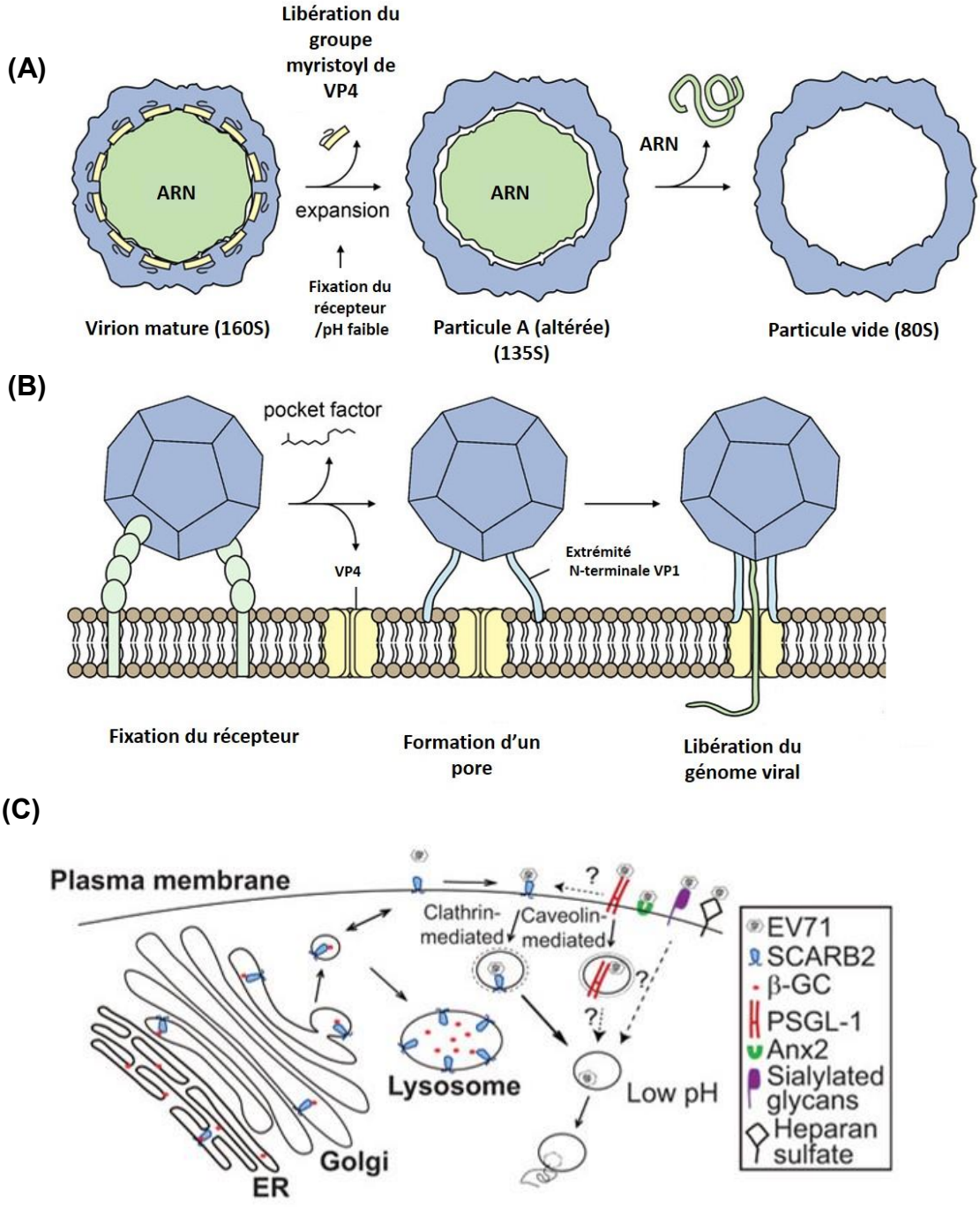


Figure 6 : Voies d'entrée du génome des entérovirus dans la cellule hôte

(A) Types de particules observés lors de la décapsidation *in vitro* d'entérovirus, avec leurs coefficients de sédimentation.

(B) Lors de l'entrée dans la cellule, le premier événement déstabilisant après la liaison au récepteur est la libération du « pocket factor » du virion. Par la suite, l'extrémité N-terminale de la protéine VP1 externalisée ancre le virion à la membrane endosomale et le groupe myristoyl de la protéine VP4 forme les pores de la membrane cellulaire à travers lesquels l'ARN viral est transporté dans le cytoplasme.

(C) Pour libérer son génome dans la cellule hôte, l'EV-A71 utilise la voie de l'endocytose médiée soit par la clathrine, soit par la cavéoline selon le récepteur et le type cellulaire.

La libération de l'ARN dans le cytoplasme se fait par les mouvements des quatre protéines de la capside virale pour créer un canal, permettant à l'ARN d'être transporté à travers la membrane cellulaire. Ce processus implique l'insertion de cinq copies de l'extrémité N-terminale de VP1 dans la membrane cellulaire, aidée par les groupes d'acide myristique de VP4, pour former un canal.

Une seconde expansion du virus se produit alors et l'ARN est libéré. Après la libération de l'ARN, le canal se referme et le virion se retrouve dans la conformation d'une particule vide 80S **(Figures 6A et 6B)** (de Sena & Mandel, 1977). L'endocytose est la voie utilisée par les EV pour délivrer le génome viral dans les cellules hôtes. Ce processus, largement décrit pour le poliovirus (Hogle, 2002), l'échovirus (Ylipaasto et al., 2010) et le CVB3 (Coyne et Bergelson, 2006), dépend du type d'entérovirus, du récepteur et du type cellulaire.

Après la fixation du virus à la surface de la cellule, les différentes voies d'endocytose proposées pour l'EVA71 sont : **(1)** l'internalisation du complexe virus-récepteur par un processus d'endocytose dépendante de la clathrine dans l'endosome ou le lysosome, où le pH est faible, le virus amorce un changement de conformation qui conduit à la libération du génome viral (Hussain et al., 2011; Lin et al., 2012), **(2)** l'internalisation du complexe virus-récepteur par un processus d'endocytose dépendante de la cavéoline mais sans libération du génome viral **(Figure 6C)** (Lin et al., 2013).

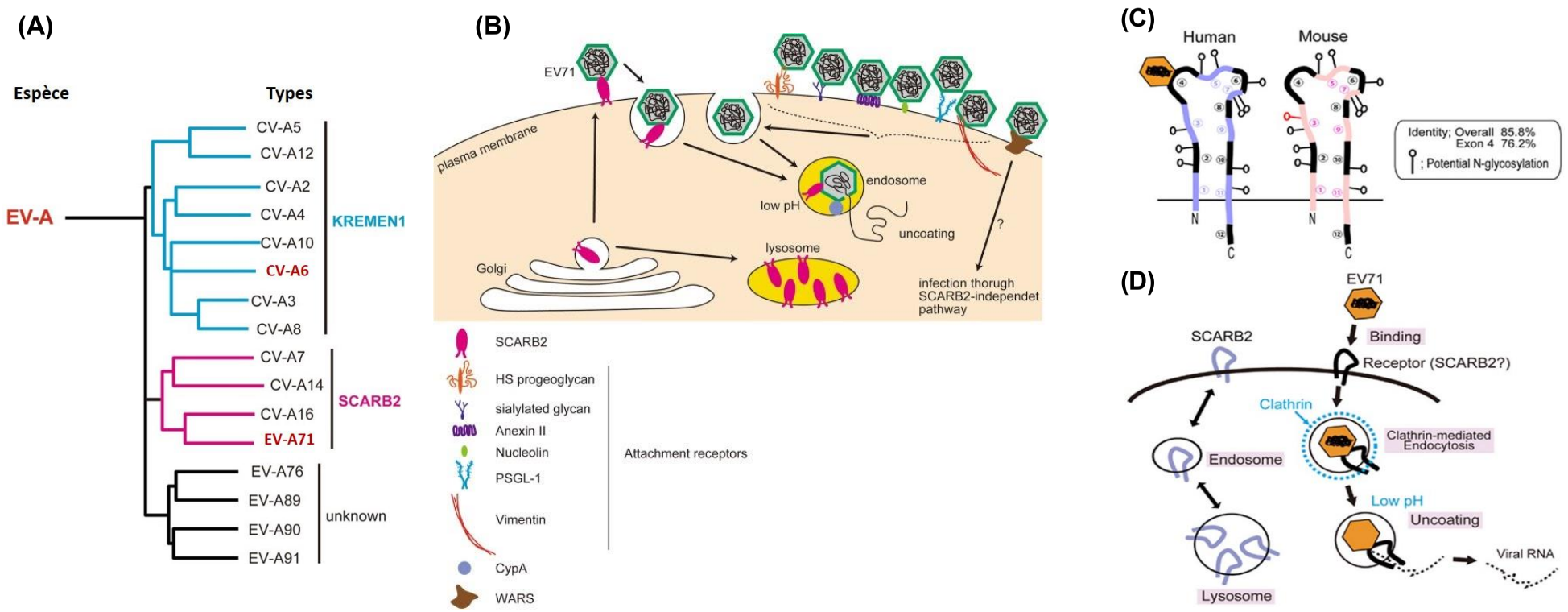
2. Récepteurs cellulaires

La fixation du virus au récepteur cellulaire est un déterminant important du tropisme tissulaire et de la pathogenèse. Les premiers récepteurs cellulaires des EV ont été identifiés en 1989 : il s'agit du récepteur PVR (CD155) pour le poliovirus (Koike et al., 1990) et de la molécule d'adhésion intercellulaire 1 (ICAM-1) comme récepteur spécifique de différents EV de l'espèce C (Newcombe et al., 2003). Depuis, de nombreux récepteurs ont été identifiés notamment parmi les familles des immunoglobulines ou des intégrines.

Parmi la gamme de récepteurs de surface décrits pour les entérovirus, plusieurs sont utilisés par les EV de l'espèce A **(Tableau 2)**. Au moins deux groupes ont été décrits parmi les 25 types d'EV A selon le récepteur utilisé **(Figure 7A)** (Staring et al., 2018; Yamayoshi et al., 2012).

a) Récepteurs cellulaires de l'EVA71

L'EVA71 appartient au premier groupe, avec les CVA7, A14 et A16, et défini par l'utilisation du récepteur humain du scavenger classe B, membre 2 (hSCARB2) comme récepteur principal (Yamayoshi et al., 2009; 2012). D'autres molécules ont été rapportées : le ligand-1 de la glycoprotéine P-sélectine (PSGL-1) (Nishimura et al., 2009), l'annexine II (Anx2) (Yang et al., 2011), la vimentine



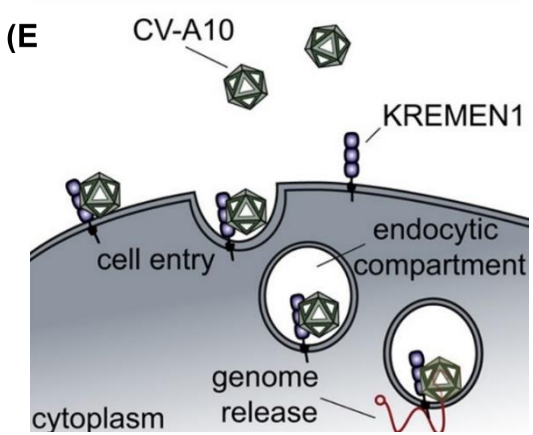


Figure 7 : Récepteurs cellulaires de l'EV-A71 et du CVA6

(A) Les récepteurs connus des EV-A

(B) Rôle du SCARB2 et des récepteurs d'attachement de l'EV-A71

(C) Comparaison des structures du SCARB2 humain et de la souris. L'identité des acides aminés de SCARB2 humain avec SCARB2 de souris est de 85,8%.

(D) Mécanisme d'action de SCARB2. La protéine SCARB2 est localisée dans les lysosomes et les endosomes et peut se lier à l'EV-A71 lorsqu'elle est présente à la surface des cellules. L'internalisation de la capside virale est clathrine-dépendante

(E) Mécanisme d'action du KREMEN1 : Les virions de CVA10 se lient à KREMEN1 sur les cellules, ce qui entraîne l'endocytose du complexe KREMEN1/CVA10. **(D'après Staring et al., 2018).**

(Du et al., 2014), la nucléoline (Su et al., 2015), le sulfate d'héparane (HS) (Tan et al., 2013), les acides sialiques (Yang et al., 2009), la fibronectine (He et al., 2018) et la prohibitine (Too et al., 2018) **(Figure 7B)**. Certains de ces facteurs pourraient favoriser la fixation du virus à la cellule mais sans induire les changements conformationnels du virion. Un autre facteur – la cyclophiline A (CypA) – favorise la décapsidation du virion (Qing et al., 2014). La tryptophanyl aminoacyl-ARNt synthétase humaine (hWARS) accroit la sensibilité des cellules en présence de SCARB2 (Yeung et al., 2018).

- **SCARB2**

SCARB2, également connu sous le nom de protéine II de la membrane intégrale lysosomale (LIMP-II), LGP85 et CD36b like-2, appartient à la famille CD36. C'est une protéine de type III à double membrane de 478 acides aminés impliquée dans le transport membranaire et la réorganisation du compartiment endosomal-lysosomal. Elle est ainsi principalement exprimée sur la membrane lysosomale et présente un large domaine externe et de courts domaines cytoplasmiques aux extrémités N et C-terminales (Calvo et al., 1995; Yamayoshi et al., 2009, 2014).

SCARB2 a été identifié comme récepteur de l'EVA71 en 2009 grâce à des analyses transcriptomiques. En transfectant du génome humain à des cellules murines non permissives à l'infection par l'EVA71, Yamoshi et al (2009) ont montré que les cellules exprimant l'ARN du gène humain SCARB2 devenaient sensibles à l'infection **(Figure 7C)**. Les domaines nécessaires à la liaison et à l'infection par l'EVA71 sont formés par les acides aminés 142 à 204 de l'exon 4 du gène SCARB2, les principaux sites de contact étant les domaines α5 (153-163) et α7 (183-193) (Yamayoshi et al., 2014).

La décapsidation de l'EVA71 est dépendante de SCARB2 et nécessite un pH bas. L'incubation de particules virales en présence de la molécule SCARB2 induit un changement de conformation à pH inférieur à 6,0 et la décapsidation du génome viral.

L'étude du complexe virion-SCARB2 a révélé que SCARB2 ne se fixe pas à l'intérieur du canyon mais plutôt sur son bord sud, et en particulier au niveau des boucles G-H de VP1 et E-F de VP2. Le mécanisme moléculaire serait un changement conformationnel de SCARB2 dépendant du pH, qui déforme la boucle G-H de VP1, de sorte que le facteur de poche est expulsé par un effet allostérique. L'internalisation de la capside virale est clathrine-dépendante **(Figure 7D)** (Zhou et al., 2019). SCARB2 est exprimé dans un grand nombre de tissus humains. Une forte expression de SCARB2 est en particulier observée dans les neurones du SNC, les pneumocytes pulmonaires, les hépatocytes, l'épithélium tubulaire rénal et l'épithélium intestinal. Les analyses immunohistochimiques réalisées sur des tissus collectés au cours d'infections fatales à la fois chez l'homme et l'animal ont permis de détecter des antigènes de l'EVA71 dans les neurones du SNC et les cellules épithéliales qui tapissent les amygdales, deux régions où SCARB2 est exprimé (Yamayoshi et al., 2014).

Tableau 2: les récepteurs cellulaires de l'EV-A71 et du CVA6

Récepteurs	Expression cellulaire ou tissulaire /modèle animal	Fonctions principales	Fonction dans l'infection par l'EV-A71 ou le CVA6	Virus	Références
SCARB2 (Scavenger receptor class B member 2)	Compartiments des lysosomes et des endosomes et migration à la surface de la cellule. (Mouse L929, Ltr929, Ltr245, Ltr051, RD)*	Transport membranaire et réorganisation des compartiments lysosomaux et endosomaux	- Lors de la migration de SCARB2 des lysosomes ou endosomes jusqu'à la surface cellulaire, SCARB2 peut se lier à la capside virale de l'EV-A71 et l'internaliser par la voie d'endocytose médiée par la clathrine à un pH (<6,0). - Lorsque le virion s'est fixé à un récepteur d'attachement (incapable d'internaliser le virion), SCARB2 intervient également dans le processus d'internalisation et de changement de conformation de la capside virale pour la libération du génome viral.	EV-A71, CVA16, CVA7, CVA14	(Yamayoshi et al., 2009, 2014)
PSGL1 (Ligand-1 de la glycoprotéine P-sélectine ; CD162)	Surface des leucocytes activés et cellules dendritiques dans les ganglions lymphatiques et les macrophages de la muqueuse intestinale. (CHO-K1, RD, Jurkat, MOLT4, MT-2, HEp-2)*	Adhésion et roulement des leucocytes sur l'endothélium des capillaires sanguins, lors du recrutement des cellules immunitaires dans un site inflammatoire	Les virions d'EV-A71 ayant un résidu glycine (Gly/G) à la position 145 de la protéine VP1 peuvent se lier à PSGL-1 et sont internalisés mais sans subir le changement conformationnel nécessaire à la libération du génome viral.	EV-A71	(Yamayoshi et al., 2013)
Anx2 (Annexine A2)	Majorité des types cellulaires et des tissus (HepG2)*	Rôle dans les processus suivants : endocytose, exocytose, l'organisation du domaine membranaire, le remodelage de l'actine, la transduction du signal, l'assemblage de protéines, la transcription et le transport d'ARNm	Anx2 est capable de se lier à l'EV-A71 en interagissant mais ne serait pas capable de permettre l'entrée du virus dans la cellule ou la décapsidation	EV-A71	(Yang et al., 2011)

Etant exprimé dans un grand nombre de tissus humains, ces données suggèrent que SCARB2 joue un rôle crucial dans la réplication et la dissémination virale dans l'organisme, pouvant favoriser un « multi-tropisme » de l'EVA71.

- **PSGL1 (**ligand-1 de la glycoprotéine P-sélectine ; **CD162)**

PSGL-1 est une glycoprotéine de type mucine exprimée à la surface des leucocytes activés. Elle intervient dans l'adhésion et le roulement des leucocytes sur l'endothélium des capillaires sanguins, lors du recrutement des cellules immunitaires dans un site inflammatoire (McEver & Cummings, 1997).

PSGL-1 n'est pas un récepteur pour toutes les souches d'EVA71. La distinction entre les souches dépendantes et indépendantes de ce récepteur repose sur la présence des résidus glycine (Gly/G) ou acide glutamique (Glu/E) à la position 145 de la protéine VP1 de l'EVA71 (Nishimura et al., 2013). La structure tridimensionnelle et des études de mutagénèse suggèrent que PSGL-1 établit des interactions avec les acides aminés chargés positivement situés près de l'axe d'ordre 5. Les souches caractérisées par un résidu Gly en VP1/145 peuvent se lier à PSGL-1 grâce à la présence de résidus lysine (Lys/K) aux positions 242 et 244. Pour les souches dont le site VP1/145 est un résidu acide glutamique (Glu/E), les résidus Lys/242 et Lys/244 sont moins exposés, ce qui gêne la liaison à PSGL-1 (Kataoka et al., 2015; Nishimura et al., 2013). Trois résidus tyrosine (Tyr/Y) sulfatés aux positions 46, 48 et 51 dans l'extrémité N-terminale de PSGL-1 interviennent dans l'interaction (Nishimura et al., 2010). Le complexe « PSGL-1/virion » pénètre dans la cellule par une voie dépendant de la cavéoline (Lin et al., 2013).

Le rôle exact de PSGL-1 reste controversé, car une étude suggère que les virions d'EVA71 se lient à PSGL-1 et sont internalisés mais sans subir le changement conformationnel nécessaire à la libération du génome viral (Yamayoshi et al., 2013). Une autre molécule stimulant la décapsidation du virion capturé par PSGL-1 pourrait être nécessaire pour établir une infection.

PSGL-1 est aussi exprimée à la surface des cellules dendritiques dans les ganglions lymphatiques et les macrophages de la muqueuse intestinale (Laszik et al., 1996). L'expression de PSGL-1 n'a pas été rapportée dans les neurones du système nerveux central et les cellules épithéliales de l'amygdale (He et al., 2014). Il n'a pas été rapporté de variation dans les conséquences physiopathologiques entre les souches d'EVA71 dépendantes et non-dépendantes de PSGL-1 et l'expression de hPSGL-1 chez la souris transgénique n'est pas suffisante pour provoquer une maladie (Liu et al., 2012).

Récepteurs	Expression cellulaire ou tissulaire /modèle animal	Fonctions principales	Fonction dans l'infection par l'EV-A71 ou le CVA6	Virus	Références
Vimentine	Types cellulaires en cours de développement embryonnaire et toutes les lignées cellulaires établies en culture cellulaire (U251, RD, Vero, HeLa)*	Maintien de la forme cellulaire, de l'intégrité du cytoplasme, et stabilise les interactions cytosqueletiques	L'interaction de la vimentine et le virion de l'EV-A71 favorise indirectement l'endocytose virale dans les cellules hôtes	EV-A71	(Du et al., 2014)
ICAM-3 (intercellular adhesion molecule-3)	Surface des lymphocytes T	Rôle dans le contact entre la cellule dendritique (DCs) et le lymphocyte T en interagissant avec DC-SIGN (un récepteur d'adhésion présent à la surface des cellules dendritiques).	ICAM-3 se fixe à au virion et interagit avec DC-SIGN, récepteur d'adhésion présent à la surface des cellules dendritiques	EV-A71	(Ren et al., 2014)
Sulfate d'héparane	Exprimée à la surface des cellules épithéliales et endothéliales ou dans la matrice extracellulaire (Chinese hamster ovary cells (CHO), RD)*	Glycosaminoglycane (GAG) exprimé à la surface de plusieurs cellules et au niveau de la matrice extracellulaire et de la membrane basale	Sulfate d'héparane est un récepteur de fixation de la capside virale de l'EV-A71 sans induire l'internalisation	EV-A71, CVA16	(Tan et al., 2013)
Glycane sialylé	Exprimée au niveau de l'épithélium intestinal et respiratoire (DLD-1 intestinal cells, K562 myeloid)	Rôle dans le maintien de la structure, de la porosité et de l'intégrité des tissus	Interaction directe entre les acides sialiques et l'EV-A71 non démontré	EV-A71	(Tan et al., 2013)
Nucléoline	Exprimée de manière ubiquitaire dans les cellules eucaryotes en croissance (RD)	Contrôle du métabolisme de l'ADN et de l'ARN dans le nucléole, du transport des protéines dans le noyau, assure la régulation post-transcriptionnelle des ARNm dans le cytoplasme	la nucléoline est un facteur d'attachement de l'EV-A71, mais l'internalisation du virus après la liaison n'a pas été prouvée	EV-A71	(Su et al., 2015)
Prohibitine (PHB)	(NSC-34)	Rôle important dans la prolifération et le métabolisme cellulaire	le rôle de la PHB dans l'entrée et la réplication de l'EV71 était limité aux cellules d'origine neuronale	EV-A71	(Too et al., 2018)

- **Annexine A2 (Anx2)**

L’annexine A2 est une protéine multifonctionnelle impliquée dans l'endocytose, l’exocytose, l’organisation du domaine membranaire, le remodelage de l'actine, la transduction du signal, l’assemblage de protéines, la transcription et le transport d'ARNm (Grindheim et al., 2017).

Elle est exprimée dans la majorité des types cellulaires et des tissus, et elle se lie à de nombreux ligands. L’Anx2 fait partie d’une famille de protéines capables de s’associer aux membranes biologiques en présence de calcium. Une des particularités de l’Anx2 est sa capacité à lier simultanément les phospholipides et le cytosquelette d’actine, deux acteurs majeurs de l’exocytose. Il a été démontré que l’anx2 est capable de se lier à l’EVA71 en interagissant avec les acides aminés 40-100 de la protéine VP1 en dehors du canyon.

Elle ne serait pas capable de permettre l’entrée du virus dans la cellule ou la décapsidation (Yamayoshi et al., 2014; Yang et al., 2011).

- **Vimentine**

La vimentine est une protéine des filaments intermédiaires de type III qui, avec les microtubules et les microfilaments d'actine, constituent le cytosquelette (Goldman et al., 1996). La vimentine est aussi présente à la surface des cellules et elle a été décrite comme un récepteur pour plusieurs agents pathogènes : le virus de l'encéphalite japonaise (JEV) et le virus de Theiler (Das et al., 2011; Kim et al., 2006; Koudelka et al., 2009). La liaison de l’EVA71 à la vimentine a également été rapportée *in vitro* avec les cellules RD, U251, HeLa et Vero via la protéine VP1 (Du et al., 2014). Si la diminution de l’expression de la vimentine à la surface des cellules entraîne une réduction de la liaison du virus, elle ne permet pas d’empêcher l’infection. L'interaction de la vimentine avec la protéine VP1 pourrait faciliter la fixation de l’EVA71 aux autres récepteurs cellulaires et favoriser indirectement l'endocytose virale dans les cellules hôtes (Du et al., 2014).

- **ICAM3 (intercellular adhesion molecule-3)**

La molécule d’adhésion ICAM-3 (Intracellular Cell Adhesion Molecule 3) est présente à la surface des lymphocytes T. La lectine transmembranaire DC-SIGN est un récepteur d’adhésion présent à la surface des cellules dendritiques, DC-SIGN en interagissant avec l’ICAM-3 établit le contact entre la cellule dendritique (DCs) et le lymphocyte T.

Les cellules dendritiques ont un rôle crucial dans l'immunité innée antivirale en tant que cellules présentatrices d'antigènes qui activent les lymphocytes T et en sécrétant des cytokines pour moduler les réponses immunitaires. Dans un modèle de souris de l'infection par l’EVA71, les cellules dendritiques du cerveau ont exprimé l'antigène viral et activé une réponse par les lymphocytes T (Lin et al., 2009a). Cette réponse serait médiée par une interaction entre l’EVA71 et DC-SIGN (dendritic cell (DC)-specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing nonintegrin), qui est encore mal définie.

Récepteurs	Expression cellulaire ou tissulaire /modèle animal	Fonctions principales	Fonction dans l'infection par l'EV-A71 ou le CVA6	Virus	Références
Fibronectin	(RD, HEK293)	Exprimée de manière omniprésente et participe à que la morphogenèse, la migration cellulaire, l'inflammation et l'internalisation des récepteurs de surface	la fibronectine affecte l'infection à l'EV-A71 à l'entrée extracellulaire et augmente l'affinité de liaison de l'EV-A71 avec la cellule hôte	EV-A71	(He et al., 2018)
Cyclophiline A (Cyp A)	(RD)	Favorise la prolifération des cellules musculaires lisses de l'endothélium ainsi que l'inflammation	CypA a interagi avec et modifie la conformation de la capside de l'EV-A71 au niveau de la boucle H-I de VP1, et module le processus de décapsidation	EV-A71	(Qing et al., 2014)
hWARS	Localisé dans le noyau cellulaire et dans l'espace extracellulaire (human neuronal NT2, mouse fibroblast L929)	Rôle clé dans l'immunité innée, l'angiogenèse et la signalisation de l'IFN-γ	hWARS est un facteur d'entrée induit par la voie de signalisation IFN-γ et favoriser la sensibilité des cellules neuronales à l'infection par l'EV-A71	EV-A71, CVA16 et EV-D68	(Yeung et al., 2018)
KREMEN1	(HAP1, H1-HeLa, HEK293, HCT 116, Vero E6, RD; Kremen1/2-Deficient Mice)*	Coopère avec son homologue DKK1 pour bloquer la signalisation Wnt/β-caténine impliquée dans la prolifération, l'apoptose, la polarité, la différentiation et la pluripotence des cellules souches durant le développement embryonnaire	Les domaines KR et WSC du KRM1 se lient à travers le canyon du CVA10 en faisant des interactions largement hydrophiles avec les boucles de surface de la capside. Ce qui déclenche la libération du facteur de poche et des changements conformationnels permettant la libération du génome	CVA10, CVA2, CVA3, CVA4, CVA5 et CVA12	(Staring et al., 2018)

Il est essentiel de caractériser le rôle des récepteurs des cellules dendritiques et des autres cellules de l'immunité pour comprendre les réponses immunitaires de l'hôte et développer des traitements pour lutter contre l'infection causée par l'EVA71 (Lin et al., 2009; Ren et al., 2014).

- **Sulfate d'héparane**

Le sulfate d'héparane est un polysaccharide linéaire formé par la répétition d'un disaccharide comprenant une glucosamine N-acétylée ou N-sulfatée et soit l'acide glucuronique ou l'acide iduronique. Il est chargé négativement en raison des groupes sulfates, s'attache à des protéoglycanes et se retrouve à la surface des cellules ou dans la matrice extracellulaire. Les chaînes de sulfate d'héparane servent de ligands pour un grand nombre de protéines et de virus.

L'attachement de l'EVA71 via le sulfate d'héparane a été montré pour les cellules RD. Les particules virales se lient aux colonnes d'héparine-sépharose à des concentrations physiologiques en sels. La pré-incubation du virus avec des analogues du sulfate d'héparane (héparine ou suramine) inhibe l'infection des cellules RD par l'EVA71. En outre, l'infection par l'EVA71 ou la liaison avec des récepteurs de surface est réduite lorsque la biosynthèse du sulfate d'héparane est bloquée par le chlorate de sodium, en éliminant la N-désacétylase, la N-sulfotransférase 1 et l'exostosine-1, ou encore lorsque le sulfate d'héparane est retiré par un traitement à l'héparinase. Il a été également rapporté que les résidus de lysine en 162, 242, et 244 de la protéine de capside VP1 sont responsables des interactions électrostatiques avec le sulfate d'héparane (Tan et al., 2013; Yamayoshi et al., 2014).

- **Acide sialique (sialylated glycan)**

L'acide sialique est présent sur les monosaccharides terminaux des chaînes de glycanes des glycolipides et des glycoprotéines. Ils sont omniprésents dans les tissus en particulier l'épithélium intestinal et respiratoire et servent de récepteurs à de nombreux virus. Même si l'interaction directe entre les acides sialiques et l'EVA71 n'a pas encore été montrée, le traitement par sialidase α2,3 et α2,6 de cellules intestinales réduit significativement la multiplication de l'EVA71, suggérant la participation des acides sialiques dans les premières étapes du cycle cellulaire de l'EVA71 (Yamayoshi et al., 2014; Yang et al., 2009).

- **Nucléoline**

La nucléoline est une phosphoprotéine eucaryote multifonctionnelle située principalement dans les régions fibrillaires denses du nucléole (Tajrishi et al., 2011). Elle est également exprimée à la surface cellulaire et serait un récepteur du virus respiratoire syncytial (VRS) (Tayyari et al., 2011). Une analyse glycoprotéomique des protéines membranaires exprimées par les cellules RD suggère que l'EVA71 interagit avec la nucléoline par la protéine de capside VP1.

Cette liaison peut être inhibée avec un anticorps anti-nucléoline et l'inhibition de la synthèse de la nucléoline dans les cellules RD réduit l'infection (Su et al., 2015). Ces résultats suggèrent que la nucléoline est un facteur d'attachement de l'EVA71, mais l'internalisation du virus après la liaison n'a pas été prouvée.

- **Fibronectine**

La fibronectine est une glycoprotéine de haut poids moléculaire aux fonctions multiples dans l'adhésion, la croissance et la migration des cellules, et la différenciation (Pankov & Yamada, 2002). Une étude rapporte une augmentation de l'infection *in vitro* par l'EVA71 en surexprimant la fibronectine et une réduction de la liaison du virus aux cellules RD/FN knockout dont le gène codant pour la fibronectine a été supprimé par le système CRISPR-Cas9 (He et al., 2018).

Un peptide court contenant un motif Arg-Gly-Asp (RGD), connu pour inhiber l'interaction entre l'intégrine et la fibronectine, permet d'inhiber l'infection par l'EVA71 dans les cellules cultivées et chez le souriceau. Une analyse par co-précipitation montre que l'extrémité N-terminale de la protéine VP1 de l'EVA71 interagit avec le domaine D2 de la fibronectine (He et al., 2018). Ces résultats suggèrent que la fibronectine cellulaire sert de plateforme d'attachement à l'EVA71.

- **Prohibitine (PHB)**

La prohibitine est exprimée dans plusieurs compartiments cellulaires, y compris les mitochondries, le noyau et membrane plasmique. La PHB mitochondriale et nucléaire a des fonctions multiples, notamment la différenciation cellulaire et la morphogenèse (Chowdhury et al., 2014). Plusieurs approches expérimentales ont démontré que la PHB exprimée à la surface des cellules joue un rôle dans l'entrée de l'EVA71 et la réplication intracellulaire dans les cellules NSC-34 (Cashman et al., 1992; Too et al., 2018). Too et al ont observé une colocalisation de la PHB mitochondriale avec le génome viral réplicatif (ARNdb) et les protéines non structurales (3D polymérase et complexe 3CD) et suggéré des interactions probables favorisant la réplication virale de l'EVA71 dans les mitochondries (Too et al., 2018; Wang et al., 2013).

- **Facteurs d'entrée de l'EVA71 dans la cellule hôte**

La **cyclophiline A (CypA)** est une protéine appartenant à la famille des cyclophilines ayant une activité de peptidyl prolyl isomérase. La CypA joue un rôle de régulateur de décapsidation en modifiant la conformation de la boucle HI dans VP1 lors de l'entrée de l'EVA71 par divers récepteurs fonctionnels (Qing et al., 2014). L'incubation de CypA avec des virions d'EVA71 à un pH de 6,0 modifie le coefficient de sédimentation de virions de l'EVA71, suggérant que la CypA est un organisme de régulation d'une manière dépendante du pH.

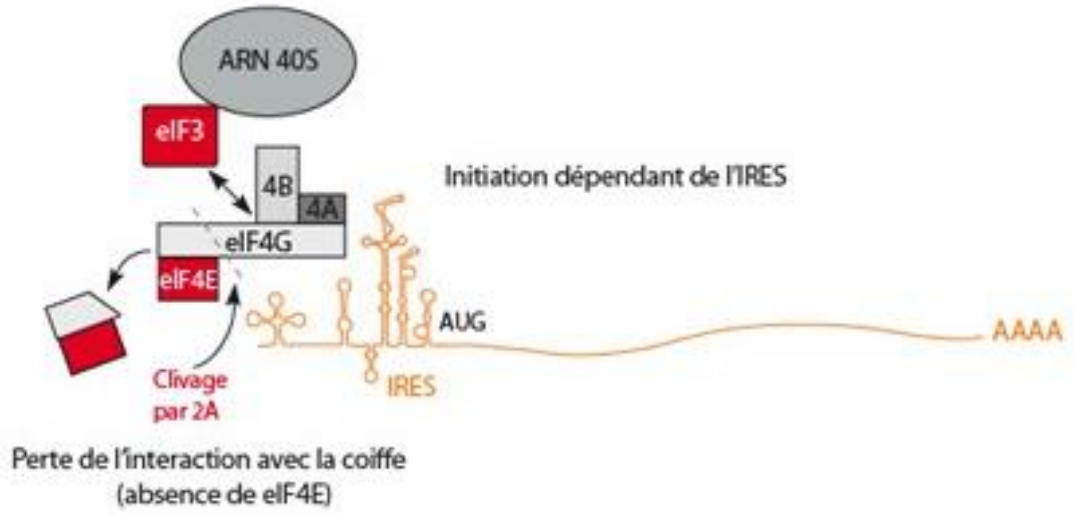


Figure 8 : Mécanisme de l'initiation de la traduction du génome viral des entérovirus

L'étape de la traduction est amorcée de manière indépendante à la coiffe via l'IRES localisé dans région 5'NC du génome viral. La protéase 2A du poliovirus clive le facteur eIF4G, dissociant ainsi le complexe de reconnaissance de la coiffe (via eIF4E) et le complexe d'initiation de la traduction (ribosome + eIF4G/4B/4A). Le facteur eIF4G ne peut donc plus reconnaitre les ARNm cellulaires mais conserve la capacité de reconnaître l'IRES du virus et d'initier la traduction du génome viral.

Human tryptophanyl aminoacyl-ARNt synthetase (hWARS) a été identifiée comme une protéine facilitant l'infection par l'EVA71. En absence de hWARS, on observe une diminution de l'ECP et de la réplication virale dans les cellules RD (Shih et al., 2018).

Un effet similaire a également été observé avec d'autres types d'entérovirus, dont le CVA16, CVA6, E-11, E-6, E-25, E-30 et entérovirus-D68, ce qui suggère que hWARS jouerait un rôle important dans le large spectre de l'infection par les entérovirus. Bien que la protéine hWARS fonctionne indépendamment de hSCARB2, son rôle reste à élucider dans la médiation de l'entrée des EV dans la cellule hôte (Kisselev, 1993; Perlman et Gallagher, 2018; Yeung et al., 2018).

b) Récepteurs cellulaires du CVA6 et d'autres EV A

KREMEN1 (kringle (KR) containing transmembrane protein 1) est une protéine transmembranaire de type I. KREMEN1 a été identifiée comme un récepteur pour la souche prototype du CVA10 (Staring et al., 2018). KREMEN1 se lie au CVA10 au niveau des deux premiers domaines de KRM1 (KR et WSC) qui couvrent le canyon, chacun ayant des interactions avec les bords nord et sud du canyon **(Figure 7E)**. Bien que le KREMEN1 se fixe dans le canyon, il n'atteint pas le fond du canyon. Le domaine KR s'engage dans la partie étroite du canyon et le domaine WSC (cell wall stress-responsive component) se lie à la région plus large du canyon, interagissant avec les boucles EF et GH de la protéine VP1, la boucle EF de la protéine VP2 et la boucle GH de la protéine VP3 comme tous les récepteurs d'EV (CVA10, PV-1, CVA24 et E-6) qui se fixent au canyon (Baggen et al., 2017; Strauss et al., 2015; Zhao et al., 2019).

KREMEN1 est également utilisé comme récepteur par un autre groupe d'EV de l'espèce A comprenant les types CVA2, CVA3, CVA4, CVA5, CVA6, CVA8, CVA10 et CVA12 (Staring et al., 2018). Les récepteurs des autres types de cette espèce n'ont pas encore été identifiés.

3. La traduction du génome viral

Le cycle infectieux intracellulaire se produit entièrement dans le cytoplasme de la cellule hôte et commence avec la traduction de l'ARN viral, ce qui implique que celui-ci soit libéré de la protéine VPg. Cette réaction est réalisée par la phosphodiestérase cellulaire 5′-tyrosyl–DNA phosphodiesterase-2, (TDP2) (Ambros et Baltimore, 1980; Virgen-Slane et al., 2012). La traduction de l'ARN des picornavirus fait intervenir l'IRES pour recruter de nombreux facteurs protéiques viraux et cellulaires.

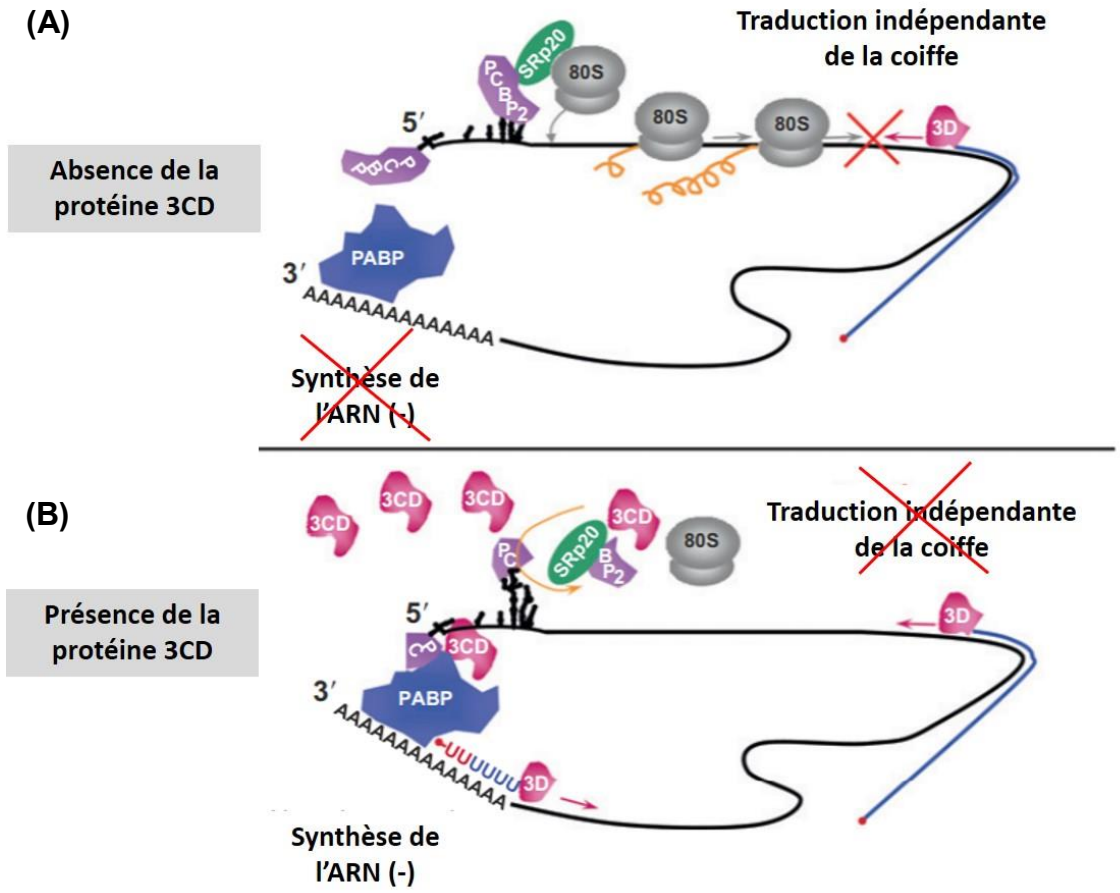


Figure 9 : Modèle du processus de régulation de la traduction et de la réplication du génome viral des entérovirus

Au cours de la réplication virale dans une cellule hôte, le devenir du génome viral va être déterminé par la présence de la protéine précurseur 3CD

(A) Absence de la protéine 3CD : le génome viral va subir le processus de traduction coiffe indépendante via l'élément IRES. Les protéines cellulaires PCBP2 et SRp20 interagissent avec l'IRES pour recruter des ribosomes 80s sur l'ARN viral. Les ribosomes vont empêcher la synthèse de l'ARN (-) par la RdRp (3Dpol) qui se produit également sur l'ARN (+), mais dans la direction opposée (flèches roses).

(B) Présence de la protéine 3CD : la protéase 3C/3CD du poliovirus clive la protéine PCBP2 et perturbe sa capacité à interagir avec SRp20 et de recruter des ribosomes pour l'élément IRES (indiqué par la flèche orange). La protéine 3CD va interférer avec les protéines cellulaires PCBP (localisée sur la 5'NC) et la PABP (localisée sur la 3'NC) ce qui va entrainer la circularisation du génome viral et faciliter le recrutement de la RdRp (3Dpol) au niveau de la queue poly(A) pour initier la synthèse de l'ARN (-). **(D'après Perera et al., 2007)**.

De nombreuses études in vitro ont cherché à décrire la dynamique de l'étape d'initiation de la traduction des ARN génomiques de picornavirus et ont abouti à un modèle consensus présenté pour les EV **(Figure 8)**.

L'ARN viral est alors traduit en une grande polyprotéine unique qui subit un traitement post-traductionnel par un certain nombre d'enzymes protéolytiques. La protéase 2A effectue le clivage entre la région génomique P1 et la région P2 (Toyoda et al., 1986). Le clivage doit avoir lieu pour que le traitement ultérieur des protéines de la capside puisse se poursuivre (Nicklin et al., 1987).

Ensuite, la protéase 3Cpro sépare la région P2 de la région P3. Le clivage se poursuit par la protéase 3Cpro ou son précurseur 3CD jusqu'à ce que la polyprotéine ait été séparée en 4 protéines structurales et 7 non structurales **(Figure 9)** (Racaniello, 2007).

4. La réplication du génome viral

La réplication du génome des EV se produit dans une structure appelée usine virale qui se forme dans le cytoplasme (Jiang et al., 2014). L'usine virale est générée par la formation de structures vésiculaires et tubulaires issues de la désorganisation et restructuration des membranes du réticulum endoplasmique, de l'appareil de Golgi et des autophagosomes, grâce à la protéine virale 3A. Cette nouvelle structure « viro-cellulaire » produit un réseau complexe localisé à la périphérie du noyau (Belov & Ehrenfeld, 2007)**.** L'usine virale concentre l'ensemble des facteurs viraux et cellulaires nécessaires à la réplication. Elle apporterait l'avantage supplémentaire de protéger les ARN viraux des récepteurs intra-cytoplasmiques (RIG-1, MDA5) qui reconnaissent les ARN viraux simple brin ou double brin et participent ainsi à une défense immunitaire précoce qui se manifeste de façon ubiquitaire dans les cellules (Fogg et al., 2003).

Poliovirus. La réplication du génome viral fait intervenir de nombreux facteurs protéiques viraux et cellulaires. L'ARN viral de polarité positive (ARN+) est d'abord transcrit en ARN de polarité négative (ARN-) et le complexe double brin (ARN+/ARN-) devient une plateforme (intermédiaire) pour synthétiser en grand nombre le nouvel ARN génomique de polarité positive (Gamarnik et Andino, 1998). Le modèle de la synthèse de l'ARN viral, comprend les étapes décrites dans la **Figure 10**.

L'initiation de la synthèse de l'ARN+ nécessite une dissociation partielle du duplex « ARN+/ARN- » (appelé aussi forme réplicative) qui ferait intervenir l'activité hélicase la protéine virale $2C^{ATPase}$ (Pfister & Wimmer, 1999; Rodriguez & Carrasco, 1993; Yang et al., 2015). L'ARN- se termine par la séquence « 5'TTAAAA…3' » ce qui permet à la protéine VPg-pU-pU de servir aussi d'amorce à la polymérase 3D lors de cette phase. L'ARN- est son tour est réutilisé comme matrice pour la synthèse de molécules d'ARN+.

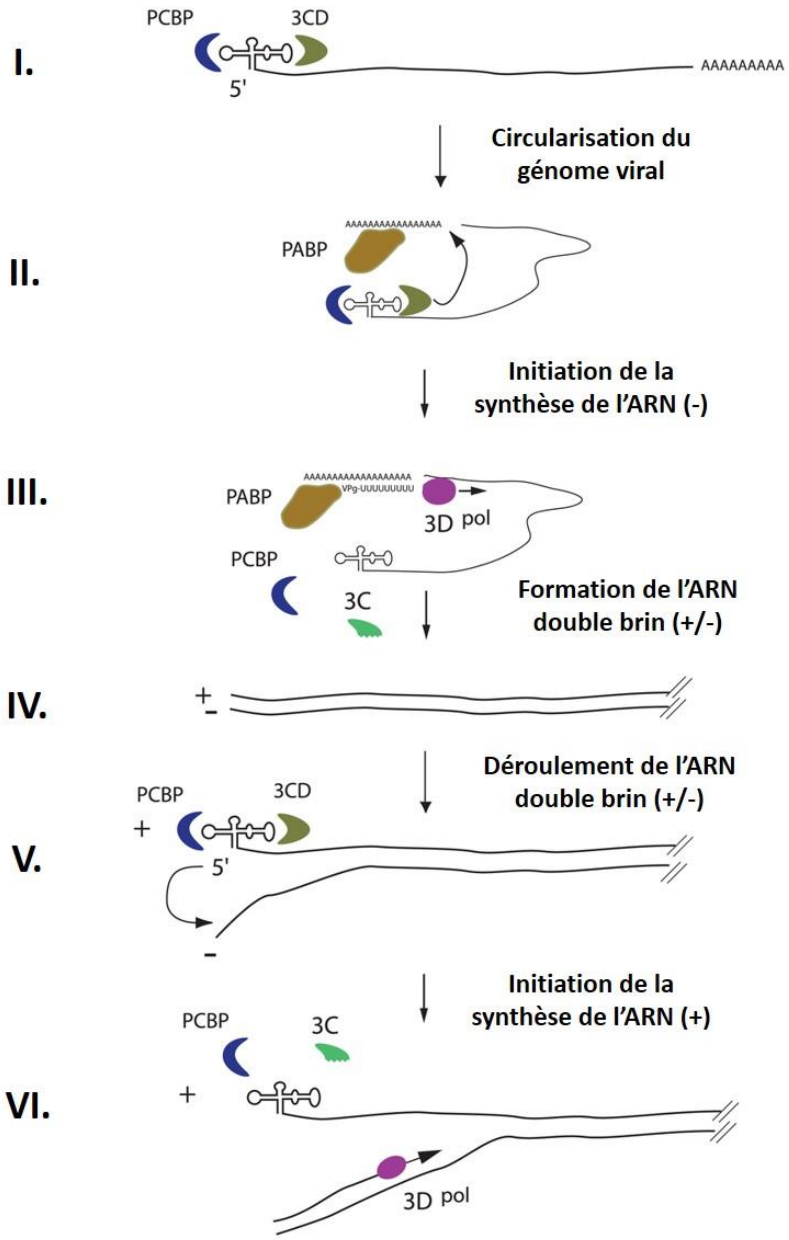


Figure 10 : Modèle du mécanisme de la réplication du génome viral des entérovirus

(I. et II.) La synthèse du brin négatif est initiée par la circularisation du génome du brin positif via un pont protéique par l'interaction du complexe à l'extrémité 5′NC (protéase 3CD/protéine PCBP) et de la protéine PABP liée à la queue 3′-poly(A). **(III.)** La protéine VPg-pUpU (poly-uridylylation de VPg médiée par la CRE) est utilisée comme amorce pour la synthèse du nouveau brin négatif par la polymérase 3D, ce qui donne un ARN intermédiaire à double brin (RF : replicative form) **(IV.)**. L'ARN intermédiaire positif-négatif se défait, de sorte que la structure en trèfle à l'extrémité 5′ du brin positif peut se former. La protéine précurseur 3CD et la protéine PCBP se lient à la structure en trèfle pour former un complexe ternaire, qui, à son tour, initiera la synthèse du brin positif à l'extrémité 3′ du brin négatif (ARN-) **(V.)**. L'amorce, VPg-pUpU, est recrutée et se lie à la queue poly-A de l'extrémité 3′ du brin négatif, et le nouveau brin positif est synthétisé par la polymérase 3D **(VI.)**. **(Daprès Vogt et al., 2010)**.

Les molécules d'ARN+ peuvent alors soit entrer dans un autre cycle de traduction et de réplication, soit être conditionnées en protéines de capsides virales dans lesquelles seront injectées des ARN+ pour produire des particules virales infectieuses.

Entérovirus A71. Les mécanismes moléculaires présentés ci-dessus n'ont pas tous été étudiés précisément pour l'EVA71 et le CVA6, mais ils peuvent être considérés comme ayant une valeur générale pour tous les picornavirus (Racaniello, 2007).

Certains aspects comme l'interaction de la région 5'NC avec PCBP2 et l'uridylylation de la protéine VPg catalysée par 3Dpol ont été confirmés pour l'EVA71 (Lin et al., 2008).

E. L'assemblage et la libération des virions

Selon le modèle actuel proposé pour tous les entérovirus, la dernière étape du cycle de multiplication virale de l'EVA71 et le CVA6 est la libération du virus infectieux mature de la cellule hôte (Jiang et al., 2014).

Dans une première étape, la maturation de la polyprotéine est nécessaire pour que les particules virales puissent être assemblées. La protéine HSP90 (Heat Shock protein 90) s'associe au précurseur P1 de la capside virale, catalysant le traitement protéolytique par la $3C^{pro}$ pour donner les protéines matures de la capside : VP0, VP1 et VP3, constituant un protomère qui s'auto-assemble ensuite pour former des particules pentamériques (Putnak & Phillips, 1981; Tsou et al., 2013). Au cours de ce processus, le glutathione (GSH) est un facteur de l'hôte nécessaire pour la morphogenèse de la capside virale des EV en assurant la stabilité des précurseurs de la capside et du virus mature (Jiang et al., 2014).

Ensuite les particules pentamériques se condensent autour de l'ARN viral répliqué pour former le « provirion ». L'ARN viral assure la médiation du clivage catalytique de VP0 en VP2 et VP4, générant la particule virale mature **(Figure 11)** (Basavappa et al., 1994; Holland et Kiehn, 1968). Pour les entérovirus, il est suggéré que la spécificité de l'encapsidation est médiée par l'interaction directe entre la protéine 2C, dans le cadre du complexe de réplication, et la protéine VP3 de la capside virale sans implication apparente d'un signal d'encapsidation d'ARN encore identifié (Liu et al., 2010).

Après l'étape de l'assemblage, les virions qui s'accumulent dans le cytoplasme sont libérés à la surface de la cellule soit par voie lytique par apoptose/nécrose (Agol et al., 2000; Belov et al., 2003), soit par voie non lytique par autophagie (Huang et al., 2009; Owino & Chu, 2019; Too et al., 2016) (voir § **Modulation de la mort cellulaire**).

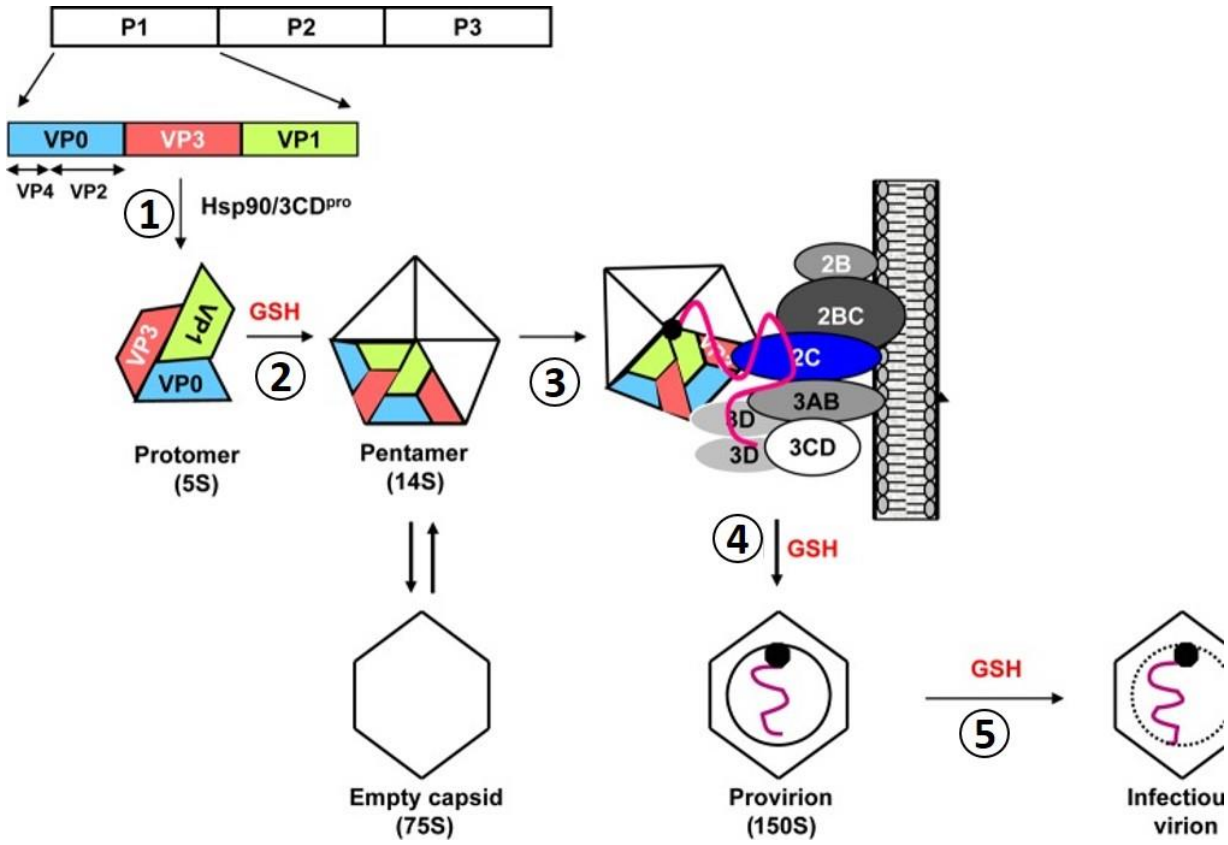


Figure 11 : Modèle du processus de morphogenèse des entérovirus

Une fois que le précurseur de capside P1 nouvellement fabriqué est libéré de la polyprotéine, il interagit avec la protéine chaperonne Hsp90 pour assurer une conformation compétente pour le clivage par la protéine 3CDpro **(1)**. Après le traitement protéolytique, un protomère se forme spontanément, constitué d'une copie de chacun des VP0, VP1 et VP3. En présence de GSH, cinq protomères s'assemblent pour générer un pentamère **(2)** qui, par les interactions entre la protéine 2CATPase et la protéine VP3 ou la protéine VP1, est recruté dans le complexe de réplication pour s'associer à l'ARN viral de polarité positive lié à VPg **(3)**. Par la suite, 12 pentamères se condensent autour de l'ARN pour produire un « provirion » non infectieux **(4)**. La dernière étape est le clivage et la maturation de VP0, qui est autocatalytique et dépendant de l'ARN et donne une particule stable contenant 60 copies de chaque protéine de la capside virale (VP1, VP2, VP3 et VP4) **(5)**. Les étapes auxquelles la protéine GSH est nécessaire sont indiquées. Glutathion (GSH).

F. Conséquences de la multiplication virale sur les cellules hôtes

Lors de l'infection d'une cellule par un EV et lorsque la multiplication n'est pas déjouée par les réponses de l'immunité innée intracellulaire, la cellule hôte subit des changements (métaboliques) et une réorganisation structurale drastiques qui se traduisent par la mort cellulaire. Les études utilisant la microscopie photonique et électronique ont montré les altérations structurales importantes subies par les cellules infectées par le poliovirus (Bienz et al., 1973).

1. Inhibition de la traduction des ARNm cellulaires

Les conséquences de l'infection par un EV sur la production des protéines cellulaires ont été bien décrites anciennement pour le poliovirus et plus récemment pour d'autres entérovirus.

Poliovirus. Après l'entrée du virus dans la cellule, la traduction des ARNm cellulaires est très vite arrêtée et remplacée par la traduction des ARN viraux positifs qui s'accumulent dans la cellule hôte. Pour le poliovirus, l'inhibition de la traduction des ARNm cellulaires résulte à la fois du clivage du facteur d'initiation de la traduction eIF4G par la protéase 2A et du clivage de la protéine PABP par la protéase 3Cpro (Kuyumcu-Martinez et al., 2004). Le peptide C-terminal de eIF4G ainsi généré possède toujours une activité de liaison à l'ARN et participe à l'initiation interne de la traduction médiée par l'IRES du poliovirus (Gradi et al., 1998). Un autre facteur d'initiation de la traduction, eIF5, est clivé par la protéase 3Cpro du poliovirus (de Breyne et al., 2008). Une étude indique que la protéine 4E-BP1 (Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1) est déphosphorylée et devient un compétiteur d'eIF4G pour la fixation d'eIF4E, empêchant ce dernier d'être recruté au niveau du complexe eIF4F, indispensable à la traduction des ARNm cellulaires (Racaniello, 2007).

Entérovirus A71. Les altérations du facteur eIF4G ont aussi été montrées pour l'EVA71. La préincubation des cellules HeLa avec la protéase 2A, qui clive eIF4GI, a entraîné une diminution significative de la traduction de l'ARNm de la cellule hôte en augmentant l'efficacité de traduction de l'IRES de la région 5'NC de l'EVA71 BrCr (souche prototype) (Hambidge & Sarnow, 1992; Liebig et al., 1993; Thompson & Sarnow, 2003).

Coxsackievirus A6. Il n'existe pas de données concernant le CVA6 ou d'autres EV-A.

2. Inhibition des activités transcriptionnelles cellulaires

Poliovirus. Les études *in vitro* montrent que la transcription des ARNm cellulaires est inhibée par la protéase 3Cpro. Le précurseur 3CD du poliovirus et du rhinovirus peut être adressé vers le noyau

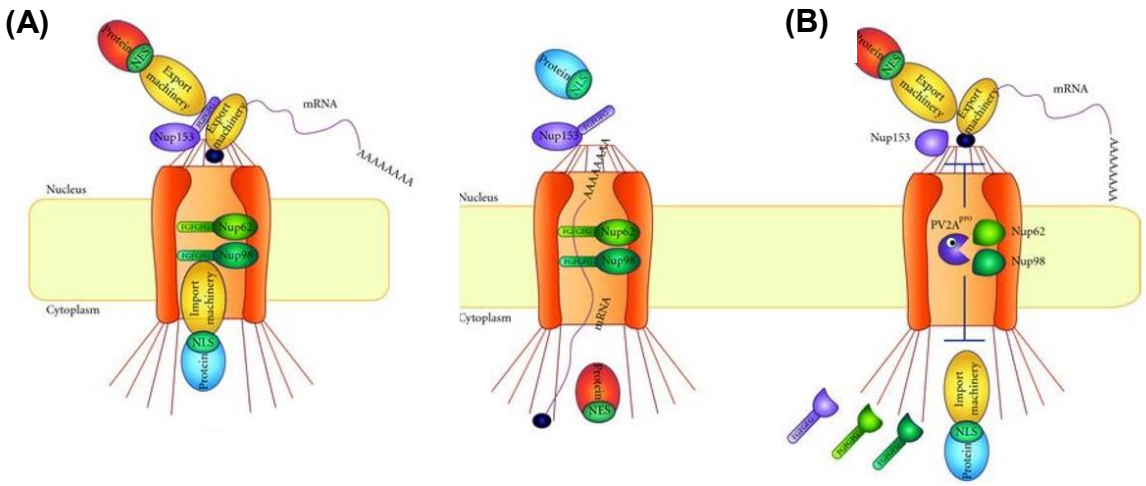


Figure 12 : Altérations du complexe des pores nucléaires (NPC) induites par les picornavirus

(A) Régions du NPC où se trouvent les cinq protéines nucléoporines (Nup) ciblées par les protéines du picornavirus pendant l'infection. Les protéines et les ARNm sont importés et exportés à travers les NPC par la médiation des nucléoporines FG (Nup98, Nup62 et Nup153) et facteurs d'importation et d'exportation des protéines nucléaires.

(B) La protéinase 2A (2Apro) des entérovirus clive les Nup153 (violet), Nup62 (vert clair) et Nup98 (vert foncé) au niveau du FG du canal central, ce qui entrave l'intervention de ces composants du NPC dans les mécanismes d'importation et d'exportation des protéines nucléaires. **(D'après Castello et al., 2011)**.

car il contient un site de localisation nucléaire (NLS), puis il subit une autocatalyse de maturation finale en libérant la protéase 3Cpro. La protéase 3Cpro du poliovirus peut alors inactiver plusieurs protéines dont des facteurs de transcription (Sharma et al., 2004). Elle provoque le clivage de plusieurs facteurs d'initiation de la transcription par l'ARN polymérase II – protéine TBP (TATA-binding protein), CREB-1, Oct-1 (Kundu et al., 2005; Yalamanchili et al., 1997) et par l'ARN polymérase III, facteur TFIIIC (Shen et al., 1996).

La protéase 2Apro est également reliée à l'altération de composants des pores nucléaires (NPC, Nuclear Pore Complex) et la conséquence de cette altération est une limitation du transport nucléo-cytoplasmique des ARNm cellulaires (Park et al., 2008).

Entérovirus A71. La littérature n'apporte pas de donnée montrant que la protéase 3Cpro de l'EVA71 inactive les facteurs transcriptionnels mentionnés ci-dessus, mais une étude montre que l'enzyme 3Cpro de ce virus clive le facteur nucléaire CstF64, ce qui provoque l'inhibition de la polyadénylation des ARNm cellulaires (Weng et al., 2009).

Coxsackievirus A6. Il n'existe pas de données concernant le CVA6 ou d'autres EV-A.

3. Altération du transport des protéines nucléaires

Poliovirus. L'infection des cellules hôtes par le poliovirus perturbe le trafic des protéines depuis le cytoplasme vers le noyau, ce qui cause une accumulation protéique dans le cytoplasme, en particulier celle de facteurs agissant en *trans* pour favoriser la traduction et la réplication des ARN viraux (cf. ci-dessus). L'activité protéasique 2Apro a été associée à la dégradation des nucléoporines Nup62, Nup98 et Nup153, protéines qui constituent les pores nucléaires **(Figure 12)** (Castello et al., 2011).

Coxsackievirus B3. Le clivage de la nucléoporine Nup98 par la protéase 2Apro a été rapporté dans les cellules HeLa infectées par le CVB3. Chez des souris infectées par ce virus, le clivage est aussi associé à une redistribution cytoplasmique de Nup98 dans les cardiomyocytes (Hanson et al., 2019). Cette observation suggère un lien avec le cardiotropisme du CVB3.

Rhinovirus. L'inhibition de l'importation de protéines dans le noyau, consécutive à l'altération de nucléoporines par la protéase 2Apro a aussi été montrée pour les rhinovirus (Park et al., 2010).

Entérovirus A71 : Une diminution de l'expression de la glycoprotéine des pores nucléaires Nup62 est détectée après l'infection par l'EVA71 et la transfection de la protéine 2Apro de celui-ci dans les cellules RD.

Cette étude démontre que le clivage de la glycoprotéine des pores nucléaires Nup62 par la protéase 2A de l'EVA71 pourrait être le mécanisme d'inhibition du transport des protéines nucléaires et la perturbation de la perméabilité nucléaire (Zhang et al., 2013).

Bien qu'il n'existe pas de donnée sur le sujet concernant le CVA6, on peut faire l'hypothèse que la protéolyse des nucléoporines est un mécanisme général chez les entérovirus, avec pour conséquences le blocage de l'exportation des ARNm cellulaires et une accumulation dans le cytoplasme de protéines dont des facteurs nécessaires à la réplication et la traduction de l'ARN viral.

4. Modulation de la mort cellulaire

Pour favoriser la réplication et la propagation des virus, les EV modifient de manière sélective les voies de signalisation intracellulaires, par exemple en modulant les processus engendrant leur mort (Agol et al., 2000; Belov et al., 2003; Neznanov et al., 2001; Xu & Eissa, 2010). Les EV peuvent subvertir l'autophagie et l'apoptose/nécrose en exploitant sélectivement certains facteurs cellulaires clés, qui sont des voies indispensables au devenir des cellules et à leurs fonctions cellulaires normales (Agol, 2012; Amarante-Mendes et al., 2018; Glick et al., 2010; Harris & Coyne, 2014). Plusieurs mécanismes moléculaires sont utilisés par les EV pour moduler l'apoptose/nécrose et l'autophagie qui jouent dans la réplication et la propagation des virus. Ces processus sont principalement réalisés par des protéines virales non structurales, en particulier les protéases 2Apro et 3Cpro.

Les EV sont généralement considérés comme des virus cytolytiques qui entrainent la mort leur cellule hôte par apoptose/nécrose pour être libérés dans le milieu extracellulaire (Harris & Coyne, 2014). Toutefois, plusieurs études ont révélé que les EV peuvent également être libérés de manière non lytique via des vésicules qui nécessitent l'autophagie pour former des autophagosomes à double membrane transportant des virions vers l'environnement extracellulaire (Bird et al., 2014; Chen et al., 2015; Lai et al., 2016; Robinson et al., 2014; Too et al., 2016).

a) Modulation de l'apoptose et de la nécrose lors de l'infection virale

(1) Mort cellulaire par apoptose

L'apoptose est un type non inflammatoire de mort cellulaire programmée dont l'activation résulte d'une cascade de protéines de signalisation pour répondre à un signal de mort. Ce processus est caractérisé par la facilitation des changements morphologiques, y compris le rétrécissement des

(A) **(B)**

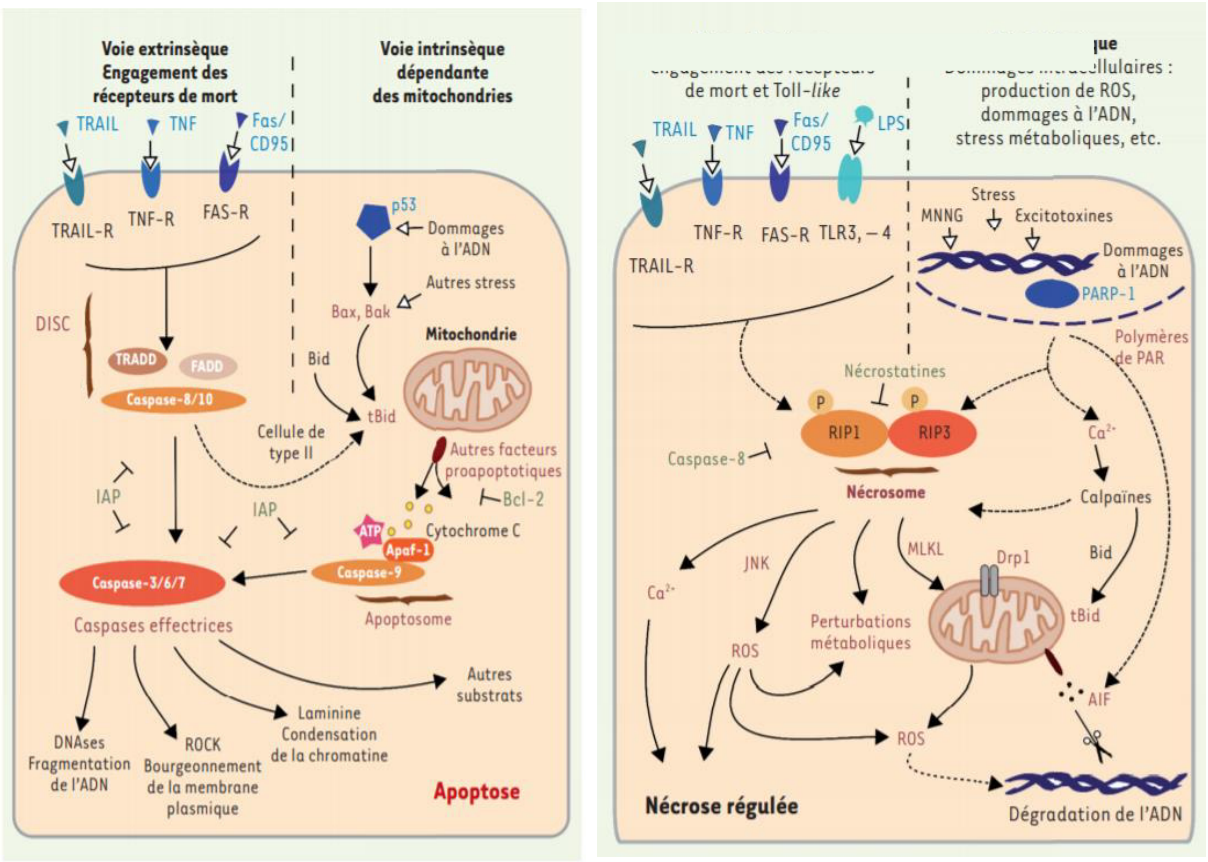


Figure 13 : Mécanismes de mort cellulaire et leur modulation par les entérovirus

(A) Vue d'ensemble du mécanisme d'apoptose (voie extrinsèque et voie intrinsèque). La fixation des récepteurs de mort (DR) permet l'assemblage du complexe de signalisation induisant la mort (DISC), dans lequel les caspases 8 et 10 subissent une auto-activation. Le clivage de Bid médié par la caspase-8 peut amplifier un signal apoptotique provenant de la voie extrinsèque en engageant parallèlement la voie intrinsèque. Cette dernière voie apoptotique est déclenchée par un stress toxique et d'autres stimuli qui convergent vers l'activation de Bax et Bak. Ces membres proapoptotiques de Bcl-2 induisent la libération de facteurs proapoptotiques tels que le cytochrome c. Le cytochrome c cytosolique s'associe à l'Apaf-1 pour assembler le complexe d'apoptosomes et activer la caspase-9. Les caspases initiatrices activées traitent directement les caspases exécutantes-3 et -7. Ces dernières clivent un ensemble de substrats cellulaires et induisent l'apoptose. D'Après Cabon et al., 2013.

(B) Mécanisme de nécrose. La nécrose peut être induite par plusieurs types de signaux et comporte divers mécanismes de régulation. La nécroptose, provoquée par les récepteurs de mort et les récepteurs Toll-like, repose sur l'assemblage fonctionnel des kinases RIP1 et RIP3, à savoir la formation du nécrosome. **(D'après Cabon et al., 2013)**.

cellules, la condensation de la chromatine et le décollement de la membrane plasmique (Galluzzi et al., 2012). Il existe principalement deux voies d'induction de l'apoptose dans la cellule : la voie extrinsèque et la voie intrinsèque **(Figure 13)** (Cabon et al., 2013).

La voie apoptotique extrinsèque est activée en réponse à la fixation de ligands spécifiques, de type cytokines, sur des récepteurs transmembranaires de mort (DR : Death receptor).

Les DR identifiés chez l'homme incluent le récepteur Fas, le récepteur du TNF-α (Tumor Necrosis Factor-α), les récepteurs DR3 et DR6 et les récepteurs du TNF-related apoptosis inducing ligand-1 : TRAIL-1, DR-4 et DR-5, qui possèdent tous une séquence conservée appelée DD (Death Domain).

La fixation d'un ligand aux récepteurs Fas, DR4 et DR5, au niveau de leur DD, provoque le recrutement de protéines adaptatrices FADD (Fas Associated Death Domain) ce qui active les caspases-8 et -10 et forme le complexe Death Inducing Signaling Complex (DISC). Le domaine TNF Receptor Associated Death Domain (TRADD) va être recruté par le récepteur du TNF-α et DR3. La caspase 8 déclenche une activation directe des caspases effectrices d'apoptose et peut accroitre le signal apoptotique par le clivage de la pro-apoptotique Bid (BH3 interacting domain death agonist) et stimuler l'action de BAX et BAK **(Figure 13A)**.

La voie apoptotique intrinsèque est induite par un déséquilibre intracellulaire. Une perméabilisation de la membrane mitochondriale externe résulte de la formation des pores par les facteurs cytoplasmiques pro-apoptotiques : BAX et BAK, permettant la libération du cytochrome C et des protéines Smac et Diablo dans l'espace intermembranaire. Dans le cytosol, le cytochrome C s'associe à l'adaptateur Apaf-1 *(apoptosis protease-activating factor-1),* ce qui permet le recrutement puis l'activation de la caspase 9 pour former le complexe nommé « apoptosome ».

La caspase 9 active les caspases 3, 6 et 7, principales caspases effectrices du phénotype apoptotique. L'activation des caspases 9 et 3 est inhibée par des protéines anti-apoptotiques IAPs *(linked inhibitor of apoptosis protein)* telles que Bcl-2/Bcl-XL mais pour neutraliser cette inhibition, les facteurs pro-apoptotiques Smac et Diablo interviennent favorisant l'activation des caspases **(Figure 13A)**.

(2) Mort cellulaire par nécrose

La nécrose ne présente généralement pas les changements associés à l'apoptose, et se caractérise plutôt par un gonflement irréversible du cytoplasme et des organites dont les mitochondries, la dégradation aléatoire de la chromatine, et une lyse ultime de la membrane plasmique. La nécrose se traduit par la libération de matériel intracellulaire (comprenant souvent des

enzymes de dégradation) dans la zone environnante, ce qui peut induire des dommages aux cellules voisines non nécrotiques (Festjens et al., 2006; Zong & Thompson, 2006). La nécrose est de ce fait souvent associée au déclenchement d'une réaction inflammatoire liée au déversement du contenu cytoplasmique dans le milieu extracellulaire. L'engagement d'un processus d'apoptose et de nécrose dans une cellule infectée est un mécanisme de défense pour répondre aux agents pathogènes à multiplication intracellulaire, tributaires de la cellule hôte.

Au cours de l'évolution des microorganismes, des mécanismes se sont élaborés pour contourner les voies de signalisation qui conduisent à la mort cellulaire. Cette voie est enclenchée par l'activation des récepteurs de mort (DR) et des récepteurs TLR3 et TLR4. L'association des kinases RIP1 et RIP3 (receptor interacting protein) aux récepteurs TNF est primordiale dans l'initiation de cette voie et interagir avec des mitochondries et être inhibée par les caspases, notamment la caspase-8 **(Figure 13B)**.

Les mitochondries génèrent des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et activent la protéine PARP-1 avec l'épuisement des stocks d'ATP intracellulaire, ce qui entraine la perméabilité de la membrane mitochondriale (Heeres et Hergenrother, 2007).

(3) Modulation de l'apoptose et de la nécrose par les EV

L'infection des cellules par le poliovirus et le CVB3 induit l'apoptose mais son exécution est modulée pour favoriser la multiplication virale. L'apoptose est induite très tôt au début de l'infection par le poliovirus (Agol et al., 1998, 2000; Ammendolia et al., 1999; López-Guerrero et al., 2000; Tolskaya et al., 1995) mais les protéases 2Apro et 3Cpro du poliovirus opèrent le clivage des caspases et des protéines pro-apoptotiques et inhibent ainsi l'apoptose dans la cellule hôte à un stade tardif de l'infection. Chacun de ces virus a des cibles spécifiques et des mécanismes distincts pour moduler la réponse apoptotique de la cellule hôte.

Au cours d'une infection par un entérovirus, tels que le poliovirus, CVB3, l'EVA71 et le CVA6, l'activation des voies de mort cellulaire (apoptose et nécroptose) pourrait résulter du déclenchement de la réponse antivirale induisant un programme de transcription antiviral qui se compose de l'expression de cytokines, de chimiokines, d'interférons (IFN) et pouvant également être réguler par les protéases de ces entérovirus.

Les voies IFN, qui sont composées de capteurs viraux (RIG-I, MDA-5, TLR-3), de protéines adaptatrices (MAVS, TRIF), de kinases et de facteurs de transcription (IRF3 et IRF7), constituent des antagonistes de l'infection virale en facilitant l'expression des gènes stimulés par l'interféron (ISG) (Sun et al., 2019) **(Figure 13C)**.

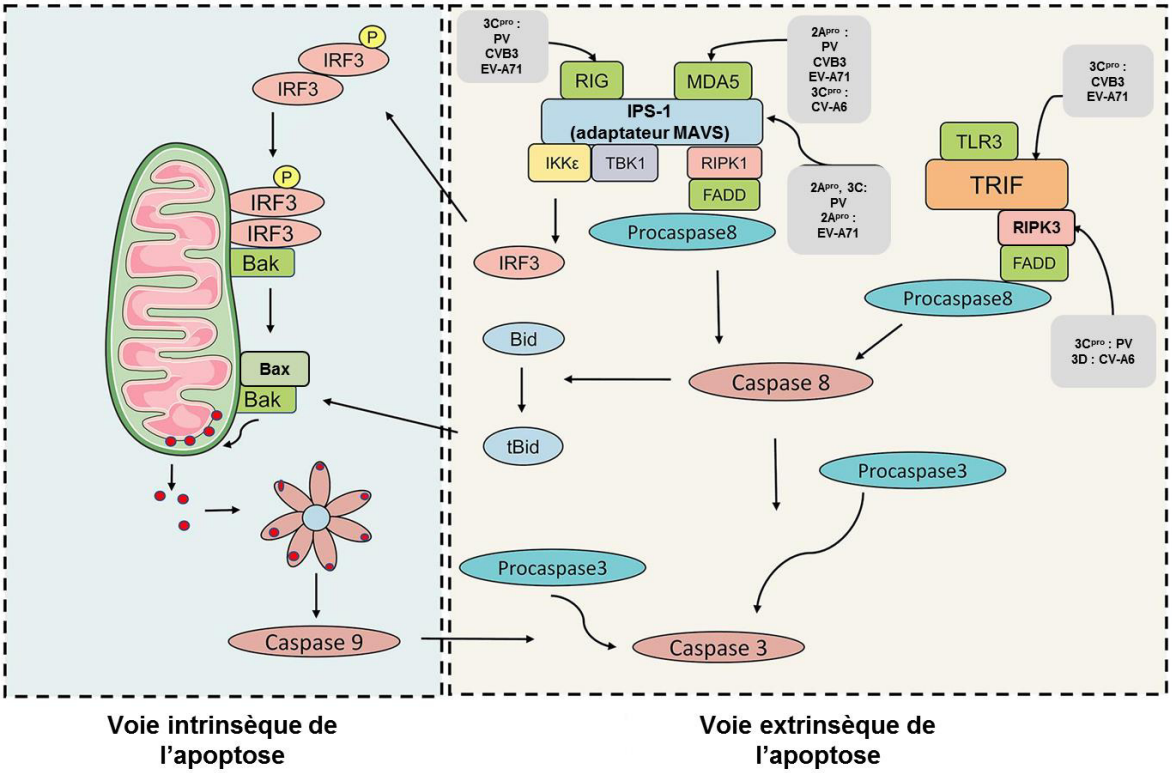


Figure 13 : Mécanismes de mort cellulaire et leur modulation par les entérovirus

(C) Modulation des voies apoptotiques intrinsèques et extrinsèques par les entérovirus. Lorsqu'ils sont activés, les capteurs d'ARN (RIG-I et MDA-5) s'associent à IPS-1 et recrutent TBK1 et IKKγ un complexe récepteur de mort dans les mitochondries. TBK1 et IKKγ phosphorylent les dimères IRF-3, qui induisent alors un pore dans la membrane mitochondriale, permettant la libération du cytochrome c dans le cytoplasme, ce qui induit une apoptose intrinsèque. Le capteur RIG-I est clivé par la protéase 3C dans les cellules infectées par le PV, le CV-B3 et l'EV-A71, tandis que le MDA-5 est une cible de la protéase 2A. L'adaptateur MAVS est dégradé par les protéases virales de PV, EV-A71, CVB3 et. L'apoptose extrinsèque nécessite la formation du complexe caspase 8/RIPK1/FADD/IPS-1. RIPK1 est également une cible pour la protéase 3C, qui perturbe l'apoptose extrinsèque. **(D'après Sun et al., 2019)**.

Dans les stades tardifs de l'infection par le poliovirus, la protéase 2Apro peut également inhiber l'apoptose en inactivant la pro-caspase-9 (Belov et al., 2003; Burgon et al., 2009), ce qui induit un basculement vers une mort par nécrose. La protéine DAP5 (Death-associated protein 5) est un homologue structural du facteur eIF4G, qui favorise la traduction des ARNm cellulaires qui portent un IRES. Dans une cellule hôte infectée par le CVB3, DAP5 est clivée par la protéase 2Apro en deux peptides (Hanson et al., 2016).

Le peptide N-terminal conserve la capacité de stimuler l'initiation de la traduction IRES-dépendante et le peptide C-terminal exerce un effet négatif sur la traduction dépendant de la coiffe. Ces deux effets antagonistes favorisent la mort cellulaire.

Concernant l'EVA71, l'engagement des cellules infectées vers l'apoptose et ses effets caractéristiques ont été rapportés dans plusieurs types cellulaires (Chang et al., 2004; Lu et al., 2013; Song et al., 2018). L'apoptose induite lors de l'infection par ce virus impliquerait l'activation de caspases (Chang et al., 2004). Après une infection par l'EVA71, la protéine 2B est localisée dans les mitochondries et affecte la voie apoptotique mitochondriale. Ensuite, elle interagit avec le facteur pro-apoptotique Bax et l'active l'apoptose (Cong et al., 2016).

Comme pour le poliovirus, la protéine 2A de l'EVA71, peut cliver le facteur eIF4G dans les cellules hôtes, inhibant ainsi la traduction cap-dépendante de l'ARNm de la cellule hôte et induisant de préférence une traduction non cap-dépendante des protéines apoptotiques (Lai et al., 2020). Li et al. (Li et al., 2002) ont utilisé la lignée cellulaire SF268 du glioblastome humain pour étudier l'induction de l'apoptose par la protéine 3Cpro de l'EVA71. Ils ont découvert que l'activité protéolytique du 3Cpro déclenche l'apoptose dans les cellules SF268 par un mécanisme impliquant l'activation de la caspase, et que cette voie apoptotique pourrait jouer un rôle important dans la pathogénie de l'infection par l'EVA71. La protéase 3Cpro peut induire l'apoptose par le clivage des facteurs de transcription et d'initiation de la traduction qui contrôlent les voies de survie et de mort des cellules. L'apoptose induite pendant l'infection par l'EVA71 est liée à l'activité protéolytique de la protéine 3Cpro (Li et al., 2002). Un processus apoptotique a aussi été décrit *in vitro* dans différents types cellulaires pendant l'infection par le CVA16 (Li et al., 2014).

Longtemps considérée comme une mort accidentelle et non contrôlée, la nécrose est en fait un processus régulé, rebaptisé nécrose programmée ou nécroptose (Cabon et al., 2013). Il a été démontré que la nécroptose induite par une infection virale est capable d'inhiber ou de favoriser la réplication virale (Bozym et al., 2011), selon le virus et le type cellulaire. Un tel processus a été rapporté in vitro dans des cellules infectées par le CVA6 (Zhang et al., 2020). Il a été démontré que l'infection par le CVA6 favorise une voie distincte de mort cellulaire qui implique la perte de l'intégrité de la membrane cellulaire. La nécrostatine-1, un inhibiteur de la nécroptose, bloque la mort cellulaire

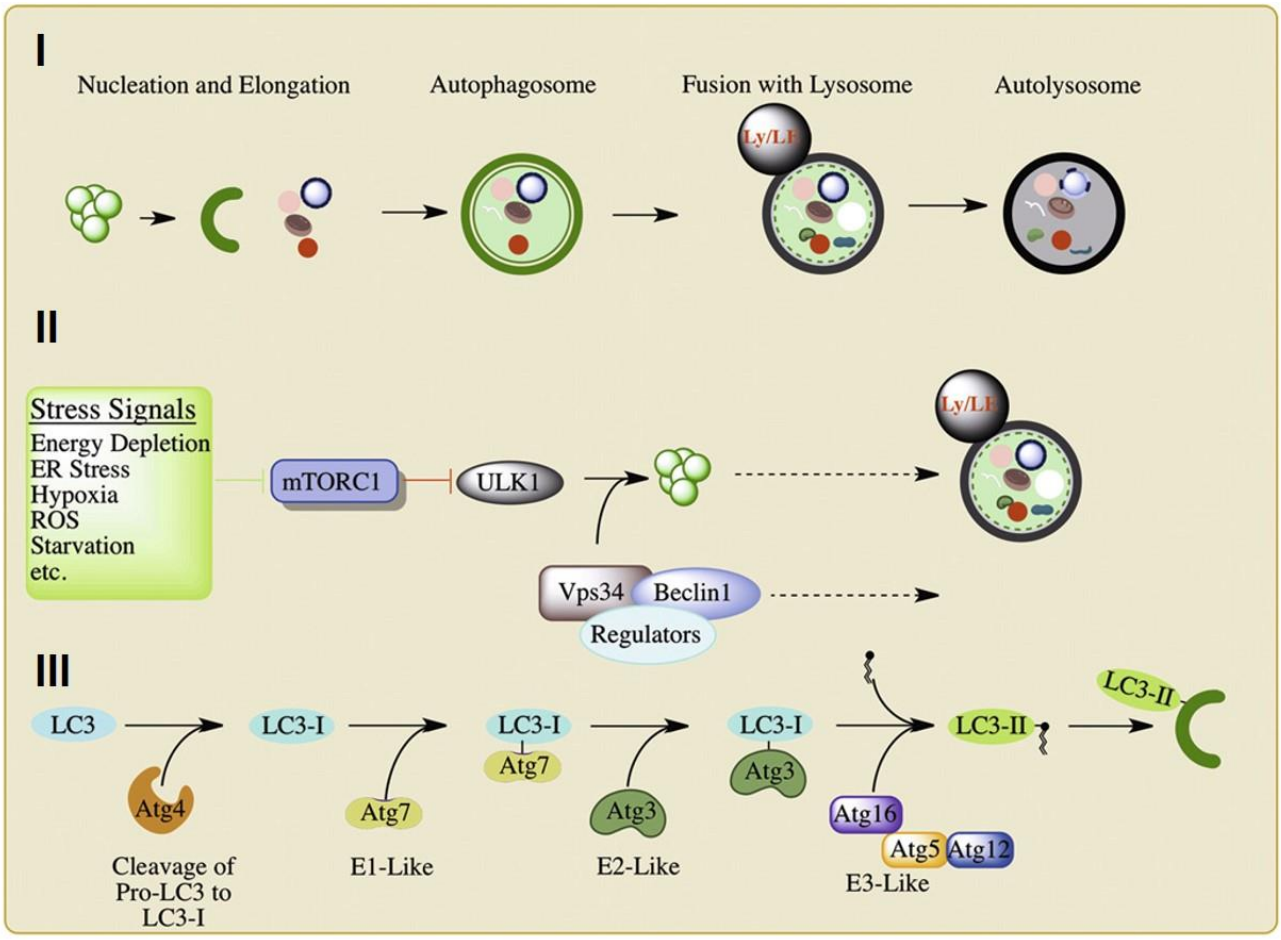


Figure 13 : Mécanismes de mort cellulaire et leur modulation par les entérovirus

(D) Mécanisme autophagique.

I. Le processus autophagique est amorcé par la nucléation initiale de l'autophagosome et l'élongation correspondant à la dilatation du phagophore qui engloutit le contenu cytoplasmique et se referme pour former des autophagosome. Puis, l'autophagosome fusionne avec le lysosome et mature en autolysosome en vue de la dégradation et du recyclage des nutriments.

II. L'induction de l'autophagie est stimulée par divers signaux de stress qui inhibent l'action du complexe mTORC1 sur diverses protéines régulatrices de l'autophagie.

III. La LC3-I est conjuguée à la phosphatidyl-éthanolamine (PE) pour générer la LC3-II qui s'insère dans le phagophore et conduit à sa maturation en autophagosome. **(D'après Jordan et Randall, 2012)**.

induite par l'infection par le CVA6. En outre, l'infection par le CVA6 régule l'expression de la molécule de signalisation de la nécroptose, RIPK3.

La nécrostatine-1 inhibe les niveaux de protéine VP1 et d'ARN génomique ainsi que les particules infectieuses du CVA6. La nécroptose induite par le CVA6 ne dépend pas de la génération d'espèces réactives de l'oxygène ; cependant, la protéine 3D du CVA6 peut se lier directement à RIPK3, ce qui suggère un mécanisme direct d'induction de la nécroptose.

Par conséquent, le CVA6 induit un mécanisme de nécroptose dépendant de RIPK3 pour la production virale qui est distinct du mécanisme d'apoptose induit par d'autres EV associés à la maladie PMB (Zhang et al., 2020).

b) Mécanisme de l'autophagie et modulation par les entérovirus

(1) Machinerie autophagique

L'autophagie est un processus conservé par lequel l'homéostasie cellulaire et la survie cellulaire sont maintenues dans des conditions de stress. L'autophagie peut être classée en plusieurs types, cependant la mort cellulaire ne résulte que de la macro-autophagie appelée ci-après autophagie.

L'autophagie est caractérisée par l'acheminement et la dégradation vers les lysosomes des protéines cytoplasmiques, les organites dysfonctionnels ou même les agents pathogènes dans des vésicules membranaires désignés autophagosomes. Plusieurs études rapportent qu'il existe une relation mutuelle entre autophagie et immunité innée qui peut être spécifique de tissus, de types cellulaires, et dépendre du contexte environnemental. La progression de l'autophagie est divisée en plusieurs étapes : induction et nucléation du phagophore, élongation et fermeture pour former l'autophagosome, fusion de l'autophagosome avec le lysosome pour former l'autolysosome, et dégradation des organites qui s'engouffrent dans l'autolysosome. L'étape d'induction implique mTOR (mamalian Target of Rapamycin), qui inhibe l'autophagie en phosphorylant l'Atg13. Lorsque mTOR est inhibée, l'Atg13 déphosphorylée se lie à l'Atg1 et à l'Atg17 pour induire l'autophagie. L'activation du facteur de transcription NF-κB responsable de la synthèse de plusieurs cytokines inflammatoires et des adaptateurs des TLR, TRAF6 (*TNF receptor-associated factor 6*) et TRIF (*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon*-β) déclenche l'autophagie.

La LC3 (microtubule associated protein 1 light chain 3) conjuguée aux lipides, appelée LC3-II reste associée et intervient dans la fermeture du phagophore, elle est ainsi l'un des meilleurs

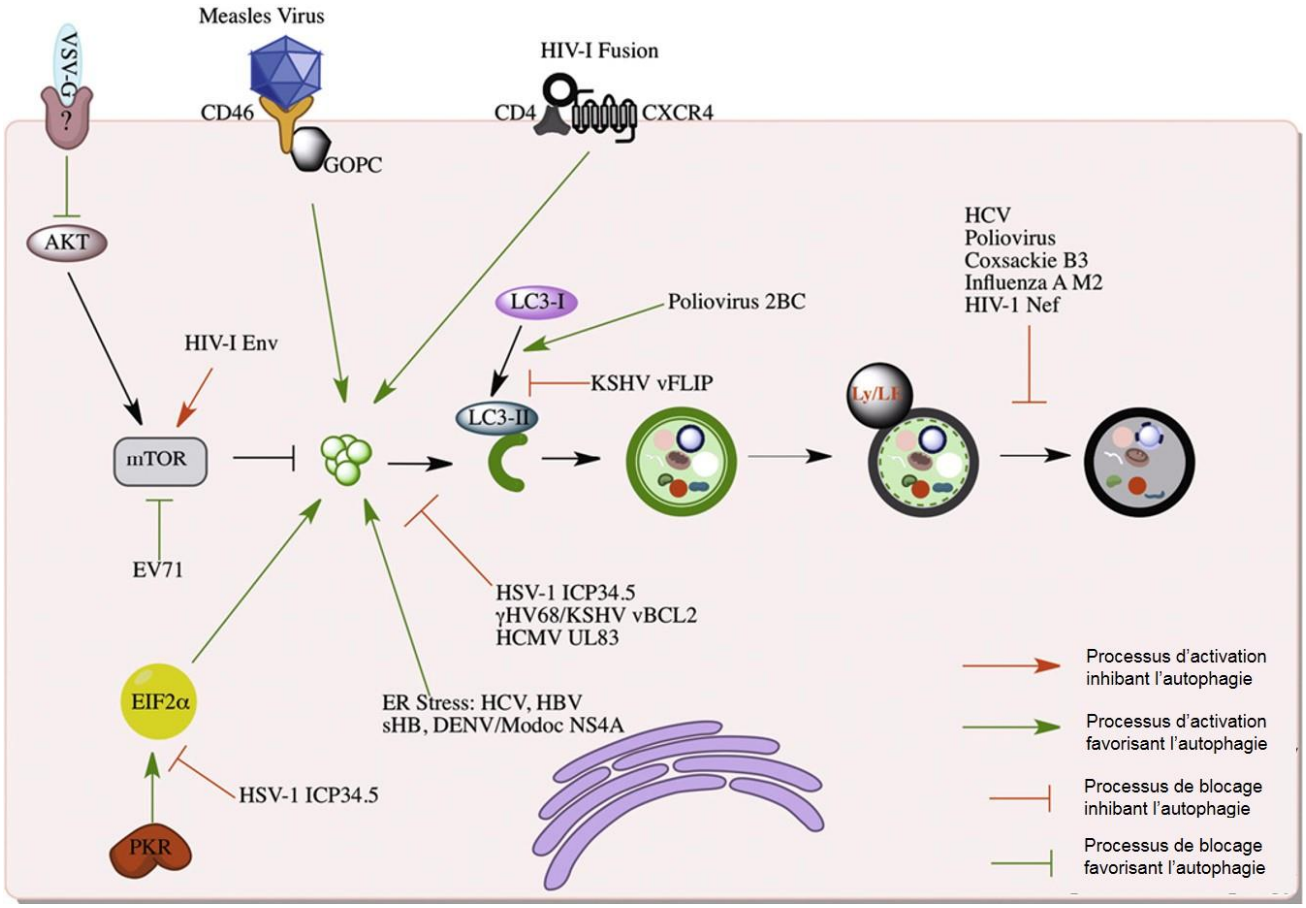


Figure 13 : Mécanismes de mort cellulaire et leur modulation par les entérovirus

(E) Modulation virale de l'autophagie. L'activation (représentée en lignes vertes) et l'inhibition (représentée en lignes rouges) de l'autophagie peuvent être obtenues par la modulation de la signalisation mTOR, des interactions entre récepteurs, des diverses contraintes et des capteurs. Plusieurs virus bloquent divers stades de la maturation autophagosomique. **(D'après Jordan et Randall, 2012)**.

marqueurs de l'autophagie et des structures membranaires qui lui sont liées. Les autophagosomes fusionnent avec les lysosomes, ce qui entraîne la formation d'autolysosomes.

La membrane interne et le contenu luminal de ces autolysosomes sont ensuite dégradés par les hydrolases des acides lysosomaux, et certains acides aminés sont transportés vers le cytosol pour la synthèse des protéines et pour soutenir les fonctions cellulaires normales **(Figure 13D)**. L'autophagie joue un rôle antiviral en intervenant en tant que réponse immunitaire cellulaire, bien que certains virus aient développé des stratégies pour l'utiliser à leur avantage.

Plusieurs études ont montré que les EV détournaient la machinerie de l'autophagie pour favoriser l'infection virale au sein des cellules hôtes, facilitant ainsi les différentes étapes du cycle viral, de la réplication, de l'assemblage à la sortie.

(2) Modulation de l'autophagie par les entérovirus

Les EV tels que le poliovirus, le CVB3 et l'EVA71 déclenchent l'autophagie et détournent les membranes autophagosomiques pour améliorer la réplication virale (Huang et al., 2009; Suhy et al., 2000; Wong et al., 2008). Il a été démontré que les protéines 2BC et 3A du poliovirus s'introduisaient dans les membranes du réticulum endoplasmique et induisaient la formation d'autophagosomes (Wileman, 2006). La co-localisation du complexe de réplication de l'ARN viral avec des vésicules à double membrane dans les cellules infectées a été bien documentée (Kirkegaard et al., 2004).

La microscopie électronique des cellules infectées par le poliovirus a montré que les vésicules à double membrane induites par le virus enferment des particules virales et/ou du matériel cytosolique (Schlegel et al., 1996). Les protéines virales VP1, 2C et 3D du poliovirus et la LC3, marqueur majeur de la formation d'autophagosomes sont localisées dans les vésicules autophagosomiques, comme le démontrent les expériences d'immunomarquage (Jackson et al., 2005). Le processus autophagique a été rapporté pour l'EVA71 par la co-localisation de vésicules de type autophagosomique avec la protéine VP1 de l'EVA71 et la protéine LC3, marqueur de l'autophagie dans les neurones de la moelle épinière cervicale chez des souris infectées par l'EVA71. La membrane autophagosomale servirait de plateforme pour les complexes de réplication de l'ARN viral et favoriserait la réplication du virus. Les protéines virales de l'EVA71 ont contribué à l'inhibition de la voie mTOR/p70S6K et à l'induction de l'autophagie. La formation de vésicules de type autophagosome dans les neurones des souris infectées indique que l'autophagie se produit également en réponse à l'infection par l'EVA71 *in vivo* (Lin & Huang, 2020). Une autre étude a démontré que le remplacement de la protéine de capside VP1 entrainerait une diminution de la réplication virale de l'EVA71 dans les cellules SH-SY5Y en affectant l'autophagie cellulaire par la voie de signalisation mTOR (Liu et al., 2019).

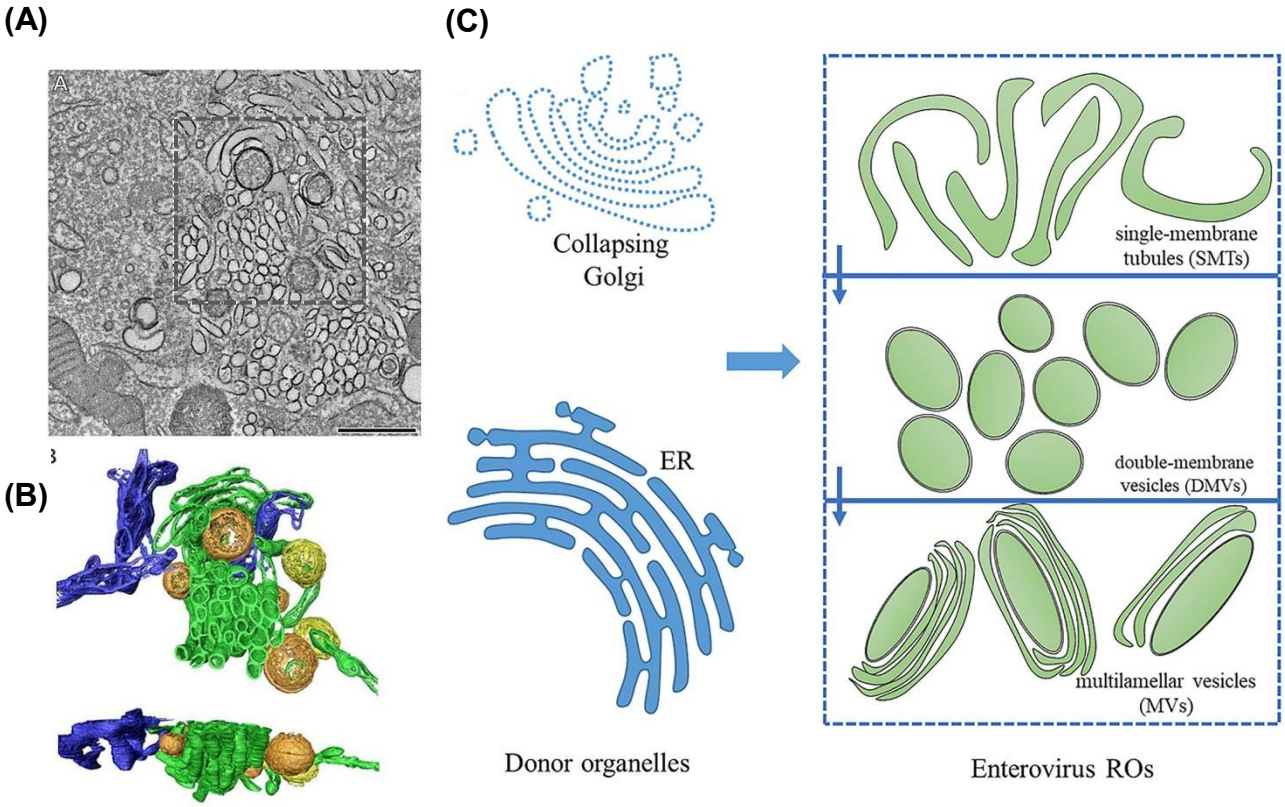


Figure 14 : Remodelage cytoplasmique, formation d'organites de réplication

(A) Coupe tomographique en série d'une cellule infectée par le CV-B3 (5h après l'infection) (échelle à 500 nm).

(B) Vues de dessus et de côté d'une modélisation 3D en micrographie électronique à partir d'une coupe tomographique au stade précoce (région encadrée de la figure 14.A) montrant le SMT (vert), les DMV ouvertes (orange), les DMV fermées (jaune) et les RE (bleu).

(C) Modèle de la morphologie des OR. Les entérovirus RO sont générés à partir de l'ER et du Golgi. Au cours des premiers stades de l'infection, les entérovirus produisent des RO ayant une morphologie de tubule à membrane unique (SMT). Les SMT se transforment en vésicules à double membrane (DMV) et en vésicules multi-lamellaires (MV) avec la progression de l'infection. **(D'après Li et ., 2020)**.

(3) Réorganisation cytoplasmique, formation d'usine virale

La réplication virale des EV entraine un ECP caractérisé par une réorganisation de la membrane des cellules infectées. L'ECP induit par les EV consiste à un ensemble de changements morphologiques de la cellule tels que la condensation de la chromatine, une altération du noyau, une réorganisation ou élimination des organites, un arrondissement de la cellule et une multiplication de structures vésiculaires, observés en microscopie électronique.

La réplication du génome de plusieurs virus à ARN conduit à ces transformations morphologiques, bien que les mécanismes moléculaires impliqués soient mieux décrits pour le poliovirus et le CVB3 parmi les EV **(Figure 14A)** (Miller & Krijnse-Locker, 2008).

(4) Mécanisme de formation des organites de réplication des entérovirus

La microscopie électronique bidimensionnelle indique que les structures des OR (organites de réplication) évoluent constamment au cours du processus d'infection virale. Au début de l'infection, les OR formés par les EV apparaissent dans le cytoplasme sous la forme de tubules à membrane unique (SMT). Avec la progression de l'infection, les SMT se transforment en vésicules double membrane (DMV) par appariement des membranes. Au dernier stade de l'infection, des vésicules multilamellaires (VM) apparaissent dans le cytoplasme **(Figure 14B et 14C)**. Au cours du processus d'infection par les entérovirus, l'appareil de Golgi s'effondre et ne peut être détecté, ce qui suggère que les membranes des OR pourraient dériver de l'appareil de Golgi.

Les recherches sur l'infection par le poliovirus et le CVB3 ont permis d'élucider qu'il existe un lien entre les protéines virales, l'ARNdb, et les vésicules viro-induites. Les protéines 2BC et 3A du poliovirus provoquent une modification des RE, déclenchant la formation des OR (Suhy et al., 2000). La protéine 2C de l'EVA71 interagit avec le réticulon 3 (RTN3), qui peut modifier la courbure de la membrane des RE (Tang et al., 2007). Au début de l'infection, lorsque le niveau de protéines virales est faible, le poliovirus et le CVB3 utilisent le compartiment de Golgi et les membranes du RE pour la biogenèse des OR.

(5) Rôle des organites de réplication « usine virale »

Les OR favorisent une réplication efficace du génome viral, coordonnent les étapes du cycle de réplication virale et protègent l'ARN viral des réponses immunitaires de l'hôte **(Figure 14D)**.

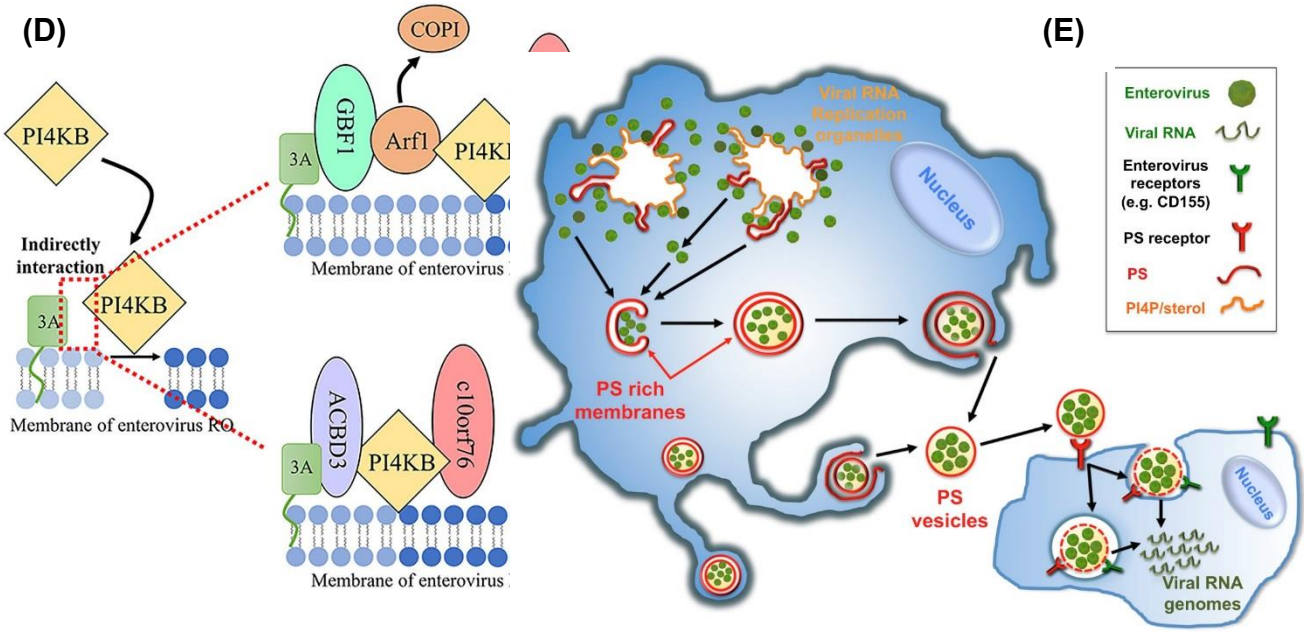


Figure 14 : Remodelage cytoplasmique, formation d'organites de réplication

(D) Représentation schématique de la mise en place des complexes de réplication génomique à la surface des membranes. La protéine 3A recrute la PKI4III sur la membrane des OR pour phosphoryler la PI en PI4P. La protéine virale 3A se lie et régule le complexe GBF1/Arf1, ce qui augmente l'accumulation de PI4KB sur la membrane des OR par rapport au COPI. L'ACBD3 est un régulateur intermédiaire de la protéine 3A et de la PI4KB, mais il participe également à la localisation de la protéine 3A virale dans le noyau cellulaire. La protéine c10orf76 peut contribuer à une activation de l'Arf1 et augmente le niveau de PI4P des OR. La PI4P est liée au transport du cholestérol vers les OR et au recrutement de la polymérase virale 3D pour synthétiser de l'ARN viral au sein des OR. **D'après Li et ., 2020**.

(E) Les entérovirus matures assemblés sont libérés des OR dans le cytoplasme. Les particules virales multiples sont sélectivement capturées par des vésicules qui fusionnent avec la membrane plasmique et une membrane enrichie en lipides PS. Cette vésicule facilite ensuite l'infection par un mécanisme dépendant du lipide PS et du récepteur viral, ce qui entraîne le transfert collectif vers une nouvelle cellule hôte réceptrice de multiples génomes d'ARN viral. Ce mode de transmission virale améliore l'efficacité de l'infection. **(D'après Altan-Bonnet & Chen, 2015)**.

Lors de l'infection par un EV tels que le poliovirus, le CVB3 et l'EVA71, la protéine 3A, située sur les membranes des organelles sécrétoires et recrute le complexe GBF1/Arf1, ce qui augmente l'accumulation de PI4KB sur le complexe protéique Coat I (COPI), entraînant la production de structures non enrobées enrichies en phosphatidylinositol-4-phosphate (PI4P) à proximité des ER (Hsu et al., 2010). Cette combinaison lipidique PI4P au sein des membranes permet la fixation de la polymérase virale 3D et forme une courbure des membranes favorisant la formation des vésicules viro-induites.

Les EV peuvent induire et exploiter le mécanisme de l'autophagie. Les vésicules formées après une infection par un EV présentaient les caractéristiques des autophagosomes et la membrane autophagosomale servirait de plateforme pour les complexes de réplication de l'ARN viral et favoriserait la réplication du virus. L'autophagie jouerait un rôle dans la dissémination virale. L'autophagie est une voie selon laquelle les autophagosomes fusionnent avec la membrane plasmique au lieu des lysosomes pour libérer des structures vésiculaires à membrane unique remplies de virions dans l'environnement extracellulaire. Des études ultérieures ont démontré par microscopie quantitative à intervalle de temps que le poliovirus pouvait se propager à une autre cellule sans lyse, ce qui dépendait des composants de la voie d'autophagie (Bird et al., 2014). De plus, il a été constaté que les particules de poliovirus regroupées étaient emballées dans des structures vésiculaires, puis transmises de cellule en cellule par libération non lytique (Altan-Bonnet & Chen, 2015). Ce mode de transmission entre les cellules pourrait permettre une plus grande efficacité de l'infection virale.

Toutefois, l'infection par des vésicules contenant des particules de poliovirus est dépendante de la présence des lipides phosphatidyle-sérine (PS) et des récepteurs du poliovirus au sein de la cellule hôte et non pas simplement de la fusion membrane-membrane **(Figure 14E)**.

II. Caractéristiques physiopathologiques générales des infections à EVA71 et CVA6

A. Portes d'entrée et dissémination des virus dans l'organisme

Les infections à EVA71 et CVA6 se transmettent principalement par la voie fécale-orale et peuvent être propagées par contact direct avec des sécrétions buccales, le liquide vésiculaire ou par contact indirect avec des surfaces contaminées. Comme pour les autres entérovirus, la multiplication virale initiale se produit au niveau des tissus lymphoïdes de la cavité oropharyngée (amygdales) et de l'intestin grêle (plaques de Peyer) **(Figure 15)**.

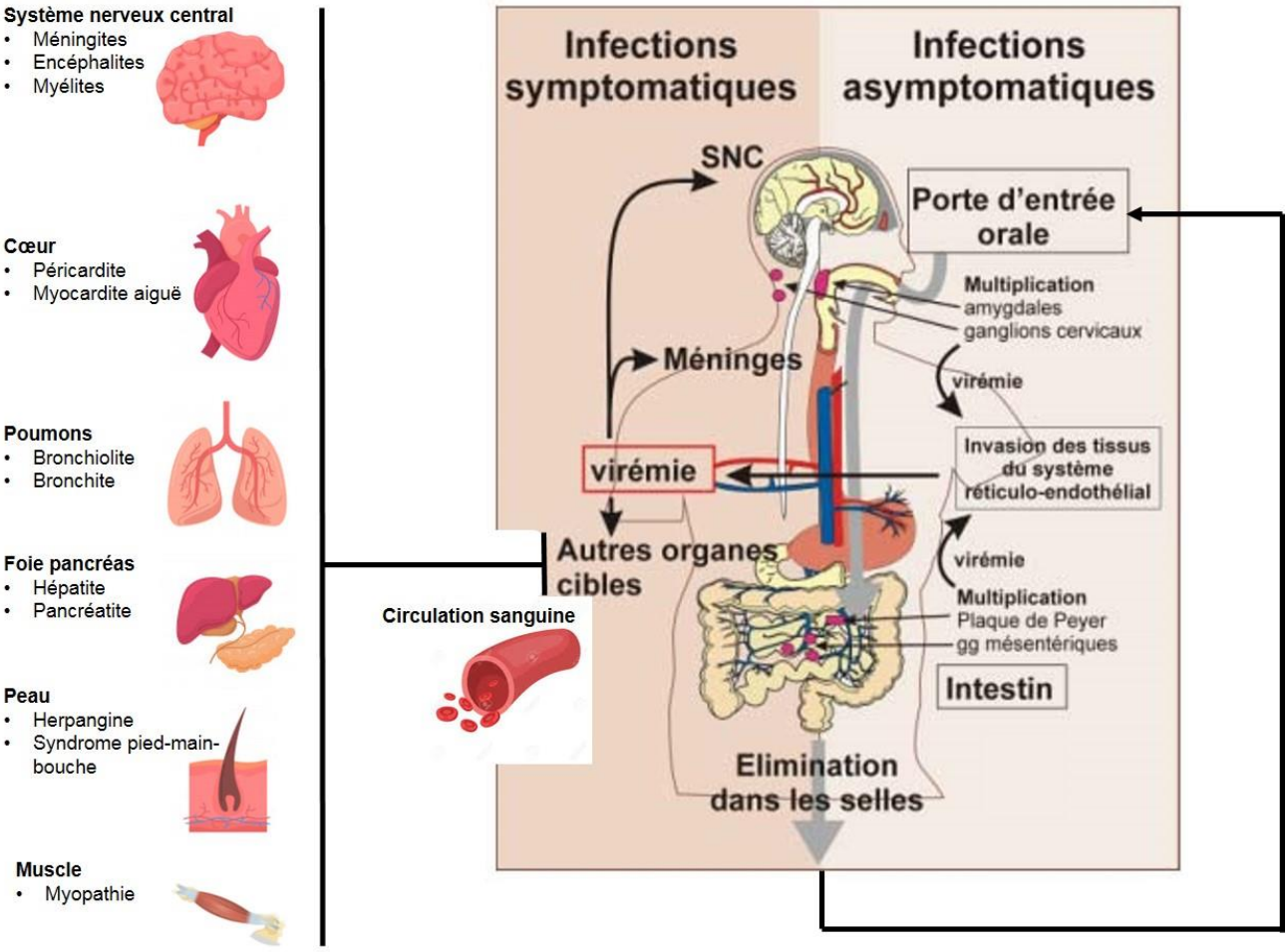


Figure 15 : Physiopathologie générale des infections à entérovirus

Les entérovirus migrent vers le tissu lymphatique au niveau de l'oropharynx ou de l'intestin, avant d'atteindre les organes cibles.

Modifié d'après http://www.microbes-edu.org/etudiant/imgpicor/14.jpg.

Une multiplication ultérieure se produit dans les ganglions lymphatiques régionaux (ganglions cervicaux et mésentériques profonds), qui donne lieu à une légère virémie cliniquement silencieuse ou peut s'accompagner des manifestations cliniques non spécifiques (Pallansch et al., 2013). Chez la majorité des patients, l'infection virale est contrôlée à ce stade et les patients restent asymptomatiques (Lee et al., 2012). La virémie dissémine le virus vers d'autres organes ou tissus (foie, cœur, poumons, peau, muqueuses, muscle, méninges, moelle épinière…) dans lesquels une infection pourra s'installer selon le tropisme du virus et la réponse immunitaire de l'hôte.

Si l'infection virale n'est pas contrôlée, l'EVA71 et le CVA6 atteignent alors des titres élevés et se disséminent dans la peau et les muqueuses pour provoquer la maladie PMB, avec une incubation de 3 à 6 jours. Les premiers symptômes sont une fièvre modérée, une éruption cutanée avec ou sans ulcérations buccales. Plus rarement, l'EVA71 peut également pénétrer dans le SNC et provoquer des complications sévères (Solomon et al., 2010). Il a été noté que les enfants qui présentaient une virémie détectable après 3 jours étaient plus à risque de complications neurologiques (Cheng et al., 2014). Comme pour le poliovirus, deux voies sont évoquées pour l'atteinte du SNC par l'EVA71 : la voie hématogène ou par transport axonal rétrograde. Au cours de la phase virémique, les leucocytes infectés peuvent migrer à travers la barrière hémato-encéphalique en raison de la régulation à la hausse des molécules d'adhésion cellulaire. Divers modèles *in vivo* et rapports d'autopsie ciblés sur les atteintes du SNC par l'EVA71 suggèrent que le virus traverse la barrière hémato-encéphalique par un transport axonal rétrograde le long de la paroi crânienne ou des nerfs périphériques (Solomon et al., 2010; Wang et al., 2020).

Actuellement, la dissémination du CVA6, impliquant son dermotropisme accentué, dans l'organisme reste à élucider. L'excrétion fécale des EV qui commence dès l'apparition des signes cliniques marque la fin de l'histoire naturelle de l'infection (Pallansch & Roos, 2007).

B. Tropisme cellulaire et tissulaire

Chaque EV a un tropisme distinct qui est déterminé par une combinaison de facteurs de l'hôte et du virus (Lin & Shih, 2014). Bien que les EV puissent atteindre le système nerveux et soient associés à des troubles neurologiques, la dissémination du virus dans le système nerveux semble se produire sporadiquement et on ne sait pas exactement comment des régions et des types cellulaires spécifiques dans le cerveau et la moelle épinière sont « ciblées ».

Les études sur le poliovirus ont suggéré que le neurotropisme du virus est déterminé par le récepteur cellulaire médiateur de l'entrée du virus (Holland, 1961). Cependant, le récepteur CD155 du poliovirus est exprimé dans des tissus qui ne sont pas affectés par ce virus lors d'une infection *in*

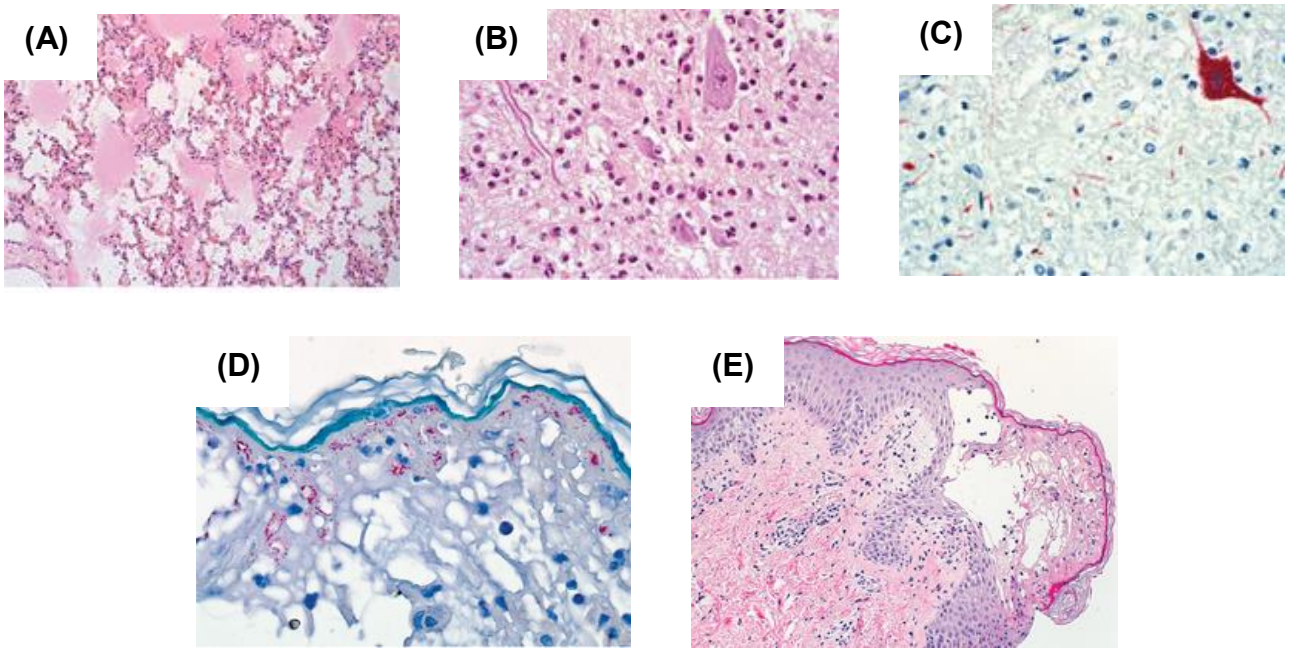


Figure 16 : Tropisme cellulaire et tissulaire de l'EV-A71 et du CVA6

Localisation des antigènes d'EV-A71 dans une infection à EV-A71 fatale

chez un jeune enfant

(A) Œdème pulmonaire neurogène (H&E) ;

(B) Inflammation des neutrophiles dans le cas d'une encéphalite du tronc cérébral (H&E) ;

(C) antigène (rouge) d'un entérovirus localisé dans les neurones du tronc cérébral par immunohistochimie. Grossissements (A) ×25 ; (B, C) ×100.

Localisation des antigènes de CVA6 dans un cas de maladie PMB chez un enfant de 13 ans

(D) Nécrose épidermique avec formation de vésicules (H&E) ;

(E) antigène d'entérovirus localisé dans le cytoplasme des kératinocytes (rouge) par immunohistochimie. Grossissements (A) ×25 ; (B) ×100

(H&E : coloration à l'hématoxyline et à l'éosine)

vivo (Freistadt et al., 1990; Koike et al., 1990; Mendelsohn et al., 1989). Ceci indique que le récepteur cellulaire est nécessaire à l'initiation de l'infection par le poliovirus mais n'est pas le seul déterminant du tropisme du virus.

Dans le SN, le poliovirus infecte et se réplique principalement dans les motoneurones de la corne antérieure de la moelle épinière, ce qui cause la poliomyélite (Arita et al., 2006; Nagata et al., 2004). Dans les cas les plus graves, le poliovirus attaque les neurones du tronc cérébral, provoquant une poliomyélite bulbaire. Bien que l'EVA71 soit neurotrope, les zones infectées sont bien distinctes de celles rapportées pour le poliovirus. L'encéphalite du tronc cérébral est la présentation neurologique la plus courante de l'infection par l'EVA71.

De manière constante, les lésions virales sont principalement observées dans le tronc cérébral (Kao et al., 2004). Quelques lésions sont également observées dans le cortex, le cervelet et la moelle épinière. Parmi les nombreux récepteurs cellulaires décrits pour l'EVA71, deux ont été reliés à son neurotropisme **(Figures 16A, 16B et 16C)**. Il s'agit du récepteur scavenger de classe B, membre 2 (SCARB2, également connue sous le nom de CD36L2) (Yamayoshi et al., 2009) et le ligand 1 de la glycoprotéine P-sélectine (également connu sous les noms de PSGL-1 et CD162) (Nishimura et al., 2009). SCARB2 est également un récepteur du CVA16 qui n'est pourtant pas souvent retrouvé dans les atteintes neurologiques sévères des EV (Yamayoshi et al., 2009). Il s'agit d'une glycoprotéine membranaire intégrale et omniprésente dans l'organisme. L'EVA71 est l'un des principaux EV associés à la maladie pieds-mains-bouche et présente donc un tropisme cutanéo-muqueux même si celui-ci est très peu étudié.

Le tropisme cutané de l'EVA71 dans l'épiderme humain de la peau et de la muqueuse buccale a été récemment étudié à l'aide de cultures organotypiques. Les cellules épithéliales cutanées ou kératinocytes des couches supérieures de la peau sont permissives à l'infection par l'EVA71 qui s'accompagne d'un œdème intraépidermique, de la formation de vésicules et d'infiltrats neutrophiles. Les antigènes viraux sont également observés dans le cytoplasme des kératinocytes (Phyu et al., 2017).

La nécrose des kératinocytes est également observée dans l'épiderme de patients infectés par un CVA6. Par immunohistochimie, les antigènes viraux sont principalement visibles dans la moitié supérieure de l'épiderme. Ils sont localisés dans le cytoplasme des kératinocytes et associés à des zones de nécrose épidermique **(Figure 16D et 16E)** (Chung et al., 2013; Muehlenbachs et al., 2015). Le tropisme de ce virus pour les kératinocytes cutanés de sites anatomiques comme la partie antérieure des mains et des pieds est un facteur qui facilite la transmission entre individus par contact direct ou par contamination de surfaces. La détermination des facteurs moléculaires de ce tropisme serait particulièrement intéressante.

(A)

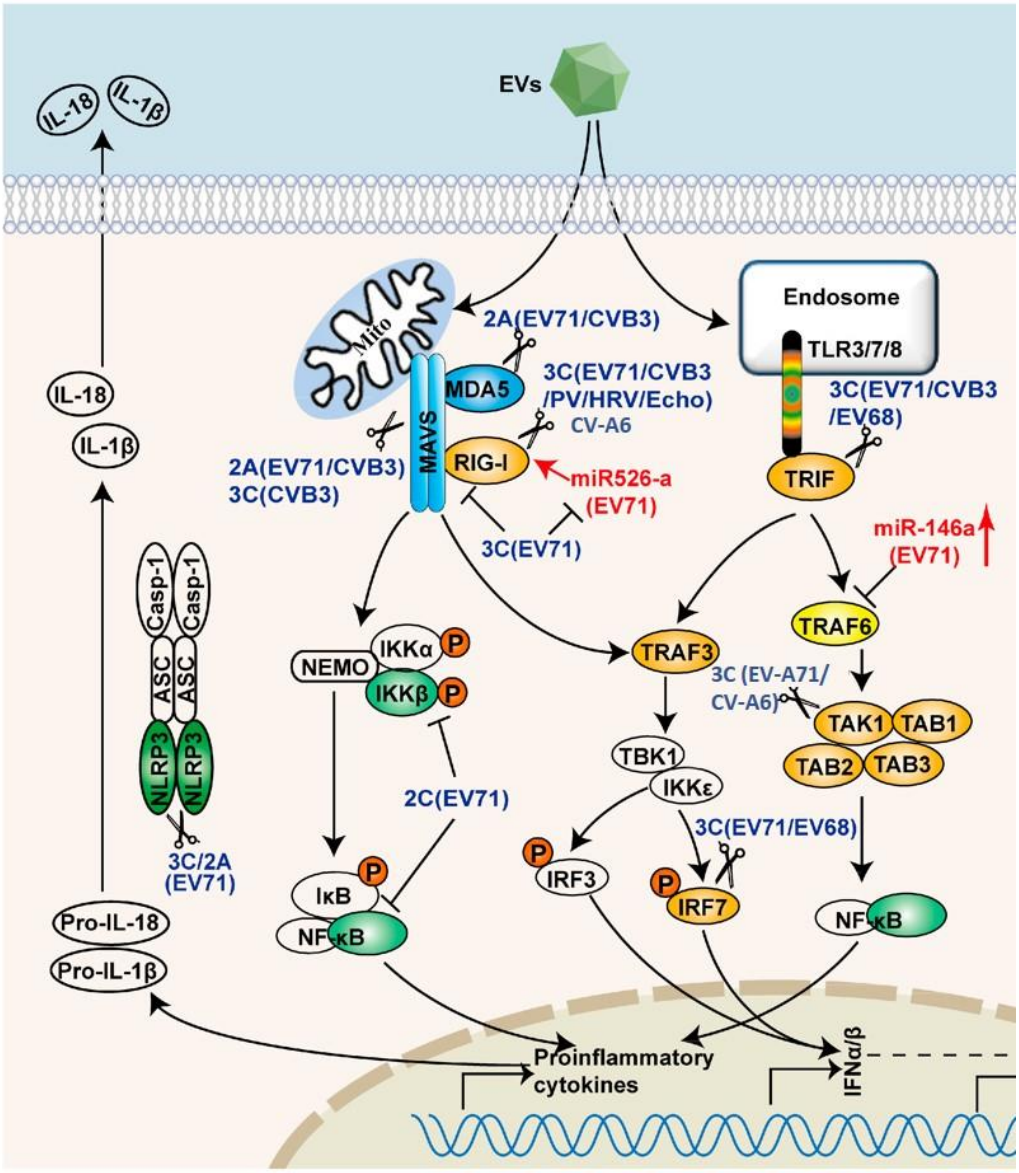


Figure 17 : Modulation des réponses immunitaires innées et adaptatives par l'EV-A71 et le CV-A6

(A) Pendant l'infection, les EV ciblent les voies de signalisation de l'IFN de type I. Les protéases EV-A71 telles que 2A et 3C sont connues pour moduler l'immunité innée en contrant les réponses antivirales médiées par l'IFN de type I. La protéase 2A clive les MAVS et MDA5, et dégrade l'IFNAR1. La protéine 2C inhibe l'activation de NF-κB. 3C perturbe le complexe RIG-I et MAVS, et clive TRIF, IRF9, IRF7, TAK1 et TAB1/2/3. La protéase 3C inhibe également l'activation du RIG-I médiée par le miR-526a. L'EV-A71 peut également échapper à l'immunité innée en induisant l'expression du miARN-146a. Les ciseaux représentent le clivage. **(D'après Lei al., 2016)**.

C. Réponse immunitaire de l'hôte contre les infections à l'EVA71 et au CVA6

Au cours de l'infection par les entérovirus, les réponses immunitaires de l'hôte sont activées pour limiter la dissémination du virus. La réponse immunitaire innée agit comme le premier mécanisme de défense suivie par la réponse immunitaire adaptative qui éradique l'infection.

1. La réponse immunitaire innée

Cette réponse antivirale est initiée par la reconnaissance des motifs moléculaires caractéristiques des agents pathogènes (PAMP : Pathogen Associated Molecular Patterns) (Kato et al., 2006). Ces signaux d'alerte peuvent être des ARN double brin et sont reconnus par des récepteurs cellulaires de type PRR (Pattern recognition receptor). Les virus à ARN tels que les EV sont principalement détectés par trois types de PRR : les récepteurs de type Toll (TLR : Toll-like receptor), les récepteurs de type RIG-I (retinoic acid-inducible gene I) (RLR) et les récepteurs de type NOD (nucleotide-binding oligomerization domain) (NLR) (Takeuchi & Akira, 2009 ; Yan & Chen, 2012).

Après la détection de motifs moléculaires viraux par ces récepteurs, ils déclenchent une cascade d'événements moléculaires impliquant l'activation de la protéine mitochondriale de signalisation antivirale (MAVS) et entraînent la production d'IFN de type I, de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines (Takeuchi & Akira, 2010; Loo, 2011).

Les interférons de type I (IFN : interférons alpha/bêta [IFN-α/β]) sont des acteurs clés de la réponse antivirale innée contre les infections virales. Lorsqu'ils sont produits et sécrétés par les cellules infectées, les IFN-α/β se lient au récepteur de l'IFN de type I (IFNARI), ce qui va initier la synthèse de plusieurs protéines telles que PKR, OAS et MxA qui ensemble induisent un état dit antiviral qui limite la réplication et la dissémination du virus (Ivashkiv, 2014 ; Stark & Darnell, 2012). Les EV ont développé des mécanismes pour interférer avec la signalisation des récepteurs de la réponse immunitaire innée. Cette capacité des EV est assurée par les protéases 2Apro et 3Cpro qui jouent un rôle essentiel en inhibant la production d'IFN et la voie de signalisation en aval de l'IFN, ce qui s'oppose à une réponse antivirale efficace de l'hôte **(Figure 17A)**.

a) Inhibition de l'activation de la protéine RIG-I par la protéase 3Cpro

RIG-I est un récepteur d'ARNdb (forme réplicative de l'ARN des entérovirus) intracellulaire. Lei et al ont montré que la protéine 3C inhibe l'expression de l'IFN-β médiée par RIG-I de manière dose-dépendante. En l'absence de RIG-I, la protéine 3C ne stimule pas l'expression de l'IFN-β.

La protéine 3Cpro de l'EVA71 pourrait moduler l'induction de l'immunité antivirale dans les cellules 293T infectées en ciblant le récepteur cytosolique RIG-I (Xiaobo Lei et al., 2010).

b) Inhibition de l'activation de la protéine MDA5 par les protéases 2Apro et 3Cpro

MDA5 est une enzyme hélicase de récepteur ARNdb de type RIG-I. Le MDA5 est un élément essentiel de la voie RLR de l'hôte. Plusieurs études utilisant des souris déficientes en MDA5 ont démontré que la signalisation de MDA5 est critique pour l'induction de l'IFN de type I après une infection virale. Les souris déficientes en MDA5 ont notamment une sensibilité accrue à l'infection létale induite par le poliovirus (Abe et al., 2012; Wang et al., 2010). L'infection par l'EVA71 augmente la dégradation de la MDA5, et la surexpression de la MDA5 peut inverser la suppression de la transcription de l'IFN de type I (Kuo et al., 2013). Feng et al (2014) ont suggéré que la protéine 2A dérivée de l'EVA71 (2Apro) inhibe la réponse de l'IFN antiviral de type I en clivant la MDA5 dans les cellules infectées, empêchant ainsi son interaction avec une MAVS (Feng et al., 2014). La capacité d'interaction avec le MDA5 a également été évaluée pour le CVA6. La protéine 3Cpro du CVA6 supprime efficacement l'activité du promoteur IFN-β induite par MDA5, en empêchant l'interaction de MDA5 entre les MAVS (Rui et al., 2017). Par conséquent, l'inhibition de l'activation de la MDA5 fournit une nouvelle stratégie utilisée par l'EVA71 et le CVA6 pour échapper à l'immunité innée antivirale de l'hôte.

c) Inhibition de l'activation dépendant des protéines MAV

La protéine mitochondriale de signalisation antivirale (MAVS) sert d'adaptateur clé dans l'immunité cellulaire antivirale innée et réside sur les membranes externes des mitochondries et des peroxysomes. Les MAVS sont surtout connues pour initier la transcription du gène antiviral dépendant TBK1 (TANK-binding kinase 1) et du facteur nucléaire NF-κB (nuclear factor-kappa B) (Seth et al., 2005). Il a été démontré que la protéine 2Apro de l'EVA71 supprime la signalisation du facteur de régulation de l'interféron (IRF)3 par le clivage des MAVS, ce qui entraîne une réduction de l'IFN-α/β dans les cellules HeLa infectées (Feng et al., 2014). Une autre étude a montré que l'infection par l'EVA71 provoque des modifications morphologiques et fonctionnelles des mitochondries et le clivage des MAVS par la 2Apro de l'EVA71 (Wang et al., 2013). Concernant le CVA6, des données suggèrent que la protéine 3Cpro perturbe l'activité des MAVS (voir § **Inhibition de l'activation de la protéine MDA5 par les protéases 2Apro et 3Cpro**) (Rui et al., 2017).

d) Inhibition de l'activation de la voie TLR par les protéases 2Apro et 3A pro

La signalisation TLR est essentielle pour induire la production d'IFN de type I pendant l'infection par l'EVA71 (Wang et al., 2016). Pour échapper à l'immunité innée de l'hôte, la protéine 3Cpro de l'EVA71 bloque la production d'IFN-β par l'intermédiaire de la protéine adaptatrice TIR-domaine contenant l'interféron inducteur d'adaptateur-β (TRIF) en réponse à l'activation endosomale de TLR3 (Lei et al., 2011). Comme TLR3, TLR7 réside également sur les endosomes pour détecter l'ARN viral. L'augmentation de la réplication de l'EVA71 induite par l'autophagie entraîne la dégradation des endosomes, ce qui supprime une peu plus les réponses de l'IFN de type I médiées par TLR7 dans les cellules épithéliales bronchiques humaines (16HBE) en utilisant un inhibiteur d'autophage (3-MA) (Song et al., 2018).

La protéine 3Cpro du CVA6 a été proposée pour subvertir la réponse immunitaire innée de l'hôte, en clivant le facteur de croissance transformant β-activated kinase 1 (TAK1), entraînant l'inhibition de l'activation de NF-κB, une réponse de l'hôte également critique pour la signalisation médiée par le récepteur Toll-like (TLR) (Rui et al., 2017). Par conséquent, l'inhibition directe ou indirecte de la signalisation antivirale dépendante des TLR est un mécanisme efficace d'évasion immunitaire utilisé par l'EVA71 et CVA6. D'autres protéines impliquées dans les voies de signalisation intracellulaires sont affectées lors de l'infection par l'EVA71 : le complexe de l'inflammasome NLRP3 (Wang et al., 2015), la protéine IRF7 (Lei et al., 2013) et la voie NF-kB (Lei et al., 2014).

Dans leur ensemble, ces données suggèrent que les protéases virales ont un rôle majeur dans les processus d'échappement aux réponses immunitaires. Une solution thérapeutique pourrait être de développer des molécules à large spectre dirigées contre l'action de ces protéases pour lutter contre les infections sévères.

2. La réponse immunitaire adaptative

En général, la réponse immunitaire adaptative au cours des infections virales est induite 3 à 5 jours après l'apparition de l'infection, un stade où les infections sont établies et où la quantité de virus atteint un niveau requis pour activer la réponse adaptative avec l'aide de cytokines, qui sont libérées au cours de la réponse immunitaire innée. L'induction de réponses des cellules B et T dépend de leur activation par les cellules présentatrices d'antigènes. Les cellules dendritiques jouent un rôle essentiel dans l'initiation et la liaison de la réponse immunitaire adaptative innée par la reconnaissance des antigènes vaccinaux. Le rôle prédominant des cellules B dans la production d'anticorps est crucial pour la liaison spécifique à un virus.

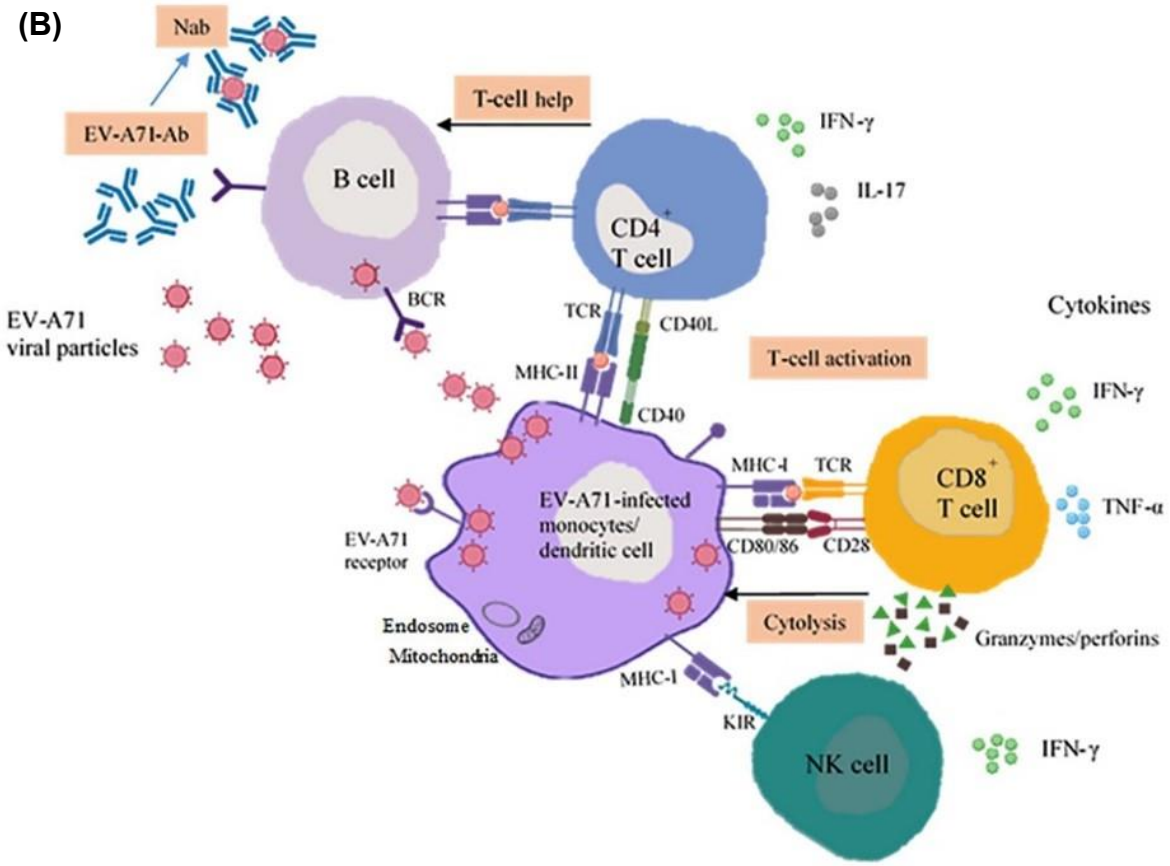


Figure 17 : Modulation des réponses immunitaires innées et adaptatives par l'EV-A71 et le CV-A6

(B) Les EV peuvent infecter des cellules et se répliquer avant d'être dégradés en fragments peptidiques. Certains fragments seront présentés sur des molécules du CMH de classe I aux cellules T CD8+ naïves. La liaison de la BCR (récepteur des cellules B) au complexe peptidique du CMH de classe I active les cellules T CD8+ et libère des granules cytotoxiques et des cytokines (TNF-α et IFN-γ). Certains peptides viraux peuvent être présentés sur les molécules du CMH de classe II en parallèle par des APC (cellule présentatrice d'antigène). La BCR des cellules T CD4+ naïves peut reconnaître les complexes de peptides du CMH de classe II sur les APC et se différencier en cellules Th1 et Th2. **(D'après Lim et al., 2019).**

L'IL-2, l'IL-4, l'IL-10 et l'IFN-γ sont les principales cytokines qui se sont révélées jouer un rôle crucial dans les réponses immunitaires à l'EVA71 (Chung et al., 2008 ; Zhou et al., 2015). La sécrétion de diverses cytokines pro-inflammatoires, dont l'IFN-γ, l'IL-8 et l'IL-17, a été augmentée chez les souris humanisées et infectées par l'EVA71, ce qui pourrait contribuer à l'accentuation de la pathogenèse de la maladie (Ke et al., 2018). Il a été rapporté que les niveaux de cellules Th1/IFN-γ étaient significativement plus élevés chez les patients atteints de maladie PMB légère et sévère, tandis que le niveau de cellules Th17/IL-17 était uniquement plus élevé chez les patients atteints de la maladie PMB sévère, ce qui suggère que le déséquilibre des lymphocytes T CD4+ sont impliqués dans la pathogénie des infections par EVA71 **(Figure 17B)** (Li et al., 2014).

3. Facteurs viraux associés à la virulence

Les recherches sur la génétique moléculaire de la virulence du poliovirus menées depuis de nombreuses années ont montré que des variations ponctuelles de la séquence du génome, en particulier la région 5′NC et le gène 3Dpol, sont suffisantes pour expliquer de grandes différences de virulence entre des souches fortement apparentées. Ceci suggère que le phénotype exprimant la virulence des EV peut être codé par un petit nombre de déterminants génétiques critiques lors de la multiplication intracellulaire (Gromeier et al., 1999). De nombreux travaux ont établi que la région 5′NC et la polymérase 3Dpol des EV exercent une influence considérable sur le tropisme tissulaire, la neurovirulence et la pathogénèse virale (Chumakov et al., 1979).

Plusieurs études sur différents modèles murins ont indiqué que les facteurs viraux, tels que les 5’ et 3’NC, la modification génétique sur la région VP1, et la polymérase 3D, contribuent au tropisme des cellules et des tissus ainsi qu'à la pathogenèse.

a) La région 5’ non codante (5’NC)

Nous avons décrit dans la 1ère partie, l’importance de la région 5′NC, et en particulier de l’IRES, pour former le complexe fonctionnel d’initiation de la traduction et synthétiser la polyprotéine virale (Gamarnik & Andino, 2000; Murray et al., 2004 ; Bedard & Semler, 2004).

Les positions 480, 481 et 472 dans le domaine V de l’IRES sont décrites comme des déterminants de la neurovirulence des trois types de poliovirus (Chumakov et al., 1979; Melnick et al., 1979).

D'autres positions de la région 5′NC telles que la guanine à 272 (272G), l'uracile à 448 (448 U) et l'adénine/uracile à 700 (700A/U) ont été associées à une prévalence plus élevée dans les cas

graves de l'infection à EVA71 (Li et al., 2011). Huit protéines cellulaires ont été décrites comme des facteurs transactivateurs qui se lient à différents domaines de l'IRES de l'EVA71 (Lai et al, 2020). Par exemple, il s'établit une interaction entre le domaine IV de l'IRES de ce virus et la protéine PCBP1 (Luo et al., 2014). Les protéines Hur et Ago2 interagissent avec le domaine II et une étude mentionne qu'une substitution nucléotidique uracile > cytosine à la position 158 contribuerait à accroître la traduction et la virulence de l'EVA71 chez la souris (Yeh et al., 2011).

b) La protéine virale VP1

Plusieurs déterminants de la virulence du virus ont été identifiés pour l'EVA71 au niveau de la protéine virale VP1. Dans les souches d'EVA71 adaptées à la souris, un changement en position 145 (G>E) de la protéine VP1 a été identifié (Arita et al., 2008; Chua et al., 2008). Huang et. al (Huang et al., 2012) ont également trouvé que la substitution Q145E améliorait la fixation de l'EVA71 à des cellules de neuroblastome de souris (Huang et al., 2012). Dans un modèle de primate non humain, la présence de l'acide glutamique (E) à la position VP1-145 est responsable du développement de la virémie et de la neuropathogénèse (Kataoka et al., 2015). Cependant, Chang et. al (2012) ont observé qu'un changement d'acide aminé de l'acide glutamique (E) à la glutamine (Q) en position 145 du VP1 ($VP1^{E145Q}$) était plus fréquemment retrouvé dans des cas plus graves d'infections par EVA71 (Chang et al., 2012). En outre, une mutation de $VP1^{145G/Q}$ a été associée à la capacité du virus à se lier au récepteur PSGL-1, tandis que les souches $VP1^{145E}$ n'avaient pas la capacité de se lier au PSGL-1 (Nishimura et al., 2013). Une étude a montré que la sensibilité des organoïdes des voies respiratoires humaines était dépendante de la souche EVA71. La position bien connue VP1-145 s'est également avérée être un déterminant clé de l'infectiosité des voies respiratoires humaines et identifié $VP1^{145Q}$ comme un déterminant clé de l'infectiosité accrue des organoïdes des voies respiratoires humaines (Van Der Sanden et al., 2018).

Il a été également proposé que les résidus de lysine conservés à la surface du virus pourraient être responsables de l'interaction avec les résidus de tyrosine sulfatée à l'extrémité N-terminale de la PSGL-1, et que VP1-145 pouvait agir comme un commutateur qui contrôle la liaison à la PSGL-1 en modulant l'exposition de VP1-244K (Nishimura et al., 2013).

c) La polymérase 3Dpol

Un autre aspect important de la virulence des EV serait la fidélité de la polymérase virale 3Dpol lors de la réplication du génome viral (Baltimore, 1964). La faible fidélité de la polymérase 3D est un facteur essentiel qui détermine le taux élevé des mutations, et qui contribue à la survie de la

population virale en présence d'une pression sélective (Pfeiffer & Kirkegaard, 2005). La comparaison des gènes 3D des souches d'EVA71 de 1986 et 1998, a permis d'identifier un nouveau déterminant à la position 251, qui était probablement responsable de la sensibilité à la température et de la virulence du virus. La substitution I251T pourrait notamment expliquer l'augmentation de la virulence virale du virus lors de l'épidémie de 1998. Des études ont tenté de comprendre le rôle de la polymérase 3D dans la virulence de l'EVA71, on a découvert que la 3Dpol entrait dans le noyau et ciblait le facteur de traitement pré-ARNm pour bloquer la synthèse de l'ARNm de la cellule.

Ce mécanisme d'attaque virale contribue à la pathogénèse de l'infection virale par l'EVA71, ce qui a été également observé pour le PV (Liu et al., 2014).

Dans un test de résistance à la ribavirine, une nouvelle variante haute-fidélité de l'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp ou 3D polymérase) de l'EV 71 avec une seule substitution d'acide aminé de Leucine (Leu/L) à Phénylalanine (Phe/F) à la position 123 a été identifiée. Sur la base de la structure cristalline de la RdRp de l'EVA71, la position 123 se situe à l'entrée du canal de liaison de la matrice d'ARN, ce qui pourrait former un point de contrôle de la fidélité. La pathogénicité des souches présentant les mutations RdRp-L123F et/ou RdRp-G64R, (précédemment signalées) étaient fortement réduites chez les souris AG129, en particulier avec les doubles mutants (Meng & Kwang, 2014).

4. Modèles animaux des infections aux EV A

Les modèles animaux de l'infection causée par un EV peuvent potentiellement fournir des indications objectives du processus complet de l'infection. Les informations recherchées concernent les manifestations cliniques, les réponses immunitaires et les mécanismes physiopathologiques sous-jacents, en particulier la dissémination virale dans l'organisme.

a) Modèles animaux de l'infection à EVA71

- **Modèle de primates non humains**

Les premières études ont montré que les primates non humains tels le macaque « cynomolgus » ou Macaca fascicularis, le macaque rhésus « Macaca mulatta » et le « singe vert » ou Chlorocebus sabaeus, sont sensibles à une infection causée par l'EVA71 (Chumakov et al., 1979; Hashimoto et al., 1978; Hashimoto & Hagiwara, 1982). Des modèles de primates non humains ont été utilisés pour évaluer et caractériser la neurovirulence de l'EVA71 depuis les épidémies de la fin des années 1990.

Le singe cynomolgus présente des caractéristiques neuropathologiques très proches de celles de l'encéphalite sévère à EVA71 observées chez l'être humain (Chan et al., 2000; Liu et al., 1999; Lum et al., 1998; Shieh et al., 2001; Wong et al., 2000).

L'EVA71 présente notamment un neurotropisme plus important que le poliovirus chez le macaque « cynomolgus », que les souches proviennent de patients atteints d'encéphalite mortelle ou de maladie PMB (Nagata et al., 2002, 2004). Cependant, les singes « cynomolgus » ne présentent pas de lésions cutanées et bien que des lésions du tronc cérébral soient observées (Nagata et al., 2002, 2004), les singes ne développent pas de détresse cardio-respiratoire par œdème pulmonaire, pourtant considéré comme associé à la rhombencéphalite chez l'homme (Chan et al., 2000; Chang et al., 1999; Ho, 2000; Landry et al., 1995).

- **Modèles murins**

Le développement d'un modèle de souris pour étudier une infection à entérovirus, se heurte au problème de la variation de la sensibilité au virus en fonction de l'âge. Concernant l'EVA71, la résistance à l'infection par des isolats cliniques, est bien connue chez les souris âgées de plus de 14 jours, quelle que soit la voie d'inoculation (Chumakov & Rodin, 1979). Cette sensibilité au virus liée à l'âge est bien documentée pour de nombreux modèles murins (Arita et al., 2008; Chua et al., 2008 ; Fujii et al., 2013 ; Khong et al., 2012).

La virulence de l'EVA71 peut être augmentée chez la souris en adaptant le virus à son hôte. Par exemple, la souche EVA71/MP4, a été obtenue après quatre passages en série chez la souris de la souche parentale EVA71/4643 (Wang & Yu, 2014). Ce modèle de souche EVA71 adaptée à la souris a également permis de découvrir que l'interféron de type I est un mécanisme de défense innée essentielle pour contrôler l'infection virale chez la souris (Liu et al., 2005). Il a aussi permis de confirmer que l'infection à EVA71 inhibe la réponse antivirale IFN de type I via la protéase 3C tout en provoquant une réponse cytokine pro-inflammatoire (Lee et al., 2012).

L'intérêt de l'adaptation virale est aussi de pouvoir étudier la pathogénie de l'infection virale après inoculation orale, de concevoir et tester des souches vaccinales et des traitements antiviraux. Lin et al (2013) ont généré un modèle murin transgénique exprimant le facteur SCARB2 d'origine humaine. Après l'infection par l'EVA71 par micro-injections, les souriceaux transgéniques hSCARB2 présentent un syndrome précoce analogue à la maladie PMB, suivi d'une paralysie progressive des membres. Il s'agit de la première étude montrant un syndrome de type PMB causé par un EVA71 (génogroupe B4 et B5) chez la souris et rapportant que la souris transgénique pour le récepteur hSCARB2 présente une plus grande sensibilité à l'infection par voie orale. Une forme sévère de la maladie PMB et une atteinte neurologique ont été montrées après l'infection des souris transgéniques âgées de trois semaines.

En prolongeant l'âge auquel l'EVA71 peut être inoculé en produisant des manifestations analogues à celles observées chez l'homme, la souris transgénique pour le récepteur hSCARB2 peut présenter des applications qui vont au-delà du modèle du souriceau nouveau-né. Cependant, aucun des modèles de souris, qu'ils soient transgéniques ou non, ne présente d'œdème pulmonaire, bien que des atteintes neurologiques, des lésions musculaires, la paralysie et la mort surviennent après la diffusion du virus au système nerveux chez la souris. L'absence de développement d'œdème pulmonaire reste une limite importante des modèles murins pour étudier et comprendre la mécanisme de l'infection à EVA71 (Wang & Yu, 2014).

b) Modèle animal de l'infection au CVA6

Les épidémies de maladie PMB associées au CVA6 ont stimulé la recherche en faveur du développement de vaccins contre le CVA6 et donc celui des modèles animaux. Le modèle de souris néonatale est sensible, stable, facile à acquérir et peu coûteux, il a été largement utilisé dans l'étude des EV liés à la maladie PMB (Liu et al., 2014 ; Wang & Yu, 2014). Les caractéristiques de l'infection des souris néonatales par le CVA6 ont été rapportées pour la première fois en 1951 (Gifford & Dalldorf, 1951).

Contrairement à l'EVA71 et au CVA16, le CVA6 présente un tropisme faible pour le système nerveux ou les muscles cardiaques chez la souris. Le CVA6 est généralement isolé chez le souriceau nouveau-né et des études ont indiqué que le CVA6 présente un tropisme important pour les muscles squelettiques et la peau (Zhang et al., 2017).

III. Caractéristiques cliniques et évolution de la maladie pied-main-bouche associée aux infections à EVA71 et CVA6

A. Les manifestations communes au CVA6 et à l'EVA71

1. Herpangine

L'herpangine est caractérisée par une fièvre associée à une pharyngite vésiculeuse, entraînant une dysphagie. Les ulcérations buccales sont douloureuses et localisées à la partie postérieure de la cavité buccale au niveau des plis du pharynx antérieur, la luette, les amygdales et le palais mou **(Figure 18A)** (Melnick, 1996). L'infection peut se propager à d'autres parties de la bouche, comme les gencives et la langue, rendant parfois difficile la distinction entre herpangine et maladie pied-main-bouche. Les symptômes régressent spontanément en une semaine.

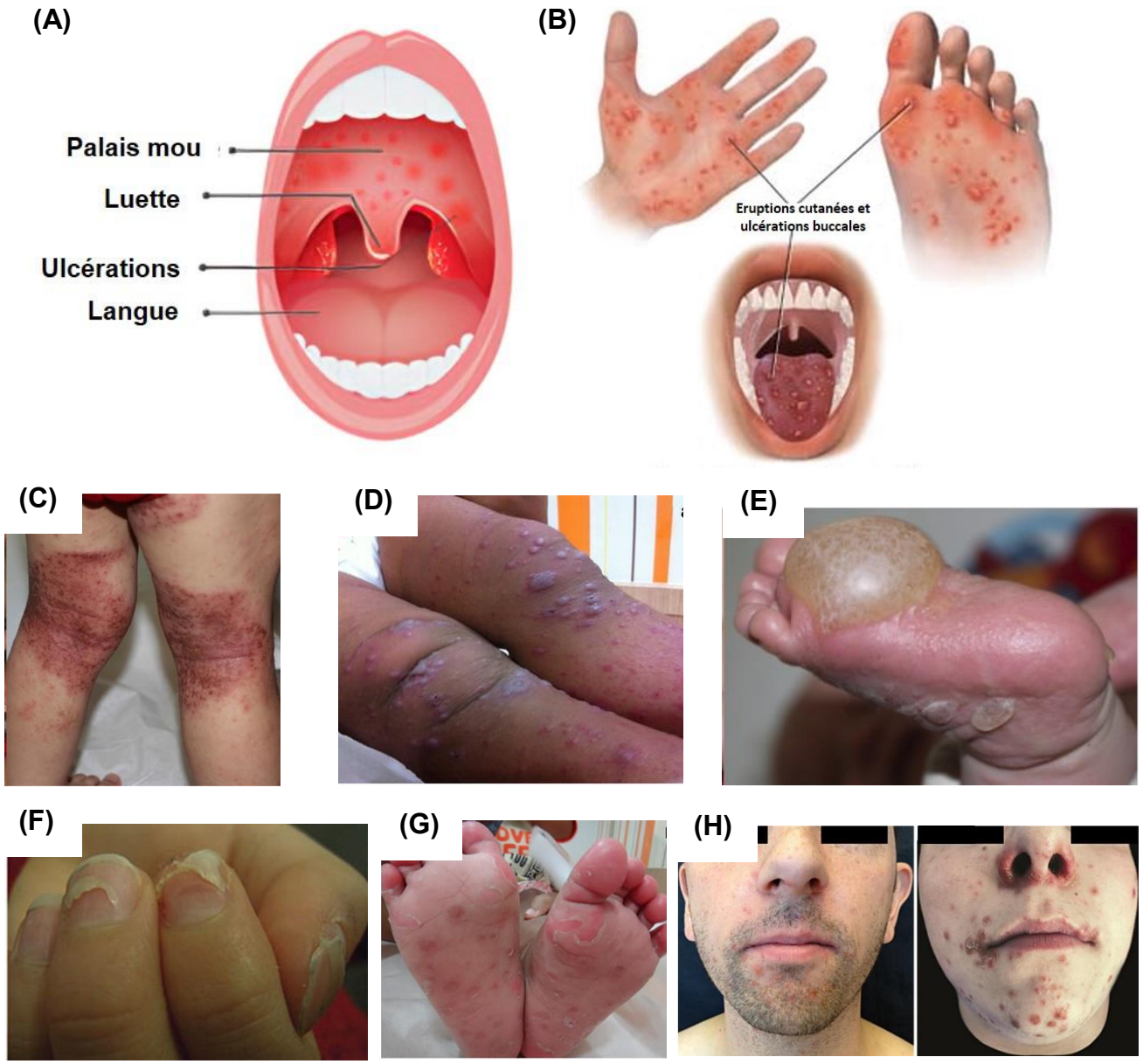


Figure 18 : Caractéristiques cliniques de la maladie pied-main-bouche associée aux infections à EV- A71 et CV-A6

(A) Herpangine : ulcérations au niveau de la cavité buccale postérieure. **(B)** Maladie PMB : Eruptions cutanées et ulcérations au niveau de la cavité buccale antérieure. **(C)** Eczéma coxsackium : lésions concentrées dans des zones de peau eczémateuse. **(D)** Eruption cutanée de type Gianotti-Crosti : papules érythémateuses à sommet plat, discrètes et multiples, distribuées de façon symétrique sur le visage, les fesses et la surface d'extension des membres. **(E)** Lésions vésiculobulleuses étendues. **(F)** Onychomadèse : chute indolore de l'ongle et fréquente pendant la convalescence. **(G)** Desquamation. **(H)** Cas de maladie PMB associés à l'infection au CV-A6 chez des adultes. (Sources : Image A www.medindia.net ; Image B : commons.wikimedia.org ; image C et E d'après Mathes et al., 2013 ; image D et G d'après Chatproedprai et al., 2015 ; image F d'après Österback et al., 2009 ; image H d'après Kaminska et al., 2013).

L'herpangine est une maladie infantile fréquente et associée classiquement aux EV A, et en particulier aux CVA même si l'infection à EVA71 peut être associée à une herpangine (Chang et al., 1999 ; Ho et al., 1999).

2. La maladie pied-main-bouche

La maladie pieds-mains-bouche (pied-main-bouche, PMB) a été décrite pour la première fois en Nouvelle-Zélande et au Canada en 1957 (Robinson et al., 1958).

La maladie a été désignée comme « maladie des mains, des pieds et de la bouche» après une épidémie rapportée aux États-Unis en 1959 (Flewett et al., 1963). Dans les années 60, d'autres épidémies ont été rapportées en Nouvelle-Zélande, au Royaume-Uni et aux États-Unis (Duff, 1968; Flewett et al., 1963). La maladie PMB est une maladie bénigne caractéristique de la petite enfance, qui se manifeste par un état fébrile et une éruption typique avec ou sans ulcérations buccales **(Figure 18B)**. L'éruption papulovésiculeuse est classiquement présente sur la paume des mains et/ou la plante des pieds. Chez les jeunes enfants, l'éruption peut être maculovésiculeuse et atteindre le siège, les genoux et les coudes (OMS, 2011). Les ulcérations buccales affectent le plus souvent la muqueuse de la partie antérieure de la cavité orale mais une herpangine peut y être souvent associée (Mirand et al., 2012). Les ulcérations buccales apparaissent un à deux jours avant l'éruption cutanée. La résolution de la maladie PMB s'observe en 7 à 10 jours (pour revue, Mirand & Peigue-Lafeuille, 2017).

B. Les formes atypiques de la maladie pied-main-bouche associées à l'infection au CVA6

En 2008, l'émergence du CVA6 a été responsable d'une épidémie en Finlande au cours de laquelle des formes inhabituelles ont été décrites pour la première fois (Österback et al., 2009). Depuis, ces formes atypiques ont été régulièrement rapportées au cours d'épidémies de la maladie PMB associées au CVA6, aussi bien en Europe qu'en Asie (pour revue, Mirand & Peigue-Lafeuille, 2017). Bien que décrites de façon plus fréquente au cours des épidémies à CVA6, ces formes atypiques peuvent être associées à d'autres entérovirus.

1. Formes atypiques et/ou extensives

L'éruption peut être non papulo-vésiculeuse et/ou toucher d'autres sites que ceux classiquement décrits. Mathes et al (2013) ont décrit quatre formes atypiques de maladie PMB (Mathes et al., 2013) :

- **Extension de l'éruption** au niveau des membres, du visage, du tronc ou des parties exposées des pieds et des mains. En France, dans une étude réalisée en 2014-2015, près de 50 % des 530 enfants inclus ont présenté des lésions essentiellement localisées au niveau des membres (188/247, 76 %) et du visage (ulcérations péribuccales et au niveau des lobes d'oreille, 161/247 soit 65 %). Ces atteintes étaient statistiquement plus fréquentes chez les enfants infectés par le CVA6 (Mirand et al., 2016). Des éruptions bulleuses sont également observées, en particulier chez les jeunes enfants.
- **Eczema coxsackium** : Il est caractérisé par des vésicules et des érosions dans les zones habituellement touchées par la dermatite atopique, de façon semblable à l'eczéma herpeticum causé par le virus herpès simplex 1. Les zones fragilisées par des coups de soleil ou sujettes aux inflammations (dermatite du siège) peuvent être touchées (pour revue, Mirand & Peigue-Lafeuille, 2017) **(Figure 18C)**.
- **Eruption de type Gianotti-Crosti :** Le syndrome de Gianotti-Crosti (SGC) est une dermatose relativement courante, observée dans le monde entier, affectant principalement les enfants âgés de 2 à 6 ans (Brandt et al., 2006). Le SGC classique se caractérise par des papules et/ou des papulovésicules monomorphes, réparties symétriquement sur le visage, les bras et les jambes et moins sur le tronc **(Figure 18D)**. Le virus Epstein-Barr et le virus de l'hépatite B sont les virus les plus fréquemment associés au SGC (Brandt et al., 2006), mais des EV tels que les CVtypes A16, B4 et B5 ont également été rapportés (James et al., 1982).

- Deux caractéristiques cliniques différencient le SGC par rapport à la maladie PMB : le SGC se caractérise par une absence d'éruption sur les paumes, la plante des pieds ou les muqueuses et a généralement une durée d'évolution plus longue de 2 à 8 semaines contre une semaine pour la maladie PMB (Chatproedprai et al., 2015).
- **Eruptions purpuriques ou pétéchiales :** elles s'observent généralement au niveau des extrémités.
- **Lésions vésiculobulleuses (Figure 18D).**

Ces formes atypiques, d'abord décrites dans les infections à CVA6 avec une fréquence de 17 % (formes purpuriques) à 61 % (formes étendues) (Mathes et al., 2013) s'observent avec d'autres types d'EV (Mirand et al., 2016).

2. Manifestations tardives : onychomadèse et desquamation

Les manifestations tardives de l'infection à CVA6 peuvent apparaitre 4 à 8 semaines après la résolution de l'éruption. Ces manifestations tardives peuvent se manifester par une atteinte de la matrice de l'ongle accompagnée ou non d'une onychomadèse ou par une desquamation de la paume des mains et de la plante des pieds **(Figures 18F et 18G)**. L'onychomadèse, caractérisée par la séparation proximale de la plaque de l'ongle de la matrice de l'ongle et du lit de l'ongle (Bodman & Brlan, 1995), se traduit par un décollement de la matrice unguéale pouvant évoluer vers la chute de l'ongle. Ces atteintes sont transitoires et représentent un motif de consultation qui nécessite la recherche de la maladie PMB dans les semaines antérieures (Ventarola et al., 2015). En 2008, ces formes tardives étaient une des caractéristiques principales des épidémies associées aux types CVA6 et CVA10 en Finlande et en Espagne (Davia et al., 2011; Österback et al., 2009).

3. Infections chez les adultes

Les adultes ont représenté un quart à un tiers des patients lors des épidémies associées au CVA6 décrites en Finlande en 2008 (Blomqvist et al., 2010) ou aux Etats-Unis en 2012 (CDC 2012), ces infections étant plus fréquentes chez les adultes vivant au contact des enfants infectés (Fujimoto et al., 2012 ; Lo et al., 2011 ; Österback et al., 2009 ; Wu et al., 2010). Les formes décrites chez les adultes sont souvent atypiques : fièvre élevée, lésions vésiculeuses ou même bulleuses se propageant à des zones corporelles habituellement épargnées **(Figure 18H)**.

Parfois plus sévères et méconnues, elles peuvent poser des problèmes de diagnostic différentiel avec d'autres exanthèmes viraux ou des réactions médicamenteuses (Lott et al., 2013; Second et al., 2017).

C. Les complications neurologiques associées à l'infection à EVA71

La maladie PMB est la principale manifestation de l'infection à EVA71 même s'il est dès sa découverte en 1969 reconnu comme un virus neurotrope. Environ 10 à 30 % des enfants hospitalisés lors d'épidémies de maladie PMB associées à l'EVA71 en Asie ont développé des complications neurologiques telles que des méningites aseptiques, des encéphalites et/ou des paralysies flasques aiguës (Ooi et al., 2007, 2009). L'évolution vers une forme neurologique apparait 2 à 5 jours après le début de la fièvre ou de la maladie PMB/herpangine lorsqu'elle est présente (pour revue, Mirand & Peigue-Lafeuille, 2017).

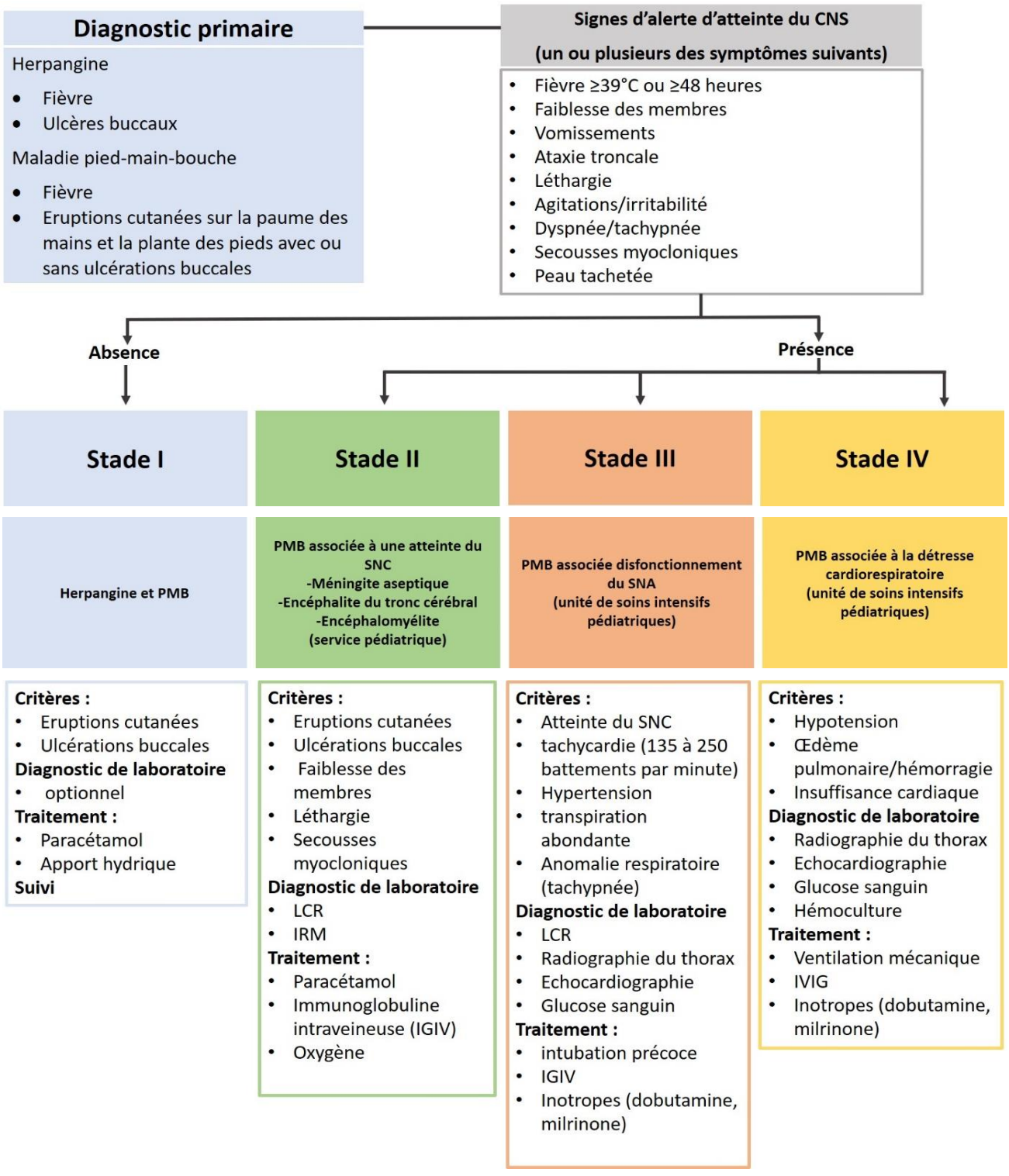


Figure 19 : Algorithme de gestion de la maladie PMB selon L'OMS

En Chine, les données recueillies entre 2008 et 2014 via la notification obligatoire des cas de maladie PMB ont permis d'estimer le taux de survenue des formes sévères à environ 1 % avec un taux de mortalité de 0,03 %, l'EVA71 étant retrouvé dans plus de 90 % des décès. Les enfants de la tranche d'âge 12-23 mois sont les plus touchés (Liu et al., 2015). Comme indiqué dans le Guide de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) pour la prise en charge clinique de la maladie PMB, l'évolution de celle-ci vers une forme neurologique est caractérisée par une progression en quatre étapes cliniques : **(I)** maladie PMB/herpangine ou fièvre, **(II)** atteintes du système nerveux central (SNC), **(III)** dysrégulation du système nerveux autonome (SNA) et **(IV)** détresse cardio-respiratoire. Bien que la détresse cardio-respiratoire soit considérée comme le stade final, le cœur et les poumons peuvent être impliqués à un stade beaucoup plus précoce **(Figure 19)** (OMS, 2011).

Les atteintes neurologiques sont de sévérité variable, allant d'une « simple » méningite à une encéphalomyélite. A Shanghai, une étude prospective entre 2010 et 2012 a montré que 40 % (89/220) des enfants hospitalisés avec une infection à EVA71 avaient présenté des atteintes neurologiques (méningite : 36 %, encéphalite : 66 %, encéphalomyélite : 3,6 % des cas), et dix d'entre eux une détresse cardio-respiratoire (Zhang et al., 2014).

1. Méningite aseptique

La méningite aseptique est une inflammation des méninges et les EV non poliomyélitiques en sont la principale étiologie. La méningite à EV associe un syndrome infectieux caractérisé par l'apparition brutale d'une fièvre et un tableau clinique typique : céphalées, photo/phonophobie, raideur de la nuque, accompagnées de nausées et de vomissements.

Chez les très jeunes enfants, le tableau peut être moins évocateur (hypotonie, irritabilité) et associé à une fontanelle bombée (Abzug et al., 2013). Les méningites à EVA71 ne se distinguent pas cliniquement des méningites dues aux autres EV et en l'absence de progression vers une forme neurologique sévère définie par une atteinte du SNC, l'évolution est spontanément favorable en 3 à 7 jours.

2. Encéphalite du tronc cérébral

L'encéphalite du tronc cérébral ou rhombencéphalite est l'atteinte du SNC la plus fréquemment associée à l'infection à EVA71 et a été rapportée principalement dans les épidémies survenues en Asie depuis la fin des années 90. Plus récemment, l'EVA71 a été associé à une recrudescence d'atteinte du SNC à type de cérébellite ou de rhombencéphalite en 2016 en Europe et en France,

sans épidémie de maladie PMB associée (Antona et al., 2016; Böttcher et al., 2016; Casas-Alba et al., 2017; European Centre for Disease Prevention and Control, 2016).

Une rhombencéphalite est suspectée devant l'apparition des signes cliniques suivants : myoclonies, léthargie, ataxie, tremblements, les myoclonies constituant un indicateur précoce de l'atteinte du tronc cérébral (Ooi et al., 2010; Wang & Liu, 2009). Chez les enfants présentant une maladie PMB, des signes cliniques précoces prédictifs d'une évolution vers une forme sévère ont été identifiés : une fièvre supérieure à 38,5°C depuis au moins 3 jours, léthargie ou agitation/irritabilité inhabituelles, vomissements répétés, manifestations neurologiques comme myoclonies ou une ataxie du tronc doivent faire suspecter une atteinte du SNC (Ooi et al., 2009). A un stade plus évolué, l'atteinte du tronc cérébral se traduit par des signes d'atteinte des paires crâniennes caractérisée par des troubles oculomoteurs (nystagmus, strabisme) ou une paralysie bulbaire (aphasie, dysphagie, paralysie faciale). La rhombencéphalite peut parfois s'accompagner de faiblesses musculaires traduisant l'atteinte de la moelle épinière : on parle alors d'encéphalomyélite.

Lorsque l'atteinte est plus importante, certains enfants peuvent présenter des signes de dysrégulation du SNA caractérisée par des troubles du rythme cardiaque (tachycardie), respiratoire (tachypnée) et vasculaire (hypertension) associés à une hyperglycémie, transpiration abondante et de cyanose (Fu et al., 2004, 2006).

L'apparition d'une détresse cardio-pulmonaire marque le stade terminal et souvent fatal des complications neurologiques associées à l'EVA71 (Ooi et al., 2007). Le mécanisme exact de cette détresse cardio-respiratoire n'est pas encore bien défini, bien qu'il ait été lié à l'encéphalite du tronc cérébral à la suite de plusieurs études cliniques et pathologiques (Lin et al., 2002; Wang et al., 2003). Les patients ont fréquemment une fièvre persistante et une transpiration abondante aux points critiques de l'œdème/hémorragie pulmonaire (Liu et al., 2012; Prager et al., 2003).

L'œdème pulmonaire résulte de lésions du centre vasomoteur dans le tronc cérébral affectant le système sympathique et se traduit par des expectorations mousseuses ou sanglantes (Wang & Liu, 2009). La détresse cardio-respiratoire résulte d'une interaction complexe de divers mécanismes pathogéniques impliquant une augmentation de la perméabilité vasculaire pulmonaire causée par les lésions du tronc cérébral et/ou une « tempête » de cytokines de médiateurs inflammatoires résultant de fortes réponses inflammatoires systémiques (Fujimoto, 2008; Goto et al., 2009).

3. Paralysie flasque aiguë

Plus rare, la paralysie flasque aiguë (PFA) est en règle générale associée à une encéphalite (encéphalo-myélite) avec des lésions dans la substance grise des cornes antérieures de la moelle

comme dans la poliomyélite ou dans les myélites associées aux infections à d'autres EV tel l'EV D68 en 2014 aux Etats-Unis (Messacar et al., 2015) et en Europe (Lang et al., 2014) au cours d'épidémies d'infections respiratoires.

Comme dans la poliomyélite, elle se caractérise par la survenue brutale d'une faiblesse motrice des membres, mais contrairement à celle-ci, le pronostic est meilleur car le taux de récupération est relativement élevé (Ooi et al., 2010). Un syndrome de Guillain-Barré et une myélite transverse ont aussi été rapportés chez des patients présentant une défaillance motrice des extrémités (McMinn et al., 2001).

Les séquelles neurologiques sont fréquentes. Dans une étude sur l'évaluation des fonctions motrices et cognitives de 142 enfants ayant présenté une infection à EVA71 associée à des atteintes neurologiques et/ou cardiopulmonaires (médiane de suivi de 2,9 ans (1 – 7,4 ans)), seuls les patients ayant présenté une méningite simple avaient guéri sans séquelles. Pour les autres, 21 % (11/53) des enfants ayant présenté une encéphalite et/ou une PFA et 75 % (21/28) des enfants ayant présenté une défaillance cardiopulmonaire avaient des séquelles souvent très lourdes, à type de faiblesse/atrophie musculaire d'un membre, paralysie faciale, dysphagie nécessitant une nutrition par voie nasogastrique, hypoventilation centrale, convulsions, retard psychomoteur lié à l'hypoxie et diminution des fonctions cognitives (Chang et al., 2007).

IV. Diagnostic de la maladie pied-main-bouche

A. Diagnostic clinique

Bien connue des pédiatres, le diagnostic de la maladie PMB est généralement clinique. Cependant, tous les signes caractéristiques peuvent ne pas être présents simultanément (ulcérations buccales, éruptions cutanées niveau des mains et des pieds) et certaines formes peuvent être atypiques. Il est donc important de prendre en compte tout le spectre clinique de cette maladie pour penser à une infection à EV devant une forme tardive ou à une infection à EVA71 pour dépister rapidement des signes indiquant une évolution vers une forme neurologique.

Si les signes neurologiques ne sont pas présents lors de la consultation initiale, il est conseillé d'indiquer aux parents les motifs d'hospitalisation : forte fièvre, léthargie, refus de l'alimentation, diminution des mictions, accélération de la respiration, vomissements répétés, somnolence, irritabilité, spasmes (pour revue, Mirand & Peigue-Lafeuille, 2017). La présence de facteurs tardifs ou de sévérité de la maladie PMB (hospitalisation) nécessite le diagnostic virologique.

B. Diagnostic virologique

1. Prélèvements cliniques

En cas d'atteinte cutanéo-muqueuse isolée, les prélèvements de gorge, vésicules cutanées ou buccales et selles (ou écouvillon rectal) sont les échantillons cliniques recommandés (Ooi et al., 2007). Le prélèvements des vésicules, au site de l'infection, sont les plus informatifs car permettent le diagnostic de certitude et reflète l'infection actuelle (Ooi et al., 2007). Pour augmenter la possibilité de détection des entérovirus, il est recommandé de réaliser des écouvillonnages de gorge, d'au moins deux vésicules ou du rectum pour les patients sans vésicules. L'EVA71 et le CVA6 peuvent être excrétés dans les selles pendant plusieurs semaines et les échantillons de selles (écouvillon rectal) peuvent permettre de faire le diagnostic notamment en cas de formes tardives ou neurologiques (Harvala et al., 2018).

Le diagnostic des infections neuro-méningées à EV repose sur la détection du génome viral dans le liquide cérébro-spinal (LCS). Cependant dans les formes neurologiques sévères, les échantillons de selles ou écouvillonnages de gorge sont indispensables. La recherche d'EV dans le LCS est en effet souvent négative en cas d'atteinte du SNC associée à l'EVA71 (comme dans la poliomyélite) (Rémic, 2018).

2. Détection du génome viral et génotypage

Une meilleure connaissance de la structure du génome des EV a permis de développer des techniques moléculaires de détection du génome viral pour le diagnostic des infections à entérovirus. Ces techniques sont basées sur l'amplification par RT-PCR à partir d'amorces ciblant des segments dans la région 5'NC, très conservée parmi tous les entérovirus. La détection du génome viral par RT-PCR en temps réel est la référence.

Plusieurs trousses sont commercialisées, rendant ce diagnostic accessible à tous les laboratoires avec un résultat possible en moins de 48h. Ces méthodes permettent la détection de tous les entérovirus, sans préciser le type (Muir et al., 1998). En cas d'épidémie, des méthodes de RT-PCR en temps réel spécifique de certains types d'EV peuvent également être utilisées (Levêque et al., 2012; Volle et al., 2012).

Des méthodes de RT-PCR multiplex ont aussi été mises au point pour l'identification et la détection spécifique de l'EVA71, CVA6, CVA10 et du CVA16 directement à partir d'échantillons cliniques (Chen et al., 2006).

Le diagnostic de genre peut être complété par la détermination du type d'entérovirus, notamment dans les formes sévères ou dans le cadre d'une surveillance épidémiologique.

L'identification, autrefois basé sur le sérotypage, est aujourd'hui remplacée par le génotypage, qui repose sur l'amplification et le séquençage des régions génomiques codant les protéines de capside. La protéine VP1 est la plus utilisée car elle permet une discrimination de tous les types d'EV (Oberste et al., 1999).

3. Isolement par culture cellulaire

L'isolement des EV sur culture cellulaire n'est plus utilisé en première intention pour le diagnostic virologique. Il est réservé aux laboratoires de référence ou de recherche pour caractériser phénotypiquement les souches en culture ou isoler des souches de PV. Bien que plusieurs lignées cellulaires (humaine ou animale) soient disponibles pour l'isolement des entérovirus, aucune ne permet la détection de tous les entérovirus. Des lignées cellulaires telles que les cellules RD *(rhabdomyosarcome humain),* MRC-5, Vero, HeLa, L20B sont largement utilisées pour l'isolement de l'EVA71, CVA6, du CVA16 et d'autres entérovirus, y compris les poliovirus, en raison de leur sensibilité relativement élevée et de l'effet cytopathique apparent (ECP) induit par l'infection virale. Après l'inoculation, la multiplication virale est mise en évidence par un ECP apparaissant en 2 à 15 jours et se traduisant par un arrondissement des cellules avec un aspect réfringent et suivi d'une lyse cellulaire, observés par microscopie optique.

L'appartenance au genre EV peut être ensuite confirmée par anticorps monoclonal ciblant un antigène spécifique partagé par la plupart des EV et situé dans la protéine structurale VP1 (Trabelsi et al., 1995). L'isolement viral par culture cellulaire est confronté à plusieurs limites : la faible sensibilité pour certains types de prélèvements cliniques (LCR, sérum) et la difficulté d'isoler certains types d'EV *in vitro*.

4. Sérotypage

Dans certains laboratoires de référence ou de recherche, l'identification du type d'EV peut aussi être réalisée par des tests de séroneutralisation de l'ECP d'une souche d'EV isolée en culture cellulaire. Les tests de séroneutralisation sont réalisés par des pools d'antisérums polyclonaux. Les isolats d'EV sont incubés avec chaque pool d'antisérum, puis inoculés sur cellules ; le profil de neutralisation est établi après une incubation de plusieurs jours.

On peut en déduire le sérotype de l'entérovirus, car les pools sont conçus afin que les profils de neutralisation soient distincts pour chaque sérotype individuel. Enfin, le type d'EV suspecté peut être confirmé par neutralisation avec l'antisérum unique spécifique du type.

Le diagnostic sérologique utilise le système des pools de Lim Benyesh-Melnick (LBM) qui consiste en 16 pools (désignés A à P) contenant des antisérums permettant d'identifier 61 types d'EV différents (Lim & Benyesh-Melnick, 1960; Melnick et al., 1973; 1977). L'Institut national de la santé publique et de l'environnement (RIVM) aux Pays-Bas, propose un autre système de pools croisés qui permet également d'identifier 30 sérotypes, dont l'EVA71 (Kapsenberg, 1988). Ces deux systèmes de pools ont été constitués à partir des souches prototypes des différents sérotypes d'entérovirus.

5. Tests sérologiques

La réalisation d'une sérologie n'a aucun intérêt pour le diagnostic d'une infection. Cependant, la notion de sérotype demeure importante compte tenu de la spécificité de l'immunité induite suite à une infection à entérovirus. Les méthodes de séroneutralisation peuvent ainsi être utilisées pour l'élaboration de vaccins, le contrôle de l'immunité post-vaccinale contre le poliovirus et pour les études de séro-épidémiologie (OMS, 2004). Le test de neutralisation spécifique de l'EVA71 est utile pour évaluer les niveaux d'immunité au sein des communautés (Ooi et al., 2002).

V. Traitement et prévention de la maladie PMB

A. Traitement

Actuellement, la prise en charge médicale de la maladie pieds-mains-bouche est symptomatique et s'appuie sur le paracétamol comme antalgique, notamment lorsque les ulcérations buccales sont douloureuses et gênent l'alimentation (OMS, 2011). Dans de nombreux pays touchés par des épidémies d'infections à EVA71, les immunoglobulines (Ig) sériques sont utilisées pour le traitement et la prévention des infection sévères avec une efficacité controversée (Lin et al., 2002; Wang et al., 1999).

En Chine et en Taiwan, une analyse rétrospective des cas d'enfants présentant une encéphalite à EVA71 et traités par Ig sériques montrait une survie améliorée (Chang et al., 2004; Ooi et al., 2009). L'intérêt thérapeutique des Ig sériques est validé par les taux élevés d'anticorps anti-EVA71 contre plusieurs souches différentes d'EVA71 dans les plasmas et les immunoglobulines des sujets taiwanais (Cao et al., 2010; Peigue-Lafeuille et al., 2016). Des études en Asie indiquent que l'administration des Ig sériques, à un stade précoce de l'infection à EVA71, pourrait stopper la progression de la maladie vers les formes sévères de l'infection (Wang et al., 2006, 2008).

Toutefois, l'utilisation des Ig sériques n'a pas encore été étayée par des preuves d'efficacité contre différentes souches d'EVA71 avec des essais cliniques randomisés.

Elle n'est pas sans risque (risque de transmission sanguine de certains agents pathogènes) et reste très coûteuse (Ng et al., 2015).

En cas d'évolution vers une forme neurologique et l'apparition des signes d'atteinte du SNC, l'OMS recommande une intubation précoce, en particulier pour les enfants présentant de fréquentes secousses myocloniques (OMS, 2011). Lorsque le stade de l'insuffisance cardio-pulmonaire est atteint, une ventilation mécanique et l'utilisation d'inotropes (milrinone, dobutamine, dopamine, épinéphrine) aide à maintenir l'activité cardiaque (Wang et al., 2005).

B. Prévention non spécifique de la maladie PMB

Le point essentiel de la prévention et du contrôle est de bloquer la transmission virale et d'éviter les complications et les cas fatals de la maladie PMB. Les lignes directrices de l'OMS sur la maladie PMB résument les mesures de prévention et de lutte aux points suivants (OMS, 2011) :

- Établir et renforcer la surveillance de la maladie PMB ;
- Mener des campagnes d'éducation sur une bonne hygiène personnelle ;
- Fournir une assistance aux organisations de garde d'enfants pendant les épidémies
- Renforcer les mesures de lutte contre l'infection dans les établissements de soins et la communauté ;
- Améliorer l'équipement des médicaments et des soins pour les formes compliquées
- Échanger des informations sur la préparation et la réponse au niveau régional pendant les flambées épidémiques ;
- Établir un cadre administratif favorable à la promotion des mesures de prévention et de lutte, évaluer et surveiller.

Une surveillance épidémiologique et de laboratoire renforcée à l'échelle mondiale de la maladie PMB est utile pour prédire l'apparition éventuelle d'un foyer et ainsi prévenir la gravité et les complications (Aswathyraj et al., 2016). Dans ce cadre, la maladie PMB est une maladie à déclaration obligatoire dans plusieurs pays asiatiques, dont la Chine depuis 2008 (Xing et al., 2014).

C. Vaccins contre la maladie PMB

1. Vaccins contre l'EVA71

Un large éventail d'approches expérimentales ont été étudiées, notamment les vaccins à virus inactivé par le formaldéhyde, les vaccins de type particules analogues (VLP), les vaccins sous-unités à protéines recombinantes (protéine VP1) et le vaccin de type le virus vivant atténué adapté aux cellules Vero et l'immunisation passive par des sérums provenant de personnes infectées (Chen et al., 2008; Klein et Chong, 2015; Li et al., 2015; Tian et al., 2014). Parmi ceux-ci, le vaccin de type virus inactivé par le formol s'est révélé le plus immunogène.

La recherche et le développement du vaccin contre l'EVA71 ont été menés dans plusieurs pays asiatiques. Cinq vaccins inactivés ont été soumis à des essais cliniques. Les résultats de ces essais cliniques ont indiqué que le vaccin inactivé conférait un niveau élevé de protection et d'immunogénicité. L'efficacité de la protection était supérieure à 90 % pour la maladie PMB associée à l'EVA71. Deux vaccins ont reçu l'approbation réglementaire pour une fabrication et une commercialisation à grande échelle en Chine. Les fabricants de vaccins travaillent également à l'élaboration d'un protocole standard pour faciliter la comparaison de l'efficacité et de l'immunogénicité des vaccins candidats (Reed & Cardosa, 2016). Les récents essais cliniques ont montré que les niveaux d'anticorps neutralisants diminuaient après 6 mois. Une injection de rappel 1 an après la vaccination et une troisième dose à 18 mois sont fortement recommandées pour une protection durable. La durabilité des anticorps neutralisants induits et la variabilité génétique de l'EVA71 constituent toujours à l'heure actuelle un défi, la capacité de neutralisation croisée entre les différents sous-génotypes devant encore être évaluée (Lee et al., 2012; Liu et al., 2014).

2. Vaccin bivalent EVA71/CVA16

Le CVA16 est un des EV A majoritairement associé à la maladie PMB. Un large éventail de vaccins a été testé: vaccin de type clone d'ADNc infectieux, vaccin à virus entier inactivé et vaccin à pseudo-particules (Cai et al., 2013; Liu et al., 2011; Liu et al., 2013). Les vaccins anti EVA71 et anti CVA16 produits sous forme de virions inactivés et de VLP ont été comparés pour leur immunogénicité et leur capacité de protection lorsqu'ils sont administrés seuls ou en combinaison.

Les vaccins monovalents et bivalents ont induit le même niveau d'anticorps neutralisants spécifiques à la souche, confirmant qu'il n'y a pas d'interférence entre les immunogènes dans le vaccin bivalent.

Figure 20 : Surveillance de la maladie PMB en France

Tous les vaccins bivalents ont produit des anticorps de neutralisation croisée contre 12 sous-génogroupes d'EVA71 et 6 sous-génogroupes de CVA16. Le transfert passif de sérums immuns a conférée une protection chez les souris nouveau-nées contre une infection mortelle par les deux virus, bien que les vaccins bivalents de type VLP aient été plus puissants que les formulations individuelles (Sun et al., 2014).

3. Vaccin polyvalent contre la maladie PMB : entre rêve et réalité

L'idée d'un vaccin multivalent comprenant l'ensemble des types d'EV associés à la maladie PMB est la tendance actuelle. En examinant les profils épidémiologiques des EV responsables, des travaux pour l'élaboration des préparations vaccinales multivalentes avec une composition virale variable pourraient être entrevus. Au cours de la dernière décennie, la plupart des cas de maladie PMB dans le monde ont été causés par 4 principaux virus : EVA71, CVA6, A10 et A16. Même si les études en cours sur un tel vaccin sont prometteuses, la plupart des études actuelles sont limitées aux modèles animaux (Caine et al., 2015; Klein & Chong, 2015; Mao et al., 2016; Zhang et al., 2018).

VI. Epidémiologie générale de la maladie pieds-mains-bouche

A. Surveillance de la maladie pieds-mains-bouche

1. Les pays de la région Asie-Pacifique

Depuis la fin des années 1990, la région Asie-Pacifique a connu plusieurs grandes épidémies de maladie PMB chez les enfants. Les complications neurologiques et la mortalité associées à ces épidémies ont justifié une surveillance accrue de la maladie PMB et de la circulation de l'EVA71.

Depuis la survenue en Malaisie en 1997 et à Taïwan en 1998 d'épidémies d'ampleur inédite causées par l'EVA71, les autorités sanitaires de nombreux pays asiatiques ont déployé des systèmes sentinelles de surveillance et mis en place une stratégie de prévention de la maladie PMB. En 2003, un réseau de surveillance des infections à EVA71 (APNET : Asia-Pacific Enterovirus Surveillance) est établi entre cliniciens, épidémiologistes et virologues de Singapour, Malaisie et d'Australie.

En 2011, le Bureau régional de la région Pacifique occidentale (WPRO) de l'OMS met en place un système de notification de la maladie PMB. Son efficacité est cependant limitée par l'absence de description précise des tableaux cliniques et de détection systématique du génome

viral et de génotypage associé. Ce système de déclaration de la maladie PMB n'est donc pas optimal pour décrire et comprendre l'épidémiologie des différents types d'EV en circulation dans ces pays.

Pour corriger ces insuffisances, le réseau Asie-Pacifique de surveillance des EV (APNES : Asia-Pacific Network for Enterovirus Surveillance) a été créé en 2017 grâce à la collaboration entre des instituts universitaires et des hôpitaux au Cambodge, en Malaisie, au Vietnam et à Taïwan. Ce réseau a pour objectif de partager les connaissances et l'expertise dans différents domaines – cliniques, épidémiologiques, diagnostiques et en santé publique – pour identifier des solutions communes transnationales pour prévenir et traiter la maladie PMB, en particulier les manifestations sévères et parfois fatales de l'infection à EVA71 (Chiu et al., 2020).

2. Les États-Unis

Deux systèmes de surveillance recueillent des informations sur les cas et les foyers associés aux infections à EV non poliomyélitiques aux États-Unis. Aucun n'est spécifique de la maladie PMB.

Depuis les années 60, le système national de surveillance des EV non poliomyélitiques (NESS) est formé par un réseau de laboratoires déclarant rétrospectivement et volontairement les données virologiques associées aux échantillons positifs à EV et à parechovirus. Les données collectées sont générales : l'État dans lequel a été hospitalisé le patient, le mois et l'année de la collecte des échantillons, la nature de l'échantillon, le type de la souche. Ces données sont notamment utilisées pour estimer l'incidence mensuelle des cas d'infections à entérovirus.

Depuis juillet 2007, la déclaration des infections à EV est aussi effectuée par le Système national de surveillance des virus respiratoires et entériques (NREVSS) via un réseau de laboratoire sur la base du volontariat. Ce système permet de suivre le nombre de recherches d'EV réalisées et la proportion de recherches positives, par type d'échantillon, par lieu et par date de collecte.

Le centre de contrôle des maladies infectieuses (CDC) supervise les données issues de ces deux systèmes de surveillance des infections à EV pour établir et rapporter la dynamique de circulation des souches d'EV et le spectre épidémiologique des cas graves d'infections.

3. L'Europe

Chaque pays européen dispose de son propre système de surveillance des infections à EV et il n'existe pas de centralisation par le Centre Européen de Prévention et de Contrôle des maladies (ECDC). De plus, la plupart des systèmes ne collectent que les données relatives aux atteintes neuro-méningées à EV et aucune donnée n'est disponible pour la maladie PMB.

Une initiative comparable à l'APNES en Asie a émergé en Europe en 2018 : le réseau ENPEN (European non-polio enterovirus network) vise à orienter les activités de surveillance des EV non-poliomyélitiques afin d'harmoniser les méthodes de diagnostic, standardiser et partager des données épidémiologiques afin d'améliorer la détection des épidémies et des EV émergents. Trois protocoles de surveillance, ciblant les atteintes neuro-méningées, respiratoires et cutanéo-muqueuses associées aux infections à EV ont été proposés aux laboratoires de virologie volontaires au sein d'ENPEN.

4. La France

La surveillance des infections à EV est assurée le Réseau de surveillance des EV (RSE). Ce réseau est constitué de 38 laboratoires de virologie qui transmettent de façon volontaire les données cliniques et virologiques des infections à EV diagnostiquées et est coordonné par les deux laboratoires du Centre National de Référence (CNR) des EV et paréchovirus **(Figure 20)**. Les données recueillies par les laboratoires sont collectées pour chaque patient sous la forme de fiches standardisées accessibles grâce à une interface web (figure/fiches). Si la plupart des données portent sur les méningites, principales causes d'hospitalisation associées aux infections à entérovirus, le recueil des données cliniques permet de couvrir le spectre clinique large des infections à EV et de surveiller les infections sévères.

Cependant, il s'agit d'un réseau hospitalier et les enfants présentant une maladie PMB sont rarement vus à l'hôpital, ce qui ne permet pas d'obtenir des informations épidémiologiques et cliniques sur cette maladie.

C'est pourquoi, en 2010, afin de surveiller la circulation de l'EVA71, un réseau de surveillance ambulatoire spécifique de la maladie PMB a été mis en place dans l'agglomération clermontoise. Ce réseau s'est ensuite élargi dans toute la France en 2014 et s'appuie à ce jour, sur une centaine de pédiatres libéraux. Ces pédiatres participent au réseau PARI (Panel Ambulatoire de Recherche en Infectiologie) dont l'objectif est de surveiller plusieurs maladies infectieuses pédiatriques dont la maladie PMB. En plus de la surveillance syndromique, une surveillance virologique de la maladie est réalisée par la détection du génome des EV (+ génotypage) dans des échantillons cliniques transmis au laboratoire associé du CNR (Clermont-

Ferrand). Sont ainsi disponibles les données suivantes : 1) le nombre de cas de maladie PMB et d'herpangine via un logiciel médical dédié (développé et hébergé par CompuGroupMedial avec le soutien de l'association clinique et thérapeutique infantile du val de marne ACTIV) et 2) les données cliniques, démographiques et virologiques associées aux échantillons cliniques transmis. Ce système de surveillance de la maladie PMB, unique en Europe, permet de préciser le spectre clinique de la maladie PMB en France et de suivre la circulation des différents types d'EV associés.

B. Les épidémies d'infections à EVA71 dans le monde

L'EVA71 a été isolé pour la première fois à partir des fèces d'un enfant de 9 mois atteint d'encéphalite en 1969 en Californie (États-Unis) (Schmidt et al., 1974). Il a ensuite été isolé en Australie en 1972 et 1973 (McMinn, 2002). La souche prototype de l'EVA71 a été désignée « BrCr » et s'est distinguée initialement par son aptitude à se multiplier dans les cellules diploïdes de rein humain (HFDK) (Schmidt et al., 1974). Une analyse rétrospective effectuée par un groupe aux Pays-Bas suggère une circulation antérieure de la souche prototype dès 1963 (Van Der Sanden et al., 2009).

1. Premières épidémies d'infections à EVA71, 1972-1990

Au cours des trois années suivantes, l'EVA71 a été isolé chez 23 patients présentant des atteintes neurologiques graves en Californie (Melnick, 1984). Les premières épidémies ont été signalées à New York avec 28 cas entre 1972 et 1977 (Deibel et al., 1975; Melnick, 1984).

Dix-neuf cas étaient associés à des manifestations neuro-méningées, de type méningite aseptique, encéphalite ou paralysie flasque aiguë. L'EVA71 a été isolé pour la première fois en dehors des États-Unis en Australie, lors d'une épidémie de méningite aseptique à Melbourne entre 1972 et 1973 (Kennet, 1974).

Au Japon, en 1973 et 1978, des épidémies associées à la maladie PMB sont rapportées avec respectivement 335 cas de maladie PMB dont 81 (24 %) cas d'atteintes neurologiques et 692 cas de maladie PMB dont 56 (8 %) cas d'atteintes neurologiques (Ishimaru et al., 1980).

En Europe, une épidémie de méningite aseptique dont la majorité des patients présentaient un syndrome PMB associé à l'EVA71 est rapportée en Suède en 1973 (pour revue Blomberg et al., 1974) et ce virus causera deux autres épidémies peu après. La première est rapportée en Bulgarie, entre mai et septembre 1975, au cours de laquelle 705 sont décrits. Sur les 705 patients, 545 (77 %) ont présenté une méningite aseptique, 149 (21 %) une paralysie

flasque et 68 (10 %) des désordres bulbaires ayant entraîné la mort de 44 (6 %) personnes par paralysie. Aucun cas de maladie PMB n'a été rapporté malgré l'ampleur de cette épidémie (Chumakov et al., 1979). La seconde épidémie est rapportée en Hongrie, de mai à septembre 1978, avec 826 cas de méningites aseptiques, 724 cas d'encéphalites et 45 décès et seulement 4 cas de maladie PMB (Nagy et al., 1982 ; Shindarov et al., 1979). L'association de l'EVA71 avec des manifestations neuro-méningées est une caractéristique épidémiologique de la circulation de ce virus en Europe pendant les années 1990 – 2000.

En France en 1979, 5 cas d'infections à EVA71 sont détectés chez des enfants entre 5 et 9 ans présentant une infection respiratoire aigüe parfois associée une atteinte neurologique avec un rétablissement rapide (Sohier, 1979).

Au cours des années 1980, deux épidémies successives d'infections à EVA71 sont rapportées en Chine. En 1985 à Hong Kong, plusieurs cas de paralysie flasque aiguë ont été détectés (Samuda et al., 1987) alors qu'en 1987 dans la province de Hubei, aucun cas de paralysie flasque aiguë ou de méningite aseptique n'a été rapporté (Zheng et al., 1995). Une augmentation du nombre de cas d'infections à EVA71 associée à une hospitalisation est signalée au Pays-Bas en 1986 (Van Der Sanden et al., 2009). Au Brésil entre 1988 à 1990, 426 cas sont décrits avec une association à une atteinte neurologique dans 5 % des cas (Takimoto et al., 1998).

2. Réémergence épidémique de l'EVA71 en Asie Pacifique (1990 – 2000)

Depuis la fin des années 1990, des épidémies récurrentes d'infections à EVA71 surviennent dans la région Asie-Pacifique. Contrairement aux épidémies décrites auparavant, ces épidémies sont 1) dominées par des formes cutanéo-muqueuses (maladie PMB et herpangine) associées plus rarement à des complications neurologiques et 2) caractérisées par la survenue d'une détresse cardio-respiratoire associée à un œdème pulmonaire, décrit pour la première fois à Taïwan en 1998 et associé à un taux de mortalité élevé (Chang et al., 1998; Lum et al., 1998).

Malaisie. En 1997 dans la province du Sarawak, 2628 cas de maladie PMB et d'herpangine sont décrits et 29 décès associés à une encéphalite du tronc cérébral et un œdème pulmonaire sont enregistrés (Chan et al, 2000). Depuis cette épidémie, des épidémies de maladie PMB parfois compliquée ont été rapportées tous les 3 ans en 2000, 2003, 2006 et 2009 (NikNadia et al., 2016; Solomon et al., 2010). La survenue de ces épidémies cycliques récurrentes pourrait être la conséquence d'une circulation endémique de l'EVA71 et à l'immunité vis-à-vis de celui-ci dans la population générale et en particulier les enfants.

Taiwan. La première épidémie massive s'est produite à Taiwan en 1998 (Ho et al., 1999; Hsiung & Wang, 2000; Yan et al., 2000). Au cours de cette épidémie, environ 130000 cas de maladie PMB ont été rapportés, dont 405 cas graves et 78 décès (Ho et al., 1999; Wang et al., 1999). Depuis l'épidémie de 1998, les centres de contrôle des maladies de Taiwan ont mis en place un système national de surveillance des EV et l'EVA71 a été responsable d'épidémies cycliques à l'échelle nationale tous les 3-4 ans. A chaque épidémie, le nombre de cas sévère varie allant jusqu'à plus de 600 cas en 2000-2001 avec un taux de mortalité compris entre 8,5 et 11 % (Lin et al., 2000, Chen et al., 2010; Hsu et al., 2011; Lee et al., 2011, Luo et al., 2015; Wu et al., 2013).

Australie. Une importante flambée de maladie PMB (6000 cas signalés dont 14 cas sévères cliniquement) associée à des infections à EVA71 s'est produite à Perth, Australie occidentale, en 1999 (McMinn et al., 2001 ; Sanders et al., 2006). Au cours de l'été 2000-2001, d'autres cas ont été signalés, principalement à Sydney, avec environ 200 hospitalisations et 14 cas graves (Nolan et al., 2003). Une augmentation de cas de maladie PMB à EVA71 s'est à nouveau produite à Sydney (Australie) en 2013 avec 4 décès parmi 120 cas rapportés d'atteintes neurologiques sévères (Horsley et al., 2014; Teoh et al., 2016; Zander et al., 2014). Au cours de cette épidémie, d'autres types d'EV tels que le CVA2 et le CVA4 ont été également décrits, pour la première fois, comme responsables d'atteintes neurologiques en Australie. La co-circulation de ces EV généralement détectés dans les cas de maladie PMB, pourrait être un facteur majeur de la forte prévalence des complications neurologiques observées durant l'épidémie de 2013 comparé aux épidémies précédentes.

Chine. Peu de foyers d'infections graves à EVA71 ont été décrits en Chine avant les années 2000. Bien que la maladie PMB ait été signalée au cours des années 1980, sa prévalence n'était pas bien connue avant 2007, année où plus de 80000 cas et 17 décès sont rapportés (Lee et al., 2012). Un système national de surveillance renforcée de la maladie PMB a alors été mis en place en mai 2008 et pleinement effectif en juillet 2009 (Xing et al., 2014), ce qui a permis la détection d'épidémies dans différentes régions en 2009 (1155525 cas dont 13810 atteintes neurologiques et 353 décès), 2010, 2011 et 2012.

Selon le Centre de contrôle et de prévention des maladies chinois (CDC chinois), 13,7 millions de cas de maladie PMB ont été signalés entre 2008 et 2015, dont 123261 cas graves et 3322 décès dont 2457 causés principalement par une défaillance cardio-pulmonaire et tous liés une infection à EVA71 (Huang et al., 2018; Yang et al., 2017). Au cours de cette période, les épidémies de maladie PMB présentaient un pic principal d'incidence annuelle pendant la période estivale et une prévalence plus élevée chez les enfants entre 12 et 23 mois (Xing et al., 2014). La détection de l'EVA71 est maintenant rapportée chaque année et montre une inflexion depuis 2017 (2013, 1 855 078 cas de syndrome PMB dont 265 décès ; 2014, 1 688 640 cas et 220

décès ; 2015, 1 898 760 cas et 4 décès ; 2016, 2 141 471 cas et 204 décès ; 2017, 130 280 cas ; 2018, 377 629 cas et 4 décès) (OMS, 2018).

Selon les recommandations du CDC Chine, la confirmation en laboratoire d'un cas probable d'infection à EV repose sur une détection générique du génome des EV suivie par RT-PCR spécifique de l'EVA71 et du CVA16.

Le diagnostic a été potentiellement ciblé dans les formes sévères de la maladie PMB et les autres types d'EV n'étaient pas recherchés, ce qui pourrait favoriser ces taux élevés de détection de l'EVA71 (Xing et al., 2014).

Singapour. Après la première épidémie décrite en 2000, entre 2001 et 2007, le nombre de cas de maladie PMB rapportés à Singapour varie entre 5187 et 20003 cas par an (Chan et al., 2003, Ang et al., 2009). Les rapports de la surveillance des EV montrent qu'en plus de l'EVA71 (30 %) , le CVA16 (40 %) prédominait dans les cas rapportés au sein des jardins d'enfants et des écoles entre 2001 et 2007 (Ang et al., 2009). En 2008, Singapour connait une épidémie de maladie PMB de plus grande ampleur avec environ 29686 cas enregistrés et seulement 4 cas d'encéphalite et un décès (Yan Wu et al., 2010a). Au cours de cette épidémie, une co-circulation de plusieurs entérovirus, tels que le CVA6 (23,5 %), l'EVA71 (21,6 %) et le CVA10 (11,8 %), a été observée. Le CVA4 et CVA16 ne représentaient que 9,8 % des cas.

Japon. Depuis la première épidémie de maladie PMB rapportée en 1973, un foyer de 12 cas de maladie PMB avec atteintes neurologiques avait été signalé au Japon (Komatsu et al., 1999). Entre 1981 et 2007, Iwai et al (2009) a rapporté des foyers sporadiques de maladie PMB associés exclusivement à l'EVA71 et au CVA16, possiblement liée à l'approche diagnostique ciblant ces deux types d'entérovirus (Iwai et al., 2009). Cette étude rapporte au total 203 cas de maladie PMB dont 92 (51,4 % associés à l'EVA71 et 11 cas neurologiques graves dont 10 à EVA71. Les rapports mensuels des instituts de santé publique du Japon ont signalé deux grandes épidémies de maladie PMB.

La première en 2010 avec 151021 cas recensés dont 880 cas associés à l'EVA71 et 61 avec une méningite aseptique (Infectious Agent Surveillance Report. HFMD, 2011). En 2011, la deuxième épidémie est la plus importante signalée au Japon avec 347362 cas rapportés principalement chez des enfants de moins de trois ans et seulement 18 cas d'infection à EVA71. Contrairement aux précédentes épidémies de maladie PMB au Japon, le CVA16, CVA10 et le CVA6 ont prédominé dans cette épidémie avec respectivement 529, 448 et 1187 cas sans atteinte neurologique signalée (Infectious Agent Surveillance Report. HFMD, 2011).

D'autres épidémies de la maladie PMB associées à l'EVA71 suivent en 2013, 2015 et 2017 avec respectivement 1515 cas (dont 43 cas de méningites aseptiques), 1590 cas et 1900

cas (dont 30 cas de méningites aseptiques) (Infectious Agent Surveillance Report HFMD, 2018). Au Japon, au cours de la dernière décennie, les épidémies de maladie PMB surviennent en moyenne tous les trois ans.

La détection d'autres EV au cours de ces dernières épidémies résulte du choix de la méthode de d'identification du type d'EV par l'amplification des séquences partielles de la région VP4-VP2 et/ou des régions VP1 directement à partir des prélèvements cliniques, adopté au Japon depuis 2009. Toutefois, la sélection d'un faible nombre d'échantillons cliniques à analyser en comparaison aux nombres de cas de maladie PMB limite la compréhension de l'épidémiologie de la maladie PMB au Japon.

Corée du sud. La première épidémie de maladie PMB est signalée en Corée du sud en 2000, avec 12 cas confirmés d'infections à EVA71 dont 4 avec des complications neurologiques (Jee et al., 2003). Une étude, basée sur la surveillance nationale des EV dans environ 180 centres de santé du pays, a montré que l'EVA71 était endémique avec de rares cas détectés chaque année. Parmi les cas de maladie PMB enregistrés, l'EVA71 était retrouvé dans 4 % (6/155) contre 37 % (58/155) et 16 % (24/155) pour le CVA16 et le CVA6, respectivement (Hyeon et al., 2013). En ce qui concerne les cas de maladie PMB avec complications neurologiques, l'EVA71 était le type prédominant avec 84 % (247/295) des cas, le CVA16 étant retrouvé ans 5 % des cas (Hyeon et al., 6 é 2013). En 2016, près de 1000 cas de maladie PMB à EVA71 ont été signalés dont 4 cas mortels suite à des complications neurologiques (Baek et al., 2020).

Thaïlande. Depuis 2001, le bureau de l'épidémiologie du ministère thaïlandais de la santé publique a mandaté une surveillance de la maladie PMB en milieu hospitalier. Au cours de la période 2001-2018, un total de 502 329 cas de maladie PMB a été recensé (entre 769 et 79 910 cas par an) (Bureau of Epidemiology Department of Disease Control MoPH, 2019).

Alors que le nombre de décès associés à la maladie PMB a diminué, passant de 7 en 2006 à 2 en 2012, le nombre de cas maladie PMB est passé de 3961 en 2006 à 45 464 en 2012(Bureau of Epidemiology Department of Disease Control MoPH, 2019).

En 2012, une épidémie de maladie PMB a été rapportée et le diagnostic virologique à partir de 826 prélèvements sélectionnés a permis d'identifier 9,2 % (62/672) cas de maladie PMB associés à l'EVA71, qui constituait le deuxième type d'EV le plus répandu (Puenpa et al., 2012). En 2017, une autre flambée de cas de maladie PMB est rapportée à l'échelle nationale avec 59071 cas et le diagnostic virologique n'a été réalisé que sur 482 échantillons cliniques. L'EVA71 apparait comme le type le plus prédominant détecté dans 33,8 % (163/482) des cas (Puenpa et al., 2018).

Bien que réalisé sur un nombre limité de prélèvements cliniques par rapport au nombre de cas enregistrés, le diagnostic réalisé directement à partir des prélèvements cliniques et non après isolement contribue à mieux étudier l'épidémiologie générale de la maladie PMB en Thaïlande. L'analyse des manifestations cliniques rapportées au cours de ces différentes épidémies a révélé que les infections par les CVA2-16 différaient cliniquement des infections à EVA71 (Upala et al., 2018).

Viêt-Nam. En 2005, au cours d'une épidémie à EVA71, plus de 700 cas de maladie PMB sont rapportés, 51 cliniquement sévères et 3 décès (Van Tu et al., 2007). La plus grande épidémie de maladie PMB associée à l'EVA71 s'est déclarée au début de 2011 et s'est achevée fin 2012 : 200000 hospitalisations et 200 décès ont été rapportés (Khanh et al., 2012). Le diagnostic virologique spécifique de l'EVA71 et du CVA16 n'a été réalisé que sur 173 prélèvements d'enfants présentant une atteinte du SNC, confirmant l'infection à EVA71 pour 132 (73 %).

Entre 2013 et 2015 dans le sud du Viêt-Nam, une infection à EV a été diagnostiquée chez 1327/1547 (85,8 %) patients présentant un syndrome PMB. Le sérotypage a permis d'identifier un total de 20 types d'entérovirus. L'EVA71 était le type prédominant et était détecté à une fréquence plus élevée (60 %) chez les patients présentant une forme sévère de la maladie PMB (Hoang et al., 2019). En 2018, une recrudescence des cas de maladie PMB avec plus de 53 000 hospitalisations et 6 décès a été signalée (Nhan et al., 2018).

3. Circulation sporadique en Europe au début des années 2000

Les épidémies d'infections à EVA71 ont été rarement rapportées en Europe pendant les années 1990 et le début des années 2000. De plus, la surveillance portant essentiellement sur les atteintes neuro-méningées, les cas d'infections sont souvent sporadiques et associés à des formes neurologiques et les épidémies de maladie PMB, si elles existent, passent inaperçues.

La caractérisation moléculaire d'une souche d'EVA71 est décrite pour un cas d'atteinte neurologique en Allemagne en 1998 (Kehle et al., 2003). Des cas sporadiques d'infections neuro-méningées associés à l'EVA71 sont signalés à Chypre entre 2000 et 2002 (Richter et al., 2006) et en Norvège de 2001 à 2003 (Witsø et al., 2007). En Norvège, on estime à 48600 le nombre d'enfants infectés principalement de façon asymptomatique ; un seul cas d'encéphalite est rapporté. Entre 2001 et 2004, 16 cas d'infections non compliquées sont décrits en Autriche (Huemer et al., 2008). L'EVA71 (n=6) a été rapporté en Hongrie entre 2000 et 2008 (Kapusinszky et al., 2010). En 2007, 58 cas nécessitant une hospitalisation ont été signalés aux Pays-Bas après une période de faible endémicité de 21 ans (Van Der Sanden et al., 2009).

Au Danemark, 29 cas majoritairement pédiatriques (93 %) ont été rapportés entre 2005 et 2008 avec un foyer de 17 cas en 2007. Le diagnostic le plus fréquent parmi les 24 patients hospitalisés était une méningite ou une encéphalite (15/24, 63 %) (Badran et al., 2011).

En France, les données collectées depuis 2000 et transmises à Santé publique France indiquent une circulation sporadique de l'EVA71 entre 2000 et 2013, avec 0 à 26 cas détectés chaque année (Schuffenecker et al., 2011 ; Données Santé Publique France). En 2013, la mise en place d'un nouveau système de recueil des données et le renforcement des capacités de génotypage réalisé par les deux laboratoires du CNR ont permis d'augmenter l'exhaustivité des données cliniques et virologiques. Une recrudescence des cas d'infections à EVA71 a été observée en 2013 puis 2016, la circulation de l'EVA71 en 2016 ayant été associée à une plus forte proportion de patients présentant des formes neurologiques sévères (Antona et al., 2016 ; Rapport d'activités CNREVPEV, 2016). Les aspects cliniques, virologiques et épidémiologiques seront décrits dans la suite du manuscrit puisqu'une partie de la thèse porte sur l'étude des nouvelles souches qui ont émergé et circulé après 2015.

4. Autres régions

Ailleurs, la circulation de l'EVA71 est rapportée sporadiquement. En Amérique, bien que des épidémies régionales se soient produites, à Denver, aux États-Unis (en 2003 et 2005) avec 16 cas sévères, l'EVA71 n'est pas couramment signalé, représentant moins de 1 % des EV typés qui ont été signalés au système national de surveillance des EV (CDC) des États-Unis depuis 1970 (Abedi et al., 2018). En mai 2018, l'hôpital des enfants du Colorado a signalé une épidémie de maladie PMB associée à des complications neurologiques dues à l'EVA71. Il s'agit de la plus importante épidémie rapportée sur le continent américain avec 43 enfants atteints de méningite (93 % ; 40/43), d'encéphalite (72 % ; 31/43) ou de myélite flasque aiguë (23 % ; 10/43) (ou d'une combinaison de ces symptômes) (Messacar et al., 2020). Au Brésil, des études prospectives ont montré que l'EVA71 était la cause de 6 % des cas de paralysie flasque aiguë (Takimoto et al., 1998).

Des anticorps neutralisants de l'EVA71 ont été détectés dans 12,4 % (55/442) des échantillons de sérum, suggérant une circulation du virus dans la population (Luchs et al., 2010).

En Afrique, l'épidémiologie de l'EVA71 reste largement inexplorée. Deux petites épidémies ont été documentées en 1999 et en 2000 au Kenya, chez des patients infectés par le VIH (Chakraborty et al., 2004). Plusieurs cas de paralysie flasque aiguë ont été associés à une infection à EVA71 au cours de la période 2000-2013 dans toute l'Afrique: en République

démocratique du Congo, Nigeria, République centrafricaine, Cameroun, Niger, Sénégal, en Mauritanie et en Guinée (Bessaud et al., 2014; Fernandez-Garcia et al., 2018).

C. Les épidémies d'infections à CVA6 dans le monde

1. Découverte du CVA6

Plusieurs foyers de poliomyélite ont été rapportés dans l'état de New-York (États-Unis) en 1947. Les souches isolées de selles d'enfants suspectés de poliomyélite ont été inoculées chez des souris. Pour une selle, il a été observé que la paralysie des membres chez les souris était associée à des lésions des muscles squelettiques, à la différence de la paralysie induite par le poliovirus, pour laquelle les lésions se produisent dans la corne antérieure de la moelle épinière (Dalldorf & Sickles, 1949). L'analyse de la souche par des techniques de séroneutralisation a révélé que le virus était différent du poliovirus et a été classé dans un autre groupe de virus appelé coxsackievirus. Le nom dérive de celui de la ville de Coxsackie où les premiers échantillons fécaux ont été collectés.

La découverte du CVA6 est assimilée à celle des autres CV et la souche appelée Gdula constitue le virus prototype du type CVA6.

2. Réémergence épidémique du CVA6 en Europe

Avant 2008, les infections à CVA6 étaient très peu rapportées dans les pays européens.

Finlande. Entre 2000 et 2007, le CVA6 n'avait été détecté qu'à 4 reprises (Blomqvist et al., 2008). En 2008, une épidémie de maladie PMB est détectée au cours de l'automne chez des patients de 2,5 mois à 70 ans. L'incidence dans la population adulte et l'apparition d'onychomadèse sont deux caractéristiques inhabituelles (Österback et al., 2009). Parmi les 117 cas détectés, le type CVA6 est identifié dans 83 cas (70,9 %) désignant pour la première fois ce virus responsable d'une épidémie de maladie PMB dans un pays européen (Blomqvist et al., 2010). L'apparition des formes atypiques de la maladie PMB associées au CVA6 en Finlande constitue un signal d'alerte pour les cliniciens dans toute l'Europe.

France. Suite à la mise en place de la surveillance ambulatoire dans l'agglomération clermontoise, une épidémie maladie PMB associée au CVA6 est observée d'avril à décembre 2010, son ampleur étant jugée habituelle par les pédiatres libéraux. L'âge des patients est compris entre 5 semaines et 14 ans. La principale présentation clinique est l'herpangine (63,8 %), suivie d'une présentation typique de la maladie PMB (48,2 %).

Sur les 134 cas d'infections à entérovirus, le type CVA6 représente 28,4 % des cas (Mirand et al., 2012). En 2014, le réseau de surveillance de la maladie PMB en pédiatrie ambulatoire a permis de détecter une nouvelle épidémie dont l'ampleur est considérée comme plus importante qu'habituellement. Le CVA6 est prédominant et associé dans 57 % des cas à une herpangine et dans 74 % à une maladie PMB, le plus souvent atypique (Mirand et al., 2016).

Espagne. Entre 2008 et 2009, des foyers de maladie PMB avec des manifestations tardives à type d'onychomadèse et associés majoritairement au CVA6 ont été décrits pour la première fois dans diverses régions espagnoles (Bracho et al., 2011; Cabrerizo et al., 2010; J Guimbao, 2010; Redondo-Granado et al., 2009). Une augmentation de cas de maladie PMB associée au CVA6 est rapportée à Irun, d'avril à septembre 2011. Contrairement aux cas rapportés lors de l'épidémie de maladie PMB de 2008 en Finlande, tous les patients de cette épidémie sont des enfants de moins de 4 ans. Le type CVA6 est détecté dans 27 des 30 cas génotypés et le type CVA10 dans deux cas (Montes et al., 2013).

Cabrerizo et al (2014) ont réalisé une investigation des différents types d'EV associés aux cas de maladie PMB en Espagne entre 2010 et 2012 : sur le total des 53 échantillons cliniques positifs à entérovirus, 43 provenaient de patients présentant une maladie PMB et 10 de patients présentant de la fièvre et une éruption cutanée atypique. Le CVA6 a été détecté dans 60 % (32/53) des cas, suivi du CVA16 et d'autres types d'EV de l'espèce A minoritaires ont également été détectés (Cabrerizo et al., 2014).

Royaume-Uni. Entre 2010 et 2014, une analyse rétrospective des données du Centre de virologie spécialisé d'Édimbourg, au Royaume-Uni, a été réalisée sur 55 cas de maladie PMB, incluant 39 cas diagnostiqués après une admission à l'hôpital et 16 cas diagnostiqués en consultation ambulatoire en 2014. Sur les 55 patients, 33 (60 %) présentaient une forme atypique, la moitié des patients ayant eu un diagnostic clinique initial d'eczéma herpétique. Le CVA6 a été identifié dans 29 des 42 échantillons typés, avec une prédominance chez les enfants de moins de 3 ans (Sinclair et al., 2014).

L'augmentation des épidémies à CVA6 et la diversité des formes cliniques associées en Europe depuis 2008 suggèrent un changement du profil épidémiologique et clinique des infections à CVA6.

3. Epidémies et circulation du CVA6 en Asie

Depuis le début des années 2000, le CVA6 est détecté de façon croissante dans la région Asie-Pacifique. Les études réalisées avant 2009 indiquent que le CVA6 circulait déjà avec une fréquence relativement élevée et qu'il était principalement associé à l'herpangine.

A Taïwan, entre 2004 et 2009, sur 4664 enfants atteints de maladie PMB, une infection à CVA6 était retrouvée chez 296 (6,3 %) dont 141 (47,6 %) étaient des patients hospitalisés et 155 (52,4 %) étaient des patients reçus en consultation ambulatoire, majoritairement âgés de moins de 6 ans. La proportion d'infection à CVA6 est passée de 15,4 % (110/712) en 2007 à 22,2 % (153/687) en 2009.

L'herpangine était la présentation clinique la plus fréquente 76,6 % (108/296), suivie de la maladie PMB 12,8 % (18/296) et une atteinte du SNC a été constatée chez trois patients, dont un cas de méningite (0,8 %) et deux cas d'encéphalite (1,6 %) (Lo et al., 2011). Entre 2009 à 2010, une épidémie de maladie PMB associée au type CVA6 est rapportée à Taïwan. Sur les 205 patients inclus, 99 patients ont été identifiés en 2009 dont 82 % (81/99) présentaient une herpangine, tandis que pour les 106 patients identifiés en 2010, 67 % (71/106) présentaient un syndrome PMB dont 31 cas avec des éruptions cutanées atypiques. Ces données cliniques recueillies indiquent un changement du tableau clinique (Chen et al., 2012). Par ailleurs, en 2010, une autre épidémie de maladie PMB associé au CVA6 détecté chez 42,27 % (130/275) des cas enregistrés. Les patients présentant une infection à CVA6 sont hospitalisés plus fréquemment hospitalisés (54 % ; 70/130) que les personnes infectées par d'autres entérovirus, tels les types CVA16 et CVA5. Enfin, l'incidence de l'onychomadèse chez les patients infectés par le type CVA6 est nettement plus élevée (37 %) (Wei et al., 2011).

À Singapour, le CVA6 était le deuxième type le plus fréquemment associé à la maladie PMB en 2001, 2002, 2006 et 2007 (Ang et al., 2009). Une épidémie de grande ampleur avec 29 686 cas de maladie PMB est rapportée à Singapour en 2009, cependant, uniquement 51 échantillons cliniques obtenus auprès de 43 patients sont analysés. Le CVA6 a été détecté dans 23,5 % (12/51) des prélèvements cliniques (Wu et al., 2010). L'analyse épidémiologique de la maladie PMB associée au CVA6 n'est portée que sur un petit nombre de prélèvement cliniques par rapport au nombre de cas rapportés au cours de cette épidémie, en soulignant que la méthode de sélection des prélèvements à analyser a été très peu détaillée dans cette étude.

En 2012, le type CVA6 est le principal EV associé à une épidémie de maladie PMB rapportée en Thaïlande. Sur 825 cas, 672 (81 %) ont présenté une maladie PMB et 153 (19 %) cas présentaient une herpangine. Les types CVA6, EVA71 et CVA16 étaient respectivement à 33 % (221/672), 9,2 % (62/672) et 9,2 % (62/672) de cas de maladie PMB. Sur les 153 cas d'herpangine, 13,7 % (21/153) étaient infectés par le CVA6 et 1,3 % (2/153) par le CVA16 (Puenpa et al., 2012). Une étude sur le spectre des agents pathogènes de la maladie PMB et de l'herpangine en Thaïlande de 2008 à 2013 a été réalisée afin d'étudier la cause de cette épidémie de maladie PMB. Les résultats de cette étude indiquent que de 2008 à 2011, les épidémies de la maladie PMB et l'herpangine ont été sporadiques en Thaïlande. Au cours de cette période le

CVA6 n'a été détecté que dans 7,6 % (9/118) des cas de maladie PMB enregistrés, alors qu'un an plus tard, en 2012, le CVA6 est devenu l'agent pathogène prépondérant avec 28,4 % des cas de maladie PMB, suivi du CVA16 (6,9 %). Aucune différence dans les symptômes cliniques n'a été constatée entre la maladie PMB associée au CVA6 et la maladie PMB associée à l'EVA71 ou au CVA16 (Linsuwanon et al., 2014).

Au Japon, les principales causes de maladie PMB étaient le CVA16 et l'EVA71. Le CVA6 était la cause principale de l'herpangine en 2007, mais une augmentation du taux de détection du CVA6 chez les patients atteints de maladie PMB a été signalée au Japon en 2009. En 2010, le CVA6 était systématiquement associé à l'herpangine mais occasionnellement détecté chez les patients atteints de maladie PMB, tout comme les CVA2, 4, 5 et 10. En juin 2011, une augmentation soudaine des cas de maladie PMB a été signalée au système national de surveillance épidémiologique des maladies infectieuses au Japon. Par rapport aux chiffres basés sur 30 ans de surveillance, le nombre de cas de maladie PMB par site sentinelle a atteint son maximum en 2011 avec plus de 30 000 cas. Le type CVA6 a été responsable de 74 cas parmi 108 patients sélectionnés atteints de maladie PMB (Fujimoto et al., 2012).

En Chine, trois phases peuvent être distinguées dans la chronologie de l'émergence du CVA6. De 1999 à 2012, le virus est tout d'abord rapporté sporadiquement dans des épidémies de maladie PMB. Par exemple, entre 2009 et 2011, 1748 cas de maladie PMB sont rapportés au cours d'épidémies dans les provinces de Shandong, Guangdong et Chongqing : 3 % (52/1748) associés au type CVA6, 26 % (454/1748) au type CVA16 et 54 % (943/1748) au type EVA71 (Lu et al., 2012). De même, à Shanghai entre mai 2010 et avril 2011, sur 290 échantillons cliniques analysés, 277 (95,5 %) ont été testés positifs pour l'entérovirus. La proportion de cas de maladie PMB associés au CVA6 était de 8,3 % (24/290), contre 63,8 % (185/290) à l'EVA71 et 9,0 % (26/290) au CVA10 (Xu et al., 2013). Ensuite, à partir de 2008, le type CVA6 est progressivement rapporté de façon plus fréquente dans les épidémies de maladie PMB. À Shenzhen, entre 2008 et 2012, la prévalence du type CVA6 est croissante, passant de 0,5 % (2/407) des cas en 2008 à 27 % (96/350) des cas en 2012 (He et al., 2013).

À Guangzhou, entre 2010 et 2012, un total de 5 482 cas de maladie PMB ont été identifiés, dont 4111 (75 %) se sont révélés positifs à un EV et la proportion d'infections à CVA6 a augmenté chaque année, passant de 9,04 % (106/1173) en 2010 à 17,58 % (212/1206) en 2011 et 23,21 % (402/1732) en 2012 (Di et al., 2014). Enfin, une troisième phase à partir de 2013, au cours de laquelle le type CVA6 remplace les types EVA71 et CVA16 et devient le principal EV responsable du syndrome PMB dans de nombreuses provinces et villes chinoises. A Shenzhen en 2013, une épidémie de maladie PMB est signalée et 274 écouvillons de gorge collectés dont 201 échantillons étaient positifs au diagnostic entérovirus.

La proportion des infections au CVA6 était de 48 % (96/201), suivie par l'EVA71 18,9 % (38/201) et le CVA10 (16 %) (33/201) (Li et al., 2014). La même année, dans la province de Guangdong, 60,3 % des 800 patients atteints de maladie PMB, sont infectés par le type CVA6, 14,8 % par le type EVA71 et 11 % par le CVA16 (Lu et al., 2014). Ces données soulignent la transition rapide qui s'est opérée dans la fréquence des types d'EV associés à la maladie PMB en Chine depuis 2008.

L'épidémiologie et la distribution des agents pathogènes associés à des cas de maladie PMB à Beijing entre 2013 et 2015 ont été investiguées, les échantillons de gorge des 270 cas de maladie PMB ont été collectés et analysés et 59,3 % (160/270) des cas se sont révélés positifs pour l'entérovirus. La proportion de cas positifs pour les types CVA6, EVA71, CVA16 et autres EV était respectivement de 25,6 % (41/160), 31,9 % (51/160), 11,3 % (18/160) et 31,3 % (50/160).

4. Epidémies et circulation du CVA6 en Amérique

La maladie PMB ne fait pas l'objet d'une surveillance spécifique en Amérique du Nord. Plusieurs foyers de syndrome PMB associés au CVA6 ont été signalés en Alabama, dans le Connecticut, en Californie et au Nevada (États-Unis) de novembre 2011 à février 2012 (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2012). Les manifestations cliniques principalement rapportées, à partir de 63 cas, étaient une fièvre et l'extension de l'éruption cutanée au niveau des membres, du visage, du tronc ou des parties exposées des pieds et des mains. Les adultes représentaient 24 % (15/63) cas de maladie PMB rapportés et la maladie PMB n'étant pas une maladie à déclaration obligatoire aux États-Unis, les cas ont été identifiés comme inhabituels par les personnels de santé qui ont contacté le CDC. Des échantillons cliniques ont été prélevés sur les patients dans 34 des 63 cas.

Le CVA6 (CVA6) a été détecté chez 74 % (25/34) des échantillons cliniques analysés. (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2012).

Pendant l'hiver 2012, une autre épidémie associée au CVA6 a été rapportée à Boston, chez des nourrissons âgés de 4 mois à 3 ans (Flett et al., 2012).

A Cuba, 35 cas de maladie PMB ont été décrits entre 2011 et 2013 : l'âge des patients était compris entre 9 mois et 8 ans ; un seul cas adulte a été rapporté. Le type CVA6 a été détecté dans 9 échantillons cliniques, le type EVA71 dans 2 échantillons (Fonseca et al., 2014).

D. Prévalence et incidence de la maladie pieds-mains-bouche

1. Facteurs démographiques

Plusieurs facteurs démographiques influencent les présentations cliniques des infections à entérovirus.

a) Age

Les infections à EV sont classiquement plus fréquemment décrites chez l'enfant que chez l'adulte et la maladie PMB est définie comme une maladie infantile. Les enfants sont donc les plus touchés au cours des épidémies.

Les études épidémiologiques réalisées en Chine indiquent que plus de 82 % des cas de maladie PMB associée à une infection à EV se produisent avant l'âge de 6 ans, les enfants de 1 an représentent 19 % des cas et ceux de 2 ans, 18 % (Koh et al., 2016). L'incidence de la maladie PMB en Chine entre 2008 et 2012, chez les 12–23 mois, était 60 à 200 fois plus élevée que chez les plus de 15 ans (He et al., 2013). En Chine, la faible incidence de la maladie à l'âge adulte est liée à un taux de séroprévalence plus élevé, de l'ordre de 74,6 % % (Koh et al., 2016). Les travaux sont peu nombreux en Europe puisque la maladie PMB ne fait pas l'objet d'une surveillance spécifique. Une étude réalisée aux Pays-Bas décrit une incidence de 26 pour 100.000 nouveau-nés (Verboon-Maciolek et al., 2002). En Norvège, 40 % des enfants de moins de 12 mois et 90 % des enfants de moins de 2 ans ont été infectés par un EV (Witsø et al., 2006).

En France, la surveillance ambulatoire de la maladie PMB en pédiatrie d'avril 2014 à mars 2015 montre que l'âge moyen des enfants infectés par un EV est de 2,1 ans (intervalle : 1 mois – 10,5 ans). Le taux le plus élevé d'infections a été observé chez les enfants de 1 à 2 ans (pour revue Mirand et Peigue-Lafeuille, 2017; Mirand et al., 2016).

Concernant les infections sévères associées à des complications neurologiques, ce sont également les enfants les plus touchés, et en particulier les plus jeunes. Dans une étude qui a tenté d'analyser les différents facteurs associés aux complications sévères de la maladie PMB, sur 5504 cas sévères associés à l'EVA71, les patients âgés de 3 à 36 mois représentaient 87,0 % (46/54) des cas mortels, entre 2009 et 2012 en Chine (Yang et al., 2018). Entre 2008 et 2014, les décès ont été les plus fréquents dans la catégorie d'âges 1–2 ans (Liu et al., 2015). Si les présentations atypiques de la maladie PMB sont fréquentes chez les enfants, elles sont généralement décrites comme plus sévères chez les adultes (Ben-Chetrit et al., 2014; Blomqvist et al., 2010; Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2012; Lott et al., 2013).

b) Sexe

Avec un ratio compris entre 1,2 et 2,5, la maladie PMB affecte plus les garçons que les filles (Koh et al., 2016; Mirand et al., 2016). Cette caractéristique est générale pour les infections à entérovirus, quel que soit le syndrome associé (Rapport d'activités CNREVPEV, 2014).

L'apparente prédominance des infections à EV chez les patients de sexe masculin peut avoir des explications à la fois sociologiques et biologiques. Les mesures de l'infection en population (par exemple la sérosurveillance) qui sont neutres sur le plan du genre, n'ont pas toujours montré une différence de taux d'infection. D'autres explications ont été proposées sur la base d'études chez les enfants en bonne santé. La durée d'excrétion du virus pourrait être plus longue chez les hommes que chez les femmes, ce qui augmenterait le nombre de résultats positifs lors du diagnostic virologique. Une autre hypothèse propose que les infections sont plus fréquentes chez les garçons à cause d'une plus grande exposition résultant des habitudes de jeu des plus jeunes et d'une plus grande activité chez les garçons plus âgés, elles-mêmes issues de différences de traitement parental (Pallansch & Oberste, 2013).

c) Transmission interindividuelle

Les EV se multiplient dans l'oropharynx et l'intestin puis sont excrétés dans les selles pendant deux à quatre semaines et parfois jusqu'à 12 semaines après l'infection. La transmission est donc fécale-orale par contamination directe de personne à personne ou par un environnement souillé, mais la présence des virus dans la gorge, dans la bouche et les vésicules rend possible une transmission aérienne, par la salive ou par contacts rapprochés.

Les EV de l'espèce A, tels que CVA2 à A8, A10 et A14 et l'EVA71 qui provoquent principalement un exanthème vésiculaire peuvent se propager par contact direct ou indirect avec le fluide vésiculaire. Le risque de transmission, maximal au cours de la première semaine de la maladie, persiste plusieurs semaines. Une personne infectée, même asymptomatique, est contagieuse. Une transmission active a été observée dans les collectivités d'enfants (crèches, écoles) et au domicile familial (Koh et al., 2016).

Une étude prospective à Taïwan dans 60 foyers a estimé le taux de transmission familiale à 52 % avec un pic de 84 % pour les enfants de moins de 6 ans (Chang et al., 2004). Elle a également montré qu'au sein d'un foyer, le taux d'infections symptomatiques était de 68 %. Les facteurs de risque pour la transmission d'une infection à EVA71 étaient les suivants : (1) le fait d'avoir un frère ou une sœur plus âgé(e) avec une sérologie EVA71 positive, (2) l'âge entre 6 mois et 3 ans, (3) le nombre d'enfants dans la famille, et (4) l'historique de contact avec un cas de maladie PMB ou d'herpangine (Chang et al., 2004).

Les données collectées au cours de la surveillance de la maladie PMB en France en 2014–2015 ont montré que 33 % des enfants infectés avaient été exposés à des malades versus 19,7 % pour les enfants non infectés ($p < 0,05$) (Mirand et al., 2016).

2. Facteurs socio-économiques

Les facteurs qui affectent la transmission comprennent le niveau d'hygiène, la qualité de l'eau et la densité de population (Ooi et al., 2002). Une étude taiwanaise évoque aussi comme causes possibles les écarts socio-économiques et éducatifs entre les zones urbaines et rurales. Les usages en matière d'hygiène des parents et des personnes attachées au soin des enfants auraient un impact sur l'incidence et/ou la gravité de l'infection. Par exemple, une étude montre que le nettoyage du robinet après le lavage des mains était de 67 % chez les personnes attachées au soin des enfants dans le groupe critique – encéphalite avec ou sans défaillance cardiopulmonaire, contre 76 % chez les soignants des enfants présentant une forme classique de la maladie PMB, associée à l'infection par l'EVA71 (Huang et al., 2017). Une étude a montré le lien entre la densité de la population et l'incidence de la maladie PMB avec un modèle de régression linéaire ($R^2 = 0,677$) et arrive à la conclusion que les zones urbaines présentent un risque plus élevé de maladie PMB que les zones rurales en raison de la densité de population plus élevée qui facilite la propagation du virus (Cao et al., 2012). Cheng et al (2014) ont constaté que le nombre de cas de syndrome PMB en milieu urbain était beaucoup plus élevé qu'en milieu rural, avec le taux d'incidence de la maladie PMB en milieu urbain 3,6 fois plus élevé (Cheng et al., 2014).

En Chine, dans une étude basée sur l'analyse stratifiée des données de population, le taux d'incidence et le taux de gravité des cas de maladie PMB étaient environ deux fois plus élevés chez les enfants migrants que chez les enfants locaux, suggérant que les jeunes enfants migrants jouaient un rôle central dans la transmission de la maladie PMB dans la communauté (Xu et al., 2014).

3. Facteurs liés à l'environnement

Les EV ont un schéma de circulation saisonnier qui varie selon la zone géographique : ils sont détectés toute l'année mais un pic épidémique majeur est observé en été. Les déterminants saisonniers exacts de leur dynamique de transmission restent mal connus.

De nombreuse études ont montré que la température moyenne, la pluviosité et l'humidité sont des facteurs environnementaux qui interviennent dans la dynamique de propagation de la maladie PMB et des EV (Lee et al., 2015; Liu et al., 2015).

La relation entre les données météorologiques et l'incidence de l'infection à EVA71 a été bien étudiée (Chang et al., 2012 ; Xing et al., 2014). L'incidence de cette infection à Taïwan reflète une saisonnalité estivale significative d'avril à juin (Chang et al., 2012), l'incidence augmentant lorsque la température devient supérieure à 13 ˚C et diminuant lorsqu'elle est au-dessus de 26 ˚C. Cette étude indique également qu'une humidité élevée accroît le taux d'infections à EVA71. Des résultats similaires ont été décrits en Chine où deux pics d'incidence de la maladie PMB sont rapportés, l'un en juin et l'autre pendant l'hiver en novembre ou décembre (Gui et al., 2015).

Dans les pays au climat tempéré comme en Europe, les infections à EV suivent un schéma saisonnier. L'incidence est la plus élevée en été et présente un rebond en automne, et plus rarement des foyers peuvent survenir en hiver (Pallansch et Oberste, 2013). La circulation des EV montre un schéma saisonnier marqué du printemps à l'automne dans l'hémisphère nord, alors que ce schéma n'est pas observé dans les zones tropicales où la répartition saisonnière est homogène (Pallansch et Oberste, 2013). En France, le pic majeur d'incidence de la maladie PMB est rapporté entre mai et juillet et culmine généralement en juin et le pic secondaire entre septembre et décembre (Mirand et al., 2016). Le schéma saisonnier de la maladie PMB en Espagne indique des résultats similaires (European Centre for Disease Prevention and Control, 2016).

Le profil de la saisonnalité des cas d'infections à EV aux États-Unis, décrit à partir des données de surveillance nationale recueillies pendant trois décennies (1983-2013), montre que l'infection à CVA6 présente une incidence élevée en avril, précédant celui des autres EV A (Pons-Salort et al., 2018). Bien que l'ampleur des épidémies de maladie PMB associées au CVA6 varie entre différents pays, la distribution temporelle des cas suit le schéma habituel.

VII. Evolution et épidémiologie moléculaire de l'EVA71 et du CVA6

A. Mécanismes d'évolution des entérovirus

En tant que virus à ARN, les EV sont caractérisés par une grande variabilité génétique reposant sur deux mécanismes évolutifs : la mutation et la recombinaison génétique.

Comme pour de nombreux virus, les mutations et la recombinaison génétique sont des participants actifs aux événements évolutifs intra-hôte et inter-hôte subis par les entérovirus.

Ces deux facteurs majeurs de l'évolution des EV peuvent modifier le tropisme, la gamme d'hôtes et la virulence des EV et entraîner la persistance des virus au niveau de la population (Domingo et al., 2008).

1. Mutations ponctuelles

a) Mécanisme

Comme tous les virus à ARN, les EV possèdent leur propre ARN polymérase ARN-dépendante (protéine $3D^{pol}$) qui n'est pas associée à une activité correctrice exonucléasique de 3' à 5', retrouvée chez les polymérases cellulaires. Au cours des cycles de réplication du génome viral, la 3D polymérase infère des substitutions de bases nucléotidiques qui engendrent des mutations ponctuelles dans les génomes viraux en cours de synthèse. Le taux moyen d'évolution par celle-ci est de l'ordre de 10^{-3} à 10^{-4} substitution par site nucléotidique (Domingo et al., 2012). Les EV ont un génome qui mesure 7500 bases nucléotidiques et possèdent un des taux de mutations les plus élevé, en raison de la survenue d'une mutation aléatoire à chaque génome répliqué (Jenkins et al., 2002). La fidélité de la 3D polymérase des EV est influencée par le type de substitution nucléotidique, le taux de transversions et de transitions se situant entre $3,2 \times 10^{-5}$ et $4,3 \times 10^{-7}$ et $1,2 \times 10^{-4}$ et $1,0 \times 10^{-6}$ substitutions par site, respectivement (Freistadt et al., 2007). Le taux de mutation est si élevé que la présence d'un agent mutagène ne l'augmente que très peu (~ 2,5 fois) sous peine d'altérer la capacité réplicative du virus (Holland et al., 1990).

b) Conséquences à l'échelle du génome

La comparaison des séquences génomiques des EV révèle que la région P1 codant pour les protéines de capside présente un polymorphisme plus élevé que les autres régions du génome viral. Le polymorphisme plus marqué sur la région P1 s'explique par l'exposition des boucles protéiques à la surface de la capside virale qui leur confère un plus grand potentiel d'adaptation et entraîne une diversité de déterminants antigéniques des entérovirus, tout en maintenant les structures tridimensionnelles fonctionnelles dans le génome viral et la capside virale, et la conservation de sites actifs des enzymes virales (Domingo et al., 2008).

La sélection naturelle contrôle les conséquences de l'accumulation des mutations en induisant la multiplicité des sérotypes d'une part et la multiplicité des variants à l'intérieur d'un même sérotype d'autre part. Ainsi, les EV existent sous forme de populations complexes de variants génétiques (Domingo et al., 2012).

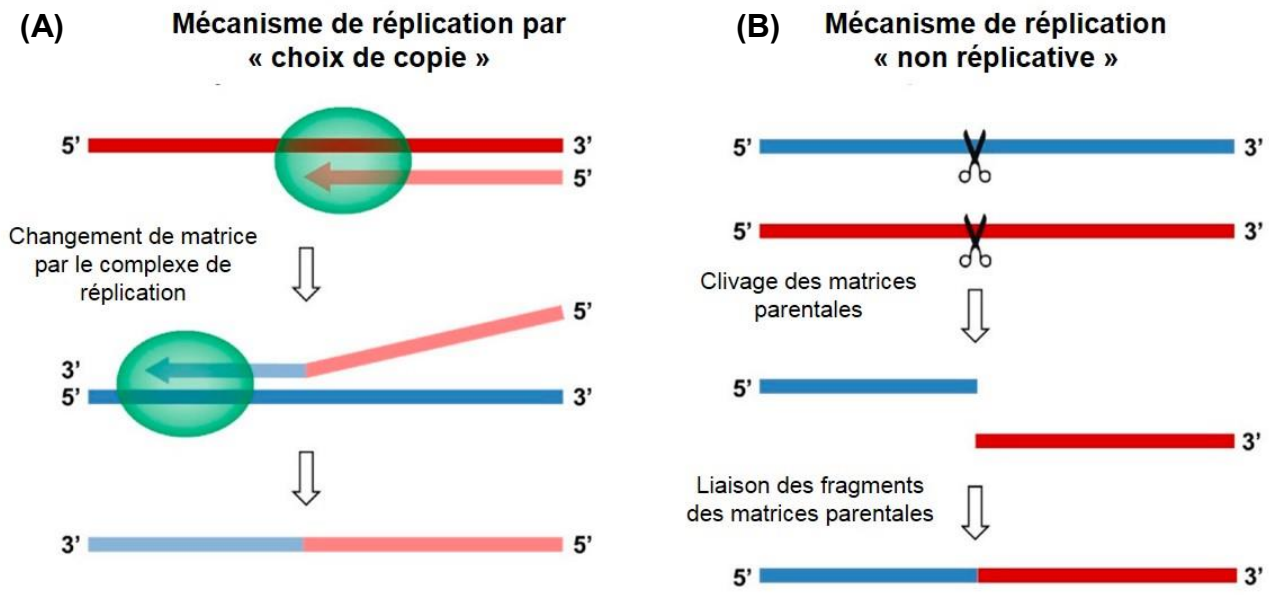


Figure 21 : Mécanismes de recombinaison génétique des EV

(A) Le mécanisme réplicatif par « choix de copie ». Le complexe de réplication s'arrête pendant la synthèse du brin complémentaire du donneur d'ARN (en rouge) et se dissocie du modèle du donneur d'ARN. Ensuite, le brin d'ARN naissant incomplet interagit avec l'ARN accepteur (en bleu) où le complexe de réplication est transféré et la synthèse du brin complémentaire reprend.

(B) Le mécanisme non réplicatif. Les brins d'ARN parentaux sont dégradés, ensuite les deux fragments générés sont liés par covalence. **(D'après Muslin et al., 2019)**.

2. Recombinaison génétique

Deux virus ne peuvent échanger du matériel génétique qu'en cas de co-infection de la même cellule hôte. Deux modèles de recombinaison ont été proposés pour les entérovirus, l'un réplicatif (modèle de choix de copie) où la réplication de l'ARN est nécessaire et l'autre non réplicatif qui se produit en l'absence de réplication. Il est très probable que les deux mécanismes soient valables ; toutefois, il n'est pas possible de conclure lequel d'entre eux est prédominant.

a) Mécanismes

(1) Recombinaison homologue ou « choix de copie »

La première preuve expérimentale soutenant le mécanisme de recombinaison homologue a été fournie en 1986 par Kirkegaard et Baltimore, qui ont démontré que la synthèse d'ARN était nécessaire pour la recombinaison du poliovirus (Kirkegaard & Baltimore, 1986). Le modèle proposé postule que l'ARN polymérase $3D^{pol}$ amorce la synthèse du brin de polarité négative à partir de l'extrémité 3' d'une première molécule d'ARN de polarité positive.

Le complexe intracellulaire de réplication se dissocie et est transféré sur une nouvelle matrice ARN et continue la réplication du brin (-), ce qui produit une molécule génomique hybride qui contient des informations génétiques provenant des deux matrices parentales (Galli & Bukh, 2014; Kirkegaard & Baltimore, 1986; Pilipenko et al., 1995) **(Figure 21A)**.

Le décrochage du complexe de réplication pourrait être causé par la présence de structures secondaires dans la matrice initiale (White & Morris, 1995; Romanova et al., 1986). La liaison du complexe de réplication à un autre génome à proximité est liée à la similitude nucléotidique entre les deux matrices parentales (Tolskaya et al., 1987), l'une des conditions requises pour la recombinaison virale étant la présence de régions homologues entre les deux souches parentales (Kirkegaard & Baltimore, 1986).

(2) Recombinaison non homologue « non réplicative »

Le modèle non réplicatif a également été proposé comme autre mécanisme de recombinaison dans les virus à ARN (Chetverin, 1999; Gmyl et al., 1999). Selon ce modèle, les ARN viraux sont clivés et leurs extrémités exposées sont réunies, indépendamment de la présence d'une activité enzymatique. L'existence de ce mécanisme de recombinaison n'impliquant pas la polymérase virale a été démontrée sans ambiguïté *in vivo* pour le poliovirus en utilisant des paires de fragments d'ARN génomiques complémentaires défectueux (Gmyl & Agol, 2005; Gmyl et al., 1999, 2003).

Le transcrit contenant la partie fonctionnelle 5' du génome viral est appelé partenaire 5', celui qui fournit la partie fonctionnelle 3' est le partenaire 3'. La co-transfection de cellules avec ces deux fragments d'ARN génomique complémentaires du poliovirus qui ne peuvent pas être traduits ou se répliquer a conduit à la production de génomes infectieux qui sont recombinants. Ces résultats suggèrent que la recombinaison de l'ARN pourrait se produire en l'absence d'une RdRp fonctionnelle. Cette hypothèse a été confirmée de manière encore plus rigoureuse avec une autre configuration de paires, dans laquelle les deux fragments d'ARN correspondaient au génome PV avec une rupture dans la région codant pour RdRp (Gmyl et al., 2003).

Comme chaque fragment ne contenait qu'une partie du gène RdRp viral, cette enzyme ne pouvait pas être impliquée dans les premières étapes de la génération de la molécule recombinante. Dans le cas où les partenaires ARN se complètent précisément, une simple ligature par liaison phosphodiester, permettrait de restaurer l'intégrité du génome du poliovirus, que lorsque le partenaire 5' contenait un groupement 3'-phosphate et que le partenaire 3' abritait et un groupement 5'- hydroxyl (Chetverin, 1999) **(Figure 21B)**. La jonction s'effectue préférentiellement au niveau d'une région simple brin et peu structurée du génome viral ; la proportion de chaque matrice parentale influence l'efficacité de la recombinaison non homologue (Austermann-Busch & Becher, 2012).

b) Avantages et contraintes

Les séquences génomiques complètes des souches prototypes de différents types d'EV de l'espèce B ont été comparées par une analyse de similitude nucléotidique qui a révélé des évènements de recombinaison intra-typiques et inter-typiques fréquents sur les régions non-structurales P2-P3 (Oberste, Maher, & Pallansch, 2004; Santti et al., 1999). Bien que le rôle de la recombinaison génétique dans l'évolution des EV nécessite d'être précisé, le mécanisme de recombinaison génétique favoriserait une adaptabilité maximale en supprimant les mutations délétères qui ont été accumulées au cours du temps et en produisant un génome fonctionnel (Lukashev, 2005). De nouveaux EV variants issus de la recombinaison génétique apparaissent très fréquemment (Domingo, 2006; Leitch et al., 2009).

Par conséquent, la recombinaison a été communément considérée comme un mécanisme qui contribue à la diversité des entérovirus. Les EV existent donc sous la forme d'un ensemble de gènes de capside, de gènes de protéines non structurelles et de la région 5'NC qui évoluent indépendamment et se recombinent fréquemment pour générer de nouveaux virus variants qui seront soumis à la pression de la sélection naturelle (Brown et al., 2003; Lukashev, 2005; Pallansch, et al., 2004).

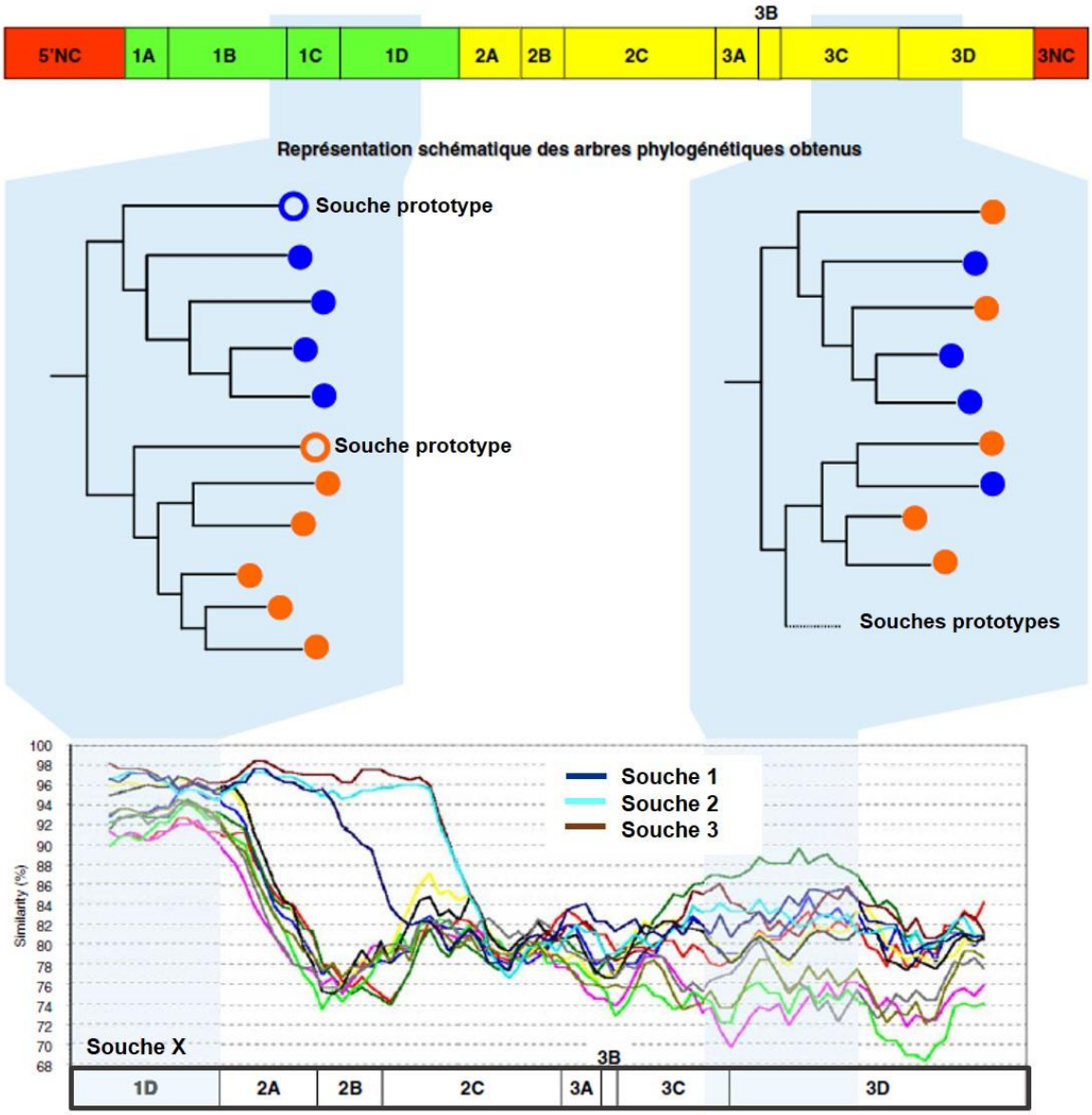


Figure 22 : Mise en évidence de la recombinaison génétique

Les souches d'EV d'origine recombinante sont détectées par des discordances entre les relations phylogénétiques établies avec des séquences géniques distantes 1D et 3D d'un échantillon de souches d'EV de deux sérotypes différents, par exemple. La recombinaison génétique est confirmée par la comparaison de la séquence génomique de la souche X (séquence d'intérêt) et des séquences des souches proches génétiquement. On obtient un graphe présentant les pourcentages de similitude nucléotidique (ordonnées) calculés entre chaque couple de séquences sur le long du génome analysé (abscisses). Les diminutions brutales du pourcentage de la similitude nucléotidique sont observées majoritairement dans les séquences géniques 2A, 2B et 2C et se traduisent par des discordances entre les relations phylogénétiques établie avec le segment 3CD, ce qui révèle un événement de recombinaison génétique. **(D'après Bailly et al., 2008)**.

Les virus de la même espèce subissent régulièrement ce brassage génétique entre eux et le degré de la diversité au sein d'une même correspond à la compatibilité biologique de fragments de génome.

c) Mise en évidence de la recombinaison génétique

L'analyse phylogénétique comparative du gène 1D (codant la protéine de capside VP1) te le gène 3D (codant la polymérase virale) permet de mettre en évidence des discordances entre les relations de parenté génétique qui résultent des évènements recombinaison génétique (Peigue-Lafeuille et al., 2014). Toutefois il existe plusieurs méthodes permettant de confirmer ces discordances en les distinguant des discordances liées aux mutations ponctuelles.

L'analyse comparative des similitudes nucléotidiques est la plus utilisée et consiste à calculer le pourcentage de similitude entre deux séquences génomiques complètes à analyser. Les résultats de cette méthode sont traduits par la construction d'un graphe qui indique le pourcentage de similitudes nucléotidiques tout le long du génome, une variation brutale du pourcentage de similitude nucléotidique signalant un site de recombinaison. Un seuil de similarité nucléotidique inférieur à 90 %, entre la séquence d'intérêt et la séquence à analyser, indique une origine recombinante. Cette méthode fournit une évaluation qualitative de la localisation des points de recombinaison génétique. La procédure de calcul de similitudes nucléotidiques est implémentée dans le logiciel Simplot **(Figure 22)**.

Une approche phylogénétique désignée « bootscanning » permet de confirmer l'analyse comparative de similitude en générant un arbre phylogénétique pour chaque fenêtre d'analyse à partir de l'alignement de séquences à analyser. Les évènements de la recombinaison génétique sont détectés par une différence de topologie des arbres d'une fenêtre d'analyse à une autre. Les points de recombinaison génétique identifiés peuvent être localisés plus précisément par des outils bio-informatiques plus complets comme le logiciel RDP4. Le logiciel RDP4 contient les algorithmes de 7 programmes (RDP, GENECONV, Bootscan, MaxChi, Chimera, Siscan et 3SEQ) qui peuvent être combinés pour une évaluation statistique de la localisation des sites de recombinaison génétique (Martin et al., 2015).

Toutes ces méthodes permettent de mettre en évidence la recombinaison génétique entre différentes séquences génomiques. Cependant, aucun outil à ce jour ne permet de préciser les séquences donatrices ou receveuses parmi les séquences apparentées.

B. Caractérisation moléculaire des entérovirus

1. Identification des types d'EV et étude de la diversité intratypique

L'identification des sérotypes peut faire appel à la séroneutralisation (Melnick, 1996), aux techniques de RFLP utilisée par exemple pour différencier les trois types de poliovirus ou identifier de façon itérative la même souche au cours d'une épidémie, ou à l'analyse des séquences génomiques (Santti et al., 1999). Seul le génotypage identifie les souches de façon précise et permet de retracer leur parenté génétique.

Le génotypage repose sur l'amplification suivie du séquençage d'une séquence génique d'intérêt. Traditionnellement, le génotypage est basé sur la méthode Sanger comme technique de séquençage. Toutefois, l'avènement des nouvelles méthodes de séquençage pourrait faire progresser l'étude de la diversité génétique des entérovirus.

L'analyse des séquences génomiques obtenues, pour le génotypage des entérovirus, se fait alors par la comparaison de la séquence obtenue avec les séquences disponibles dans les banques génomiques. Le processus d'identification du génotype d'un EV fait intervenir également des outils bio-informatiques, notamment la méthode BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) qui permet de réaliser un alignement et la comparaison de séquences 2 par 2 et le programme ClustalW qui permet de constituer un alignement multiple des séquences. Généralement, ces deux méthodes d'alignement sont complétées par une analyse phylogénétique.

L'identification moléculaire des EV repose sur la relation entre le degré de similitude nucléotidique de la séquence génique utilisée pour distinguer les différents types d'EV et le degré de la différence génétique au sein d'un type d'entérovirus. La région présentant le degré de variation intratypique et intertypique le plus élevé est celle qui code les protéines de capside des EV (Bailly et al., 1999; Oberste et al., 2004; Pöyry et al., 1996). Chez les entérovirus, la séquence génique 1D codant pour la protéine VP1 est la région qui possède les principaux caractères antigéniques (Minor, 1990). Ces caractères antigéniques constituent les bases moléculaires de l'identification des EV désignés « sérotype/génotype ».

a) Séquence génique 1D (protéine virale VP1)

La démonstration de l'existence d'une corrélation entre les regroupements phylogénétiques déterminés avec la séquence 1D et le sérotype des souches dans ces regroupements a été amorcée par la constitution d'une banque de séquences complètes 1D de toutes les souches prototypes par M Pallansch (Oberste et al., 1999).

Les premiers travaux de l'équipe du CDC ont porté sur l'étude de variants et des isolats cliniques typés par séroneutralisation. Ces travaux montrent que l'identification des EV en utilisant la partie 3' de la séquence génique 1D concordent avec les résultats du sérotypage (Oberste et al., 2000). La partie 5' de la séquence génique 1D contient la boucle BC qui joue un rôle important dans la structure antigénique de la capside des entérovirus. Cette partie a donc également été proposée par d'autres méthodes d'identification.

De nombreuses études ont été réalisées sur des séquences partielles de VP1 et montrent que l'identification des EV à partir de n'importe quelle partie de VP1 présente des résultats similaires à l'identification par séroneutralisation. Les résultats obtenus à partir de l'analyse de similitude nucléotidique sont validés par l'analyse phylogénétique en montrant que les souches appartenant à un même type d'EV partagent une parenté génétique entre elles et avec la souche prototype homologue (Nix et al., 2006; Caro et al., 2001; Iturriza-Gómara et al., 2006; Norder et al., 2001; Thoelen et al., 2003). En utilisant les séquences complètes du gène 1D des souches prototypes, le seuil de différenciation d'un sérotype a été établi à 25 % de différences nucléotidiques, soit 12 % de différences en acides aminés (Oberste & Pallansch, 1999).

La méthode comparative avec une souche prototype ancienne est nécessaire pour l'identification d'un entérovirus, en considérant la méthode d'analyse des similitudes nucléotidiques et l'analyse phylogénétique (Palacios et al., 2002). En plus de l'identification proprement dite du type d'entérovirus, la séquence complète du gène 1D permet une différenciation précise de tous les rangs taxonomiques utilisés dans le cadre de l'épidémiologie moléculaire (espèce, sérotype, génotype, variant) (Bailly et al., 2008).

b) Séquence génique 1B (protéine virale VP2)

Initialement, la séquence génique 1B (protéine VP2) a été la région choisie pour le typage moléculaire des EV non poliomyélitiques en ciblant une région de 160 nucléotides (Arola et al., 1996). Casas et al. (Casas et al., 2001) ont utilisé une approche couplant le diagnostic générique par la région 5'NC et le typage par la séquence génique 1B.

Les résultats de l'identification du type d'EV en utilisant la région 5' de la protéine VP2, à partir de 8 souches d'EV et 18 prélèvements cliniques, n'ont pas été corrélés avec le sérotype pour 30 % (8/26) des échantillons testés. L'intérêt de la séquence génique 1B a aussi été étudié en comparant des séquences de la partie 5' de la protéine VP2 des variants antigéniques de 6 différents types d'EV (Echovirus 4, 6, 11, 30, CVA20 et CVA24) aux séquences homologues des souches prototypes.

L'analyse de similitude révèle que ces variants antigéniques présentent de 0,7 à 25,3 % de différences nucléotidiques (acides aminés de 0 à 8 %) avec les souches prototypes et l'analyse phylogénétique n'indique pas une parenté génétique directe (Oberste et al., 1998). Les variations observées dans cette partie de la protéine VP2 ne permettent pas de déterminer spécifiquement le type d'entérovirus, ce qui limite son intérêt pour étudier l'évolution des entérovirus. Deux études proposent pourtant une nouvelle technique de typage utilisant la partie centrale de VP2 pour identifier les souches d'entérovirus.

La première étude a étudié 116 isolats viraux et comparé les résultats par comparaison de similitude et par analyse phylogénétique de cette partie centrale de la protéine VP2 par rapport à la séquence VP1 et à la séroneutralisation: une bonne corrélation était observée (Nasri et al., 2007). La partie centrale de VP2 a fait l'objet d'une deuxième étude portée sur l'identification des EV directement à partir de prélèvements cliniques (bouche, gorge, selle, prélèvements sanguins, respiratoires et cutanés) et pour 58 % (204/352) des échantillons, le génotype a pu être attribué corroborant les résultats de l'analyse de similitude réalisée (Ibrahim et al., 2014). Cette méthode de génotypage pourrait être utilisée en l'associant avec une comparaison de similitude et une analyse phylogénétique.

c) Séquence génique 1A (protéine virale VP4)

Localisée entre la région 5'NC et la protéine VP2, la séquence génique 1A est amplifiée sans difficulté et peut donc servir à une utilisation générique. Ishiko et al (2002) ont utilisé la séquence génique 1A (protéine VP4) pour l'identification de 66 souches prototypes et de 89 isolats cliniques représentant 26 sérotypes différents (Ishiko et al., 2002). L'analyse comparative des séquences nucléotidiques VP4 obtenues et celles des souches prototypes présentaient entre 75,8 % et 99,5 % de similitudes nucléotidiques et étaient apparentées génétiquement par analyse phylogénétiques (Ishiko et al., 2002).

Cela indique que l'utilisation de la séquence génique 1A (protéine VP4) est moins discriminante pour le génotypage des EV car elle cible une région peu variable codant pour une protéine absente de la surface de la capside virale et donc ne portant pas de déterminant antigénique.

2. Identification moléculaire à partir des régions non codantes des entérovirus

Les phylogénies construites à partir des régions P1 et P2-P3 du génome des EV des espèces A et B ont montré une recombinaison intra et inter-espèces fréquentes (Oberste et al., 2004).

Les différences généralement observées entre les relations phylogénétiques établies entre deux locus distants du génome des EV suggèrent une évolution indépendante de la région structurale P1 et les régions non structurales P2-P3.

Cette notion d'évolution propose que chaque espèce taxonomique d'EV utilise un ensemble de gènes structuraux (capside) correspondant aux différents types d'EV et peuvent donc recombiner avec un autre ensemble de gènes non structuraux (Lukashev et al., 2003; Oberste et al., 2004). Le brassage des séquences génomiques des EV peut conduire à l'émergence d'un nouveau virus variant et l'analyse du génome complet permet de détecter les évènements de recombinaison.

Compte tenu de la forte variabilité issue du processus de recombinaison génétique entre différents types d'entérovirus, le séquençage du génome complet est le moyen le plus approprié pour étudier la diversité des entérovirus. De nombreuses études ont porté sur l'étude de la diversité génétique de l'EVA71 et du CVA6 à l'échelle du génome complet, nous aborderons certaines d'entre elles dans la partie discussion.

Les méthodes de séquençage ont connu un progrès remarquable depuis le séquençage Sanger en 1977 (Sanger et al., 1977). En 2005, des technologies de séquençage de deuxième génération notamment technologie 454 (Roche) ; technologie Solexa (Illumina) et SoliD (Applied Biosystems) ont été développées et ont conduit à une ère de séquençage haut débit. Les technologies de séquençage de troisième génération qui permettent le séquençage d'une molécule unique sont représentées par la technologie Minion (Nanopore) et SMRT (Pacific Bioscience) qui est très utilisée dans les travaux de recherches biologiques et médicales (Nakano et al., 2017).

3. Méthodes d'analyse de l'épidémiologie moléculaire des EV

a) Phylogénie moléculaire des entérovirus : multiplicité des lignées phylogénétiques

La phylogénie moléculaire consiste à identifier des caractères homologues présents entre plusieurs taxons. Un arbre phylogénétique modélise la répartition des caractères entre différents taxons. Chaque caractère (type de nucléotide ou d'acide aminé) est classé à partir d'une matrice quantitative. Les données numériques de la matrice sont utilisées pour la schématisation graphique de l'arbre phylogénétique.

Les séquences des taxons à analyser sont représentées par les feuilles de l'arbre et les nœuds qui sont connectés par des branches qui indiquent la persistance d'une lignée phylogénétique au cours du temps.

L'analyse phylogénétique débute par une étape cruciale qui est l'alignement des séquences. A partir des bases de données publiques ou locales des séquences génomiques, l'alignement de ces séquences permet de rechercher au maximum une similarité entre nucléotides ou acides aminés dans les différentes séquences génomiques comparées.

Trois méthodes permettent de construire les arbres : l'analyse des distances (Fitch & Margoliash, 1967), l'analyse de la parcimonie (Fitch, 1971), l'analyse du maximum de vraisemblance (Felsenstein, 1981).

La méthode d'analyse des distances (Neighbor-joining, NJ) (Saitou et Nei, 1987) est la plus couramment utilisée car elle convient à une comparaison des séquences en les regroupant par le taux de similitude nucléotidique élevé et partagé entre les différentes séquences analysées. L'algorithme du NJ utilise une matrice des distances pour générer un arbre phylogénétique. Le degré de fiabilité de chaque embranchement est estimé par une méthode statistique de rééchantillonnage aléatoire, non paramétrique désignée « bootstrap ». Les positions des sites de l'alignement sont sélectionnées aléatoirement pour construire un nouvel alignement. Cette opération est répétée au maximum 1000 fois et permet d'inférer un arbre phylogénétique consensus dont les nœuds de chaque branche porte le pourcentage de regroupement des séquences. En pratique, le nœud est considéré comme fiable à un pourcentage supérieur à 70 %. Cette procédure d'analyse comparative phylogénétique est implémentée dans le logiciel MEGA (Tamura et al., 2011).

Appliquée à la phylogénie moléculaire des entérovirus, la méthode des distances permet de déterminer les différents niveaux taxonomiques des EV (type, génogroupe et sous-génogroupe). En réalisant une analyse comparative phylogénétique des séquences géniques 1D des entérovirus, des valeurs seuils de différences nucléotidiques et protéiques ont été définis à partir de matrices de proportion de distances nucléotidiques (P-distance) et matrice de proportion de différences protéiques. Entre 25 % et 50 % de différences nucléotidiques et 13 % et 50 % de différences protéiques deux souches de l'espèce A appartiennent à deux types différents (Hassel 2015.

La méthode du maximum de parcimonie est basée sur un principe statistique non paramétrique qui favorise la sélection d'un minimum de mutations pour passer d'une séquence à une autre.

La méthode du maximum de vraisemblance est basée sur un principe statistique qui suppose que les changements évolutifs dans les séquences génomiques analysées suivent des méthodes probabilistes dont le modèle d'évolution a été prédéfini avant l'analyse des caractères.

Cette méthode permet de construire un arbre dont la probabilité maximale pour qu'un ensemble de données représente les résultats de l'évolution de cet arbre phylogénétique.

Tous les nucléotides possibles sont testés à chaque position et pour chaque nœud en définissant la probabilité maximale pour que la séquence obtenue présente une longueur de branche donnée. Les étapes du processus de cette méthode sont les suivantes :

- **Choix du modèle d'évolution :** le modèle d'évolution le plus utilisé et le plus complet est le modèle GTR (General Time Reversible).
- **Tests statistiques :** LRT (Likelihood Ratio Test) et AIC (Critère d'information d'Akaike) sont des tests statistiques qui permettent de comparer les modèles d'évolution afin de sélectionner le modèle d'évolution le mieux adapté aux données à analyser.
- **Construction d'un arbre phylogénétique initial :** un arbre phylogénétique initial est généré par un algorithme (BioNJ) qui intègre progressivement les taxons à chaque étape de l'analyse, à partir du modèle d'évolution sélectionné.
- **Réarrangement de l'arbre phylogénétique initial :** Les méthodes de NNI (Nearest Neighbor Interchange) et SPR (Sub-tree Prunning and Regrafting) effectuent un réarrangement de l'arbre phylogénétique initial afin de générer plusieurs arbres phylogénétiques avec des topologies différentes.
- **Comparaison des différents paramètres de la topologie de l'arbre inféré :** Les paramètres de la topologie des arbres obtenus sont comparés aux paramètres du modèle d'évolution moléculaire qui maximisent la vraisemblance des données.
- **Résultats de l'analyse :** l'arbre phylogénétique retenu est celui qui présente une topologie optimale dont la valeur de vraisemblance est élevée et se rapprochant des données de proposées par le modèle d'évolution sélectionné (Felsenstein, 1973).

- Le processus d'inférence phylogénétique par la méthode du maximum de vraisemblance est implémenté dans le logiciel phyML (Guindon & Gascuel, 2003).
-

b) Inférence bayésienne appliquée à la phylogénie

(1) Phylogéographie : Répartition et circulation des souches d'entérovirus

La phylogéographie est une approche qui décrit la distribution géographique de diverses lignées génétiques, au sein d'une même espèce ou entre espèces proches parentes. La phylogéographie recherche donc où et quand l'ancêtre commun de deux populations a vécu, et vise à déterminer les processus d'évolution qui ont pu conduire aux populations actuelles, en multipliant

les taxons analysés sur les différentes zones géographiques ciblées. Lorsque des virus évoluent en même temps que les facteurs environnementaux qui déterminent leur diversité, leurs dynamiques spatiale, temporelle et démographique peuvent être décrites par analyse phylogénique.

Les études de diffusion spatiale nécessitent un ensemble de données notamment les séquences génomiques, les dates d'échantillonnage et les localisations géographiques de la détection des souches à analyser.

Pour les entérovirus, il est intéressant d'établir une relation entre la phylogénie et la localisation géographique afin de mieux cerner les principes clés de leur diffusion géographique et de comprendre l'épidémiologie des entérovirus. La phylogéographie est établie par des méthodes phylogénétiques qui combinent la méthode de maximum de vraisemblance, une inférence bayésienne couplée à une chaine MCMC et des informations temporelles et spatiales des souches d'EV analysées.

Ces méthodes phylogénétiques permettent d'estimer l'évolution, la datation, la dynamique épidémique et la localisation géographique des différents nœuds de la phylogénie virales. Cependant, ces méthodes phylogénétiques rencontrent des limites comme la difficulté de faire des inférences dans des zones géographiques non ou peu échantillonnées. Aussi, un déséquilibre dans le jeu de données avec plus de séquences génomiques d'une même région pourrait amplifier le rôle de cette région dans l'histoire de l'épidémie. Une approche plus récente qui tente de limiter de tels biais est implémentée dans le logiciel BEAST2 (Bouckaert et al., 2014; De Maio et al., 2015).

(2) Datation moléculaire

Le séquençage des micro-organismes a permis de mettre en évidence une accumulation des changements génétiques au cours du temps. Cette observation est liée au concept clé d'horloge moléculaire développé par Emile Zuckerkandl et Linus Pauling en 1965 (Douzery et al., 2006). En considérant que le taux d'accumulation de mutations dans un génome suit une évolution uniforme et constante, l'horloge moléculaire permet d'estimer le taux d'évolution entre deux génomes à partir de la date à laquelle ils ont divergé (âge de leur ancêtre commun le plus récent). À partir d'un gène donné, un arbre phylogénétique est inféré, et les longueurs de branches sont déduites à partir des changements observés dans les séquences. La constance de l'horloge moléculaire n'est pas toujours confirmée chez les micro-organismes, en particulier les EV qui sont des virus à ARN évoluant rapidement avec des taux de substitution pouvant atteindre plus de 10^{-3} substitutions par position dans le génome. Les méthodes d'horloge moléculaire ont été assouplies par des hypothèses qui considèrent l'héritabilité du taux d'évolution. Ces hypothèses utilisent une distribution mathématique pour modéliser les variations du taux d'évolution entre deux taxons (Thorne et al., 1998). Appliquées

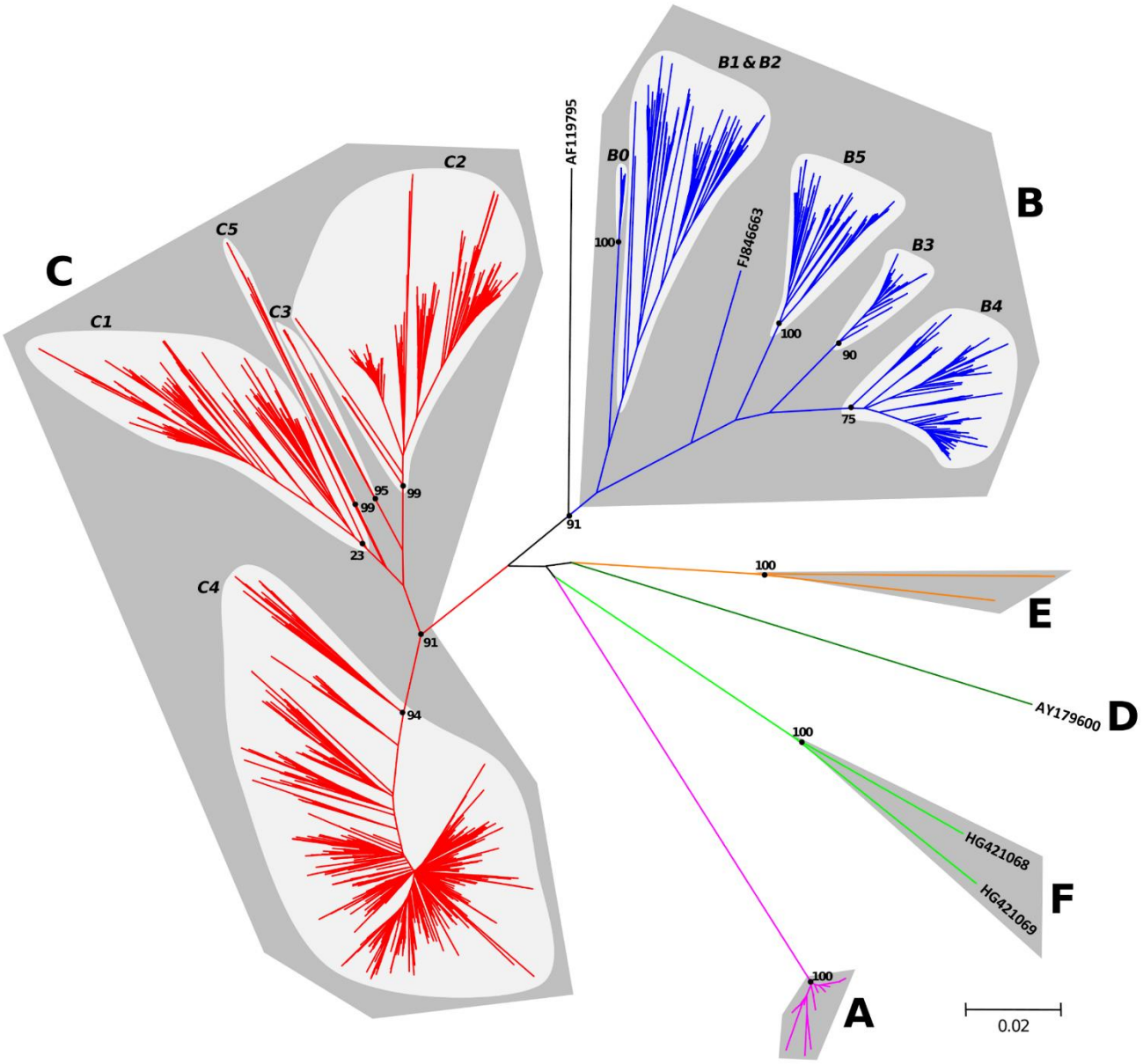


Figure 23: Relations phylogénétiques entre les séquences VP1 complètes d'EV-A71 déduites à l'aide de la méthode de Neighbor-Joining

Les distances évolutives ont été calculées à l'aide de la méthode Kimura à 2 paramètres. La longueur des branches est proportionnelle au nombre de divergence nt. Le pourcentage de réplications bootstrap est indiqué pour les nœuds principaux. **(D'après Bessaud et al., 2014).**

à la phylogénie moléculaire et également implémentées dans le logiciel BEAST2, ces méthodes d'horloge moléculaire assouplies ont intégré une inférence bayésienne associée à une chaîne MCMC.

La datation moléculaire des EV consiste ainsi à transposer un arbre phylogénétique décrivant les relations de parenté génétique entre différentes souches d'entérovirus, reconstruit à partir de séquences génomiques, et les dates de détection de ces souches afin d'estimer des âges absolus de divergence entre elles (Drummond et al., 2003; 2006).

C. Diversité génétique et épidémiologie moléculaire de l'EVA71

La première analyse phylogénétique de l'EVA71 basée sur les séquences géniques 1D (protéine VP1) a identifié trois génogroupes distincts désignés par A, B et C, présentant plus de 15 % de différences nucléotidiques **(Figure 23)** (Brown et al., 1999).

Le génogroupe A comprend la souche prototype EVA71 BrCr, isolée en Californie en 1969. Cependant, des isolats de virus présentant un lien génétique relatif avec la souche BrCr ont été collectés en Chine dans les années 2000 et 2010 (Yu et al., 2010; Zhu et al., 2013). Les génogroupes B et C, regroupant la majorité des souches circulantes, ont été regroupés en sous-classes phylogénétiques désignées « sous-génogroupe » B0-B5 et C1-C5, sur la base des relations phylogénétiques des séquences nucléotidiques qui présentent entre 10 et 14 % de divergences nucléotidiques (McMinn, 2012; Solomon et al., 2010). Les génogroupes D et G ont été récemment signalés en Inde (Saxena et al., 2015). Le génogroupe E a été isolé exclusivement en Afrique (République centrafricaine, Cameroun et Sénégal) (Bessaud et al., 2012; Fernandez-Garcia et al., 2016; Sadeuh-Mba et al., 2013), et le génogroupe F n'a été signalé qu'à Madagascar (Bessaud et al., 2014). Les génogroupes D, E, F et G de l'EVA71 ont été identifiés dans les selles de patients atteints de paralysie flasque aiguë et chez des individus sains, mais n'ont été signalés dans aucune épidémie spécifique.

La co-circulation de multiples sous-génogroupes a été observée à l'échelle mondiale **(Figure 24)**, en Malaisie, aux États-Unis, à Taïwan, au Japon, en Bulgarie et en Hongrie (Alexander et al., 1994; Chumakov et al., 1979; Nagy et al., 1982). Les premiers sous-génogroupes (B1 et B2) qui ont provoqué des épidémies majeures de maladie PMB dans les années 1970 et 1980 semblent avoir été remplacés par de nouveaux sous-groupes (B3, B4 et B5) qui sont depuis devenus prédominants et circulent de manière endémique dans la région Asie-Pacifique (Brown et al., 1999). L'épidémiologie moléculaire de l'EVA71a révélé que les sous-génogroupes B1 à B5, C1, C2 et C4 présentent une distribution mondiale, alors que les lignées C3 et C5 sont limitées à la Corée et au Vietnam, respectivement. En revanche, le sous-groupe C1, qui a été décrit pour la première fois en Australie

	Years					
Region/Countries	**1960-1969**	**1970-1979**	**1980-1989**	**1990-1999**	**2000-2009**	**2010-2016**
Asia-Pacific region						
Singapore	-	-	-	B3, B4	B4, B5, C1	-
Malaysia	-	-	-	B3, B4	B4, B5, C1,	-
Australia	-	-	-	B3, C2	C1	-
Japan	-	-	-	B3, B4, C2	B4, B5, C2, C4a	C2
Korea	-	-	-	B4, C2	C2, C3, C4a, C4b	C4a
Taiwan	-	-	-	B4, C2	B4, B5, C4, C5	B5, C4
China	-	-	-	-	C4	C4, C4a
Cambodia	-	-	-	--	-	C4
Vietnam	-	-	-	-	-	C4, B5
Other countries						
France	-	-	-	-	C1, C2, C4	B5,C1, C2
UK	-	-	-	C1	C1, C2	-
Germany	-	-	-	-	C1, C2	-
Austria	-	-	-	-	C1, C4	-
Norway	-	-	-	-	C1	-
Netherlands	B0	B1	B2	C1	C1, C2	-
Hungary	-	B1	-	-	C1, C4	-
Bulgaria	-	B1	-	-	-	-
USA	A	B1	B2	C1, C2	C2	-
Canada	-	-	-	-	-	-
Peru	-	-	-	-	C1	-

Figure 24 : Répartition géographique et temporelle des génotypes et sous-génotypes de l'EV-A71 lors des épidémies de 1960 à 2016 (D'après Lin al., 2018).

et aux États-Unis au milieu des années 1980 (Alexander et al., 1994; Sanders et al., 2006), a été identifié de façon continue dans divers pays depuis sa détection initiale.

Plus tard dans les années 1990, la diversité du génogroupe C s'est considérablement accrue en raison de l'émergence d'un certain nombre de nouveaux sous-groupes dans la région Asie-Pacifique, notamment les sous-génogroupes C2, C4 et C5 qui ont été associés à des cas mortels de la maladie PMB à Taïwan (1998) (Ho, 1999), en Chine (2008) et au Vietnam (2005) (Tu et al., 2007), respectivement.

En 1998, le sous-génogroupe C4 est apparu pour la première fois dans la région du Pacifique occidental et a provoqué une importante épidémie en Chine en 2008 (Tan et al., 2011; Zhang et al., 2010). Le sous-génogroupe C4 s'est ensuite étendu au reste de la région et a provoqué des épidémies majeures dans plusieurs pays. Certaines de ces épidémies ont été associées à de graves complications neurologiques et à des cas de mortalité, comme en Australie (2013) (Zander et al., 2014), au Cambodge (2012) (Duong et al., 2016), au Laos (2011) (Nguyen et al., 2014), en Mongolie (2010) (Tian et al., 2013), en Corée du Sud (2009-2012) (Kim et al., 2016).

Au Viêt-Nam, le sous-génogroupe C4 a été impliqué dans une épidémie nationale à grande échelle entre 2011 et 2012 (Khanh et al., 2012). Le sous-génogroupe B5, détecté en 2012 est devenu majoritaire en 2013 (Hoang et al., 2019). L'épidémie nationale au Viêt-Nam en 2018 était liée à la réémergence du sous génogroupe C4 après une absence de circulation pendant 6 ans (Nhan et al., 2018).

En Europe, une seule flambée d'EVA71 avec 58 cas graves d'hospitalisation a été signalée aux Pays-Bas en 2007 avec une prédominance du sous-génogroupe C2 (Van Der Sanden et al., 2009). En Allemagne, de 2006 à 2015, les taux de détection accrus d'EVA71 ont été enregistrés et C2 était le sous-génogroupe prédominant. En 2014, un foyer d'infection à EVA71 de sous-génogroupe C2, a été détecté dans une école maternelle en Italie (Medici et al., 2016).

En France, l'analyse de 51 souches d'EVA71 collectées entre 1994 à 2009 a montré le remplacement du sous-génogroupe C1, prédominant entre 1994 et 2005, par le sous-génogroupe C2, prédominante depuis 2007 (Schuffenecker et al., 2011). Ce switch avait également été observé aux Pays-Bas (Van Der Sanden et al., 2009). Les autres sous-génogroupes n'ont été que très rarement signalés en Europe : les souches de génogroupe C4 ont été identifiées en France, en Allemagne, en Autriche et au Danemark en 2004 et 2012, respectivement (Midgley et al., 2018 ; Mirand et al., 2010 ; Schuffenecker et al., 2014 ; Rabenau et al., 2010), et le sous-génogroupe B5 a été signalé au Danemark en 2007 (Badran et al., 2011) et en 2013 en France (Mirand et al., 2015).

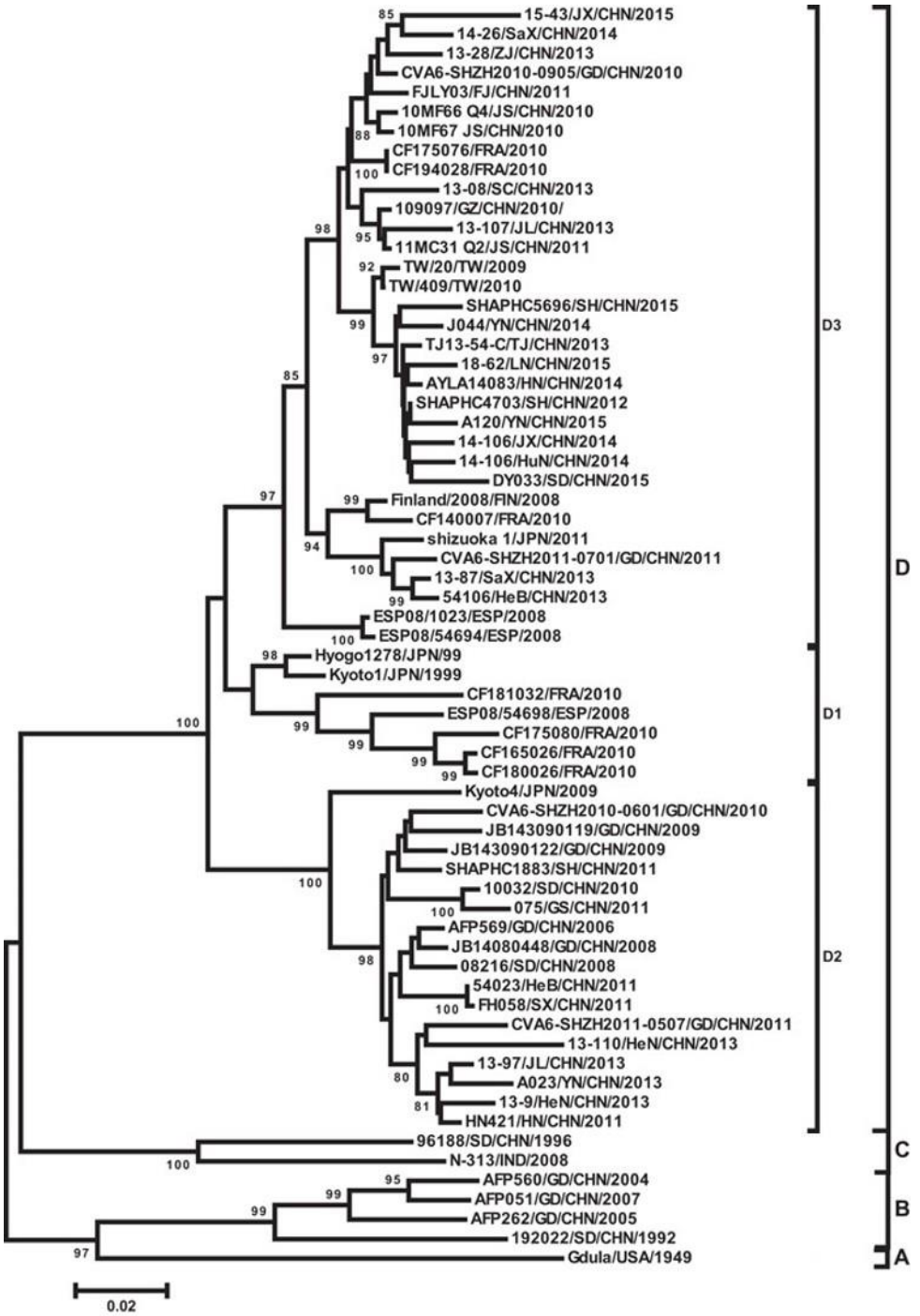


Figure 25 : Relations phylogénétiques entre les séquences VP1 complètes du CV-A6 déduites à l'aide de la méthode de Neighbor-Joining.

La fiabilité des nœuds est déterminée par la méthode du Bootstrap (1000 réplicats). Les différents génogroupes et sous-génogroupes sont indiqués à droite de l'arbre. CHN, Chine ; JPN, Japon ; IND, Inde ; TW, Taiwan, Chine ; FIN, Finlande ; FRA, France ; ESP, Espagne. **(D'après Song et al., 2017).**

D. Diversité génétique et épidémiologie moléculaire du CVA6

Une différence nucléotidique supérieure à 15 % des séquences géniques 1D (protéine VP1) a également été utilisée pour distinguer les classes phylogénétiques du CVA6. Les souches de CVA6 ont été classées en quatre groupes principaux, désignés par les lettres A, B, C et D **(Figure 25)** (Feng et al., 2015). La souche prototype Gdula isolée aux USA en 1969 a été désignée comme le génogroupe A.

Quant au génotype D, la classification en sous-génogroupes reste controversée en raison des analyses phylogénétiques basées sur un nombre limité de séquences géniques 1D incomplètes pour certaines études (Bian et al., 2015; Chen et al., 2012; Feng et al., 2015; He et al., 2013; Tan et al., 2015).

En Asie, les souches des génogroupes B et C ont circulé dans les années 1990. Depuis 2000, le génogroupe D circule en 2008, une association aux foyers de maladie PMB. Au Japon, les souches du génogroupe D ont été détectées en 1999, 2003, 2009 et 2010 associés majoritairement à des cas de maladie PMB. À Taïwan, et en Chine, les souches du génogroupe D sont devenues les souches prépondérantes depuis 2009 (Chen et al., 2012; He et al., 2013).

En Europe, aucune étude jusqu'à ce jour n'a rapporté une classification/diversité sur la région structurale (codant les protéines de capside) des souches circulantes de CVA6, bien que depuis 2008 le CVA6 soit rapporté comme génotype prédominant dans les épidémies de maladies PMB (Blomqvist et al., 2010; Mirand et al., 2012; 2016; Montes et al., 2013; Sinclair et al., 2014).

E. Conséquences de la recombinaison génétique pour l'EVA71 et le CVA6

La recombinaison génétique est une caractéristique commune des entérovirus, bien qu'elle ait été rapportée comme plus fréquente chez les EV de l'espèce B (plus étudiés) que ceux de l'espèce A (Oberste & Pallansch, 2004).

Récemment, de nombreuses études ont signalé que de multiples EV A, en particulier l'EVA71, CVA2, 4, 6, 10 et 16, pouvaient co-circuler dans la même zone géographique au cours des épidémies de maladie PMB, pouvant favoriser les événements de recombinaison entre ces virus (Feng et al., 2015; Guo et al., 2015; Van der Sanden et al., 2011). La recombinaison est bien impliquée dans l'évolution des EV de l'espèce A, y compris l'EVA71, et il a été démontré par plusieurs travaux qu'elle est associée à l'émergence de différentes lignées de l'EVA71(McWilliam Leitch et al., 2012). Mirand et al. (2010) ont montré une incongruence dans les topologies des analyse phylogénétiques multilocus (gène 1D et région 3CD) de 86 souches

d'EVA71 isolées en France, en Autriche et en Allemagne. Cette observation suppose la survenue de la recombinaison génétique dans l'histoire évolutive de certaines lignées de l'EVA71. Une autre étude portée sur 308 souches d'EVA71, permet de confirmer ces différences de topologies de l'analyse multilocus (gène 1D et région 3CD) et suggère que la recombinaison génétique aurait jouer un rôle dans l'émergence des sous-génogroupes d'EVA71 (McWilliam Leitch et al., 2012). Cependant, l'analyse comparative multilocus ne permet pas d'indiquer les sites de recombinaison.

Plusieurs autres études ont mis en évidence la recombinaison génétique par une analyse comparative de similitude nucléotidique des séquences génomiques complètes d'EVA71. A Taiwan entre 1986 et 2008, une recombinaison génétique intertypique a été mise en évidence entre l'EVA71et le CVA8 sur la région non structurale du génome, ainsi que des évènements de recombinaison intratypique entre les sous-génogroupes B2/B3 et les sous-génogroupes B4/B5 qui a été associé à une réémergence du sous-génogroupe B5 qui n'avait pas été détecté au cours des 5 années précédentes (Huang et al., 2009).

L'analyse de similitude nucléotidique des séquences génomiques de souches d'EVA71 isolées au Pays-Bas entre 1963 et 2010 a aussi indiqué des sites de recombinaison au niveau de la région 5'NC entre des souches du sous-génogroupe B2 isolées en 1986 aux Pays-Bas et des souches des sous-génogroupes B3 et B4 isolées dans la région de l'Asie-Pacifique (Van der Sanden et al., 2011).

En Chine, le sous-génogroupe C4 a été fréquemment rapporté comme lignée virale émergente suite à des évènements de recombinaison génétique. L'analyse comparative de la séquence génomique d'une souche du sous-génogroupe C4 permet d'identifier une double recombinaison, intratypique entre les sous-génogroupes B et C et intertypique avec la souche coxsackeivirus A16-G10 isolée en 1950 (Yip et al., 2010). Une nouvelle lignée variante du sous-génogroupe C4 désignée « C4a » a été détectée au cours d'une épidémie de maladie PMB en Chine en 2008 (Zhang et al., 2010).

La caractérisation des séquences génomiques de 7 souches d'EVA71a a mis en évidence un partage de portions génomiques P2-P3 entre des souches du sous-génogroupe C1 et les CVA4 et CVA5 , celui ayant conduit à l'émergence du sous-génogroupe C4 (Wang et al., 2012). Comme pour les souches d'EVA71 et CVA16 circulant en Chine (Wang et al., 2012 ; Zhao et al., 2011), les évènements de recombinaison génétique ont été également détectés chez des souches de CVA6 en circulation. Gaunt et ses collaborateurs ont identifié huit formes recombinantes (RF-A à H) à partir d'une analyse phylogénétique multilocus des souches de CVA6 isolées à Edimbourg, en Ecosse, entre 2008 et 2014 (Gaunt et al., 2015).

Plusieurs travaux rapportent une recombinaison intertypique fréquente sur la partie non structurale P2-P3 du génome entre les souches de CVA6 ayant une parenté génétique étroite avec la souche prototype Gdula et le CVA4 (Feng et al., 2015). Un schéma de recombinaison similaire a également été trouvé chez les souches de CVA6 isolées à Shanghai en 2013, qui présentaient une plus grande similitude nucléotidique avec une souche de CVA4 dans les régions 2C et 3'NC et la souche CVA6 recombinante associée à une éruption cutanée plus généralisée du syndrome PMB (Feng et al., 2015). Guo et al (2015) ont identifié des souches de CVA6 qui partageaient des portions génomiques P3 avec des souches de CVA2 et CVA8 (Guo et al., 2015) .

Ces études suggèrent que la recombinaison génétique peut être impliquée dans l'émergence d'une nouvelle lignée virale présentant des caractéristiques biologiques imprévisibles et les régions non structurales pourraient potentiellement contribuer aux phénotypes cliniques de la maladie PMB associée aux infections à l'EVA71 et au CVA6.

OBJECTIFS DE LA THESE

Notre travail de thèse est fondé sur la biothèque d'échantillons cliniques qui a été constituée dans le cadre de la surveillance de la maladie PMB entre 2010 et 2018, en particulier pour l'étude du CVA6. Concernant l'étude des infections à EVA71, notre travail doit aussi beaucoup à la surveillance hospitalière et à la surveillance plus ponctuelle des infections asymptomatiques dans des crèches.

Les objectifs de la thèse sont les suivants :

I. Mise au point d'une méthode d'étude du génome complet des EV-A appliquée au séquençage haut débit

Les techniques de séquençage à haut débit permettent de déterminer les génomes de nombreux virus à ARN et d'explorer les épidémies provoquées par ces virus, mais elles sont encore peu employées pour les entérovirus. Il est indispensable de mettre en œuvre ces techniques dans le cadre d'études d'épidémiologie moléculaire car elles permettront la caractérisation à grande échelle des entérovirus. C'est pourquoi, notre premier objectif a été de mettre au point une méthode simple d'amplification et de séquençage des génomes complets d'EV de l'espèce A à partir de prélèvements cliniques de patients. La méthode que nous avons mise au point est basée sur la technologie de séquençage SMRT PacBio et nous l'avons appliquée à l'étude de la diversité du CVA6 détecté par la surveillance ambulatoire de la maladie PMB.

II. Description de l'épidémiologie moléculaire de l'EVA71 et du CVA6 en France

Au cours des épidémies de maladie PMB, la co-circulation de plusieurs types de l'espèce A, tels que l'EVA71 et le CVA6, représente un facteur épidémiologique nécessaire aux co-infections cellulaires et à la recombinaison génétique. Notre deuxième objectif a consisté à déterminer les caractéristiques de l'épidémiologie moléculaire de l'EVA71 et du CVA6 en décrivant les épidémies qui leur étaient associées et en analysant la diversité virale et l'histoire évolutive des virus détectés par les différentes surveillances.

III. Relation entre la recombinaison génétique et l'émergence de l'EVA71 et du CVA6

La recombinaison génétique est considérée comme un processus fondamental dans l'évolution des entérovirus. Notre troisième objectif était de rechercher les événements de recombinaison dans les génomes viraux et évaluer s'ils pouvaient être associés à l'émergence des lignées récentes des types EVA71 et CVA6. Cette étude a pu être réalisée en analysant les génomes complets. Nous avons aussi recherché une association éventuelle entre les formes recombinantes de CVA6 et les caractéristiques cliniques rapportées chez des patients.

MATERIELS ET METHODES

I. Souches et échantillons cliniques

A. Systèmes de surveillance des infections à entérovirus

Les études d'épidémiologie moléculaire ont été réalisées en utilisant des échantillons cliniques de patients pour lesquels une infection à CVA6 ou à EVA71 avait été diagnostiquée et collectés à travers 3 systèmes de surveillance des infections à entérovirus :

- la surveillance ambulatoire de la maladie PMB en France entre avril 2010 et novembre 2018. Trois périodes d'étude ont été considérées en fonction du périmètre de la surveillance qui a évolué au cours des huit années :
  - 2010-2013 : Surveillance de la maladie PMB réalisée à l'échelle de l'agglomération clermontoise ;
  - 2014-2016 : Surveillance nationale de la maladie PMB par un réseau de 47 pédiatres libéraux répartis dans toute la France ;
  - 2017-2018 : Surveillance syndromique et virologique de la maladie PMB par un réseau de 80 pédiatres libéraux répartis dans toute la France (réseau PARI).

  Les pédiatres participants ont réalisé les écouvillonnages de gorge ou de bouche chez des enfants présentant des manifestations de maladie PMB ou d'herpangine. Pour chaque cas, les pédiatres ont transmis un formulaire standardisé recueillant les caractéristiques démographiques et les signes cliniques (type d'éruption, localisation, signes associés : respiratoires, digestifs, neurologiques, ORL). A partir des items cliniques renseignés et notamment de la localisation des lésions, la présentation clinique a été classée en 3 catégories : herpangine isolée (HA), PMB typique et PMB atypique. L'herpangine isolée était définie par des ulcérations buccales prédominant dans la partie postérieure de la cavité orale sans éruption cutanée associée. La maladie PMB typique était définie par la présence d'au moins deux des signes cliniques suivant : vésicules buccales ou péri-orales, éruption au niveau de la paume des mains, plante des pieds, genoux/coudes ou siège à l'exclusion de toute autre localisation. La maladie PMB atypique était définie par les mêmes critères que la forme typique mais en association avec d'autres localisations (membres, visage, tronc, éruption généralisée).

- La surveillance hospitalière des infections à EV (données du Réseau de surveillance des entérovirus, RSE)

- La surveillance réalisée dans des crèches de l'agglomération clermontoise entre octobre 2014 et octobre 2016. Cette surveillance a consisté à collecter les selles d'enfants admis en crèche de façon hebdomadaire pour rechercher et identifier les types d'EV dans cette population majoritairement asymptomatique (étude VSVIR, de 2015 à 2016).

Tableau 3 : Présentation de la biothèque utilisée pour l'étude

Epidémiologie clinique et moléculaire des infections à CVA6	Epidémiologie clinique et moléculaire des infections à EV-A71	
Surveillance de la maladie PMB (n=981)	Surveillance des infections à EV (RSE) (n=32)	Surveillance des infections asymptomatiques à EV (étude VSVIR) (n=5)
Gorge (n=675) Bouche (n= 304) Vésicules cutanées (n=2)	Gorge (n=9) Bouche (n=2) Plasma (n=2) LCS (n=2) Lavage nasopharyngé (n=2) Sang (n=1) Selle (n=11) Ecouvillon rectal (n=1)	Selles (n=5)

Tableau 4 : Souches d'EV-A71 et de CVA6 choisies pour étudier le neurotropisme

Virus/Génogroupe	France	Allemagne
EV-A71/C1	n=3	n=2
EV-A71/C2	n=1	-
EV-A71/C4	n=1	-
CVA6	(n=3)	

Tableau 5 : Structure des oligonucléotides et conditions d'amplification génique selon les amorces utilisées

Amorce	Spécificité	Région	Tm (°C)	Séquence (5' → 3') *
IFT7R5NC	EV	5NC	62.90	TAAAACAGCCTGTGGGTTG
HEVAS1405	EV-A	1C	58.39	GGNTCNTTYATGGCNACNGGNAARATG
HEVAS1495	EV-A	1C	58.39	GGTNATNCCNTGGATAAGYAACAC
HEVAR2807	EV-A	2A	49.7	CYACNGCNCARGGNTGYGACACGA
HEVAR2C	EV-A	2C	68.07	CATGCAGTTCAAGAGCAARCACCG
HEVAS2C	EV-A	2C	68.07	CATGCAGTTCAAGAGCAARCACCG
HEVA3NC	EV-A	3NC	68.70	GTGGGGGTAAATTTGTTATAACCAGAATAGC
polyT3NC HEVA01	EV-A	3NC	59.8	GGTAAATTTGTTATAACCAGAATAGC-polyA

*N = inosine, R = A ou G, Y = C ou T, M = A ou C

B. Souches et échantillons cliniques

1. Origine et analyse du nouveau variant d'EVA71 C1 variant 2015

Trente-deux échantillons cliniques de 25 patients pour lesquels une infection à EVA71 C1v2015 avait été diagnostiquée en 2016 et 2017 ont été analysés. Ces échantillons provenaient de 16 patients hospitalisés, 4 enfants vus en ambulatoire pour une maladie PMB et de 5 enfants asymptomatiques dont les selles avaient été collectées dans le cadre de la surveillance en crèche **(Tableau 3)**. Pour étudier l'origine recombinante de ce nouveau variant, 18 souches d'EV-A collectées en France (n=10), Fédération de Russie (n=3), Allemagne (n=2), Turkménistan (n=2) et Pays-Bas (n=1). Ces souches assignées à 5 types distincts, proviennent de prélèvements pharyngés ou de selles collectés dans différents pays entre 2003 et 2017.

2. Epidémiologie moléculaire du CVA6 en France

Nous avons analysé une collection de 981 d'écouvillonnages de bouche ou de gorge d'enfants vus dans le cadre de la surveillance ambulatoire de la maladie PMB. Pour l'analyse des génomes complets, 245 échantillons cliniques ont été sélectionnés à partir des données phylogénétiques en tenant compte de la présentation clinique de la maladie PMB. Les caractéristiques démographiques et cliniques de cette sous-population étaient statistiquement comparables à celle de la population globale.

3. Etude du pouvoir infectieux

Sept souches d'EVA71 représentant 3 sous-génogroupes (France, n=5 ; Allemagne, n=2) ont été sélectionnées à partir de l'étude de l'épidémiologie moléculaire. Pour l'étude *in vitro* du pouvoir infectieux du CVA6, nous avons sélectionné 3 souches isolées de prélèvements cliniques **(Tableau 4).**

C. Désignation des souches

La désignation des séquences a été formatée selon le format suivant : l'abréviation du type d'entérovirus, le numéro du prélèvement attribué par le laboratoire qui a effectué l'isolement, le génogroupe (sous-génogroupe), le pays d'origine (selon le code ISO alpha 3) et enfin l'année de la détection de la souche.

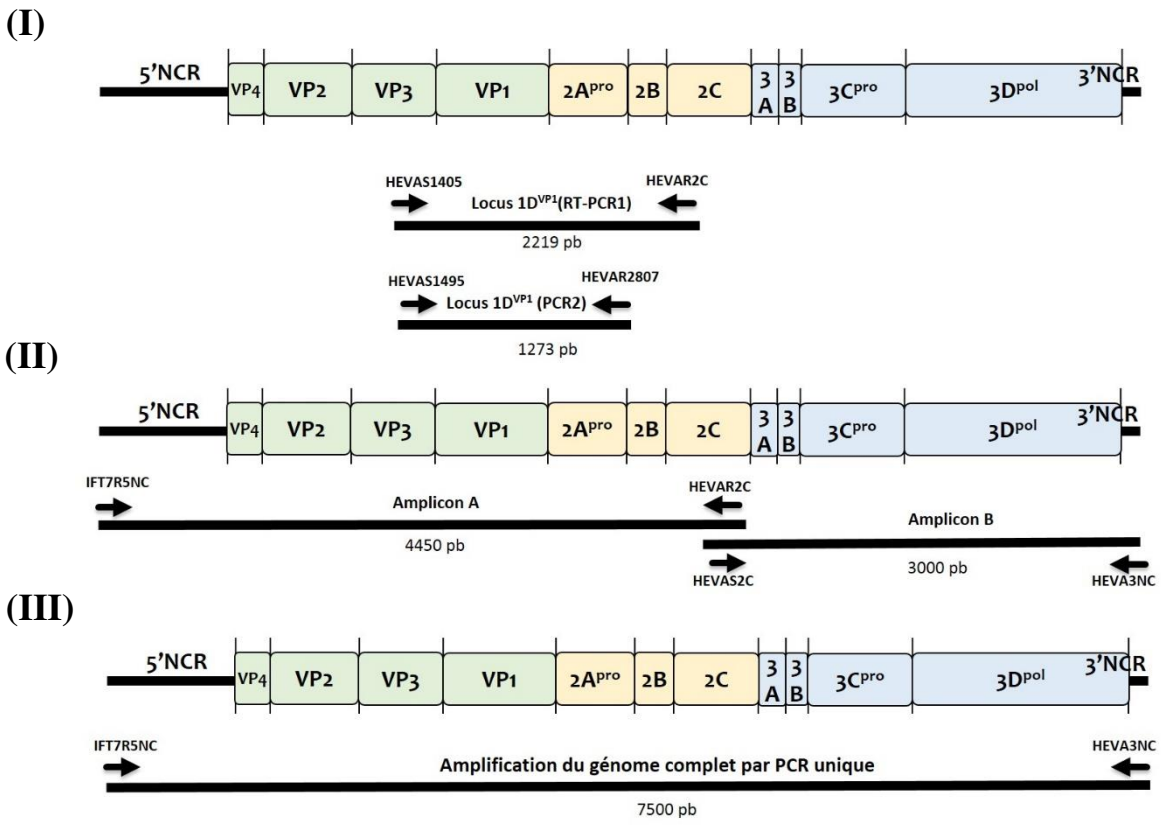


Figure 26 : Représentation schématique du génome d'un entérovirus et localisation des oligonucléotides servant d'amorces d'amplification génique

(I) Amplification du locus $1D^{VP1}$
(II) Amplification du génome complet en deux fragments
(III) Amplification du génome complet par PCR unique

II. Diagnostic et génotypage des EV

L'ARN génomique des EV a été extrait à partir de 200 µL de surnageant de culture ou directement à partir des échantillons cliniques par une méthode semi-automatisée NucliSENS® sur l'automate EasyMAG™ (bioMérieux, France), selon les instructions du fournisseur. Les acides nucléiques purifiés ont été élués dans 50 µL du tampon d'élution et conservés à -80 °C jusqu'à analyse.

Le typage moléculaire a reposé sur l'amplification génique $1D^{VP1}$. A partir des acides nucléiques ayant servi à faire le diagnostic, la séquence 1D a été amplifiée à l'aide de l'enzyme Taq Polymerase (Invitrogen) par RT-PCR en une seule étape (RT-PCR1) avec les amorces spécifiques HEVAS1405 et HEVAR2C. Si la sensibilité était insuffisante, une seconde amplification nichée (PCR2) a été effectuée avec des amorces HEVAS1495 et HEVAR2807 **(Figure 26 ; Tableaux 5 et 6)** (Mirand et al., 2008)**.**

A. Amplification du génome complet

Pour l'amplification des génomes complets, la synthèse d'un ADNc préalable à l'amplification a été réalisée. La transcription inverse a été effectuée à l'aide d'amorces hexanucléotidiques et d'une enzyme à activité ADN polymerase ARN dépendante : SuperScript reverse transcriptase III ou IV (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). La réaction se décompose en 3 étapes : le mélange réactionnel est pré-incubé 5 minutes à 65 °C afin de permettre l'hybridation des amorces puis la transcription inverse est réalisée par incubation du mélange à 25 °C pendant 10 minutes. La réaction est stoppée par un chauffage de 50 minutes à 50 °C afin d'inactiver l'enzyme. Les ADNc ont été utilisés immédiatement ou conservés à -20°C.

1. Amplification du génome viral en 2 fragments subgénomiques

Le génome complet des souches d'EVA71 a été amplifié avec des amorces spécifiques **(Tableau 5)** en utilisant l'enzyme Platinum™ SuperFi™ (Introvigen) en deux fragments subgénomiques après la synthèse de deux ADNc subgénomiques couvrant le génome entier **(Figure 26)**. Le premier produit de PCR amplifié avec les amorces IFT7R5NC et HEVAR2C a été désigné amplicon A (5NC-2C) et le second, amplicon B (2C-3'NC), a été amplifié avec les amorces HEVAS2C et HEVA3NC.

Tableau 6 : Conditions d'amplification génique selon la région génomique cible

Région d'intérêt	1D	1D (PCR2)	Amplicon A (Partie 5' du génome : 5NC-2C)	Amplicon B (Partie 3' du génome : 2C-3NC)
Synthèse d'ADNc	-	-	A partir de l'ARN extrait Superscript III (Introvigen) Amorces : HEVAR2C	A partir de l'ARN extrait Superscript III (Introvigen) Amorces : polyT3NC HEVA01
Enzyme polymérase	One Step RT-PCR Kit (Qiagen)	Taq DNA polymerase (Qiagen)	Platinum SuperFi DNA polymerase (Introvigen)	Platinum SuperFi DNA polymerase (Introvigen)
Amorce 1	HEVAS1495	HEVAS1495	IFT7R5NC	HEVAS2C
Amorce 2	HEVAR2C	HEVAR2807	HEVAR2C	HEVA3NC
Dénaturation initiale	94°C ; 2 min	94°C ; 2 min	98°C ; 30 sec	98°C ; 30 sec
Dénaturation	94°C ; 15 sec	94°C ; 15 sec	98°C ; 5 sec	98°C ; 5 sec
Hybridation	53°C ; 50 sec	50°C ; 50 sec	66°C ; 10 sec	70°C ; 10 sec
Elongation	68,5°C ; 90 sec	72°C ; 50 sec	72°C ; 2 min 25 sec	72°C ; 2 min 25 sec
Nombre de répétitions	41	39	41	41
Elongation finale	68,5°C ; 5 min	72°C ; 5 min	72°C ; 5 min	72°C ; 5 min
Taille de l'amplicon	2219 pb	1273 pb	4450 pb	3000 pb

Tableau 7 : Conditions d'amplification du génome complet en un seul amplicon

	Amplification du génome complet par PCR unique
Synthèse d'ADNc	A partir de l'ARN extrait Superscript IV (Introvigen) Amorces : polyT3NC HEVA01
Enzyme polymérase	Platinum SuperFi DNA polymerase (Introvigen)
Amorce 1	IFT7R5NC
Amorce 2	HEVA3NC
Dénaturation initiale	98°C ; 1 min
Dénaturation	98°C ; 5 sec
Hybridation et élongation	72°C ; 4 min 30 sec
Nombre de répétitions	41
Elongation finale	72°C ; 5 min
Taille de l'amplicon	7500 pb

2. Amplification du génome complet en un seul amplicon

Après la synthèse d'ADNc à l'aide de l'amorce polyT3NC HEVA01, les génomes complets des souches d'EVA71 et de CVA6 ont été amplifiés sous la forme d'un amplicon unique en utilisant l'enzyme Platinum™ SuperFi™ et le couple d'amorces IFT7R5NC et HEVA3NC. Cette paire d'amorces spécifiquesa été vérifiée à partir d'un alignement de 922 séquences de génomes complets représentant tous les types et les génogroupes d'EV A disponibles dans GenBank (consulté en mars 2019). Les séquences nucléotidiques, les emplacements génomiques et les longueurs de fragments amplifiés sont présentés dans le Erreur ! Source du renvoi introuvable. et **la figure 26**. La température e fusion de chaque oligonucléotide a ensuite été calculée avec la plateforme **Tm Calculator** (ThermoFisher). Les conditions d'amplification sont décrites dans le **Tableau 7Erreur ! Source du envoi introuvable.**.

B. Contrôle et purification des produits d'amplification

Les produits de PCR ont été contrôlés après migration sur un gel d'agarose à 1 %, en utilisant le marqueur fluorescent GelStar™ (Lonza). Après la mise en évidence des régions génomiques d'intérêt, les produits de PCR ont été purifiés avec le kit NucleoSpin™ Gel and PCR Clean-up Macherey-Nagel™ et conservés à –20 °C.

C. Séquençage

a) Séquençage des fragments subgénomiques par la méthode Sanger

Le séquençage des amplicons $1D^{VP1}$ et subgénomiques A et B a été effectué par la méthode Sanger. Les réactions de séquences ont été effectuées avec le kit BigDye terminator v1.1 cycle sequencing (Applied Biosystems) avec les oligonucléotides d'amplification génique et des oligonucléotides spécifiques intermédiaires (sens et reverse). Les produits des réactions de séquençage ont été analysés par électrophorèse capillaire avec le séquenceur automatique ABI 3500DX (Applied Biosystems, Foster City, USA). Les chromatogrammes générés par le séquenceur ont été traités avec le logiciel BioEdit pour produire les séquences « contigs » à partir de plusieurs amplicons chevauchants.

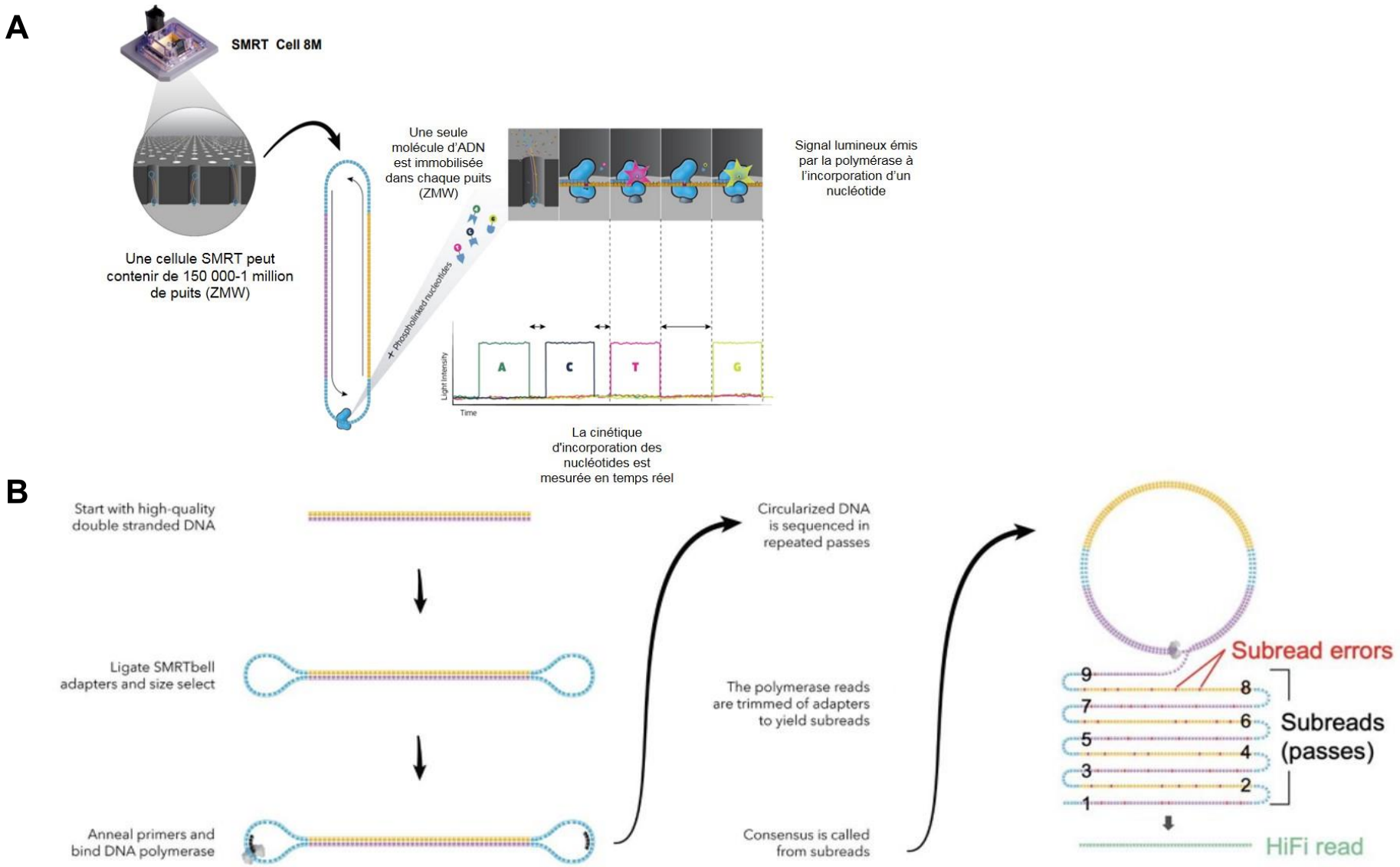


Figure 27 : Principe général de la technologie SMRT (Single-molecule real-time sequencing).

(A) Séquençage en temps réel des molécules d'ADN. **(B)** Stratégie de séquençage par circularisation de la technologie SMRT. **(D'après la notice de PacBio)**.

b) Séquençage du génome complet par NGS

(1) Principe général de la technologie SMRT (Single-molecule real-time sequencing)

La technologie de séquençage SMRT développée par la société Pacific Biosciences (Menlo Park, CA, USA) est déployée sur la plate-forme GENTYANE rattachée à l'UMR INRAE / Université Clermont Auvergne « Génétique, Diversité et Écophysiologie des Céréales ». Le principe de la technique repose sur le séquençage en temps réel des molécules d'ADN réparties dans des nanostructures (nanopuits désignés ZMW, zero-mode waveguides) d'une cellule qui comporte environ 150 000 jusqu'à 1 000 000 de puits selon le modèle de séquenceur PacBio. Au fond de chaque puits est fixée une ADN polymérase qui séquence une molécule unique d'ADN. Le séquençage SMRT est un processus d'incorporation de nucléotides identifiés par un marqueur fluorescent. Un signal lumineux est émis chaque fois que l'ADN polymérase incorpore un nucléotide en lisant la matrice d'ADN **(Figure 27A)**. La technique peut générer une longueur de lecture moyenne de 10–15 kb, ce qui permet de séquencer le génome complet des EV (7,5 kb). Pacific Biosciences a développé une stratégie pour améliorer la précision du séquençage car le taux d'erreur sur les longs fragments est de 10 à 15 % avec une introduction aléatoire d'indels (insertions et délétions). La stratégie dite CCS (Circular Consensus Sequence) consiste à ajouter des adaptateurs en épingles à cheveux aux extrémités (5' et 3') de chaque brin, ce qui permet de circulariser la matrice d'ADN dont chaque brin peut ainsi être parcouru et séquencé entièrement plusieurs fois par l'ADN polymérase. Chaque séquence obtenue constitue un « subread ». La séquence finale retenue « read CCS » est une séquence consensus d'un ensemble de « subreads » issus du nombre de boucles réalisées par l'ADN polymérase **(Figure 27B).** Tous les génomes de CVA6 ont été séquencés en un seul tenant à partir des prélèvements cliniques et les amplicons (voir § ci-dessus) ont été acheminés à la plateforme GENTYANE afin de procéder à la préparation de la librairie.

(2) Préparation des librairies pour le séquençage SMRT

La librairie SMRTBell a été préparée en utilisant un kit de préparation de modèles d'ADN 1.0, suivant la procédure de préparation des librairies pour le séquençage SMRT multiplex d'amplicon à l'aide d'adaptateurs à codes-barres PacBio **(Figure 28)** (Pacific Biosciences, Menlo Park, CA, USA). Chaque produit PCR a été purifié en utilisant des billes PacBio 0,45X AMPure et leur concentration normalisée à 20 ng/µl. La qualité des fragments a été contrôlée par électrophorèse, à l'aide d'un analyseur (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) permettant d'évaluer la distribution de leur taille.

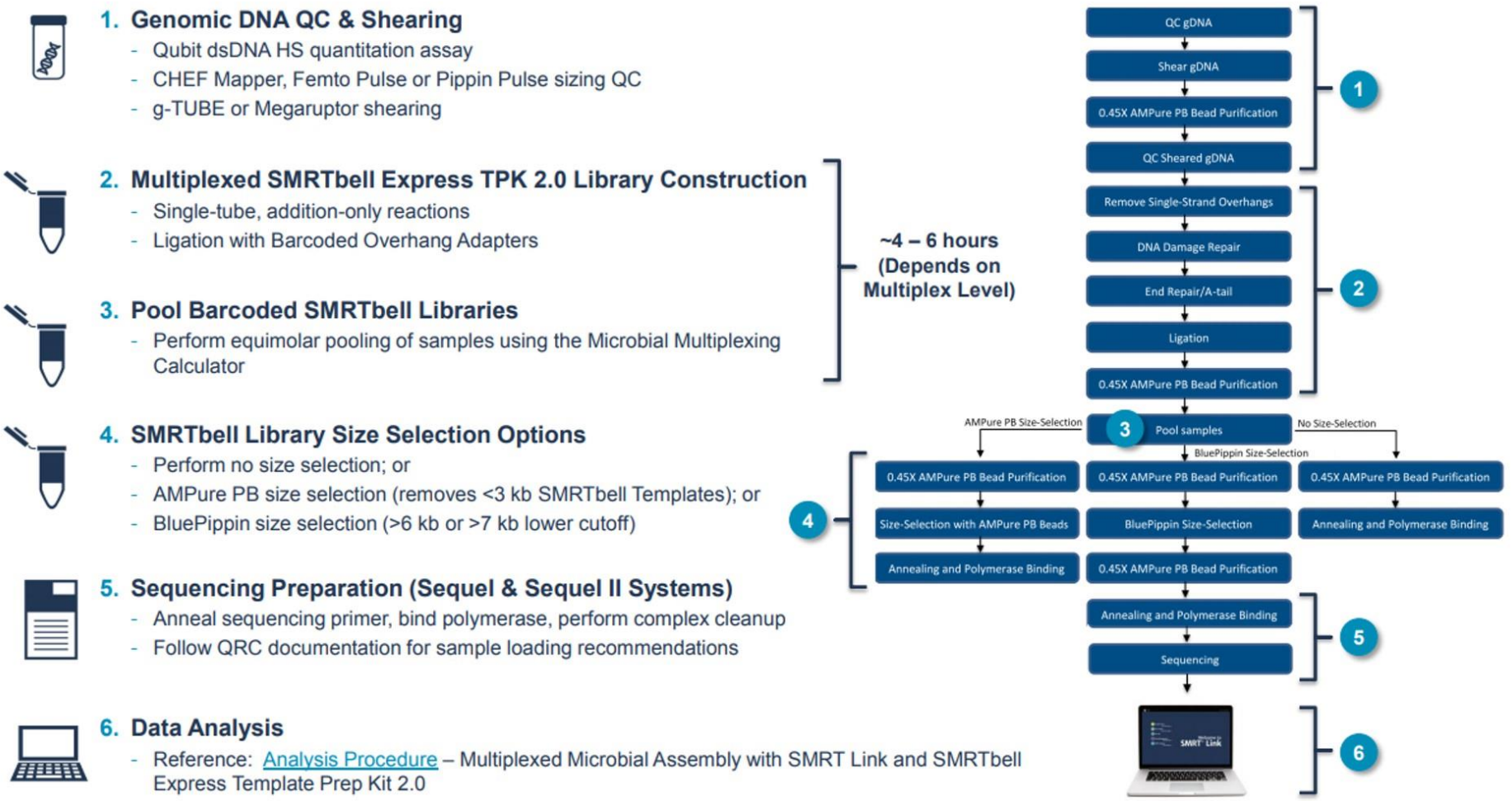


Figure 28 : Algorithme de préparation d'une librairie multiplexée pour le séquençage SMRT, PacBio

Chaque produit PCR a été soumis à une réaction enzymatique de réparation des extrémités en une seule étape et à des réactions de liaison d'adaptateur avec code-barres aux extrémités.

Les 96 amplicons identifiés par des codes-barres ont été mélangés de façon équimolaire puis purifiés avec des billes PB AMPure 0,45X, et les fragments d'une taille supérieure à 3 kb sont sélectionnés. Cinq µg du mélange d'amplicons ont été soumis à une réaction de réparation des dommages de l'ADN, suivie d'un traitement par exonucléase pour réparer les matrices endommagées. Deux autres purifications avec des billes PB AMPure 0,45X ont été réalisées pour obtenir la librairie finale. La librairie SMRTBell a été inspectée et quantifiée sur un analyseur de fragments (Agilent Technologies) et un fluorimètre Qubit avec un kit de test de réactifs d'ADN double brin (Life Technologies). Un complexe de polymérase SMRTBell prêt à être séquencé a été créé à l'aide d'un kit de liaison 3.0 et de l'amorce V4 (Pacific Biosciences). La librairie à une concentration de 8 pM d'ADN, a été chargée sur une plaque avec le système Sequel I par la méthode de diffusion, conformément aux instructions du fabricant. Enfin, trois librairies avec des codes-barres spécifiques ont été chargées sur le séquenceur PacBio Sequel en trois passages indépendants de 96 amplicons regroupées dans une seule cellule SMRT. L'instrument PacBio Sequel a été programmé pour charger et séquencer les échantillons sur les cellules SMRT PacBio v2.0 (Pacific Biosciences), sur une durée d'environ 20 heures par cellule SMRT et en générant 25 Go de données et un insert N50 à 7,9 kb.

(3) Développement d'une procédure de traitement bio-informatique des données du séquençage SMRT

Les séquences brutes issues du séquençage PacBio ont été fournies dans un fichier BAM (.bam ou .bam.pi) qui a été traité pour évaluer leur qualité et effectuer leur analyse **(Figure 29)**. Pour cela, la version 7.0 du pipeline SMRT Link en ligne de commandes a été implémentée sur le cluster de calcul hébergé par le Mésocentre Clermont-Auvergne. Plusieurs outils inclus dans le logiciel SMRT Link® v6.0.1 (SMRT-Tools-Reference-Guide-v8.0) ont été utilisés pour effectuer les cinq étapes principales suivantes :

(1) Des séquences circulaires consensus (CCS) ont été extraites des fichiers .BAM avec l'outil pbsmrtpipe avec les paramètres suivants : *min_passes=2 ; max_drop_fraction, 0.34 ; max_length, 100000 ; min_length, 100 ; min_predicted_accuracy, 0.9 ; min_passes, 2 ; min_zscore, 3.4 ; no_polish, TRUE.* Le fichier de sortie a été exporté au format CCS.BAM.

Les CCS ont ensuite été classées en deux catégories – CCS de pleine longueur et CCS de longueur partielle – en localisant les adaptateurs en 5′ et en 3′, et la queue poly(A).

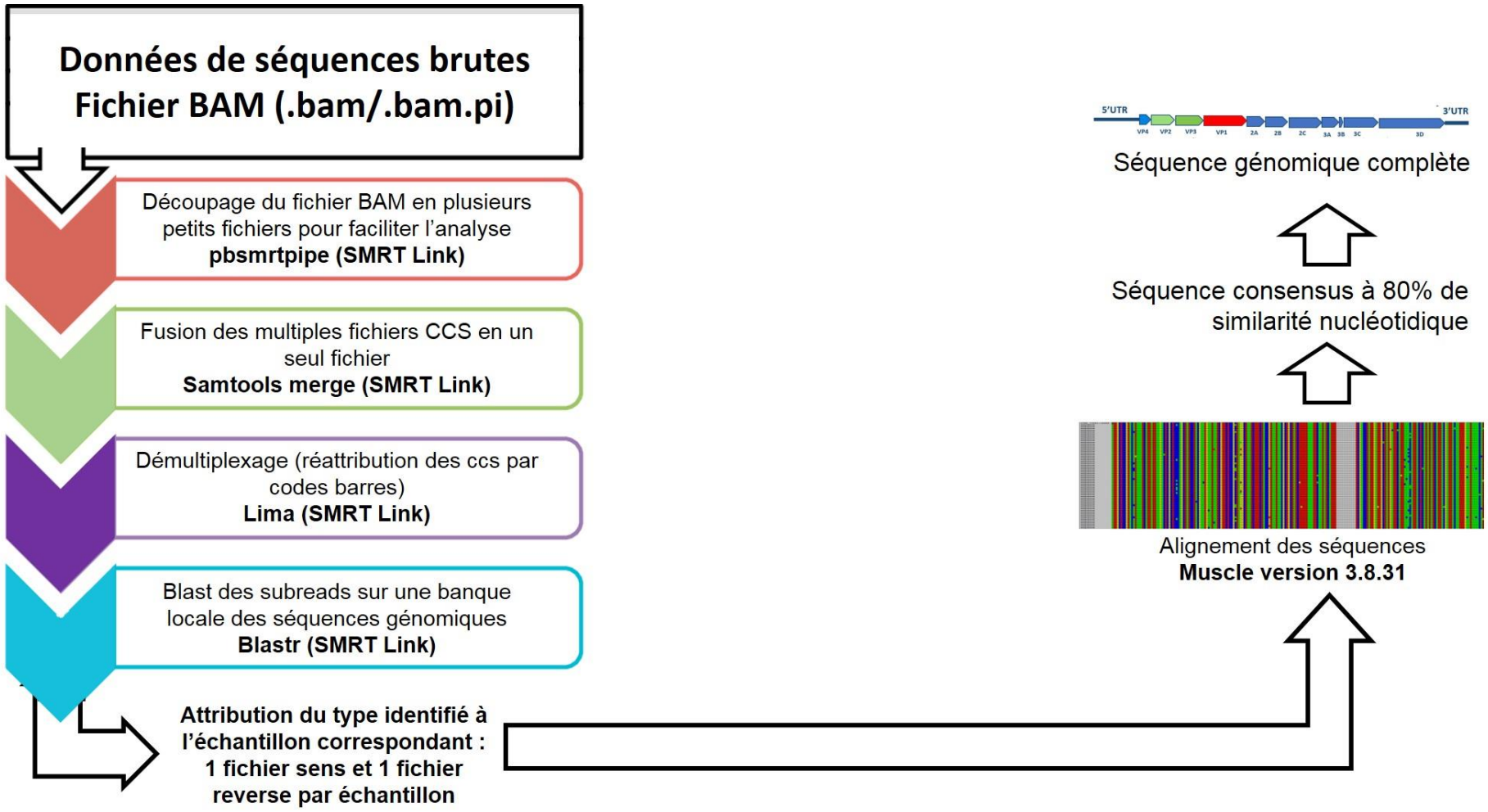


Figure 29 : Algorithme du pipeline de traitements des données de séquençage

(2) Les séquences brutes issues du séquençage ont été analysées à l'aide de l'application Lima (version 1.11.0 dans smrttools/incremental, Jan-2020), pour identifier et supprimer les codes-barres de l'échantillon, les amorces de séquençage et les appariements de codes-barres concordants ; paramètres : *-min – length 100 - -max - input - length 100000 – min passes 1 - - split-bam - - num – threads 32*.

(3) Le fichier .BAM a été converti en un fichier fasta en utilisant un script personnalisé de samtool_fasta (version 1.11.0 dans smrttools/incremental, Jan-2020).

(4) Afin de contrôler l'assignation du type d'EV, les séquences CCS ont été soumises à une analyse BLAST permettant de les comparer aux séquences d'une base de données locale représentant toute la diversité connue des types d'EV. L'outil "blasr" qui aligne les lectures longues sur une séquence de référence (paramètres : *. /blastr -m 5 --bestn 1 --nproc 200*) a été utilisé avec les paramètres par défaut.

(5) Il en résulte un seul fichier fasta contenant toutes les lectures corrigées de CCS attribuées à chaque amplicon de chaque échantillon pour les différents virus identifiés avec une répartition des séquences sens et séquences reverse.

Les séquences CCS ont été alignées avec le logiciel MUSCLE (version 3.8.31) en utilisant les paramètres : *muscle -maxhours 24 -diags -maxiters 2 -quiet -in $file -out*. Après une phase de vérification visuelle et d'édition manuelle de chaque alignement, une séquence consensus correspondant au génome complet a été générée en utilisant un seuil de similarité de 80 %.

III. Analyses moléculaires des séquences d'EVA71 et de CVA6

A. Constitution des jeux de séquences d'intérêt

Les séquences génomiques définitives ont été introduites dans les alignements constitués pour étudier l'EVA71 et le CVA6. Ces alignements contiennent les séquences disponibles dans la banque publique GenBank. Pour chaque séquence, les informations suivantes ont été renseignées : type d'EV, numéro d'accession, génogroupe et sous-génogroupe, pays et année de détection du virus. Pour les analyses phylogénétiques, des séquences de référence ont été sélectionnées et un groupe externe (séquences appartenant à un type d'EV de l'espèce A différent du type d'intérêt) a été introduit pour enraciner les arbres et vérifier l'absence de biais dans les topologies obtenues.

Tableau 8 : Jeux de données constitués pour différentes régions génomiques d'intérêt en fonction de l'objectif des analyses

Objectif de l'analyse	Région génomique d'intérêt	Etude de l'EV-A71			Etude du CVA6		
		Séquences du laboratoire‡	Séquences de GenBank¶	Nombre total de séquences*	Séquences du laboratoire‡	Séquences de GenBank¶	Nombre total de séquences*
Polymorphisme moléculaire Diversité intratypique	Séquence génique $1D^{VP1}$	EV-A71 (n= 27)	EV-A71 (n=275)	EV-A71 (n= 322)	CVA6 (n=981)	CVA6 (n=2637)	CVA6 (n=3618)
Détection de la recombinaison génétique¥	Génome complet	EV-A71 (n= 26) CVA (n= 3)	EV-A71 (n= 21) CVA (n= 20)	EV-A71 (n= 47) CVA (n= 23)	CVA6 (n=213)	CVA6 (n=547)	CVA6 (n=760)
Datation de l'émergence du virus	P1 (région codant les protéines de capside)	EV-A71 (n= 24)	EV-A71 (n= 61)	EV-A71 (n= 85)	CVA6 (n=213)	CVA6 (n=547)	CVA6 (n=760)
Datation de la recombinaison génétique	Séquence génique 3D	EV-A71 (n= 26) CVA (n=5)	EV-A71 (n= 20) CVA (n=19)	EV-A71 (n= 46) CVA (n=24)	CVA6 (n=213)	CVA6 (n=547)	CVA6 (n=760)

¥Analyse comparative préliminaire des topologies des arbres phylogénétiques des régions VP1 ou P1 et 3D et confirmation de la recombinaison génétique par analyse comparative de la similitude nucléotidique des séquences génomiques complètes.

‡Nombre de séquences nucléotidiques déterminées au cours de l'étude.

¶Nombre de séquences nucléotidiques collectées de la base de données GenBank (NCBI). Le nombre de séquences nucléotidiques déposées dans GenBank par notre laboratoire est indiqué entre parenthèses.

*Ensemble des séquences analysées pour l'étude concernée.

1. Jeu des séquences 1D de l'EVA71

Les séquences nucléotidiques du gène 1D de l'EVA71 sous-génogroupe C1 déterminées dans cette étude ont été complétées avec des séquences collectées dans la banque de séquences de notre équipe et dans GenBank (dernière consultation : février 2018).

Seules les séquences complètes (891 nucléotidiques) disposant des informations requises concernant l'année et la zone géographique d'isolement ont été retenues. Le jeu de données définitif était constitué de 322 séquences.

2. Jeu des séquences 1D du CVA6

Les séquences nucléotidiques du gène 1D du CVA6 déterminées dans cette étude (n=981) ont été complétées avec des séquences collectées dans GenBank (dernière consultation, juin 2020). L'alignement a été expurgé de toutes les séquences en doublon ou présentant un seuil de similitude > 99 % à l'aide du logiciel ElimDupes (Foley et al., 2018). Le jeu de données définitif était constitué de 3618 séquences.

3. Jeu des génomes complets de l'EVA71

Les séquences génomiques complètes de l'EVA71 déterminées dans cette étude ont été comparées aux séquences collectées dans GenBank (dernière consultation : septembre 2018). Seules les séquences de plus de 6800 nucléotides, disposant des informations requises ont été retenues. L'analyse comparative a été réalisée en incluant aussi des séquences génomiques d'autres types d'EV A (CVA2, CVA4, CVA5, CVA6, CVA7 et CVA8). Le jeu de données définitif était constitué de 70 séquences. Concernant, l'EVA71, les jeux de données de séquences ont été adaptés selon la région à analyser (Génome complet, région codante P1 et le gène 3Dpol

).

4. Jeu des génomes complets de CVA6

Les génomes complets de CVA6 déterminés dans cette étude ont été comparés avec 547 séquences génomiques disponibles dans GenBank (dernière consultation : août 2020). Seules les

séquences de plus de 6200 nucléotides, disposant des informations requises ont été retenues. Le jeu de données final pour toutes les analyses phylogénétiques, était constitué de 760 séquences.

B. Analyse de la diversité génétique virale avec le gène 1D

La séquence génique 1D codant la protéine de capside VP1 constitue la référence pour le typage moléculaire des EV. La diversité génétique des souches d'EVA71 et de CVA6 a été analysée en calculant la proportion de différences nucléotidiques (modèle p-distance implémenté dans le logiciel MEGA v5) et représentée par un arbre phylogénétique à l'aide du logiciel MEGA v5 (Tamura et al., 2011). La fiabilité des embranchements de l'arbre a été calculée par la méthode de « bootstrap » (n = 1000 répétitions) en considérant la valeur seuil de 70 % pour indiquer un nœud fiable.

C. Exploration des événements de recombinaison génétique dans les génomes complets

1. Analyse comparative de la topologie des arbres phylogénétiques reconstruits pour deux locus distants : VP1 et 3D

Les séquences potentiellement d'origine recombinante ont été détectées par une analyse préliminaire basée sur la comparaison de la topologie des arbres phylogénétiques reconstruits pour les gènes 1D et 3CD extraits du même jeu de séquences génomiques. Une incongruence topologique entre les deux arbres peut résulter de la survenue d'un évènement de recombinaison génétique.
Les arbres phylogénétiques ont été construits à l'aide du logiciel PhyML en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance et le modèle d'évolution moléculaire GTR (Guindon et al., 2010). La fiabilité des embranchements des arbres a été calculée par la méthode par la méthode du SH-test en considérant la valeur seuil de 70 % pour indiquer un nœud fiable.

2. Analyse du polymorphisme dans les génomes de CVA6

Les génomes de CVA6 ont été classés sur la base des lignées phylogénétiques identifiées dans l'arbre phylogénétique reconstruit pour le locus 1D et regroupés dans des jeux de séquences distincts. Chaque jeu a été comparé aux autres pour déterminer la diversité génétique moyenne à chaque position des génomes en utilisant la méthode de la fenêtre glissante parcourant l'alignement des génomes (taille de la fenêtre : 250 nt ; pas de déplacement : 25 nt). La présence d'évènements

de recombinaison accroît la diversité génétique localement dans le jeu de séquences. L'analyse a été réalisée avec le logiciel DnaSP v.5.10.1 (Librado & Rozas, 2009).

3. Analyse de la similitude nucléotidique des génomes complets

Les profils de similitude nucléotidique entre les séquences de génomes complets de CVA6 (n=760) et d'EVA71/EV A (n=43) ont été déterminés avec le programme SimPlot v3.5.1 (Lole et al., 1999). La méthode de la fenêtre glissante parcourant l'alignement des génomes (taille de la fenêtre : 200 nt ; pas de déplacement : 20 nt) a été utilisée. La similitude nucléotidique a été calculée avec le modèle de distance génétique Kimura à deux paramètres. Les sites de recombinaison ont été localisés par la diminution brutale du pourcentage de similitude nucléotidique entre la séquence d'intérêt et les autres séquences.

4. Analyse des signaux moléculaires de recombinaison

Les sites potentiels de recombinaison génétique au sein des séquences génomiques ont été localisés de façon approfondie avec le logiciel RDP v.4.33 disponible à l'adresse http://web.cbio.uct.ac.za/~darren/rdp.html (Heath et al., 2006). Les méthodes par défaut, RDP (Martin & Rybicki, 2000), Geneconv (Padidam et al., 1999), MaxChi (Smith, 1992), Chimaera (Posada & Crandall, 2001), Bootscan (Martin et al., 2005) et SiScan (Gibbs et al., 2000) ont été utilisées dans cette analyse. Seuls les signaux de recombinaison détectés par 5 méthodes ont été pris en compte pour exclure la possibilité d'une détection faussement positive.

D. Datation moléculaire par une approche phylogénétique Bayésienne

1. Evaluation de l'horloge moléculaire dans les jeux de séquences

Avant d'effectuer une analyse phylogénétique pour dater l'origine des lignées, il est nécessaire d'établir que l'hypothèse d'une horloge moléculaire (accumulation des mutations à vitesse constante) est vérifiée dans les jeux des séquences d'intérêt. Une telle analyse a été effectuée pour quatre jeux de données : les régions génomiques P1, P2 et P3, et le gène 3Dpol pour déterminer s'il était possible de reconstruire une phylogénie résolue dans le temps. Pour chaque jeu de séquence, un arbre phylogénétique a d'abord été généré par la méthode de maximum de vraisemblance en utilisant le modèle d'évolution moléculaire GTR en imposant une distribution gamma pour le taux des variations

nucléotidiques par site et une proportion de sites invariables (modèle GTR+Γ+I) implémentés dans le logiciel PhyML (Guindon et al., 2010).

Si les séquences ont évolué selon une horloge moléculaire constante, il est possible de localiser une racine dans l'arbre phylogénétique pour laquelle les distances entre les feuilles et la racine de l'arbre sont reliées de façon linéaire aux dates d'échantillonnage (dates des prélèvements cliniques). La valeur du coefficient de régression linéaire permet d'établir la fiabilité de cette relation. Cette analyse a été réalisée avec le programme TempEst (http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tempest/; (Rambaut et al., 2016) qui permet le calcul de la régression à partir d'une phylogénie reconstruite en maximum de vraisemblance.

2. Analyse phylogénétique par une méthode bayésienne

Lorsqu'une régression linéaire a établi l'existence d'une horloge moléculaire, les jeux de séquences ont été analysés pour reconstruire une phylogénie résolue dans le temps (généalogie) avec le programme BEAST v1.8.4 et BEAST2 (http://beast.community; Bouckaert et al., 2014; Drummond et al., 2012). Ce programme implémente une approche dite bayésienne de reconstruction d'arbres. Il s'agit d'une méthode probabiliste fondée sur le calcul de probabilités postérieures des arbres phylogénétiques en combinant une probabilité *a priori* avec la fonction de vraisemblance.

Des chaînes de Markov avec technique de Monte Carlo (MCMC) sont utilisées pour calculer la distribution des probabilités postérieures bayésiennes. Cette approche bayésienne est très performante car elle permet d'utiliser des modèles d'évolution moléculaire, démographiques ou épidémiologiques très complexes, incorporant un grand nombre de paramètres en un temps de calcul raisonnable. Pour cette étude, les reconstructions ont été réalisées avec un modèle de substitutions nucléotidiques GTR et un modèle démographique « skyline » estimés comme les plus appropriés à nos jeux de données (Hassel, 2015).

Le logiciel BEAUTI (logiciel compagnon de BEAST) a été utilisé pour paramétrer les analyses. Des chaînes MCMC de 50 millions et 400 millions de générations ont été définies selon la taille des jeux de données et ont été échantillonnées de façon à collecter un échantillon final de 10 000 arbres phylogénétiques. Les chaînes de Markov et la taille effective des échantillons ont été vérifiées à l'aide du programme TRACER v1.6 (Rambaut et al., 2018 ; http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/).

Le programme TreeAnnotator v1.5.4 (http://beast.community/ ; Drummond & Rambaut, 2007) a été utilisé pour reconstruire l'arbre phylogénétique dont la fonction de vraisemblance était la plus élevée « maximum clade credibility (MCC) tree ». Pour chaque jeu de séquences analysé, l'approche

bayésienne fourni un phylogramme consensus dont la longueur des branches est proportionnelle aux distances génétiques entre les séquences et un chronogramme qui estime l'âge de l'ancêtre commun le plus récent « time to the most recent common ancestor » (tMRCA) de chaque nœud. Les arbres finalisés ont alors été visualisés et annotés à l'aide du logiciel FigTree (Drummond & Rambaut, 2007).

3. Numéros d'accessions des séquences nucléotidiques

Les séquences nucléotidiques partielles et complètes produites au cours cette étude ont été déposées dans la base de données GenBank/EMBL sous les séries de numéros d'accession LR027521- LR027552 et MT814404-MT814616.

IV. Etude du pouvoir infectieux de l'EVA71 et du CVA6 à partir d'un modèle cellulaire de neurones humains *in vitro*

A. SH-SY5Y, cellules de neuroblastome humain

Les cellules SH-SY5Y (ECACC, 94030304) sont issues d'une lignée cellulaire de neuroblastome humain établie à partir de tumeurs métastasiques (Biedler et al., 1978). Cette lignée est utilisée comme modèle pour étudier *in vitro* la fonction et la différenciation neuronales. Elle a été entretenue en culture dans le milieu EMEM contenant 15 % de sérum de veau fœtal décomplémenté (SVFhi), 1 % de GlutaMAX et 1 % de mélange pénicilline-streptomycine. Les cellules sont utilisées entre les passages 12 et 20, selon les recommandations du fournisseur.

B. Sensibilité des cellules SH-SY5Y aux souches d'EVA71 et de CVA6

1. Isolement viral et préparation de stocks viraux

Les cellules RD (Rhabdomyosarcome ; ATCC) et les cellules MRC-5 (fibroblastes embryonnaires humain) ont été utilisées pour isoler des souches d'EVA71 (n=7) et de CVA6 (n=3) de prélèvements cliniques (bouche, gorge) des patients (**Tableau 4**). Les cellules ont été entretenues par des passages bi-hebdomadaires selon des techniques classiques (lavage avec du PBS stérile et trypsination) et une remise en culture dans le milieu de culture frais. Les cellules ont été cultivées à 37°C avec 5 % de CO_2, dans le milieu de culture d'Eagle modifié par Dulbecco (DMEM) supplémenté avec 10 % de SVF (Eurobio) et 1 % de mélange d'antibiotiques.

Les prélèvements cliniques ont été filtrés avant l'isolement en culture. Afin de disposer d'un volume suffisant de matériel infectieux pour les tests ultérieurs (identification virale, titre infectieux,

cinétique d'infection), plusieurs passages ont été réalisés en inoculant la suspension virale du passage n-1 à une nouvelle culture cellulaire. Les suspensions virales ont été préparées selon la méthode décrite auparavant (Bailly et al, 1991).

La multiplication virale a été détectée par l'apparition d'un effet cytopathique (ECP). Les suspensions virales stocks ont été contrôlées (titre infectieux, type et charge virale) et conservées à –20°C.

2. Test de cinétique de multiplication virale

L'étude de la cinétique de multiplication virale consiste à déterminer l'évolution de la production virale à différents temps après l'inoculation. Les tests ont été réalisés dans des plaques de culture cellulaire de 24 puits dont seuls les huit puits centraux ont été ensemencés (24 h avant le test) avec un volume de 1 mL d'une suspension cellulaire à 200 000 cellules/mL. Les puits périphériques sont remplis de 500 µL de PBS afin de créer un environnement humide.

Les plaques ont ensuite été incubées pendant 24 h à 37 °C. Pour l'inoculation des cellules SH-SY5Y, les différentes suspensions virales ont été préalablement diluées afin d'obtenir une multiplicité d'infection (MOI) de 0,1 et 200 µL ont été ajoutées par puits. Après une incubation pendant 1,5 h post inoculation (pi), les puits sont vidés, lavés avec 600 µL de milieu EMEM sans SVF et remplis avec 400 µL d'EMEM à 5 % de SVF hi. Les plaques ont été incubées pour une durée de 8 h pi, 16 h pi, 24 h pi et 48 h pi et ont été congelées à –20°C à chaque point de la cinétique pour stopper l'infection. Les surnageants de culture de chaque puits ont été récupérés et utilisés pour d'autres analyses.

3. Détermination du titre infectieux

Les surnageants de culture ont été titrés en utilisant les cellules RD afin de déterminer le nombre de particules infectieuses présentes dans les suspensions virales correspondant à chaque point de cinétique. Le titre infectieux a été déterminé par la méthode de dilution en point final en effectuant une série de dilutions de raison 4 des suspensions virales. Dans une plaque de culture de 96 puits, 11 répétitions de 50 µL de chaque suspension virale diluée ont été distribuées dans la plaque et 150 µL de suspension cellulaire à 200 000 cellules/mL ont été ajoutés dans chaque puits. Les plaques ont été incubées à 37°C avec 5 % de CO_2 et observées au microscope optique quotidiennement pendant douze jours afin de déterminer l'apparition d'un effet cytopathique. Le titre infectieux (nombre de particules infectieuses par mL) a été calculé avec un programme du laboratoire utilisant le nombre de puits présentant un ECP pour chaque rang de chaque dilution.

4. Détermination de la charge virale

Pour chaque point de la cinétique, un aliquot de 200 µL de surnageant de culture a été utilisé pour l'extraction de l'ARN viral (voir 3. Extraction de l'ARN viral). La charge virale a été déterminée par une RT-PCR semi-quantitative en temps réel, utilisée pour le diagnostic *in vitro* des EV (voir § ***ci-dessus***).

5. Mise au point d'un modèle cellulaire neuronal différencié (SH-SY5Y)

Pour étudier le neurotropisme des souches d'EV isolées en culture, les cellules SH-SY5Y ont été différenciées *in vitro*. Les cellules SH-SY5Y acquièrent un phénotype neuronal par différenciation lorsqu'elles sont placées dans des conditions de culture adéquates. Ce processus repose sur la privation progressive en SVF, l'adjonction d'acide rétinoïque (RA) et de facteurs de croissance (BDNF) ainsi que l'utilisation de collagène pour mimer la matrice extracellulaire nécessaire à l'adhésion des neurones matures différenciés. A partir de techniques et des pratiques intégrant des méthodes publiées antérieurement (Encinas et al., 2002; Forster et al., 2016; Lopes et al., 2017; Shipley et al., 2017), deux paramètres ont été testés pour la mise au point :

- la concentration en SVF hi (stimulation de la prolifération cellulaire) ;

- la densité cellulaire (viabilité des cellules)

En premier lieu, des plaques de 12 puits ont été enduites de collagène, c'est l'étape de « coating ». Les plaques ont été divisées en 3 sections, chaque section correspondant à une densité cellulaire (150 000, 250 000, 350 000 cellules/mL) et à deux concentrations en SVF hi (5 % et 15 %). Des réplicats de chaque condition expérimentale ont été réalisés **(Annexe 1)**.

DESCRIPTION DES TRAVAUX PERSONNELS

I. Optimisation de la méthodologie pour déterminer le génome complet des EV de l'espèce A à partir des prélèvements cliniques

Dans notre étude, deux approches ont été utilisées pour séquencer le génome complet des EV directement à partir de prélèvements cliniques. La première approche déjà utilisée auparavant dans le laboratoire consistait à amplifier deux fragments chevauchants et couvrant la totalité du génome viral (Hassel et al., 2017). Dans cette partie, nous exposerons seulement les résultats obtenus avec la deuxième approche originale de notre travail qui consiste à amplifier le génome viral complet d'un seul tenant, en utilisant une méthodologie de séquençage de 3ème génération.

A. Mise au point d'une nouvelle méthode d'amplification du génome complet

L'optimisation de la synthèse d'ADNc, a consisté à concevoir et utiliser un oligonucléotide inverse complémentaire spécifique de l'espèce EV A (polyT3NCHEVA01) pour accroître le rendement de la réaction de synthèse de l'ADNc. L'initiation de cette synthèse s'effectue donc depuis la queue poly-A de la région 3'NC. Cette procédure avait pour but de minimiser les problèmes rencontrés par la transcriptase inverse au cours de la synthèse du brin d'ADN complémentaire. L'efficacité de la réaction a été évaluée à partir d'extrait d'ARN, en analysant les résultats de la réaction d'amplification (résultat non montré).

L'amplification du génome complet au cours d'une réaction de PCR unique a été mise au point avec un couple d'oligonucléotides (IFT7R5NC, HEVA3NC) ciblant respectivement les régions 5'NC et 3'NC des génomes de l'espèce EV A. Afin d'améliorer objectivement la sensibilité et l'efficacité de la PCR avec ce couple d'amorces, nous avons recherché la température d'hybridation (T_H) optimale. Bien qu'utilisées en routine pour l'amplification de différentes régions génomiques dans les travaux au laboratoire, nous avons confirmé que les conditions d'amplification avec le couple (IFT7R5NC, HEVA3NC) à une T_H de 72°C et la concentration d'amorces de 10 µM convenaient aussi pour les prélèvements cliniques. Ensuite, deux polymérases – Phusion et Platinum SuperFi DNA Polymerase – présentant une activité de synthèse d'haute-fidélité, ont été testées avec ce couple d'amorces. Le contrôle électrophorétique montrant des amplicons à la taille attendue a indiqué que l'enzyme « Platinum SuperFi DNA Polymerase » apportait les meilleurs résultats par rapport à l'enzyme « Phusion » (résultat non montré).

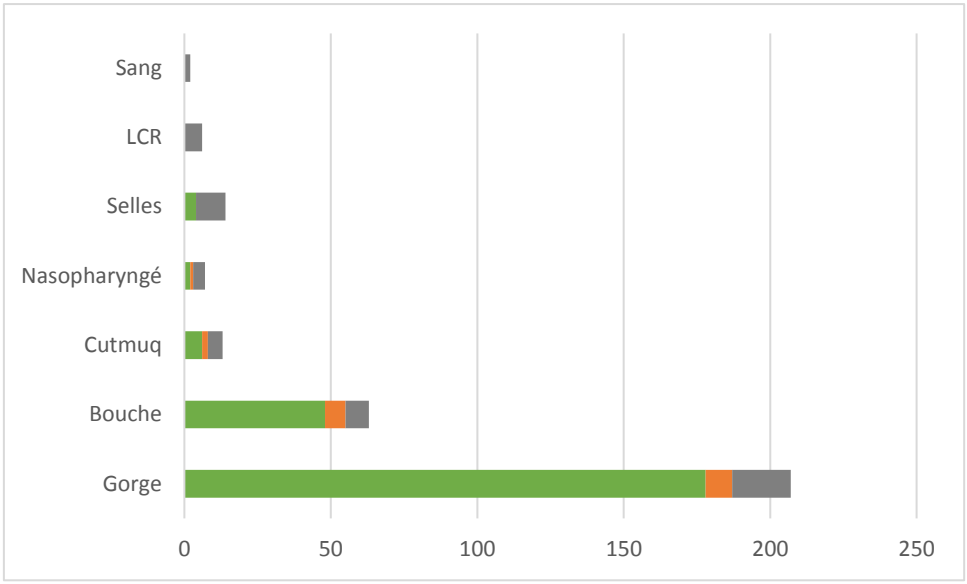


Figure 30 : Amplification du génome viral en un seul amplicon en fonction de la nature du prélèvement clinique analysé. LCS, liquide cérébrospinal ; cutmuq, prélèvement cutanéo-muqueux. Vert, amplification génomique positive ; orange, amplification génomique faible ; gris, amplification génomique négative.

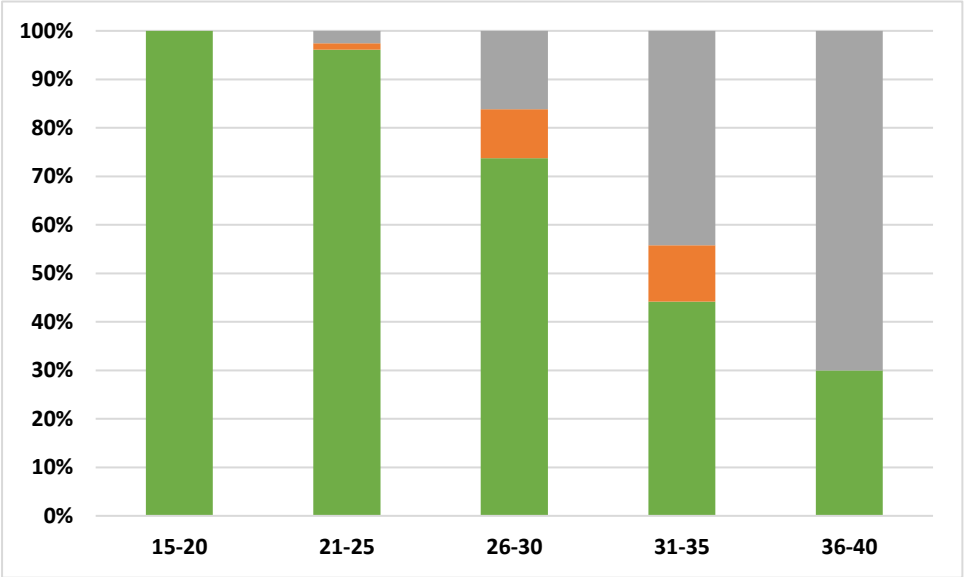


Figure 31 : Amplification du génome viral en un seul amplicon en fonction de la valeur Ct du test PCR réalisé pour le diagnostic virologique (détection du virus dans l'échantillon clinique).

Vert, amplification génomique positive ; orange, amplification génomique faible ; gris, amplification génomique négative.

B. Constitution de l'échantillon des prélèvements cliniques pour le séquençage des génomes complets de CVA6

Après la mise au point méthodologique décrite ci-dessus, nous avons testé la technique sur un total de 312 prélèvements cliniques **(Tableau 9)**. La majorité (n=245 prélèvements cliniques) ont été sélectionnés parmi les enfants ayant présenté une maladie PMB ou une herpangine et des patients ayant présenté une infection à EVA71 (n=52). Les librairies ont été complétées par des prélèvements cliniques dont le typage moléculaire préalable avait identifié un autre type d'EV.

Pour l'étude portant sur le CVA6, nous avons sélectionné les prélèvements cliniques de 245 patients parmi 981, en fonction de caractéristiques phylogénétiques et épidémio-cliniques. Dans un premier temps, la sélection a consisté à retenir les prélèvements pour lesquels les séquences VP1 présentaient une similarité nucléotidique < 99 %. Puis, un total de 245 prélèvements cliniques en proportion du nombre relatif de prélèvements collectés par année et selon les signes cliniques associés ont été sélectionnés. L'échantillon final des prélèvements cliniques analysés était constitué de la façon suivante : PMB atypique, 180 (73,48 %) ; PMB typique, 47 (19,18 %) ; herpangine isolée, 18 (7,34 %). Selon l'intensité de l'amplicon attendu à la taille du génome viral, nous avons classé les résultats de la PCR en trois catégories : positif, faible et négatif **(Annexe 2)**. Les résultats montrent l'obtention d'un amplicon de taille génomique pour 238 (76,3 %) prélèvements, l'intensité d'amplification étant faible pour 19 échantillons (6,1 %). Plus spécifiquement pour les CVA6, le test de RT-PCR ciblée a permis d'obtenir un amplicon de taille génomique pour 224/245 (91,42 %) prélèvements cliniques de patients présentant une infection à CVA6. Sur ces 224 prélèvements, l'amplicon était faible pour 15 (6,12 %) (**Tableau 9**).

Parmi les différents types d'échantillons cliniques testés, l'amplification du génome complet a été positive pour une grande proportion de prélèvements de gorge (86 %) et de bouche (76,2 %). Pour tous les prélèvements de LCR et de sang, la PCR en un seul amplicon a été négative **(Figure 30)**. Les valeurs de Ct du test RT-PCR effectué lors du diagnostic virologique étaient disponibles pour 249 (79,8 %) prélèvements testés et variaient entre 15 et 37,8 (médiane 25). Le rendement de l'amplification chute considérablement pour des valeurs Ct > 30 (44 % de résultats négatifs pour des Ct compris entre 31 et 35 et 70 % pour des Ct compris entre 36 et 39) **(Figure 31)**.

C. Application de la méthode SMRT PacBio au séquençage du génome complet des EV

Les amplicons analysés pour réaliser cette étude ont été distribués dans trois librairies d'ADN indépendantes, analysées en une série de séquençage (une seule cellule SMRT). Les résultats des lectures ont été analysés individuellement pour chaque librairie.

Tableau 9 : Résultats de l'amplification du génome complet (en un seul amplicon) par type d'entérovirus

Type	Amplification positive	Amplification faible	Amplification négative	Total
EV-A71	19 (36,2 %)	3 (5,8 %)	30 (57,7 %)	52
CVA16	3 (75 %)	0	1 (25 %)	4
CVA10	1 (33,3 %)	0	2 (66,7 %)	3
CVA8	2 (100 %)	0	0	2
CVA6	209 (85,3 %)	15 (6,12 %)	21 (8,5 %)	245
CVA5	2 (66,7 %)	0	1 (33,3 %)	3
CVA4	2 (66,7 %)	1 (33,3 %)	0	3
Total	238 (76,3 %)	19 (6,1 %)	55 (17,6 %)	312

Tableau 10 : Résultats de trois séries (96 échantillons chacune) de séquençage réalisé par la technologie Pacific Biosciences (PacBio).

	Librairie 1	Librairie 2	Librairie 3
Résultats après génération des CCS			
Nombre de (lectures de la polymérase) CCS	505 649	521 730	665 105
Nombre de « subreads »	4 571 660	3 608 692	5 319 387
Nombre moyen de « subreads » par lecture	9	6,9	8
Résultats après filtrage des subreads			
Nombre de CCS	201 359	162 812	274 118
Nombre de « subreads »	3 787 027	2 790 358	4 104 179
Nombre moyen de « subreads » par CCS	18,8	17,1	15
Résultats après démultiplexage			
Nombre de CCS attribués	108 510	88 608	171 991
Nombre moyen de CCS par code-barres (nombre moyen de CCS qui ont été attribués selon les codes-barres utilisés pour identifier les échantillons)	1 790	1 748	1 864
Nombre de génomes obtenus	95	95	96
Nombre moyen de séquences par échantillon	1066	865	1 709
Echantillons analysés			
CVA6	81	96	49
EV-A71	15	-	-
Autres types ou contrôles	-	-	47

Après la phase de démultiplexage, le nombre de CCS collectés pour chaque librairie était de 108 510 (librairie 1), 88 608 (librairie 2) et 171 991 (librairie 3).

La qualité des subreads résultants pour chacun des runs et le nombre moyen de CCS obtenu pour chaque code-barres (correspondant à un échantillon) sont indiqués dans le **Tableau 10.** Le taux d'erreur de la séquence la plus représentée par code-barre était supérieure à 0,9999 pour la majorité des échantillons. Nous avons noté que le nombre de sous-lectures était faible (<80) avec des séquences de pauvre qualité pour un seul code-barre parmi les 214 amplicons séquencés. Les différentes étapes de traitement de séquences ont été effectuées sur des séquences consensuelles générées à partir des sous-lectures d'un seuil de similarité minimum de 80 % pour chaque CCS par échantillon.

II. Origine et analyse du nouveau variant d'EVA71 C1 variant 2015

Les résultats de cette étude ont été valorisés par la publication d'un article intitulé « Multirecombinant Enterovirus A71 Subgenogroup C1 Isolates Associated with Neurologic Disease, France, 2016-2017 », publié dans le journal « Emerging Infectious Diseases (2019) 25(6):1204-1208» **(Annexe 3)**.

A. Recrudescence des infections à EVA71 en France en 2016

En 2016, 151 infections à EVA71 ont été diagnostiquées à travers les 3 systèmes de surveillance ; 82 (54,1 %) infections étaient associées à un nouveau variant d'EVA71 C1 dont 74 rapportées par le RSE, 3 par la surveillance ambulatoire de la maladie PMB et 5 par la surveillance en crèche. En 2017, 22 infections ont été rapportées dont 20 associées au nouveau variant (RSE, n = 19 ; Surveillance ambulatoire, n = 3). En comparaison, 97 infections avaient été rapportées de 2013 à 2015 et toutes étaient associées au sous-génogroupe C2.

Comme précisé dans la première partie, l'émergence de ce nouveau variant s'est accompagnée d'une augmentation du nombre de cas d'atteintes neurologiques sévères ayant fait l'objet d'une alerte sanitaire et d'une surveillance renforcée par Santé publique France (Antona et al., 2016). Afin d'analyser plus précisément l'origine évolutive de ce nouveau variant, 32 échantillons cliniques collectés en 2016 (n = 31) et 2017 (n = 1) de 25 patients ont été analysés. Les manifestations cliniques associées étaient les suivantes : détresse cardiorespiratoire, n = 1 ; encéphalite, n = 2 ; cérébellite, n = 2 ; syndrome méningé, n = 3 ; fièvre du nourrisson, n = 8 (dont 1 avec hypotonie et/ou sepsis) ;

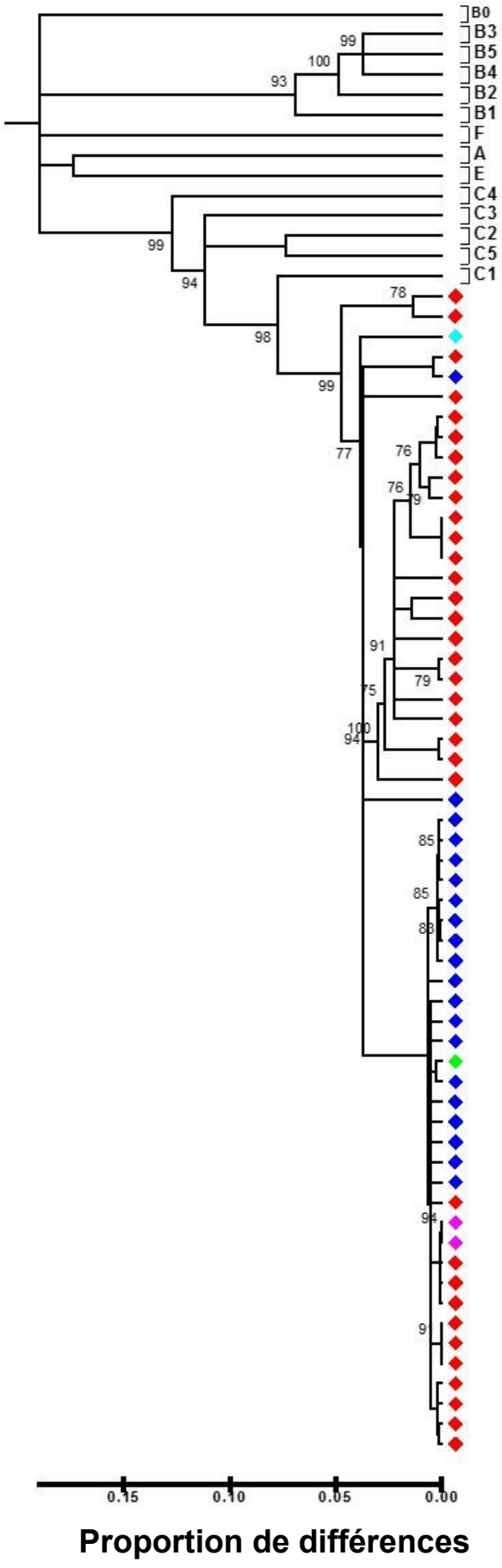


Figure 32 : Arbre phylogénétique inféré avec des séquences 1DVP1 représentant chaque génogroupe de l'EV-A71

Les distances ont été estimées avec l'algorithme de p-distance (matrice des proportions de différences nucléotidiques) et l'arbre a été construit avec la méthode « neighbor joining ». Seules les valeurs de bootstrap ≥70% sont montrées pour les nœuds qui indiquent une parent génétique considérée comme fiable. Les taxons correspondant au virus C1v2015 sont indiqués par des losanges colorés en fonction de l'origine géographique des séquences : France (rouge), Allemagne (bleu), Pologne (vert), Japon (rose), USA (turquoise).

maladie pied-main-bouche/herpangine, n = 4. Le virus était présent de façon asymptomatique dans les selles de 5 enfants de moins de 3 ans.

B. Emergence du virus C1v2015, un nouveau variant de l'EVA71

De 2007 à 2015, les données de surveillance montrent que le sous-génotype C2 était majoritaire parmi les infections à EV rapportées en France. En 2016, on note la recrudescence des infections à EVA71 associées à des atteintes neurologiques sévères et la réémergence simultanée du sous-génogroupe C1, après 9 années pendant lesquelles ce virus n'avait pas été rapporté. L'étude de cette réémergence virale a donc été entreprise pour déterminer l'origine évolutive du virus et rechercher l'existence de liens épidémiologiques avec la circulation du CVA6.

Les séquences $1D^{VP1}$ ont été déterminées dans 32 prélèvements et elles ont été comparées avec 199 séquences homologues de l'EVA71 C1 disponibles dans GenBank. Les résultats de l'analyse phylogénétique montrent que les séquences détectées chez les 25 cas d'infections sont étroitement apparentées entre elles et avec des séquences rapportées chez des patients en Allemagne en 2015. La phylogénie indique que ces séquences forment un clade bien distinct des séquences rapportées au cours des années antérieures et de ce fait, nous avons désigné le virus associé à ces infections « EVA71 C1 variant 2015, C1v2015 » **(Figure 32)**.

Devenu majoritaire en 2017, le virus C1v2015 (n = 19/21 ; 90,47 %) a été associé aux tableaux neurologiques suivants : myélite (n = 1), rhombencéphalite (n = 2) et encéphalite (n = 4). Les données du typage moléculaire en 2018 confirment le remplacement du sous-génogroupe C2 par le virus C1v2015 (n = 27/29 ; 93,1 %).

Les données cliniques étaient disponibles pour 30/31 cas d'infections à EVA71 : 13 patients ont été diagnostiqués dans le cadre de la surveillance ambulatoire de la maladie PMB et les 17 autres patients, dont l'infection a été rapportée par le RSE, ont tous été hospitalisés (17/30, 56,6 %).

C. Structure génomique recombinante du virus C1v2015

Une analyse exploratoire a tout d'abord été effectuée pour rechercher une possible origine recombinante du génome du virus C1v2015. Les séquences de la région génomique 3CD du virus C1v2015 ont été comparées à l'aide d'une analyse BLASTn à celles disponibles dans GenBank. Les résultats de cette analyse montraient que les séquences C1v2015 présentaient entre 90 et 95 % de similitude avec des séquences de différents types de CVA provenant de la Russie et du Turkménistan.

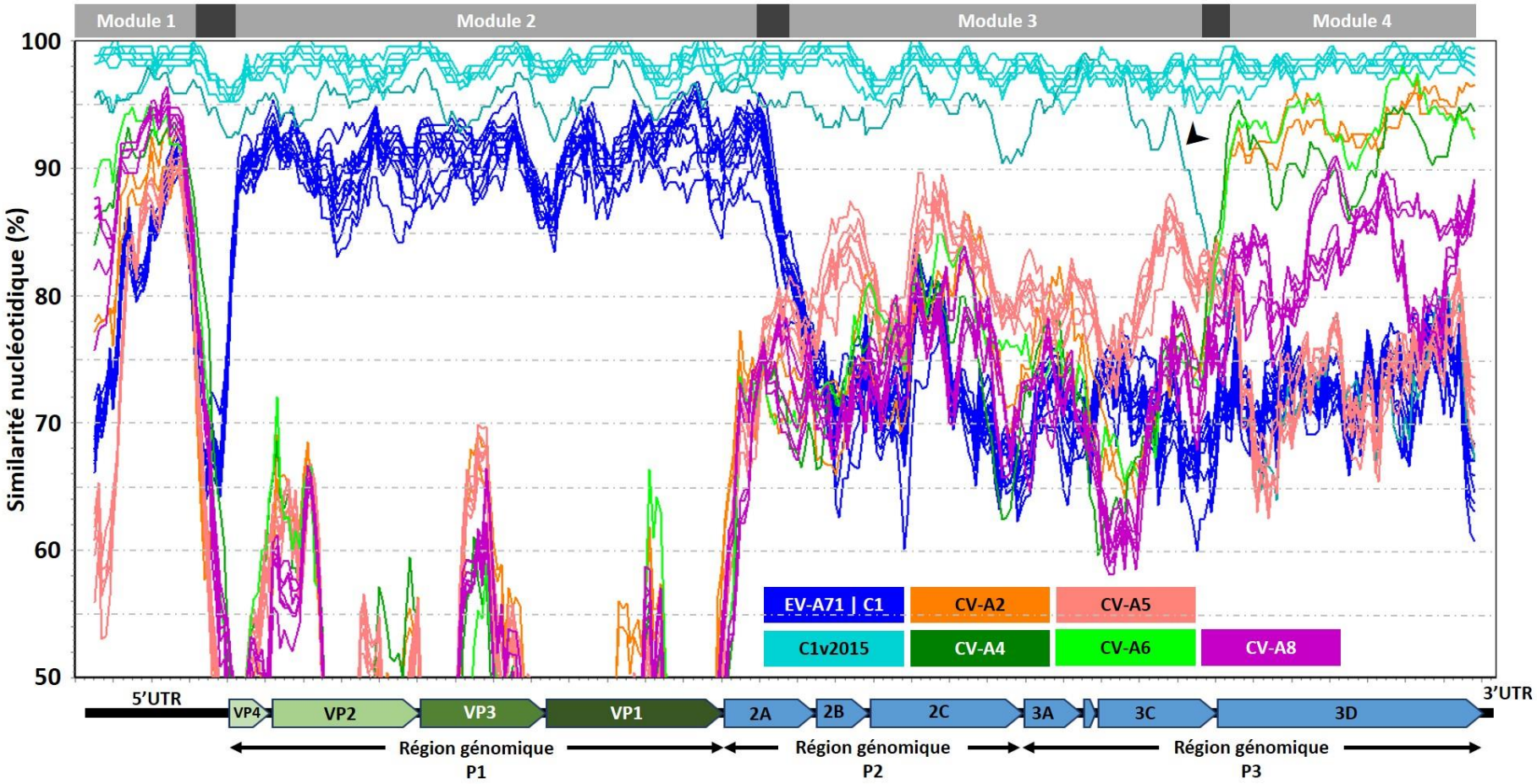


Figure 33 : Structure génomique en mosaïque de l'EVA71 C1v2015. Analyses de similitude des différentes séquences génomiques d'EVA, avec la séquence génomique EV-A71|C1v2015|250102 comme référence. Un schéma indiquant l'organisation génomique du C1v2015 et les régions structurales et non structurales est présenté. Les profils de similitude sont codés en couleur selon le type d'EV.

Les résultats de cette analyse suggéraient une parenté génétique avec des virus d'origine géographique différente : Pays-Bas, Russie et Turkménistan. Ces résultats ont motivé une collaboration avec le Dr Kimberley Benschop (National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven, the Netherlands) et le Dr Alexander Lukashev (Sechenov University, Moscow, Russia) qui avaient décrit les séquences déposées dans GenBank.

Pour poursuivre l'analyse, 18 génomes complets du virus C1v2015 ont pu être déterminés directement à partir de 20 prélèvements cliniques disponibles et comparés à ceux de 68 autres EV A**.** Cet échantillon comprenait en particulier des virus C1 décrits antérieurement au virus C1v2015 et les CVA identifiés lors de l'analyse exploratoire CVA2 (n = 2), CVA6 (n = 1) et CVA7 (n = 1). Des génomes de 2 autres types (CVA5, n = 10 ; CVA8, n = 8) ont aussi été ajoutés pour constituer un échantillon d'analyse comprenant 70 génomes. L'analyse de similarité nucléotidique a été effectuée avec l'alignement des génomes **(Figure 33)**. Les profils d'analyse comparative montrent clairement que tous les génomes C1v2015 sont colinéaires entre eux depuis la région 5'NC jusqu'à la région 3'NC. Ils montrent aussi des variations brutales du pourcentage de similarité nucléotidique qui indiquent que les génomes C1v2015 possèdent quatre modules distincts. Une analyse statistique a été réalisée pour déterminer si certains modules pouvaient avoir été hérités par recombinaison génétique. Deux sites délimitant des régions génomiques ayant des origines génétiques distinctes ont été identifiés (p-value < 10^{-5}) avec au minimum 3 des 7 méthodes d'analyses appliquées (RDP, GENECONV, Bootscan, MaxChi, Chimera, Siscan et 3SEQ).

Le module 1 concerne la région 5'NC. Le profil de similarité nucléotidique au niveau de cette région doit être considéré avec prudence car beaucoup de variations nucléotidiques compensatrices surviennent pour conserver les structures secondaires. La région 5'NC du virus C1v2015 présente une similarité nucléotidique entre 90-95 % avec deux autres types, CVA6 et CVA8.

La similarité nucléotidique est inférieure à 88 % avec les séquences génomiques de l'EVA71 C1 antérieur au virus C1v2015.

En conséquence, la région 5'NC du génome du C1v2015 a potentiellement été héritée des génomes des CVA. Le site précis de la recombinaison génétique reste indéterminé parce que la région 5'NC est terminée par une zone d'environ 100 nucléotides soumise à un taux élevé de substitutions nucléotidiques qui brouille l'analyse.

Le module 2 comprend la région P1. Le profil de similarité nucléotidique montre que cette portion du génome du virus C1v2015 présente plus de 90 % de similitude nucléotidique avec les séquences de l'EVA71 C1. Ces résultats confirment que le virus C1v2015 a hérité "en bloc" de la région codant les protéines de la capside virale d'un EVA71 du sous-génogroupe C1. Les extrémités 5' et 3' de ce module sont situées respectivement dans la région 5'NC et le gène de la protéase 2A. Le site 3' de recombinaison a été confirmé par l'analyse statistique **(Tableau 11)**.

Tableau 11 : Analyse statistique des sites potentiels de recombinaison dans les génomes de l'EV-A71 C1v2015 [a]

Méthode	Module 1	Module 2	Module 3	Module 4
RDP	$1{,}405 \times 10^{-78}$	$1{,}520 \times 10^{-17}$	$7{,}029 \times 10^{-79}$	$6{,}113 \times 10^{-26}$
Geneconv	$3{,}209 \times 10^{-62}$	/	$1{,}604 \times 10^{-62}$	/
BootScan	$1{,}518 \times 10^{-79}$	$7{,}330 \times 10^{-10}$	$7{,}592 \times 10^{-80}$	$3{,}894 \times 10^{-37}$
MaxChi	$1{,}285 \times 10^{-22}$	$5{,}802 \times 10^{-04}$	$6{,}429 \times 10^{-23}$	$2{,}647 \times 10^{-09}$
Chimaera	$2{,}330 \times 10^{-12}$	/	$1{,}165 \times 10^{-12}$	$9{,}706 \times 10^{-17}$
SiScan	$1{,}108 \times 10^{-22}$	$8{,}753 \times 10^{-60}$	$2{,}828 \times 10^{-27}$	$2{,}337 \times 10^{-32}$
3Seq	$5{,}766 \times 10^{-39}$	/	$2{,}883 \times 10^{-39}$	/

[a] La valeur-*p* est indiquée pour chaque méthode lorsque le résultat est statistiquement significatif. /, $p > 0{,}05$.

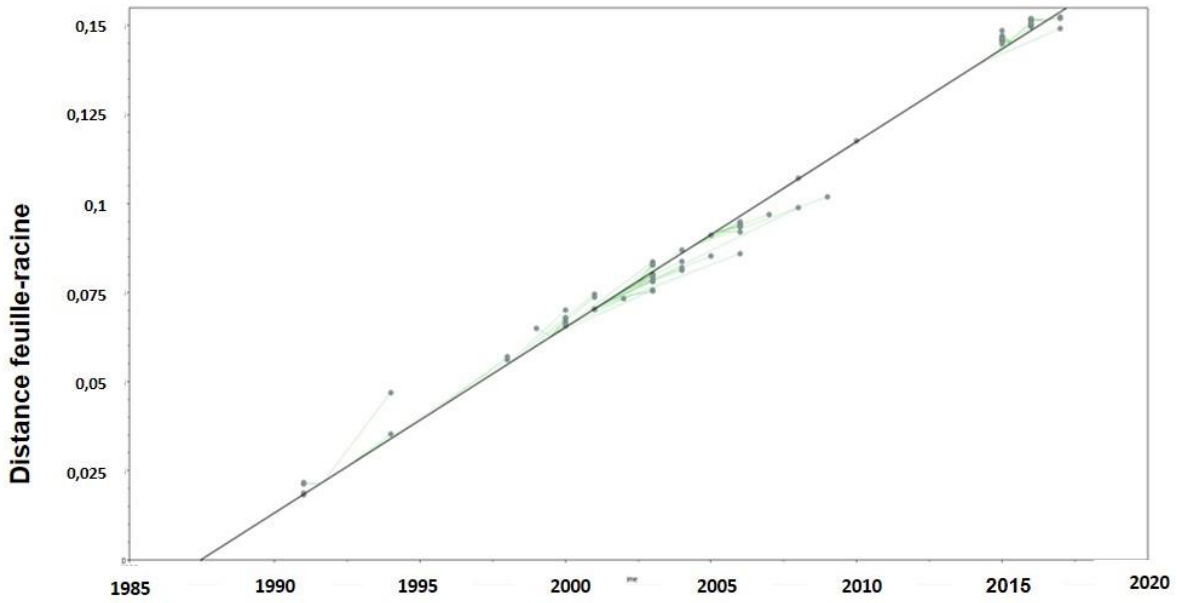


Figure 34 : Régression linéaire de la distance feuille-racine par rapport à l'année d'obtention des prélèvements biologiques dans lesquels les séquences ont été déterminées

L'analyse a été réalisée avec l'arbre phylogénétique reconstruit pour un jeu contenant 85 séquences C1 correspondant à la région P1. L'algorithme recherche la racine qui permet d'optimiser la relation linéaire entre les distances (distance feuille-racine de l'arbre) et le temps (année d'obtention des prélèvements biologiques) est recherchée par la méthode statistique de régression implémentée dans le logiciel TempEst. La liaison entre les deux variables a été évaluée par le coefficient de corrélation (ici estimé à 0,98) et le coefficient de détermination R^2. L'intersection de la droite de régression linéaire avec l'axe des abscisses donne une approximation de l'âge de l'ancêtre commun le plus récent (TMRCA) de l'échantillon des séquences analysées.

Le module 3 désigne un fragment du génome viral comprenant les séquences codant les protéines 2Apro, 2B, 2C, 3A, 3B et 3Cpro. Cette portion du génome du virus C1v2015 présente une faible similarité nucléotidique avec toutes les séquences génomiques des autres EV disponibles dans GenBank. Les pourcentages de similarité les plus élevés mais < 90 %, ont été trouvés avec des génomes de souches assignées au type CVA5, ce qui indique des relations génétiques éloignées **(Figure 33)**. La conclusion est que les séquences codantes de ce fragment ont été transférés dans le génome du virus C1v2015 par un (voire plusieurs) événement(s) de recombinaison à partir de lignées EV A non encore identifiées.

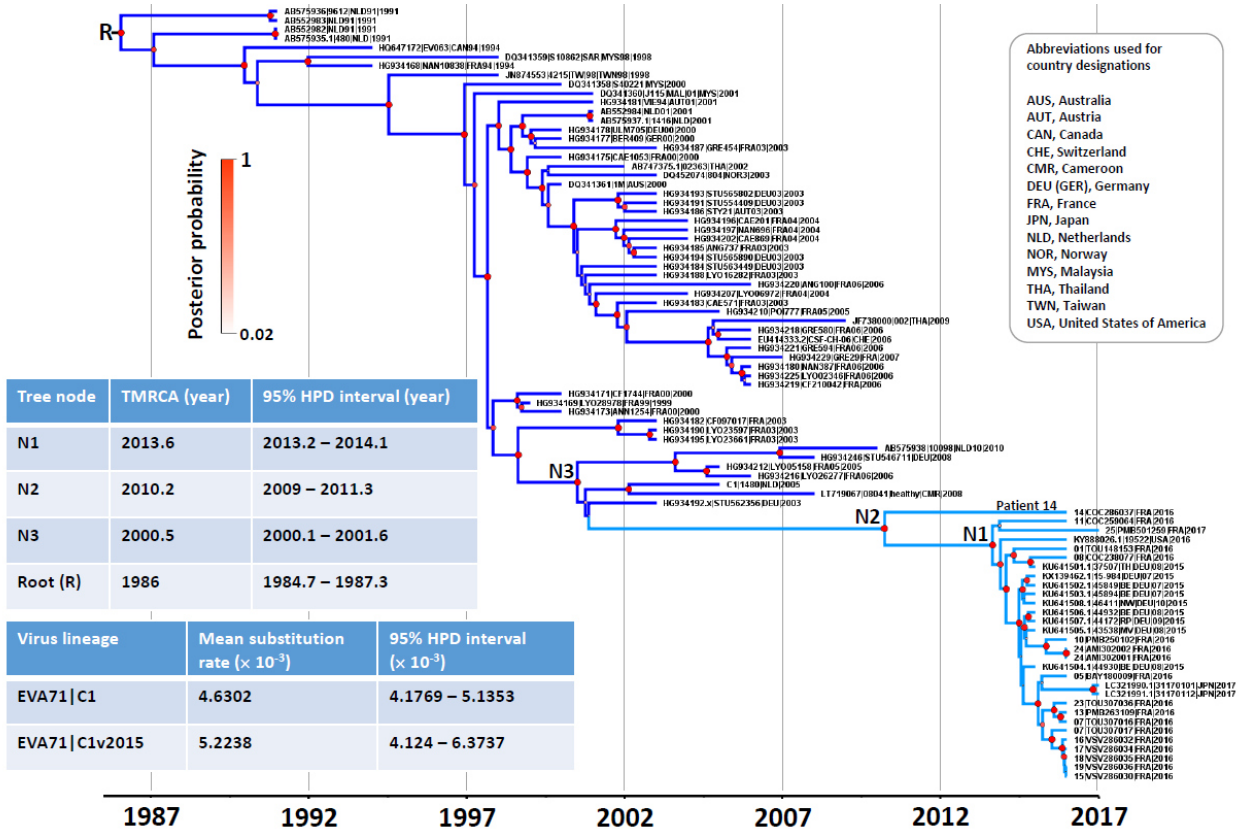
Le module 4 correspond à la totalité du gène 3Dpol dans le génome d'un EV. Ce fragment génomique du variant C1v2015 présente une similitude nucléotidique comprise entre 90 et 95 % avec des génomes de souches assignées à différents types et collectées dans plusieurs pays **(Figure 33)**. Il s'agit de virus rapportés en Russie (assignés aux types CVA2 et CVA5), au Turkménistan (types CVA6 et CVA7) et en Chine (type CVA4). L'extrémité 5' du module 4 a été située de façon statistiquement fiable à proximité de la jonction entre les gènes 3C et 3D **(Tableau 11)**.

Un résultat intrigant de l'analyse de similarité concerne le génome complet déterminé dans le prélèvement COC286037|FRA|2016 (patient 14). Ce génome possède un gène 3Dpol distinct de celui des autres virus variants C1v2015 **(Figure 33)**. Ce résultat suggère donc que plusieurs événements de recombinaison ont affecté la même région du génome C1v2015 et qu'il existe une forme majoritaire et au moins une forme minoritaire.

D. Histoire évolutive du virus variant C1v2015

1. Estimation de l'horloge moléculaire pour le jeu des séquences de la région P1

D'après les travaux antérieurs du laboratoire et ceux publiés dans la littérature, le jeu de données le plus adapté pour dater l'origine du virus C1v2015 par rapport aux souches C1 ayant circulé avant le variant, correspond aux séquences de la région génomique P1. Nous avons tout d'abord analysé le signal de l'horloge moléculaire dans un jeu de données comprenant 85 séquences permettant une comparaison des séquences C1 (n = 54) et celles du variant C1v2015 (n = 18). Les distances « feuille / racine » calculées à partir d'un arbre phylogénétique reconstruit pour ce jeu de séquences par la méthode du maximum de vraisemblance, ont été soumises à une analyse de régression linéaire par rapport aux dates de détection des souches de virus **(Figure 34)**. Les coefficients de détermination R^2 et de corrélation étaient égaux à 0,99.



Tree node	TMRCA (year)	95% HPD interval (year)
N1	2013.6	2013.2 – 2014.1
N2	2010.2	2009 – 2011.3
N3	2000.5	2000.1 – 2001.6
Root (R)	1986	1984.7 – 1987.3

Virus lineage	Mean substitution rate ($\times 10^{-3}$)	95% HPD interval ($\times 10^{-3}$)
EVA71|C1	4.6302	4.1769 – 5.1353
EVA71|C1v2015	5.2238	4.124 – 6.3737

Figure 35 : Chronogramme inféré avec les séquences de la région génomique P1 du sous-génogroupe C1 de l'EV-A71. Les branches en bleu foncé indiquent les séquences C1 antérieures au variant C1v2015 (bleu clair). La probabilité postérieure est indiquée par la taille et l'intensité de la couleur rouge des cercles aux différents nœuds.

Ce résultat a été confirmé par l'analyse d'un jeu de données récent incluant un plus grand nombre de séquences (58 séquences C1 et 51 séquences C1v2015 ; R^2 = 0,98 ; données non montrées). Pour le jeu des séquences P1, la corrélation entre les distances génétiques et les dates auxquelles les prélèvements biologiques avaient été obtenus est donc très satisfaisante. Cette corrélation indique qu'un modèle d'horloge moléculaire assouplie peut donc être utilisé pour analyser le jeu de séquences P1 en utilisant une approche bayésienne pour reconstruire la généalogie des lignées.

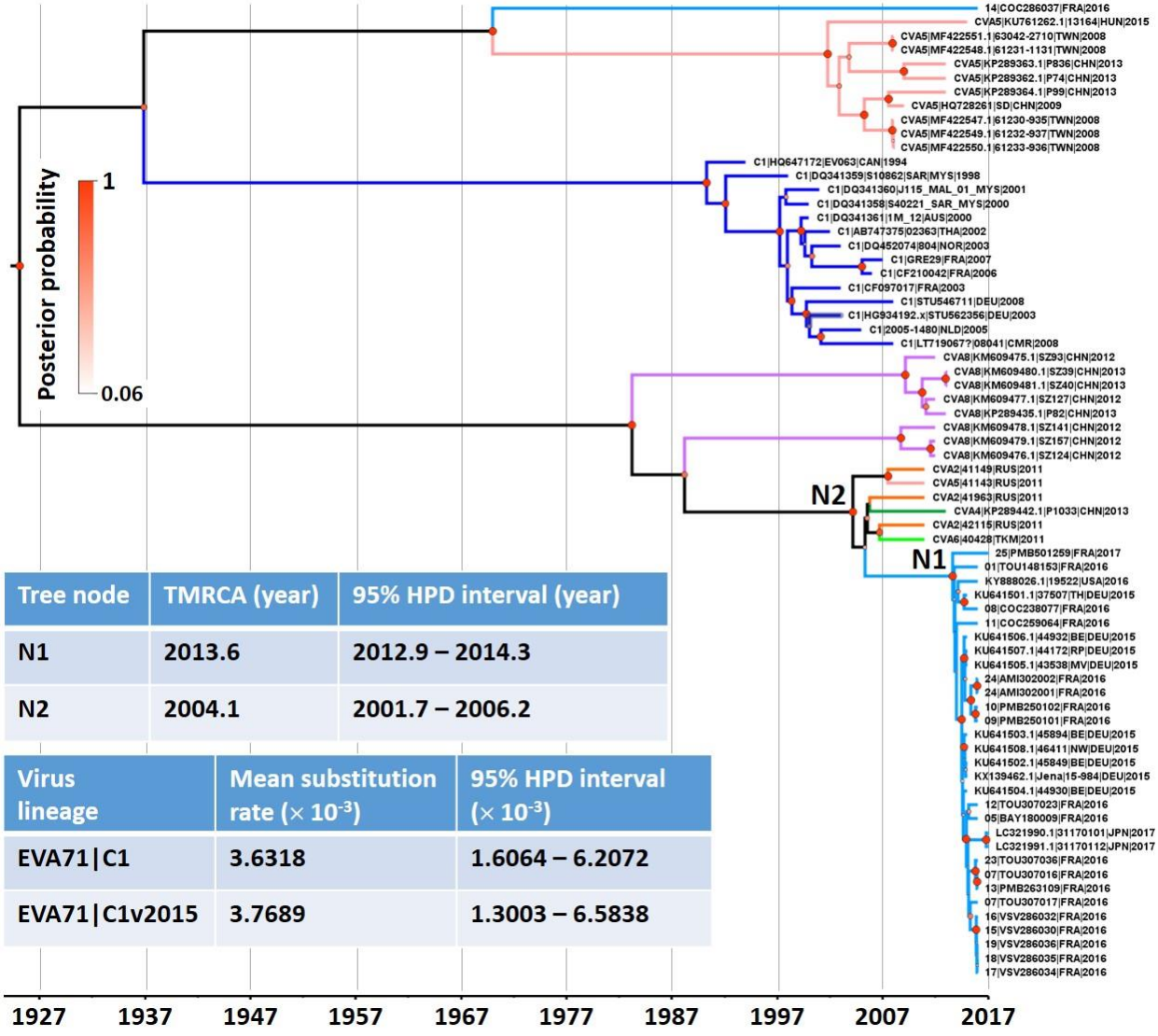
2. Taux d'évolution de la région génomique P1

Sur la base de la corrélation établie par les analyses précédentes, la généalogie du sous-génogroupe C1 a été estimée avec l'échantillon de 85 séquences P1 **(Figure 34).** Nous avons déterminé les relations évolutives entre les virus C1v2015 et C1, et daté le début de la transmission des virus variants en Europe. Toutes les séquences P1 du C1v2015 sont regroupées de façon fiable (probabilité postérieure, pp = 0,9) dans une même lignée distincte (monophylétique) des séquences C1 rapportées entre 1991 et 2010. La relation étroite entre des séquences P1 rapportées en Allemagne, aux États-Unis, au Japon et en France sur une courte période d'échantillonnage (2015–2017), est révélatrice d'une transmission rapide et généralisée du virus C1v2015.

Avec un taux de substitutions nucléotidiques t = 5,2238 [intervalle de crédibilité à 95 %, 4.124–6.374] × 10^{-3} substitutions nucléotidiques / site / an, la lignée C1v2015 évolue de façon comparable à la lignée antérieure C1 (t = 4,63 [IC 95 % = 4,177–5.135] × 10^{-3} substitutions nucléotidiques / site / an). En conséquence, la longueur de la branche qui relie les deux lignées ne résulte pas d'une augmentation de la vitesse d'évolution de la lignée variante mais indique une absence d'échantillonnage des virus pendant la période considérée, entre 2000 et 2014.

Les séquences nucléotidiques P1 assignées aux lignées C1 et C1v2015 diffèrent de 9 % et les séquences de la lignée C1v2015 présentent au maximum 2 % de différences nucléotidiques entre elles (exception faite de la séquence COC286037|FRA|2016 déterminée chez le patient 14). La séquence détectée chez ce patient présente 4,8 % de différences nucléotidiques par rapport aux autres séquences C1v2015.

L'arbre phylogénétique inféré à partir des séquences P1 suggère que la transmission interindividuelle du virus C1v2015 a commencé entre 2009 et 2011, et que sa propagation a été maintenue jusqu'en 2013 – 2014, un an avant que ce virus ne soit rapporté pour la première fois en Allemagne et deux ans avant sa diffusion épidémique en France et en Espagne **(Figure 35 ; nœud 1)**. Le dernier ancêtre commun parmi le sous-génogroupe C1 est daté entre 2000 et 2001 **(Figure 35 ; nœud 3)**.



Tree node	TMRCA (year)	95% HPD interval (year)
N1	2013.6	2012.9 – 2014.3
N2	2004.1	2001.7 – 2006.2

Virus lineage	Mean substitution rate ($\times 10^{-3}$)	95% HPD interval ($\times 10^{-3}$)
EVA71|C1	3.6318	1.6064 – 6.2072
EVA71|C1v2015	3.7689	1.3003 – 6.5838

Figure 36 : Chronogramme inféré avec les séquences 3Dpol du variant C1v2015 et des partenaires potentiels de recombinaison génétique. La probabilité postérieure est indiquée par la taille et l'intensité de la couleur rouge des cercles aux différents nœuds.

Compte tenu des intervalles de crédibilité à 95 % calculés pour les dates des ancêtres communs les plus récents correspondants aux nœuds 1 et 3, l'émergence du virus C1v2015 se serait donc produite entre 2000 et 2014, période durant laquelle il n'a pas été rapporté de façon prospective. Le virus a été détecté rétrospectivement dans des échantillons cliniques collectés au Danemark en 2014 (Midgley et al., 2018).

La généalogie montre que sept séquences du sous-génogroupe C1 détectées en Afrique (Cameroun) et en Europe (Allemagne, France et Pays-Bas) sont situées à la base de la branche C1v2015 **(Figure 35 ; nœud 3)**. Cette topologie phylogénétique suggère que la souche C1 impliquée dans l'émergence du virus C1v2015 a pu circuler au cours des années 2000, dans une population répartie dans une vaste région géographique.

3. Datation de l'évènement de recombinaison du gène $3D^{pol}$

Nous avons aussi utilisé l'analyse phylogénétique pour dater l'origine du segment génomique $3D^{pol}$ issu d'évènements de recombinaison génétique pour analyser le rôle de ces remaniements génomiques dans l'évolution des populations virales. Un jeu de données a donc été constitué en assemblant les séquences du gène $3D^{pol}$ du virus C1v2015 et celles d'autres types d'EV A. Nous avons inclus les séquences de CVA les plus apparentées en excluant celle issue de la souche de CVA7 car elle contenait un site de recombinaison.

Pour ce jeu de séquences, la corrélation entre les distances génétiques et les dates auxquelles les prélèvements biologiques ont été obtenus est moins satisfaisante (R^2 = 0,40 ; coefficient de corrélation = 0,64). La généalogie a été établie pour ce jeu de séquences **(Figure 36)**.

Le taux d'évolution des séquences $3D^{pol}$ du virus C1v2015 est de 5,38 [IC95 % = 2,99–7,8] × 10^{-3} substitutions nucléotidiques / site / an). Nous avons évalué le début de la transmission du gène $3D^{pol}$ présent chez le virus C1v2015 entre 2010 et 2014, une période qui correspond à celle de l'émergence du variant évaluée avec la généalogie établie pour la région P1.

Malgré les différences d'échantillonnage des deux jeux de séquences, les données phylogénétiques soutiennent l'existence d'une association temporelle entre le brassage de gènes $3D^{pol}$ et l'émergence épidémiologique du variant C1v2015. La généalogie indique clairement une origine différente de la séquence $3D^{pol}$ présente dans le génome déterminé chez le patient 14 (souche COC286037|FRA|2016). L'échantillonnage ne permet pas de dater son origine récente.

Tableau 12. Variations moléculaires dans les protéines de capside du virus C1v2015 par rapport aux séquences protéiques des virus C1 circulant antérieurement.

Protéine	Substitution en acide aminé	Observations	Localisation dans la protéine et la capside
VP1	V16M	Variation retrouvée dans les séquences C1v2015 à l'exception de celles associées aux infections asymptomatiques	Extrémité N-term Position interne (contact du génome)
VP2	I170V	Variation présente uniquement dans certaines séquences C1v2015	Boucle E-F (base de l'extrémité 3' du Puff) Position interne
	V217A	Variation spécifique aux séquences C1v2015 associées aux infections asymptomatiques	Feuillet βH Position interne
VP3	N93D	Variation retrouvée dans toutes les séquences C1v2015	Boucle C-D Position externe
	A232S	Variation présente uniquement dans toutes les séquences C1v2015	Extrémité C-term Position externe
	T238I	Variation spécifique aux séquences C1v2015 associées aux infections asymptomatiques	Extrémité C-term (Position interne)

Abréviations (code à une lettre pour les acides aminés) : V, valine ; M, méthionine, I, isoleucine ; A, alanine ; N, asparagine ; S, sérine ; T, thréonine.

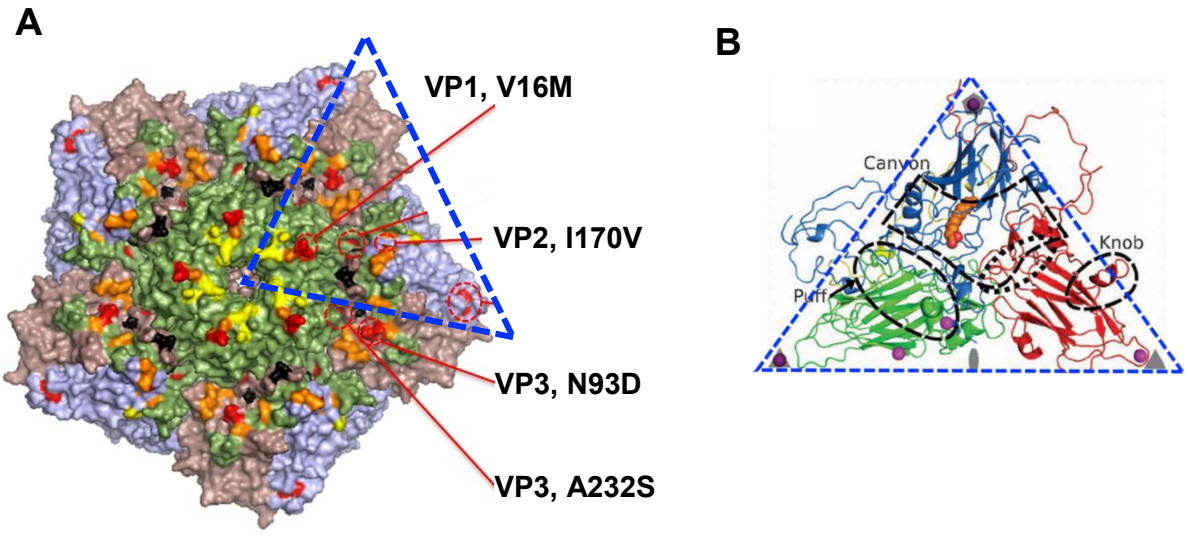


Figure 37 : (A) Localisation des différentes variations moléculaires identifiées pour les souches d'EV-A71 C1v2015. (B) Représentation de la configuration d'un protomère au sein de la capside icosaédrique

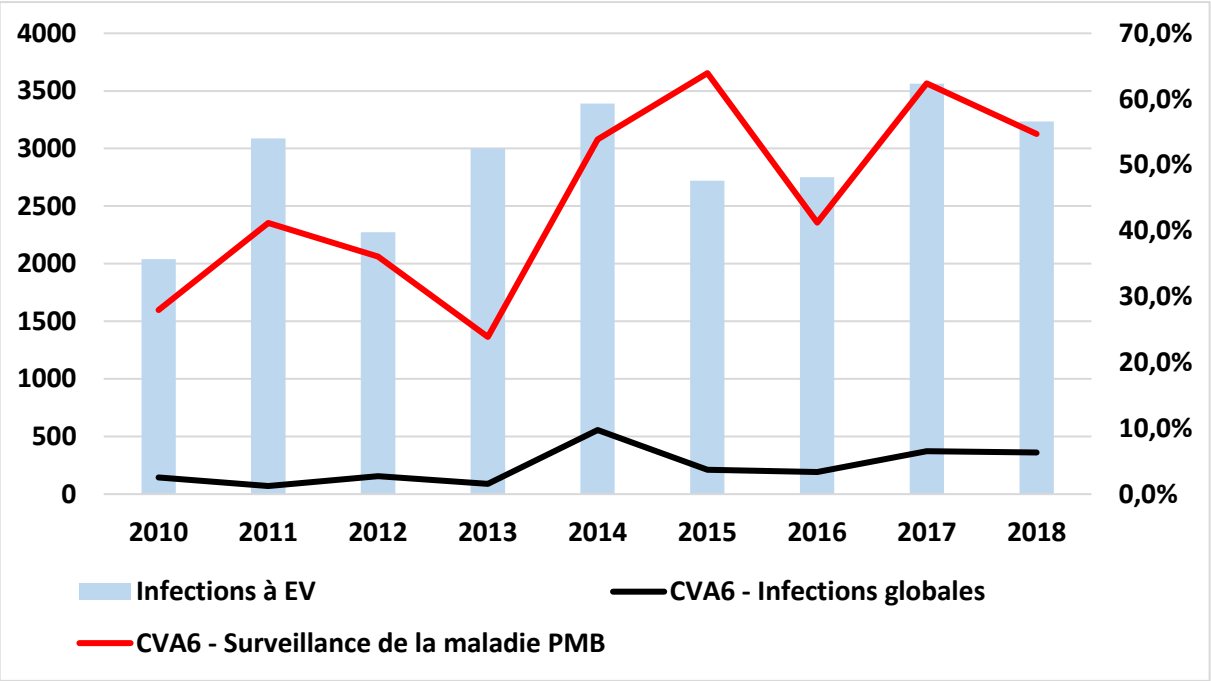


Figure 38A : Distribution annuelle des infections à CVA6, France, 2010-2018

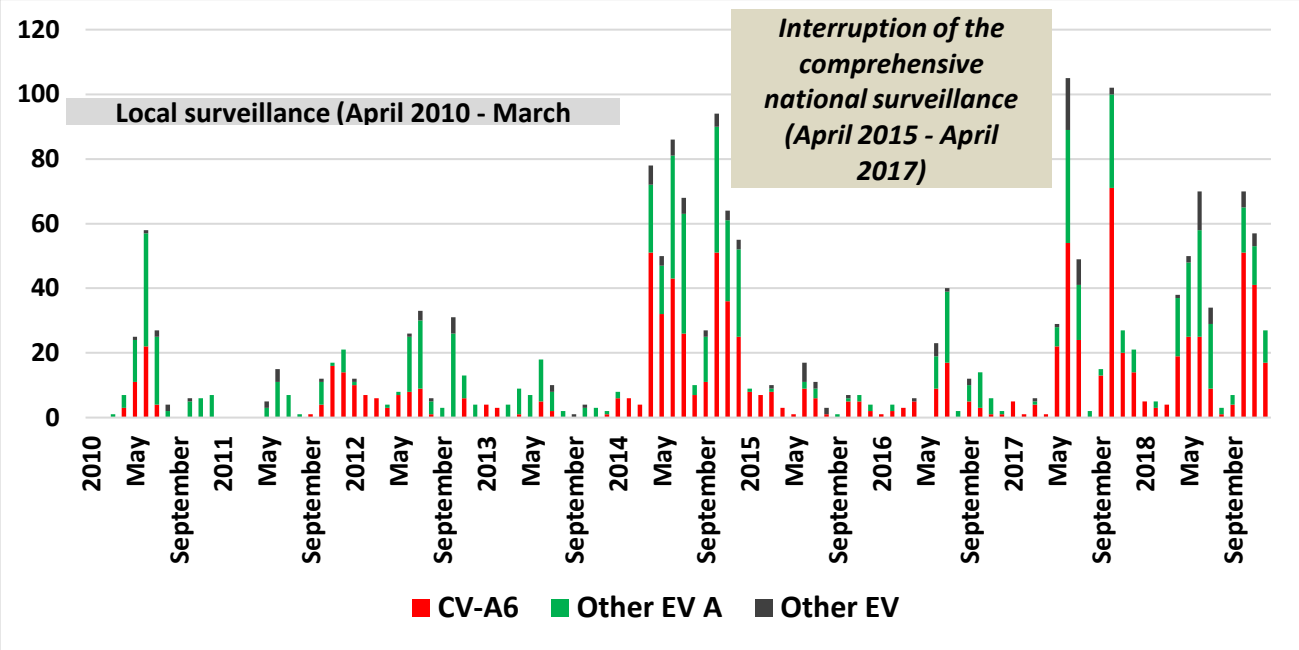


Figure 38B : Distribution des infections à CVA6 et des autres types d'EV au cours de la surveillance ambulatoire de la maladie PMB, France, 2010-2018

Tableau 13 : Données démographiques et cliniques des patients hospitalisés et infectés par un CVA6

	All CVA6 infections (n=981)	2010 (n=40)	2011 (n=35)	2012 (n=57)	2013 (n=16)	2014 (n=298)	2015 (n=55)	2016 (n=47)	2017 (n=229)	2018 (n=204)	*p*
Démographie											
Age (année)	1,52 [1,05-2,21]	1,76 [1,17-2,72]	1,80 [1,25-2,38]	1,58 [1-2,24]	2,27 [1,33-3,48]	1,56 [1,05-2,19]	1,47 [1-1,95]	1,51 [1,17-2,34]	1,48 [1,03-2,03]	1,46 [1-2,2]	0,14
Sexe ratio †	**972**	40 (4,1%)	35 (3,6%)	57 (5,9%)	16 (1,6%)	296 (30,5%)	53 (5,5%)	46 (4,7%)	226 (23,2%)	203 (20,9%)	
Female	408 (42%)	10 (25%)	19 (54,3%)	21 (36,8%)	8 (50%)	139 (47%)	18 (34%)	15 (32,6%)	83 (36,7%)	95 (46,8%)	0,02
Male	564 (58%)	30 (75%)	16 (45,7%)	36 (63,2%)	8 (50%)	157 (53%)	35 (66%)	31 (67,4%)	143 (63,3%)	108 (53,2%)	
Symptômes ‡	**976**	40 (4,1%)	34 (3,5%)	57 (5,8%)	16 (1,6%)	296 (30,3%)	55 (5,6%)	47 (4,8%)	227 (23,3%)	204 (20,9%)	
Herpangine isolée	57 (6%)	5 (12,5%)	4 (11,8%)	5 (8,8%)	1 (6,2%)	24 (8,1%)	1 (1,8%)	2 (4,3%)	11 (4,8%)	4 (2,0%)	
PMB typique	214 (22%)	16 (40%)	8 (23,5%)	23 (40,3%)	3 (18,8%)	79 (26,7%)	18 (32,7%)	3 (6,4%)	31 (13,7%)	33 (16,2%)	<0,001
PMB atypique	705 (72%)	19 (47,5%)	22 (64,7%)	29 (50,9%)	12 (75%)	193 (65,2%)	36 (65,5%)	42 (89,3%)	185 (81,5%)	167 (81,8%)	

Les données sont indiquées en n (%) ou médiane [IQR]

† Le sexe n'a été renseigné que pour 972 patients

‡ Les données cliniques n'ont été disponibles que pour 976 patients

E. Variations moléculaires structurales du variant C1v2015

Nous avons comparé les séquences en acides aminés de la région structurale P1 au sein du sous-génogroupe C1 pour rechercher l'existence de variations dans la lignée C1v2015.

Les six substitutions d'acides aminés détectées dans les protéines VP1, VP2 et VP3 sont indiquées dans le **tableau 12**. Parmi les six positions concernées, seules deux sont exposées à la surface externe de la capside : les substitutions N93D et A232S dans VP3.

Ces deux positions sont localisées à proximité du site de liaison au récepteur SCARB2 et pourraient être impliquées dans des changements du pouvoir infectieux **(Figure 37)**.

III. Epidémiologie et histoire évolutive du CVA6

A. Caractéristiques épidémiologiques et cliniques des infections à CVA6

De 2010 à 2018, 1159 infections à CVA6 ont été détectées dont 151 (13 %) par le RSE, 981 (84,6 %) par la surveillance ambulatoire et 27 (2,3 %) par la surveillance en crèche. Au total, les infections à CVA6 ont représenté 4,4 % (1159/26063) de toutes les infections à EV détectées sur cette période avec un pic de détection en 2014, coïncidant avec l'extension de la surveillance de la maladie PMB à l'échelle nationale. Dans le cadre de la surveillance ambulatoire, le CVA6 a été largement prédominant sur toute la période et a été retrouvé chez 50,4 % (981/1946) des patients. Le taux de détection a varié de 23,9 % (16/76) en 2013 à 64 % (55/86) en 2015 **(Figures 38A et 38B)**.

Parmi les patients infectés par un CVA6, 1115 (96,2 %) étaient des enfants âgés de 14 jours à 14 ans (âge médian de 1,48 ans) et 14 (1,2 %) des adultes âgés de 18 à 41 ans (l'âge n'était pas disponible pour 30 patients).

Notre étude a porté plus spécifiquement sur les infections à CVA6 rapportées dans le cadre de la surveillance ambulatoire de la maladie PMB. L'âge médian des enfants de l'étude était de 1,53 an IQR [1,05-2,2] et le sexe ratio H/F de 1,4. Les données cliniques étaient disponibles pour 99,08 % (976/981) des enfants vus en consultation. A partir des informations recueillies sur les localisations des lésions observées, une classification en 3 catégories a pu être réalisée. Sur la période d'étude, 215 (21,9 %), 705 (71,9 %) et 57 (5,8 %) enfants infectés par un CVA6 ont présenté une maladie PMB typique, atypique ou une herpangine isolée, respectivement. Une maladie PMB était associée à une herpangine dans 483/926 (52,2 %) des cas, qu'elle soit de présentation typique (119/215, 55,3 %) ou atypique (364/705, 51,6 %).

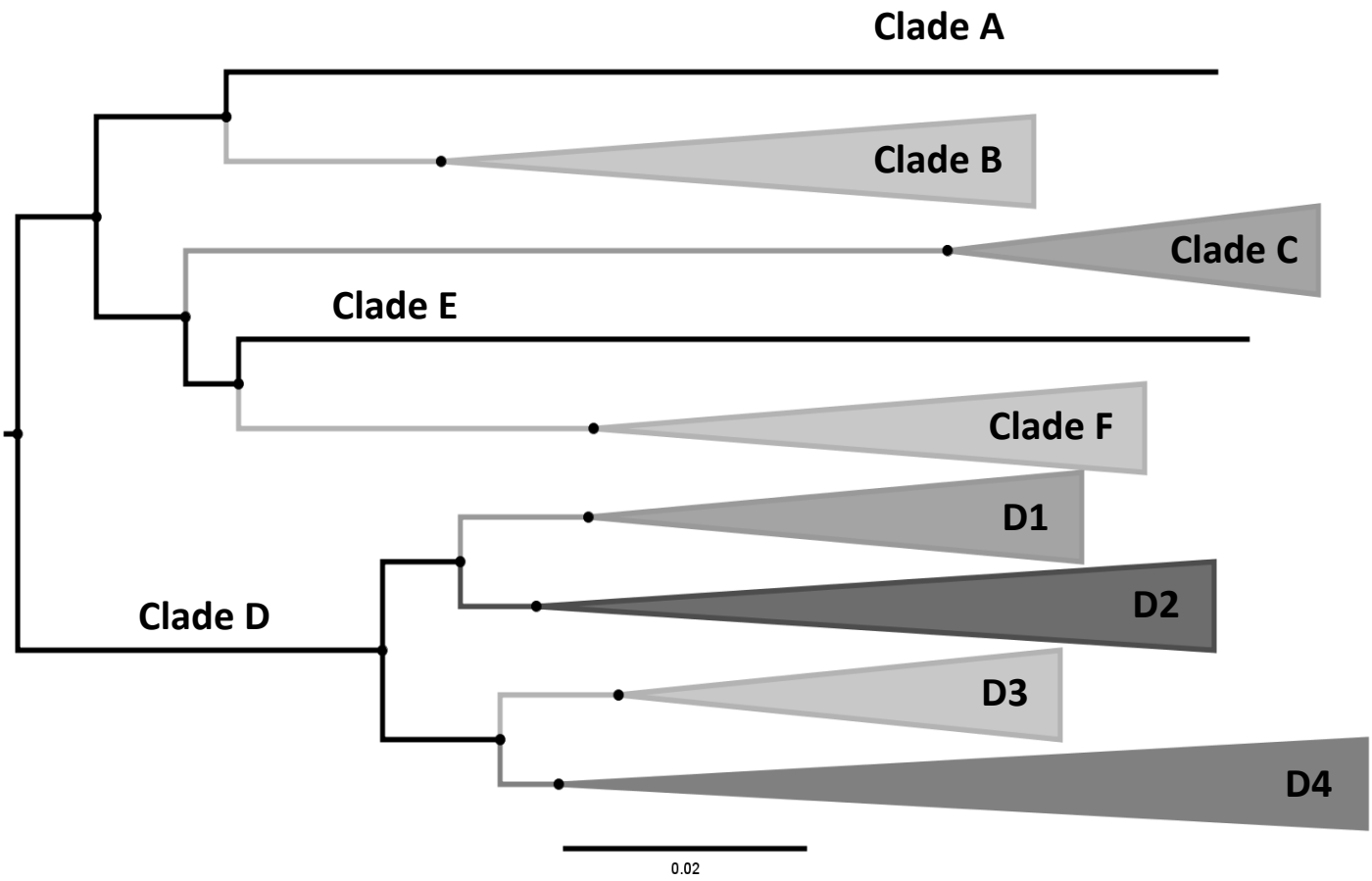


Figure 39 : Diversité phylogénétique des souches de type CVA6 détectées en France entre 2010 et 2018. Diversité des clades du CVA6 évaluée avec un ensemble de données de 3 618 séquences VP1. Le jeu de séquences pour analyser la diversité globale a été constitué de 981 séquences déterminées dans cette étude et 2637 séquences disponibles dans la base de données publique Genbank (NCBI). Le groupe externe comprenait 2 séquences assignées au type CV-A4 (numéros d'accession KJ541163.1 et KP289442.1). Les séquences qui ont été utilisés comme références pour désigner les clades et le pourcentage moyen de différences nucléotidiques au sein de chaque clade sont indiquées dans le tableau 14.

La proportion de formes atypiques de la maladie PMB a augmenté au fil des années. De 47,5 % (19/40) en 2010, elle a atteint 81,9 % (167/204) en 2018 avec un pic en 2016 (89,4 %, 42/47), la différence étant significative à partir de 2016 par rapport aux années 2010 et 2012 (p<0,0001, **Tableau 13**).

B. Analyse moléculaire des souches de CVA6

1. Diversité intratypique établie à partir des séquences codant la protéine VP1

La diversité intratypique du CVA6 a été analysée en utilisant un jeu de 3618 séquences $1D^{VP1}$ pour analyser la diversité intratypique du type CVA6, selon une méthodologie utilisée dans une étude précédente (Hassel et al., 2017). La diversité intratypique du CVA6 a été évaluée par le nombre de génogroupes et de sous-génogroupes en utilisant des seuils de distances génétiques définis dans cette étude antérieure (**Annexe 4)**.

Compte tenu du nombre de séquences, un arbre phylogénétique a été établi avec une méthode « neighbor-joining » à partir d'une matrice de distances estimées par la proportion de différences nucléotidiques **(Figure 39)**. Les séquences $1D^{VP1}$ ont été classées en 6 clades phylogénétiques principaux désignés par les lettres A à F se différenciant à des seuils compris entre 14,48 % et 18,86 % de différences nucléotidiques. Chaque clade était soutenu par une valeur bootstrap supérieure à 90 %. En conséquence, les 6 clades ont été considérés comme des génogroupes distincts.

Le clade D comprend la grande majorité des séquences de CVA6 (99,77 %) rapportées dans le monde et il est en outre divisé en 4 sous-clades monophylétiques (désignés D1 à D4).

Le seul membre du clade A est la souche prototype de Gdula isolée aux États-Unis en 1949 et qui diffère des autres clades de 15,5 à 18,5 % différences nucléotidiques. Deux séquences issues de souches détectées en Chine en 1992 et 2004 constituent le clade B. Le clade C est représenté par les séquences de deux souches l'une collectée en Chine (1996) et l'autre en Inde (2008).

Les 981 séquences $1D^{VP1}$ déterminées dans notre étude ont été assignées (valeurs bootstrap de ≥ 90 %) aux sous-clades D2 (n = 27 ; 3 %) et D4 (n = 954 ; 97 %). Dans notre étude, le sous-génogroupe D2 représentait 1/3 des infections à CVA6 en 2010 (12/39, 31 %) et n'était plus retrouvé les années suivantes à part en 2014 où il représentait 5 % (14/295) des cas. Le sous génogroupe D4 était le seul autre groupe détecté de 2010 (69 %) à 2018 (100 %).

Le sous-génogroupe D4 est constitué de la majorité des souches de CVA6 qui ont été rapportées à l'échelle mondiale et associées aux épidémies de maladie pied-main-bouche. La divergence entre les séquences du sous-clade D4 est comprise entre 0 et 11,5 %.

Tableau 14 : Séquences de références pour la classification des génogroupes et sous-génogroupes du CVA6

Génogroupe (Nombre de séquences)	Séquences de référence	Divergence nucléotidique intra-clade (%)	Divergence en acides aminés intra-clade (%)
A (n = 1)	AY421764.1 (Gdula)	-	-
B (n = 2)	JQ364886.1; KP143074.1	8,5	3,3
C (n = 2)	JQ364887.1; JN203517.1	9,2	3
D (n = 3610)		4,5 (0–15,2)	1,4 (0–11,5)
D1 (n = 75)	MF42553.1; KR706309.1; JQ946054.1	4,7 (0,1–8,7)	0,9 (0–2,3)
D2 (n = 125)	LC126145.1; AB779616.1; LC421542.1; 310181032; 310103027; MF838736.1;	4,8 (0,1–7,9)	1,01 (0–2,6)
D3 (n = 83)	LC421552.1; LC126147.1; MF285624.1; KM279379.1	4,5 (0-8,9)	0,94 (0–3.2)
D4 (n = 3327)	KP144349.1; 311277040; 3140630761; KP144344.1; MH111051.1; KX212514.1; MH111032.1; KX212520.1; MF285636.1; 180050202502; MH049744.1; KT779411.1	4,5 (0–11,5)	0,85 (0–9,5)
E (n = 1)	LR027552.1	-	-
F (n = 2)	LT719047.1; LT719048.1	4,5	1,3

La divergence à l'intérieur des clades a été définie comme la proportion moyenne des différences de nucléotides (ou en acides aminés) entre les séquences attribuées à un clade donné.

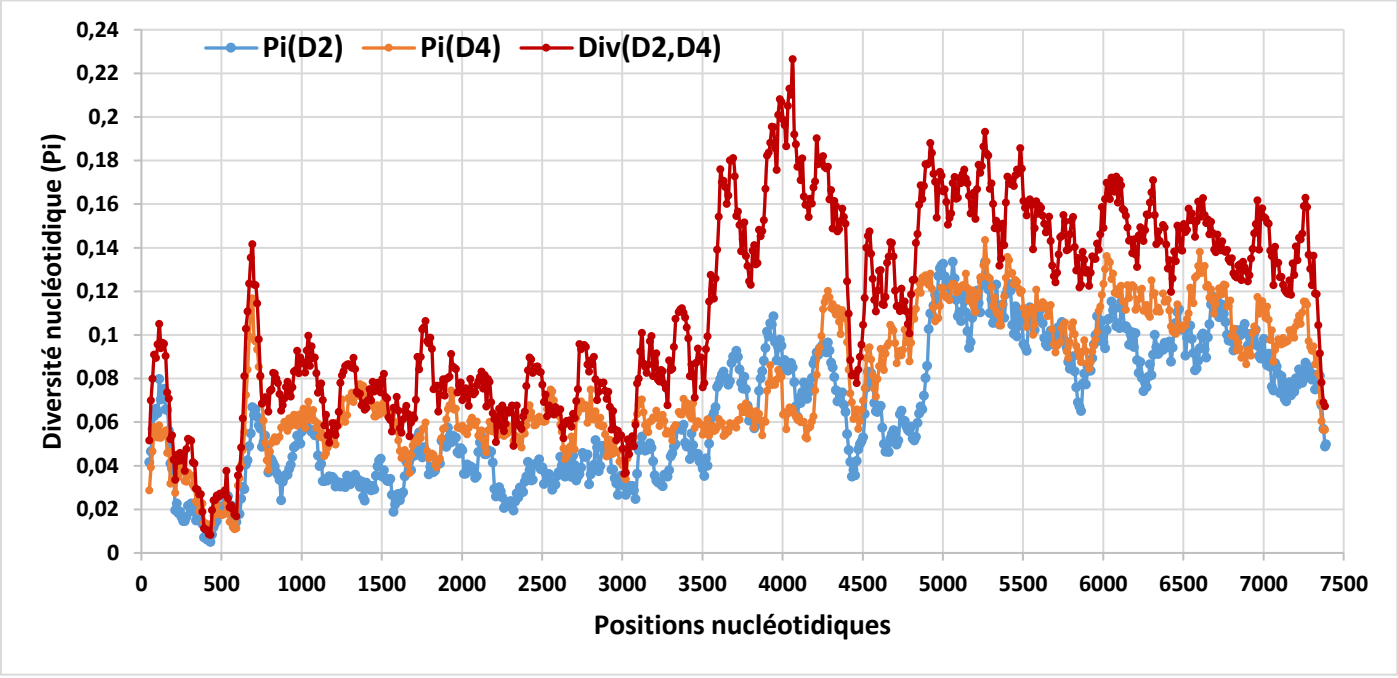


Figure 40. Diversité nucléotidique globale dans les génomes CVA6 complets déterminés dans notre étude et assignés aux sous-clades D2 et D4. La diversité nucléotidique (Pi) intra-clade (proportion moyenne été calculée sur une fenêtre de 100 nucléotides se déplaçant de 10 sites le long de l'alignement des génomes.

Les séquences classées dans les autres sous-clades présentent une divergence maximum plus modérée qui peut être liée en partie à des différences d'échantillonnage : la divergence est comprise entre 0,1 et 8,7 % pour le sous-clade D1, entre 0,1 % et 7,9 % pour D2, et pour D3 entre 2,1 % et 9 %. (**Tableau 14)**. Le clade E est composé d'une seule séquence (souche isolée au Turkménistan en 2011) et le clade F est composé de deux séquences (souches isolées à Madagascar en 2011).

2. Recherche des génomes recombinants en circulation à l'échelle mondiale

a) Analyse exploratoire du polymorphisme

Dans un premier temps, une analyse du polymorphisme nucléotidique a été entreprise avec le jeu des 213 génomes CVA6 générés dans cette étude. Le jeu de données comprend des génomes assignés aux sous-génogroupes D2 (10/213 ; 4,7 %) et D4 (203/213 ; 95,3 %). Les séquences de chaque sous-génogroupe ont été réparties dans deux jeux de données de façon à pouvoir comparer la diversité génétique (polymorphisme nucléotidique moyen par site) de ces deux populations en utilisant le logiciel DnaSP 6 **(Figure 40)**. Cette analyse montre que le polymorphisme nucléotidique intra populationnel est 2 à 2,5 fois plus élevé dans la région non-structurale P3 que dans la région structurale P1. Le polymorphisme présente aussi des variations notables à l'intérieur d'une même région génomique (P2 notamment) dans chaque population. A contrario, les variations du polymorphisme dans la région P1 sont de faible ampleur. La divergence entre les sous-génogroupes D2 et D4 est particulièrement importante pour la région génomique P2, ce qui suggère que le polymorphisme nucléotidique inter populationnel est cumulé.

Ces résultats suggèrent que les régions génomiques P2 et P3 présentent des origines génétiques complexes au sein de chaque sous-génogroupe D2 et D4. Nous avons aussi procédé à une analyse phylogénétique comparative des gènes $1D^{VP1}$ et $3D^{pol}$.

Les arbres phylogénétiques reconstruits en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance présentent des incongruences topologiques (données non montrées). Ceci confirme l'analyse précédente et suggère l'existence de lignées d'origine recombinante.

b) Analyse du gène $3D^{pol}$ pour rechercher les formes recombinantes de CVA6

D'après les données de la littérature, les séquences 3CD du CVA6 sont classées en 12 clades distincts associés à des formes recombinantes (RF) désignées par les lettres A à H et J à M. La forme recombinante I a été assignée à la séquence de la souche prototype Gdula (isolée en 1949).

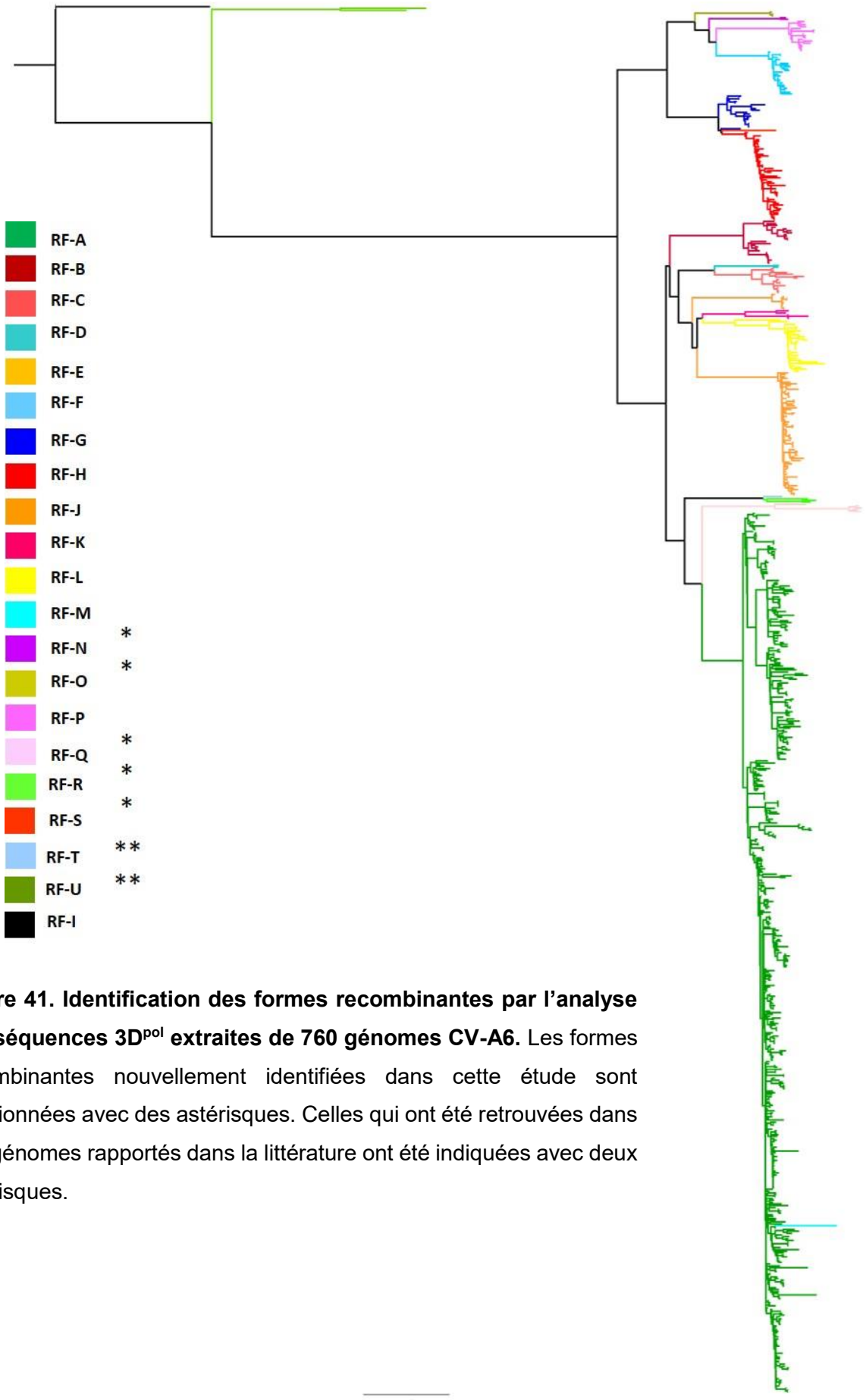


Figure 41. Identification des formes recombinantes par l'analyse des séquences 3D^{pol} extraites de 760 génomes CV-A6. Les formes recombinantes nouvellement identifiées dans cette étude sont mentionnées avec des astérisques. Celles qui ont été retrouvées dans des génomes rapportés dans la littérature ont été indiquées avec deux astérisques.

Pour analyser l'origine du polymorphisme génétique de la région génomique non structurale P3 dans notre échantillon de 213 génomes, nous avons constitué un jeu de séquences incluant aussi les génomes complets de CVA6 disponibles dans la base de données GenBank (consultation en juin 2020, n = 547 séquences).

Les séquences du gène $3D^{pol}$ ont été extraites à partir du jeu de données final (n = 760 génomes) et comparées par analyse phylogénétique (**Figure 41**). Dans la phylogénie réalisée par la méthode du maximum de vraisemblance, nous avons utilisé des séquences de référence pour assigner à chaque clade une RF déjà décrite. La forme recombinante A a été attribuée à 64 % des séquences du jeu de données (n = 483/760) et les formes recombinantes B à M, à 32 % des séquences (n = 246/760). Parmi les génomes complets déterminés dans cette étude, RF-A représentait 58 % des séquences (123/213) et les formes recombinantes B, F, G et H, 31 %. Dans notre jeu de données, 32 séquences dispersées dans sept groupes phylogénétiques (valeurs de bootstrap ≥70 %) n'ont pas pu être assignées à l'une des RF connues. Ce résultat suggère qu'il existe des formes recombinantes non rapportées avant notre étude qui ont été désignées par les lettres N (n = 2 séquences), O (n = 3), P (n = 17), Q (n = 4), R (n = 2), S (n = 1), T (n = 1) et U (n = 2). La forme recombinante P a été assignée à des génomes CVA6 déterminés dans cette étude (France, 2017 et 2018) et rapportés en Australie en 2016 et 2017 (Cobbin et al., 2018). Les formes recombinantes T et U ont été identifiés dans les génomes de souches CVA6 isolée en 2011 au Turkménistan (cette étude) et à Madagascar (Volle et al., 2019). Une recherche dans la base de données GenBank (consultée en mai 2020) par la méthode BLASTn n'a pas révélé d'autres séquences pouvant être attribuées aux sept formes recombinantes nouvelles.

Concernant la répartition annuelle des différentes formes recombinantes déterminées à partir de l'analyse des 213 génomes complets, les formes A et H étaient prédominantes pendant la période d'étude et leur distribution statistiquement différente entre les années. La proportion des formes A parmi les prélèvements analysés a d'abord progressé, 47 % en 2010 et 100 % en 2012, puis diminué progressivement pour atteindre 21 % en 2018. Les formes H ont été détectées pour la première fois en 2014 parmi 8 % des prélèvements étudiées puis à partir de 2016 et jusqu'en 2018, elles ont représenté environ 50 % des prélèvements analysés. L'ensemble des autres formes recombinantes (B, F, G et N à S) a représenté entre 5 % (2015) à 53 % en 2010 **(Tableau 15)**.

Tableau 1 : Distribution des formes recombinantes selon les années

Forme recombinante	Génome complet (n=213)	2010 (n=19)	2011 (n=9)	2012 (n=15)	2013 (n=4)	2014 (n=86)	2015 (n=21)	2016 (n=12)	2017 (n=19)	2018 (n=28)
RF-A	126 (57,8 %)	9 (47,4 %)	6 (66,7%)	15 (100%)	3 (75%)	58 (67,4%)	14 (66,8%)	3 (25%)	9 (47,4%)	6 (21,4%)
RF-H	41 (19,3 %)	0	0	0	0	7 (8,1%)	6 (28,6%)	6 (50%)	8 (42,1%)	0
Autres RF	49 (23 % %)	10 (52,6 %)	3 (33,33 %)	0	1 (25 %)	21 (24,5%)	1 (4,6 %)	3 (25 %)	2 (10,5 %)	8 (78,6%)

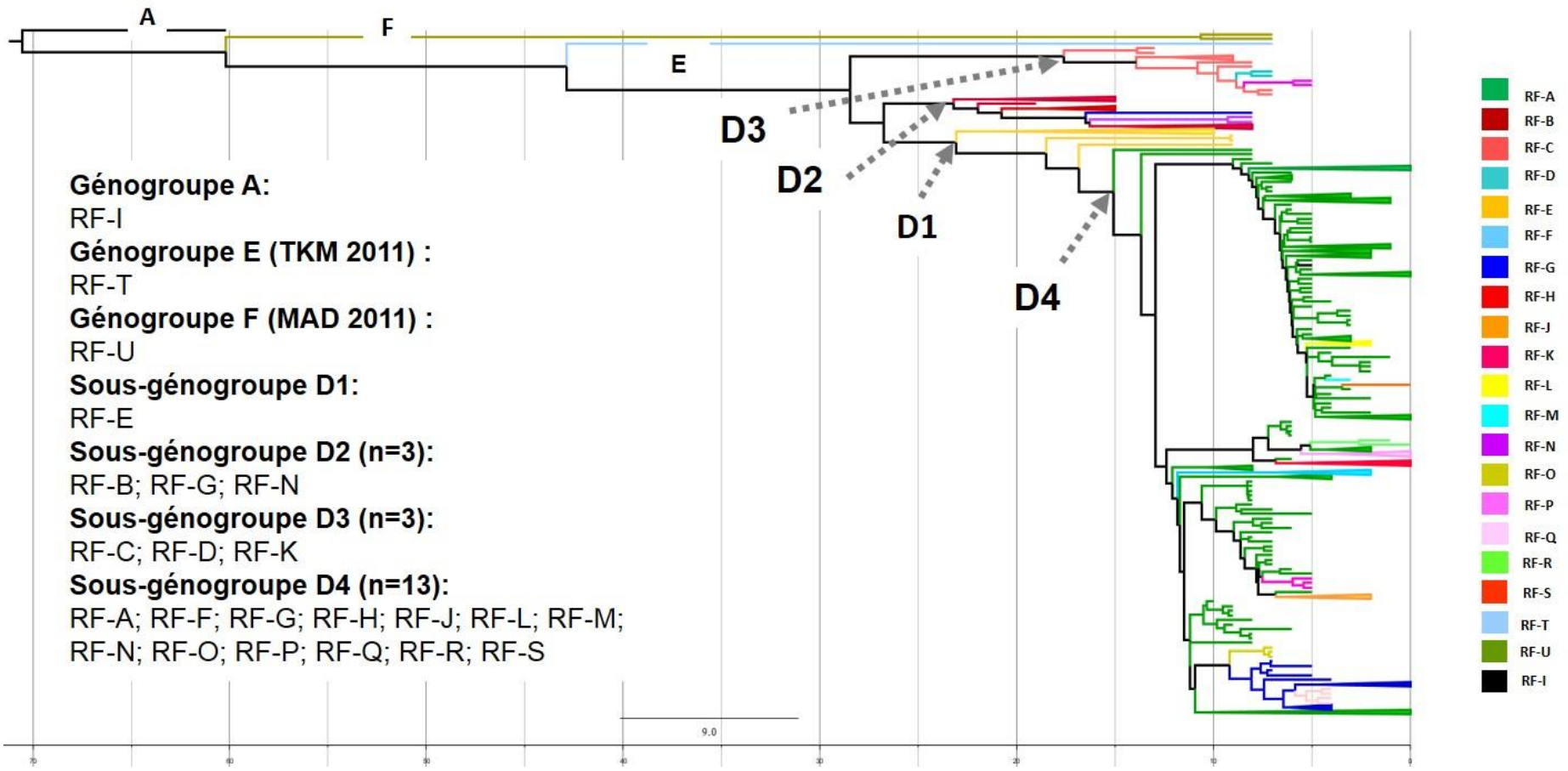


Figure 42. Distribution des formes recombinantes parmi les lignées de la phylogénie établie avec les séquences de la région génomique P1. Un jeu de 760 séquences P1 a été constitué à partir de 213 génomes complets de cette étude et 557 génomes disponibles dans GenBank. L'analyse phylogénétique a été réalisée avec le logiciel BEAST (http://beast.community; Bouckaert et al., 2014; Drummond et al., 2012).

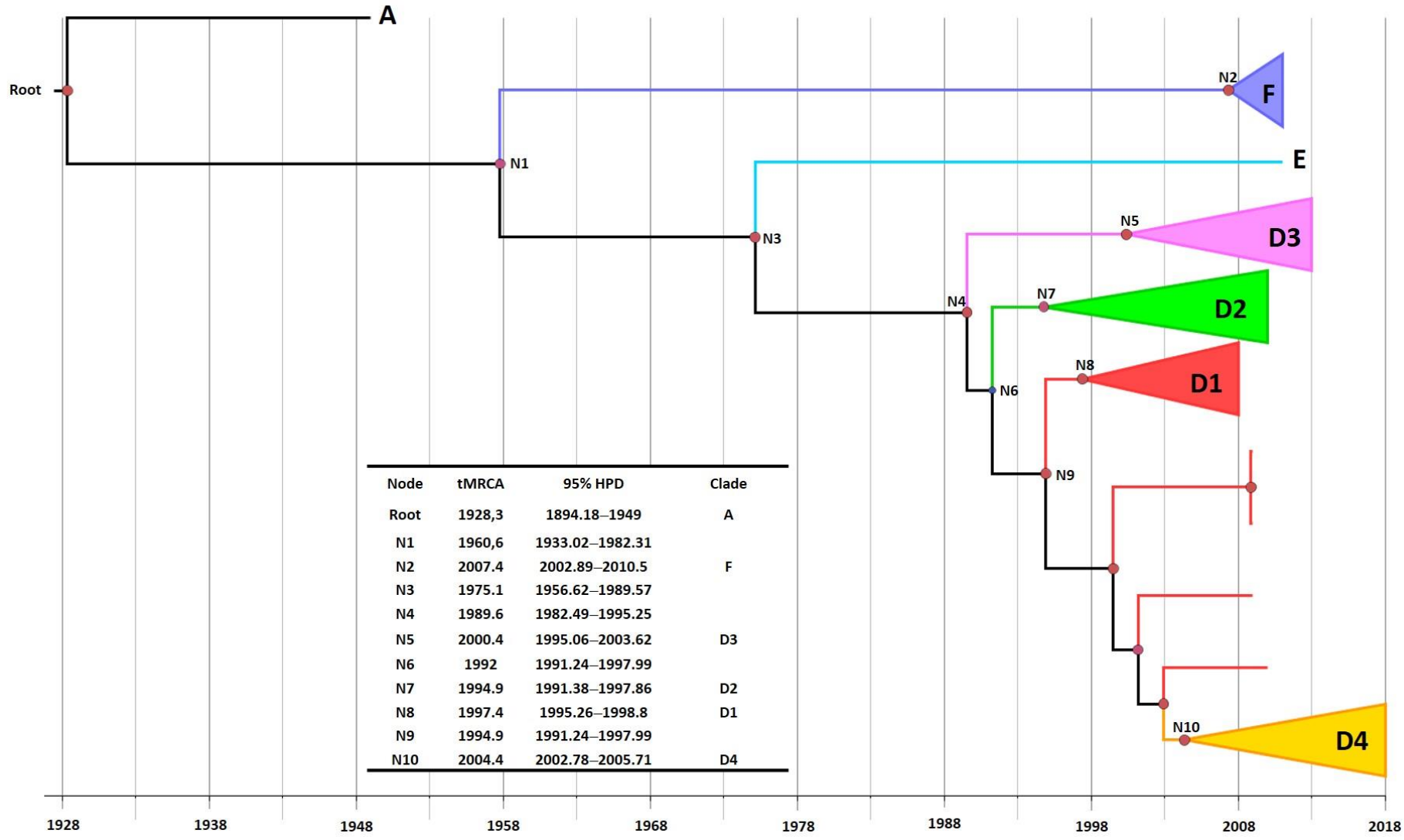
c) Distribution des formes recombinantes dans la généalogie établie pour la région génomique P1

Pour analyser l'évolution des souches CVA6, nous avons reconstruit la généalogie des séquences de la région P1 (séquences extraites du jeu de 760 génomes) et assigné une forme recombinante aux différentes lignées identifiées dans l'arbre (**Figure 42)**. Dans cet arbre, les sous-génogroupes D1, D2 et D3 sont des groupes frères constituant ensemble le clade D. Le sous-génogroupe D1 constitue un clade monophylétique incluant le sous-génogroupe D4. Les trois lignées qui constituent D1 sont formées de génomes tous assignés à la même forme recombinante E. Les sous-génogroupes D2 et D3 forment deux clades distincts mais chacun est constitué de séquences provenant de génomes assignés à différentes formes recombinantes. Trois formes recombinantes sont représentées dans chacun : B, G et N dans le clade D2 et C, D, K dans le clade D3.

Dans ces deux clades, les lignées recombinantes sont emboîtées. Le clade D4 qui est emboîté dans le clade D1 possède la structure phylogénétique la plus complexe indiquant clairement une origine multiphylétique. Les lignées qui constituent ce clade sont en majorité issues de la forme recombinante A qui est présente à la base du clade, suggérant que RF-A est la forme ancestrale. Les autres lignées de ce clade sont emboîtées dans les précédentes et issues de 13 autres formes recombinantes (F, G, H, J, L, M, O à U). Ces formes recombinantes sont dispersées dans le clade indiquant des émergences indépendantes au cours du temps. La topologie emboîtée de certaines formes recombinantes suggère que les lignées portant les formes recombinantes O, G, Q ont émergé les unes des autres de façon successive, à partir d'une lignée ancestrale portant la forme recombinante A. Les clades E et F comprennent des séquences P1 issues de génomes portant respectivement des formes recombinantes T et U.

d) Analyse de la structure des formes recombinantes

A partir de l'analyse précédente, nous avons comparé les séquences génomiques complètes de CVA6 en les regroupant selon la forme recombinante correspondante. La forme recombinante A étant majoritaire, les génomes de cette RF ont été utilisés comme références dans les comparaisons **(Annexe 5)**. Les 17 comparaisons effectuées montrent la grande diversité de la localisation des sites de recombinaison potentiels dans les profils de similarité. Les sites de recombinaison qui différencient la forme recombinante A des autres formes recombinantes sont localisés dans les régions non-structurales. Toutefois, cette observation n'a pas été confirmée car l'analyse statistique retrouve les sites de recombinaison au mieux avec 3 méthodes d'analyse, ce qui est insuffisant pour valider leur localisation précise.



Node	tMRCA	95% HPD	Clade
Root	1928,3	1894.18–1949	A
N1	1960,6	1933.02–1982.31	
N2	2007.4	2002.89–2010.5	F
N3	1975.1	1956.62–1989.57	
N4	1989.6	1982.49–1995.25	
N5	2000.4	1995.06–2003.62	D3
N6	1992	1991.24–1997.99	
N7	1994.9	1991.38–1997.86	D2
N8	1997.4	1995.26–1998.8	D1
N9	1994.9	1991.24–1997.99	
N10	2004.4	2002.78–2005.71	D4

Figure 43 : Chronogramme inféré avec les séquences de la région génomique P1 du CVA6. La probabilité postérieure est indiquée par la taille et l'intensité de la couleur rouge des cercles aux différents nœuds.

L'origine des régions non-structurales des formes recombinantes n'a pas pu être identifiée, ce qui peut s'expliquer soit par une perte du signal phylogénétique résultant de recombinaisons multiples soit par l'insuffisance de l'échantillonnage des génomes de CVgénétiquement proches.

Malgré tout, ces résultats confortent l'hypothèse d'une origine multiphylétique des régions P2 et P3 de la grande majorité des lignées de génomes CVA6.

C. Histoire évolutive et diffusion géographique du CVA6

1. Evaluation de l'horloge moléculaire dans les séquences structurales P1

L'horloge moléculaire a été évaluée dans le jeu des séquences P1 (séquences extraites de 213 génomes complets déterminés dans cette étude et 547 génomes disponibles dans GenBank) conçu pour reconstruire l'évolution des souches CVA6 rapportées entre 1949 et 2018. Une analyse de régression linéaire des distances « feuille / racine » sur les dates d'obtention des prélèvements a été effectuée en utilisant un arbre obtenu par la méthode du maximum de vraisemblance (**Annexe 6)**. Les résultats indiquent un coefficient $R^2 = 0,65$ et un coefficient de corrélation de 0,81. Les analyses réalisées pour les autres régions génomiques indiquent qu'elles sont inadaptées pour reconstruire une généalogie : région P2 ($R^2 = 0,15$), région P3 ($R^2 = 1,19 \times 10^{-3}$) et gène 3D ($R^2 = 9,83 \times 10^{-4}$).

2. Histoire évolutive des clades D2 et D4

La généalogie du CVA6 a été reconstruite avec 760 séquences P1 **(Figure 43)**. Le taux d'évolution moléculaire pour l'ensemble du jeu de données est de $4,42 \times 10^{-3}$ nucléotides par site et par an.

La topologie indique clairement que les clades D2 (nœud N7) et D4 (nœud N10) sont des groupes monophylétiques fiables (pp > 0,9). Toutes les séquences du clade D4 ont partagé un ancêtre commun entre 2002 et 2005 (tMRCA = 2004 ; pp = 0,99). Quatre séquences assignées au clade D1 sont localisées à la base du clade D4, elles sont issues de génomes de souches isolées à Taïwan entre 2009 et 2010. Le profil phylogénétique obtenu suggère que les souches du clade D1, ayant circulé en Asie (Taïwan) au cours des années 2000, seraient impliquées dans l'émergence du clade D4. L'émergence de l'ancêtre commun le plus récent des séquences du clade D2 est datée entre 1991 et 1997 (pp = 0,93). Les dernières séquences de l'échantillon du clade D2 ont été rapportées en 2014, ce qui pourrait indiquer que les souches ne circulent plus dans la population ou circulent dans des pays où elles ne sont pas rapportées.

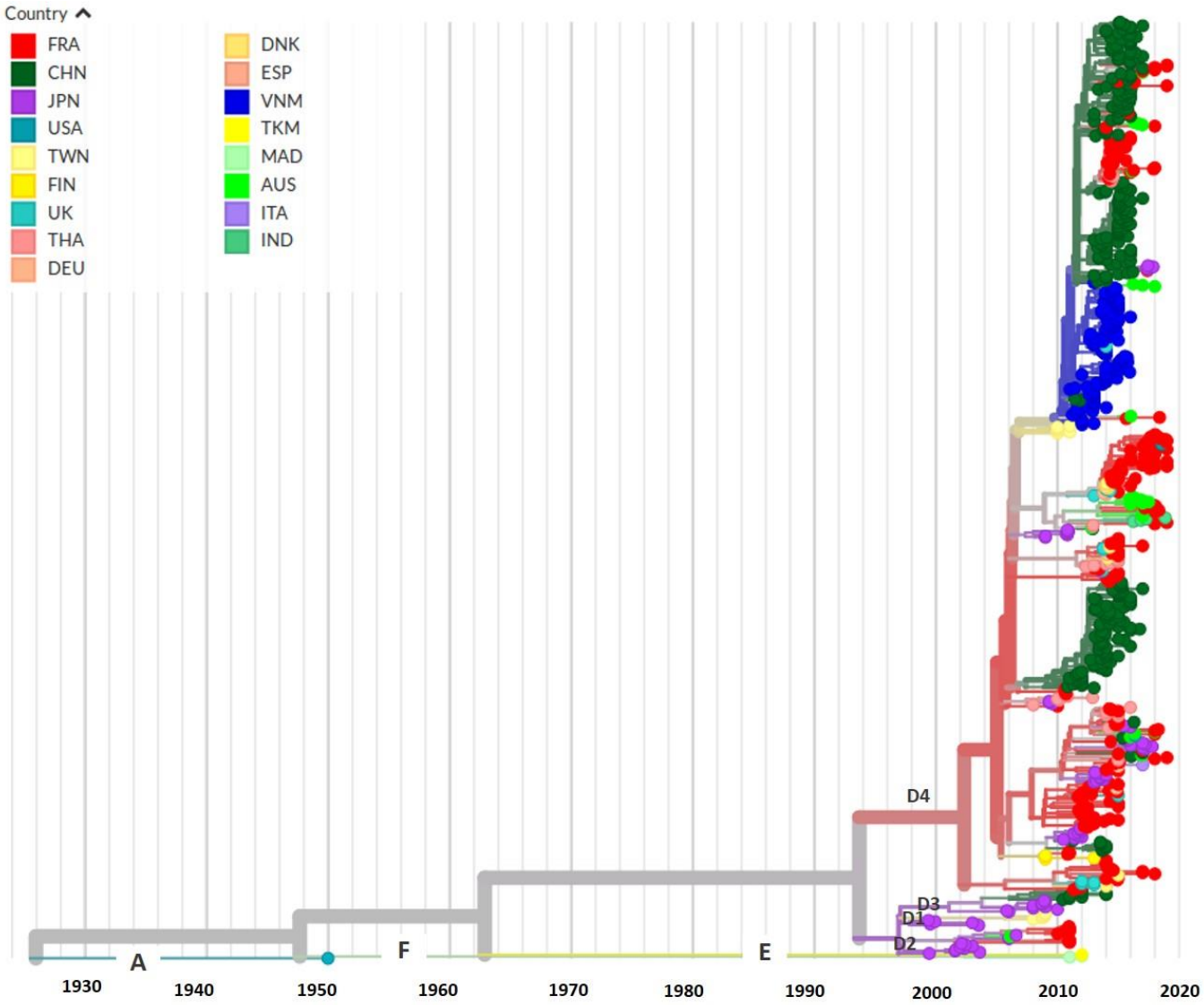


Figure 44 : Chronogramme et distribution géographique des souches de CVA6. L'analyse phylogénétique a été réalisée en utilisant le serveur Nextstrain (Hadfield et al., 2018).

3. Diffusion géographique des lignées de CVA6

L'étude de la propagation géographique du CVA6 a été explorée par une approche phylogénétique automatisée utilisant le serveur Nextstrain (Hadfield et al., 2018). La plate-forme Nextstrain génère une visualisation interactive intégrant la phylogénie et des métadonnées telles que l'origine géographique des échantillons, ce qui permet une surveillance génomique globale.

Cette approche a été appliquée à l'analyse de la région génomique P1. La topologie de l'arbre phylogénétique obtenu révèle la même topologie que celle de l'arbre phylogénétique obtenu avec la méthode Bayésienne **(Figure 44)**. L'arbre montre que le CVA6 a été rapporté (sous la forme de génomes complets) dans 17 pays. Les séquences de CVA6 déterminées dans cette étude sont à la base de l'arbre phylogénétique et dispersées avec celles des autres régions géographiques. La relation entre les souches circulantes du CVA6 de 2008 et 2018 suggère que le CVA6 migre assez vite pour permettre aux souches échantillonnées sur un continent d'avoir des ancêtres détectés sur d'autres continents. Nous avons voulu représenter la circulation géographique des souches de CVA6 entre différents pays lors des épidémies de maladie PMB associées aux infections à CVA6 relativement bien échantillonné. Parmi les différents groupes phylogénétiques identifiés, le génogroupe D était principalement asiatique. Le clade D4 présentait une diversité géographique considérable et contenait des souches CVA6 européennes et asiatiques associées à une maladie PMB atypique à partir de 2008 dans le monde entier, y compris de Taïwan (2010-2011), d'Édimbourg (2012-2013) et de Finlande (2008).

En particulier, malgré la large distribution des souches CVA6, il y a peu d'hétérogénéité dans l'origine géographique entre les lignées phylogénétiques.

D. Variations moléculaires structurales des lignées du génogroupe D du CVA6

Pour rechercher la présence de variations entre les différentes lignées du génogroupe D, nous avons comparé les séquences protéiques de la région structurale P1. Nous avons pu identifier quatre substitutions en acides aminés dans les protéines VP1 et VP2 **(Tableau 16)**. Particulièrement, la substitution V242I dans la protéine VP1 est exposée à la surface externe de la capside virale.

Tableau 16. Variations moléculaires dans les protéines de capside du CVA6 par rapport aux séquences protéiques des lignées du génogroupe D

Protéine	Substitution en acide aminé	Observations	Localisation dans la protéine et la capside
VP1	A54S	Variation retrouvée dans les séquences du sous-génogroupe D3 : D3-RFC (n=12/14) D3-RFD (n=2) D3-RFK (n=2)	Extrémité N-term Position interne
	V242I	Variation retrouvée dans toutes les séquences du sous-génogroupe D3	Boucle H-I (position externe)
VP2	V132I	Variation présente dans les séquences du sous-génogroupe D1 : D1-RFE (n=7/10)	Boucle E-F (base de l'extrémité 3' du Puff) Position interne
		Variation présente dans les séquences du sous-génogroupe D2 : D2-RFA (n=1) D2-RFB (n=24) D2-RFN (n=2) Absente pour D2-RFG (n=1)	
		Variation présente dans les séquences du sous-génogroupe D3 : D3-RFC (n=14) D3-RFD (n=2) Absente pour D3-RFK (n=2)	
	I172V	Variation spécifique aux séquences des sous-génogroupes D1,D2 et D3	
		Variation retrouvée dans certaines séquences du sous-génogroupe D4 : D4-RFQ (n=4) D4-RFO (n=3) D4-RFG (n=18) D4-RFA(n=60/481)	

Abréviations (code à une lettre pour les acides aminés) : V, valine ; I, isoleucine ; A, alanine ; S, sérine

DISCUSSION

I. Optimisation de l'amplification du génome complet des EV A

Le diagnostic moléculaire des infections à EV par une amplification génique ciblée d'un fragment de la région 5'NC et l'identification du type d'EV par typage moléculaire établi avec le gène $1D^{VP1}$ sont maintenant réalisées dans de nombreux laboratoires de façon courante. Au contraire, l'amplification du génome complet ne fait pas encore partie des analyses de "routine" même lorsqu'il s'agit d'étudier l'épidémiologie moléculaire. Pourtant, la diversité génétique, résultant de mutations et d'évènements de recombinaison intra et inter-typique, justifie de s'intéresser au génome complet pour caractériser précisément les virus variants et retracer leur histoire évolutive et ce faisant, les connexions entre les épidémies. L'analyse génomique est donc indispensable pour comprendre les facteurs viraux associés à l'émergence ou la réémergence des types d'EV. Le séquençage du génome entier (whole genome sequencing) des EV permet : (1) la détection des événements de recombinaison, (2) l'identification d'éventuels marqueurs de virulence et (3) l'étude plus exhaustive de l'évolution moléculaire du virus. L'analyse des génomes complets se heurte cependant à trois obstacles principaux : (1) la difficulté d'amplifier le génome complet d'un seul tenant avec une méthode générique sensible, à cause de la diversité génétique, (2) le séquençage classique par la méthode Sanger qui ne permet pas de séquencer de longs fragments et nécessite l'utilisation de très nombreuses amorces et (3) la faible charge virale dans les échantillons cliniques qui limite l'analyse des génomes complets aux isolats obtenus en culture cellulaire. Les jeux de génomes complets d'EV permettant l'investigation d'une épidémie avec les techniques d'épidémiologie moléculaire sont donc encore en nombre limité. Le développement et la plus grande accessibilité à moindre prix des méthodes de séquençage de nouvelle génération ou séquençage haut débit rendent possibles leurs applications pour des études épidémiologiques à plus grande échelle, plus adaptées aux objectifs de surveillance des infections à EV en termes de santé publique.

Au cours de ma thèse, j'ai optimisé l'amplification du génome complet des EV de l'espèce A en un seul fragment à partir des échantillons cliniques. Cette approche est originale puisque, jusque-là une seule étude avait été publiée (Isaacs et al., 2018). Les autres méthodes proposées reposent en majorité sur l'amplification par PCR de plusieurs fragments sous-génomiques chevauchant, en utilisant des amorces spécifiques d'un type ou d'une espèce ou parfois génériques mais pour seulement un des fragments (Bessaud et al., 2016; Joffret et al., 2018; Sahoo et al., 2017; Tan et al., 2015). Par ailleurs, la plupart des méthodes publiées ont été appliquées à des isolats viraux, ce qui limite le nombre de séquences pouvant être étudiées car la culture cellulaire est restrictive. L'étude génomique est limitée aux isolats d'EV facilement cultivables (sensibilité des lignées cellulaires) et elle peut aussi engendrer la sélection d'une population de virus sensiblement différente de celle présente dans le prélèvement clinique initial en termes de diversité génétique (adaptation à la multiplication *in vitro*).

Couplée à la technique de séquençage SMRT PacBio® de 3ème génération, notre méthode d'amplification génomique a été appliquée avec succès pour 85,3 % des échantillons cliniques testés incluant sept types d'EV-A et a permis de caractériser les séquences génomiques complètes de l'EVA71 et du CVA6 provenant de 229 prélèvements cliniques. Les valeurs de Ct des échantillons cliniques testés avec la méthode commerciale utilisée pour le diagnostic étaient comprises entre 17 et 37,8 cycles, mais le rendement de l'amplification était fortement diminué au-delà de 30 cycles. La charge virale contenue dans les écouvillonnages de gorge ou de bouche chez les enfants présentant une maladie PMB est souvent très élevée et n'a pas été un facteur limitant pour notre méthode que l'on peut donc considérer comme bien adaptée à l'investigation des EV responsables de maladie PMB. Cependant, l'amplification à partir des échantillons de LCR ou de sang s'est avérée impossible même pour des valeurs de Ct inférieures à 30 cycles ; cette limite a déjà été rapportée (Krasota et al., 2016; Stelzer-Braid et al., 2020). Par ailleurs, dans notre expérience, l'obtention des amplicons génomiques est meilleure lorsque l'amplification génique est réalisée directement après l'extraction des acides nucléiques, sans congélation intermédiaire. L'ARN viral peut se fragmenter lors de la conservation à -80°C, diminuant la sensibilité de l'amplification du génome complet.

Notre méthode diffère également de celles publiées par la technologie de séquençage employée, la technique Illumina de deuxième génération ayant été la plus utilisée (Bessaud et al., 2016; Midgley et al., 2018; Tan et al., 2015). Nous avons choisi la technologie SMRT PacBio parce qu'elle permet de séquencer des fragments d'ADN jusqu'à 10 kb. Le but était d'obtenir pour chaque échantillon, une séquence génomique consensus complète depuis l'extrémité 5'NC jusqu'à l'extrémité 3'NC, ce qui est rarement le cas pour les génomes d'EV déterminés avec d'autres technologies NGS.

Le couplage de la technologie SMRT PacBio à notre technique d'amplification du génome complet en un seul amplicon présente l'avantage d'obtenir une profondeur de séquençage identique tout le long des séquences obtenues, ce qui a permis de surmonter les limites de l'assemblage de novo. La profondeur de lecture était en moyenne de 1200X et homogène sur le génome entier, ce qui a permis de générer une séquence consensus complète de bonne qualité. Avec la technologie Illumina, il a été constaté que la méthode d'assemblage sans génome de référence ne permettait pas de reconstruire correctement les contigs lorsque les séquences géniques des souches virales sont trop divergentes (Joffret et al., 2018), ce qui peut être problématique avec des génomes d'origine recombinante. Cette limite est liée à la méthode Illumina qui ne peut séquencer que des fragments courts d'ADN obtenus par fragmentation de l'ADN matrice avant l'étape de séquençage. Bien que la technologie SMRT PacBio présente un taux d'erreur supérieur à celui de la technologie Illumina, il existe un équilibre entre la précision des séquences et la longueur des contigs qui peuvent être générés dans le cas des génomes d'EV recombinants mixtes.

A notre connaissance, parmi toutes les études ayant proposé l'application du séquençage haut débit pour déterminer les génomes d'EV, notre stratégie couplant une amplification en un seul fragment génomique et la technologie PacBio est la première méthodologie à avoir généré un aussi grand nombre de séquences génomiques complètes d'EV directement à partir de prélèvements cliniques. Hormis le problème évoqué plus haut de la conservation des échantillons, une autre limite forte de cette approche tient à l'amplification ciblée qui nécessite une connaissance préalable de la séquence nucléotidique des génomes d'EV que l'on souhaite déterminer et ne permet pas un séquençage sans *a priori* de génomes qui n'auraient pas encore été rapportés. Pour surmonter cette difficulté, il serait nécessaire d'utiliser une approche globale de transcriptomique (séquençage de l'ensemble des ARNm de l'échantillon), ce qui devient possible aussi pour les grands transcrit avec la technologie Iso-Seq (Pacific Biosciences).

II. Impact clinique de la réémergence de l'EVA71 et du CVA6

Les infections à EVA71 et CVA6 en Europe répondent à la définition de maladies émergentes, dans le sens où la diffusion virale s'est traduite par une "augmentation significative de l'incidence de ces infections dans une population donnée et durant une période donnée par rapport à la situation épidémiologique habituelle" (Toma & Thiry, 2003). Au-delà de l'augmentation du nombre de cas d'infections causés par ces deux virus, leur émergence s'est également traduite par des présentations cliniques inhabituelles ou sévères, ce qui a permis la reconnaissance des épidémies (Blomqvist et al., 2008 ; European Centre for Disease Prevention and Control, 2016).

Bien que la circulation de l'EVA71 et du CVA6 soit rapportée au cours des épidémies de maladies PMB depuis 1998 dans les pays asiatiques (Ang et al., 2009 ; Lo et al., 2011 ; Solomon et al., 2010; Xu et al., 2015), l'émergence clinique de ces infections à EV est plus récente en Europe. La survenue d'une épidémie de maladie PMB associée à des présentations cliniques atypiques ou tardives en Finlande en 2008 marque le début de l'histoire du CVA6 en Europe (Blomqvist et al., 2008 ; 2010) et d'un plus grand intérêt porté à ces formes cliniques qui n'avaient jamais été décrites au cours des épidémies en Asie.

Une vigilance renforcée des cliniciens et des centres de référence des EV a entraîné la détection croissante du CVA6 dans d'autres pays européens (Cabrerizo et al., 2014 ; Mirand et al., 2012 ; 2016 ; Sinclair et al., 2014). Le CVA6 est prédominant au cours des épidémies de maladie PMB en France en 2014, 2015 et depuis 2017, et co-circule avec d'autres EVA. Après la réémergence du CVA6 en Europe, la circulation du virus a été rapportée aux Etats-Unis (Flett et al., 2012) et surtout en Asie (Tan et al., 2015 ; Wu et al., 2010) où il remplace l'EVA71 et le CVA16 comme principal agent étiologique de la maladie PMB en Chine en 2013 et 2015 (Zeng et al., 2015).

Les atteintes associées aux souches réémergentes de CVA6 montrent une évolution par rapport aux observations cliniques antérieures qui étaient caractérisées par une herpangine (ulcérations très localisées). Les études récentes rapportent l'association à une maladie PMB (Cabrerizo et al., 2014 ; Mirand et al., 2012 ; 2016 ; Sinclair et al., 2014) souvent caractérisée par des éruptions s'étendant à des sites cutanés inhabituels. Dès 2010 en France, les infections à CVA6 étaient fréquemment associées à une maladie PMB souvent combinée à une herpangine, celle-ci n'étant isolée que dans 12,5 % des cas (Mirand et al., 2012). Le fait marquant est la proportion croissante de formes atypiques associées au CVA6 au fil des années avec une augmentation significative à partir de 2016 ($p<0,0001$).

Lorsque l'EVA71 était prédominant au cours des épidémies de maladies PMB en Asie, il était rapporté sporadiquement en Europe depuis les épidémies décrites dans les années 70 en Hongrie et Bulgarie (Chumakov et al., 1979 ; Nagy et al., 1982). Une étude ciblée sur les infections à EVA71 rapportées grâce à la surveillance hospitalière française entre 2013 et 2018 a été réalisée en collaboration avec l'ensemble du RSE (données du laboratoire). La proportion annuelle des infections à EVA71 par rapport au nombre total d'infections à EV rapportées était très variable d'une année sur l'autre, allant de 0,2 à 8 % avec une recrudescence des infections en 2013 (n = 69, 25 % des infections à EVA71 sur la période d'étude) et 2016 (n = 143, 51 %). Comme dans d'autres pays européens (Casas-Alba et al., 2017), la recrudescence des cas d'infections d'EVA71 en 2016 en France s'est distinguée des épidémies rapportées en Asie par deux caractéristiques. La première réside dans la plus grande proportion d'atteintes neurologiques sévères par rapport à 2013 : 30 % (42/143) des infections était associé à des atteintes neurologiques sévères contre 1,4 % (1/69) en 2013. Les infections à EVA71 sont rarement associées à des manifestations cutanées (Casas-Alba et al., 2017). En France, les infections à EVA71 rapportées dans le cadre de la surveillance ambulatoire de la maladie PMB en 2016 ne représentaient que 8,3 % des infections à EVA71. La seconde caractéristique de l'épidémie de 2016 est l'émergence du variant C1v2015 d'EVA71, assigné au sous-génogroupe C1 dont les souches n'avaient pas été rapportées en France depuis 2006 (Schuffenecker et al., 2014). De sorte que l'épidémie de 2016 était associée à la fois au sous-génogroupe C2 majoritaire depuis 2007 (n = 57/143, 40 %) et au variant C1v2015 (n = 77/143, 54 %), devenu majoritaire depuis (données du laboratoire).

Nous voyons deux explications possibles à la fréquence faible de ce variant dans les formes cutanées et à son association aux atteintes neurologiques : des caractéristiques phénotypiques différentes de celles des virus C1 ayant circulé auparavant ou le mode de recrutement des enfants dans les études asiatiques. En effet, la maladie PMB est le principal critère d'inclusion de sorte que les complications neurologiques ne sont rapportées qu'au décours d'une maladie PMB.

III. Intérêt de la phylogénie moléculaire pour étudier l'émergence et la diffusion virale

Sur le plan épidémiologique, l'émergence résulte de plusieurs facteurs qui créent les conditions favorables à la propagation de l'agent infectieux dans la population générale : facteurs liés à l'agent infectieux, facteurs liés à l'hôte et facteurs environnementaux. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés aux facteurs viraux en particulier, nous avons cherché à retracer l'histoire évolutive du CVA6 et de l'EVA71 à partir de l'analyse comparative de leurs génomes pour mieux comprendre les mécanismes à l'origine de leur réémergence.

Les études antérieures sur l'épidémiologie moléculaire des infections à EVA71 en Europe ont permis de montrer que les génogroupes B et C avaient des histoires évolutives distinctes : pour le génogroupe B, un remplacement rapide des souches au cours du temps sur le modèle du virus de la grippe et pour le génogroupe C, une co-circulation des populations virales correspondant aux sous-génogroupes C1 et C2 (Van Der Sanden et al., 2010). Les profils de la démographie virale tels qu'ils ressortent de l'analyse des séquences collectées en Europe montrent la coïncidence entre les périodes des pics de diversité génétique et celles des épidémies. Notre équipe a confirmé les profils phylogénétiques et les différences d'histoire évolutive entre les génogroupes B et C à une échelle plus globale (Mirand et al., 2010 ; Hassel et al., 2015). Ces études suggèrent également une alternance de périodes de recrudescence des infections causées par les sous-génogroupes C1 et C2 et une hétérogénéité de populations virales à l'intérieur de chaque sous-génogroupe. La dernière constatation à partir de ces travaux est le lien étroit de la parenté génétique entre les souches circulant en Europe et en Asie, ce qui suggère des voies de dissémination virale entre des zones géographiques distantes (Hassel et al., 2015 ; Mirand et al., 2010). L'origine des épidémies à EVA71 ne peut donc pas être comprise à l'échelle d'un pays en analysant uniquement les données rapportées nationalement, car la transmission des infections se maintient dans la population humaine à l'échelle mondiale.

Sur la période récente postérieure à 2010, deux épidémies à EVA71 ont été rapportées en France : celle de 2013 était associée aux virus C2 et celle de 2016, au virus C1v2015 (Rapport d'activités CNREVPEV, 2013, 2016). Les pics d'infections semblent donc se produire de façon rapprochée tous les trois ans, en France. En 2019, le virus C1v2015 a d'ailleurs été à l'origine d'une nouvelle recrudescence d'infections en France (Rapport d'activités CNREVPEV, 2019). Ce schéma cyclique (de 3 à 4 ans) est aussi documenté dans la région Asie-Pacifique depuis les années 1990 : Malaisie (Podin et al., 2006), Taïwan (Chang et al., 2007 ; Ho, 1999) ou Singapour (Chan et al., 2003).

L'émergence épidémique du variant C1v2015 était inattendue car les épidémies rapportées pour le sous-génogroupe C1 sont très peu nombreuses à l'échelle mondiale (Puenpa et al., 2019).

En Europe, la circulation du sous-génogroupe C1 a été rapportée entre 1994 et 2005, et a laissé la place au sous-génogroupe C2 depuis 2007. L'alternance des lignées d'un même virus au cours d'épidémies a aussi été rapportée dans une étude antérieure du laboratoire pour les deux génogroupes du type CVB5, un EV de l'espèce B régulièrement rapporté en Europe dans les vagues saisonnières de méningite aiguë (Henquell et al., 2013). Cette caractéristique épidémiologique paraît être partagée par les EV et pourrait donc dépendre d'un processus général ou de facteurs identiques. Reconstituer l'histoire évolutive et épidémique du virus C1v2015 présentait donc un intérêt épidémiologique eu égard à son profil clinique. Notre datation moléculaire a permis de situer entre 2000 et 2002, le dernier ancêtre commun entre les virus C1v2015 et C1 antérieurs, le début de la transmission active du virus C1v2015 dans la population pouvant être daté en 2010. Ces données indiquent que le variant a pu circuler entre 5 et 15 ans avant d'être rapporté pour la première fois et associé à des formes cliniques apparentes. Une telle circulation silencieuse qui a dû se produire à une large échelle géographique est donc difficilement repérable par les réseaux de surveillance clinique.

La réémergence du CVA6 en Europe est liée à un seul sous-génogroupe qui en France est rapporté depuis 2014. La comparaison de la topologie des généalogies établies avec les séquences P1 du CVA6 permet de constater l'émergence rapide de populations virales distinctes : sous-génogroupes ou lignées phylogénétiques à l'intérieur d'un même génogroupe, une caractéristique retrouvée chez d'autres types d'EV. Dans l'histoire évolutive du CVA6, le génogroupe D a émergé entre 1982 et 1995 puis s'est diversifié en peu de temps en plusieurs sous-génogroupes, ce qui indique une circulation intense des souches à l'échelle mondiale. L'émergence des sous-génogroupes D s'est produite entre 1991 et 2003 : nous avons daté l'émergence des sous-génogroupes D1, D2, et D3 respectivement en 1997, 1995 et 2000.

En France, le sous-génogroupe D2 a été détecté ponctuellement en 2010 et 2014. Le sous-génogroupe D4 qui est actuellement le plus répandu à l'échelle mondiale a émergé en 2004 (entre 2002 et 2005), soit environ 4 ans avant la première épidémie de maladie PMB causée par ce virus et rapportée en Finlande (Österback et al., 2009). En France, les souches de sous-génogroupe D4 ont circulé pendant toute la période de l'étude. A l'échelle mondiale, la prédominance de ce sous-génogroupe peut être la conséquence d'émergence de multiples lignées et/ou d'une propagation accrue dans la population. Le processus de diversification globale du génogroupe D rappelle de façon étonnante celui qui a généré les sous-génogroupes C1 à C5 parmi les souches d'EVA71. Le sous-génogroupe C4 d'EVA71 circule de façon très large en Asie du sud-est, mais sa diffusion n'est pas aussi globale que semble l'être celle du sous-génogroupe D4 du CVA6.

IV. Variations de la capside et dynamique épidémiologique des lignées

Sur un plan général, la fréquence d'un virus dans une population d'hôtes peut être augmentée par l'effet de la sélection naturelle, de la dérive génétique ou résulter de facteurs épidémiologiques agissant sur les populations d'hôte (Geoghegan & Holmes, 2018). Comme ces différents facteurs peuvent agir ensemble, il est souvent difficile de déterminer lequel a un effet prépondérant sur la diffusion d'une lignée virale. On considère que les caractéristiques de la capside des EV sont des facteurs majeurs pour déterminer la transmission des souches dans la population en induisant les réponses immunitaires notamment humorales neutralisantes (Huang et al., 2020 ; Vogt & Crowe, 2018). C'est pourquoi, notre analyse a porté plus particulièrement sur les séquences P1.

Nous avons mis en évidence des changements en acides aminés dans les structures exposées à la surface du virus C1v2015 qui peuvent être liés à sa plus grande propagation par rapport aux virus C1 qui ont précédé. Des études antérieures ont montré une neutralisation croisée entre les souches de différents génogroupes d'EVA71 (Zhang et al., 2014). Mais les enfants infectés par le génogroupe B présentent des titres de neutralisation plus élevés contre ce génogroupe que contre le génogroupe C (Huang et al., 2013). Cette observation a été confirmée en utilisant des antisérums de lapin contre l'EVA71 B2 qui ne peuvent pas neutraliser les virus C1 et C2 (Van Der Sanden et al., 2010). A l'opposé, les anticorps anti C1 peuvent neutraliser les souches des génogroupes B et C. Ces données suggèrent l'existence d'une variation antigénique entre les différents génogroupes d'EVA71 mais sont insuffisantes pour conclure à un rôle direct dans l'émergence et l'alternance des lignées virales au cours du temps. Les séquences P1 du virus C1v2015 et des virus C1 antérieurs présentent des changements d'acides aminés dans les protéines VP1, VP2 et VP3. La substitution VP1/V16M est localisée dans la région N-terminale de la protéine VP1. D'après la structure tridimensionnelle de l'EVA71, les résidus 1 à 71 de la protéine interagissent avec l'ARN viral (Lyu et al., 2014). La région N-terminale de VP1 est également exposée provisoirement pendant la transition du provirion à la particule A lors de la liaison au récepteur cellulaire (Lim et al., 2013). Une étude a aussi relevé une substitution VP1/D14N d'échappement à la neutralisation chez des souches du sous-génogroupe B4 (Niknadia et al., 2018). Des clones infectieux portant cette substitution ont été construits et sont moins bien neutralisés par des sérums immuns d'origine humaine. La position VP1/14 serait reconnue par les IgM lors d'une infection aiguë.

Les virus C1v2015 présentent des substitutions VP3/N93D et VP3/A232S ; ces deux positions sont exposées à la surface de la capside et adjacentes à la position VP3/81. L'étude des virus C1v2015 détectés récemment à Taiwan montre que la position 81 de la protéine VP3 fait partie d'un épitope reconnu par les anticorps neutralisants humains (Huang et al., 2020). La position VP3/81 est également reconnue par deux anticorps neutralisants d'origine murine qui empêchent le virus de se fixer au récepteur (Zhu et al., 2018).

Le résidu VP3/81 est immunogène et provoque une réponse d'anticorps neutralisants. Les virus C1v2015 pourraient avoir été sélectionnés par la présence de changements d'acides aminés dans cette zone antigénique, ce qui aurait favorisé leur transmission humaine à grande échelle.

En se basant sur la présence de l'acide glutamique à la position VP1/145 (VP1/145E), nous pouvons faire l'hypothèse que les virus C1v2015 sont dépendants du récepteur SCARB2. Les boucles GH de la protéine VP1 et EF de la protéine VP2 participent à l'interaction du virus avec le récepteur SCARB2, ce qui pourrait faciliter la décapsidation du virus à faible pH dans l'endosome/lysosome (Zhou et al., 2019). Or les virus C1v2015, à l'exception de ceux associés aux infections asymptomatiques, présentent la caractéristique notable d'avoir une substitution VP2/I170V située dans la boucle EF. Nous faisons l'hypothèse que les résidus VP2/170V et VP1/145E peuvent interagir en renforçant la fixation du virus au récepteur, ce qui favoriserait l'infection virale. Cette hypothèse d'un effet synergique entre ces deux régions de la capside virale a été proposée avec les doubles mutations en VP2/149M et VP1/145E qui contribuent à l'infection virale *in vitro* et à la létalité chez la souris (Huang et al., 2012). Nous avons par ailleurs identifié les substitutions VP2/V217A et VP3/T238I chez les virus C1v2015 rapportés chez des enfants asymptomatiques inscrits dans la même crèche. La substitution VP3/T238I confirme que la protéine VP3 est sujette à des variations à proximité du site VP3/232. Ces données sont préliminaires et devront être confirmées par d'autres analyses comme la modélisation moléculaire, l'analyse de séroneutralisation croisée ou l'étude de l'adsorption à la surface de cellules susceptibles. Elles suggèrent cependant que les variations d'acides aminés dans la région structurale P1 ont participé à une transmission plus efficace des souches C1v2015.

Concernant le CVA6, notre analyse comparative des variations structurales entre les génogroupes et les sous-génogroupes n'a pas été poussée suffisamment loin pour arriver à des conclusions solides. Toutefois, contrairement à l'EVA71, nous n'avons pas observé de variation qui semblerait déterminante dans les protéines structurales entre les souches des sous-génogroupes D du CVA6. Des travaux de modélisation épidémiologique à partir des données de surveillance des infections à EV au Japon entre 2000 et 2014 ont d'ailleurs montré que l'immunité acquise pour un type permettait d'expliquer la périodicité des épidémies de nombreux types d'EV dont l'EVA71 mais pas celle du CVA6 (Pons-Salort et al., 2018). Différentes études de la structure moléculaire indiquent des variations structurales dans les boucles exposées en surface de la capside du CVA6 par rapport à l'EVA71 et au CVA16, perturbant l'identification des épitopes antigéniques spécifiques du CVA6 (Anasir & Poh, 2019; Chen et al.; Xu et al., 2017). Néanmoins, d'importantes structures en boucle exposées en surface dans la capside peuvent être des épitopes de neutralisation virale du type CVA6 (Anasir & Poh, 2019; Chen et al., 2017; Xu et al., 2017). Les résidus VP1/54S et VP1/242I (localisés dans la boucle HI) spécifiques au sous-génogroupe D3 et les résidus VP2/132I et VP2/172I (localisés dans la boucle EF) qui permettent de discriminer le sous-génogroupe majoritaire D4 des autres sous-

génogroupes pourraient améliorer l'adaptation du CVA6 à l'hôte. Une étude complémentaire de séroprévalence serait nécessaire pour analyser le rôle que ces mutations pourraient être avoir dans les mécanismes d'échappement à l'immunité de l'hôte. Enfin, des modèles expérimentaux tels que des systèmes multicellulaires reproduisant la surface cutanée permettraient de tester de nombreuses souches de CVA6 présentant des variations spécifiques afin de rechercher des déterminants moléculaires de leur pouvoir pathogène.

V. Dynamique des populations virales et recombinaison génétique

L'histoire évolutive de l'EVA71 et du CVA6, comme celle des autres EV, est liée à la recombinaison génétique, comme mécanisme générateur de nouvelles lignées, dont certaines sont associées à des grandes épidémies. Les études réalisées sur l'EVA71 suggèrent que les événements de recombinaison génétique sont associés à l'émergence des différents sous-génogroupes (Lukashev et al., 2014; McWilliam Leitch et al., 2012). Pour le gène $3D^{pol}$ du virus C1v2015, nous montrons qu'il est issu d'évènements de recombinaison intertypiques pouvant impliquer 4 types d'EV différents de l'espèce A (CVA2, CVA4, CVA6). La similitude entre les séquences nucléotidiques de ces virus comprise entre 90 % et 95 %, suggère un événement plutôt récent, si l'on considère que les variations surviennent à un taux annuel de 1 %. La date de l'évènement de recombinaison dans le gène $3D^{pol}$ (2013) est contemporaine de l'augmentation de la diversité génétique du virus C1v2015 estimée entre 2010 et 2014 avec les séquences P1.

Nos résultats indiquent que l'hypothèse selon laquelle la recombinaison est associée à l'émergence d'un clade épidémique - génogroupe, sous-génogroupe - s'applique aussi à une lignée de ces mêmes groupes.

L'identification d'une souche de CVA6 parmi les partenaires de recombinaison du virus C1v2015 suggère un lien entre les profils épidémiques de ces virus sans pour autant montrer que le virus C1v2015 aurait profité de la dynamique épidémique d'une population de CVA6, comme nous en avions fait l'hypothèse à l'origine de ce travail. Un échantillonnage beaucoup plus conséquent dans les pays d'Asie centrale serait nécessaire pour poursuivre dans cette voie.

En réalité, malgré le grand nombre de séquences génomiques d'EVA71 disponibles, la fréquence des lignées recombinantes identifiées est modérée en comparaison avec le CVA6. L'analyse du gène $3D^{pol}$ des génomes d'EVA71 collectés pendant 40 ans dans 19 pays a permis d'identifier seulement 11 lignées recombinantes. Chacune est spécifique de l'EVA71, correspond à un sous-génogroupe et a une 1/2 vie de 6 à 9 ans (McWilliam Leitch, 2012). En analysant 547 génomes complets de CVA6 isolés dans 17 pays différents entre 1950 et 2018, nous avons identifiés 19 lignées recombinantes dans le seul sous-génogroupe D4.

Chaque forme recombinante constitue une lignée distincte, ce qui suggère l'existence de populations de gènes de la polymérase virale. Nous pouvons établir un parallèle entre le sous-génogroupe CVA6 D4 et le virus C1v2015 sur la base d'autres travaux en cours concernant ce dernier. Une analyse plus fine des séquences disponibles met en évidence l'existence de plusieurs variants recombinants du gène $3D^{pol}$ dont seul un serait devenu épidémique. Nous suggérons que pour des raisons encore inconnues, une majorité de lignées recombinantes de CVA6 perdurent alors que celles de l'EVA71 s'éteignent. La propagation rapide du CVA6 pourrait aussi être liée à la grande fréquence de recombinaison génétique suggérant que ce processus constitue un avantage pour le CVA6, peut-être par élimination des mutations délétères comme cela est proposé en génétique des populations. Cette hypothèse est toutefois contestée (Simon-Loriere & Holmes, 2011). Une analyse des variations en acides aminés dans les protéines non structurales permettra peut-être d'avancer sur cette question.

La recombinaison génétique pourrait également être à l'origine d'une virulence et d'une transmissibilité plus élevées, cette hypothèse est avancée pour les souches vaccinales de poliovirus ou du sous-génogroupe EVA71 C4a (Minor, 2009; Plotkin, 2010; Zhang et al., 2009; 2013). La diffusion massive du sous-génogroupe CVA6 D4 a été contemporaine de l'observation de formes cliniques étendues et atypiques de la maladie PMB, les formes tardives suggérant également une atteinte plus profonde du tissu cutané. Cette simultanéité pourrait indiquer que les différentes lignées recombinantes, en particulier RF-H, présentent une grande capacité de transmission et de persistance dans la population associée à une certaine efficacité de réplication, celle-ci pouvant aussi expliquer la diffusion rapide sur plusieurs territoires cutanés. De façon similaire, l'EVA71 C1v2015 est associé à des atteintes neurologiques sévères de façon plus fréquente que les souches ayant circulé auparavant. La propagation de ce variant multi-recombinant et donc un nombre plus élevé d'infections et de formes sévères peuvent s'expliquer par les modifications observées dans la capside en lien avec une diminution de la protection croisée entre le nouveau variant et les souches C2 ayant circulé immédiatement auparavant. Cependant, l'aspect mosaïque du génome C1v2015, en particulier des régions impliquées dans la réplication ou la traduction du génome viral, peut laisser supposer que la recombinaison a joué un rôle dans l'acquisition de capacités réplicatives plus importantes à l'origine d'une plus grande chance pour le virus d'atteindre le SNC. Pour le CVA6, l'immunité de la population ne semble pas être l'hypothèse à favoriser. Les travaux de Pons Salort et al. (2018) évoqués plus haut, suggèrent que l'augmentation de la pathogénicité est le modèle épidémiologique qui permet d'expliquer le mieux le changement de profil de circulation du CVA6 au Japon à partir de 2010. La question d'un lien entre la recombinaison et cette modification de la pathogénicité reste ouverte. La recombinaison entre des souches vaccinales de poliovirus et les CVA de l'espèce C a par exemple donné lieu à des souches de poliovirus présentant une neurovirulence accrue chez des souris transgéniques infectées par le poliovirus *in vivo* (Jegouic et al., 2009).

En France, deux lignées principales de CVA6 ont circulé : RF-A pendant toute la période et RF-H à partir de 2014. Dans notre étude, l'analyse d'un grand nombre de séquences virales et des données cliniques correspondantes n'a pas montré d'association significative entre les formes atypiques et une lignée recombinante donnée. D'autres études ont cependant associé des phénotypes cliniques à la recombinaison génétique (Feng et al., 2015 ; Österback et al., 2009 ; Sinclair et al., 2014).

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Plusieurs travaux suggèrent que l'émergence d'un clade parmi les souches d'un type d'EV peut être reliée à la recombinaison de son génome avec celui d'un autre type de la même espèce taxonomique (McWilliam Leitch, 2012 ; Lukashev et al., 2014). Partant de l'hypothèse que cette émergence peut être associée à une sévérité du tableau clinique de l'infection, notre intérêt s'est porté sur les types CVA6 et EVA71 qui sont associés à une maladie PMB atypique pour l'un et à des formes neurologiques sévères pour l'autre dans la perspective d'analyser les facteurs virologiques et épidémiologiques associés à leur réémergence épidémique. Pour cette exploration, nous avons aussi souhaité mettre en œuvre une approche de séquençage haut débit, plus globale que celle habituellement utilisée dans le laboratoire et la majorité des études d'épidémiologie moléculaire, afin de déterminer les génomes viraux complets en grand nombre à partir des prélèvements cliniques. A cause du temps nécessaire à sa mise au point, cette stratégie n'a été disponible que pour l'étude du CVA6 et nous a permis de décrire la grande diversité des souches de ce virus rapporté pendant 9 années de surveillance de la maladie PMB. Bien que nous n'ayons pas pu utiliser cette approche haut débit pour l'étude de l'EVA71 C1v2015 dont l'étude a été réalisée par séquençage Sanger classique, l'ensemble du travail sur ces deux virus montre l'intérêt de comparer les génomes complets pour analyser l'évolution génétique et la dynamique des communautés virales pendant les épidémies.

Notre travail présente plusieurs limites dont l'examen permet de proposer des perspectives. La première limite est liée à l'échantillonnage et donc au nombre de prélèvements analysés, et concerne les deux virus étudiés. Prenons l'exemple de l'étude de la diversité génomique du CVA6. Pour des raisons budgétaires, nous n'avons pas pu analyser l'ensemble des prélèvements cliniques disponibles et avons procédé à une sélection. Les génomes viraux ont été déterminés pour un échantillon de prélèvements sélectionnés de façon à représenter l'échantillon initial, qui lui-même était un sous-échantillon des populations virales en circulation dans la population pédiatrique. A cause de cette sélection, nous ne sommes pas assurés d'avoir décrit la totalité de la diversité génétique présente parmi les souches de CVA6 en circulation en France pendant la période d'étude. Par ailleurs, les données épidémiologiques rapportées pour la surveillance de la maladie PMB rapportent que ce virus est en co-circulation avec d'autres types de l'espèce A au cours des épidémies de maladie PMB. Or la co-circulation est la première condition nécessaire pour que deux virus puissent devenir des partenaires de recombinaison. L'étude de la diversité génomique liée à la recombinaison est donc fortement impactée par ces biais d'échantillonnage. Déterminer les génomes des autres virus en co-circulation avec le virus d'intérêt est donc nécessaire pour décrire complètement la dynamique de recombinaison pendant et entre les épidémies. Dans le cas de l'EVA71 C1v2015, nous avons recherché grâce à des collaborations l'origine de ce virus, mais cette analyse reste encore inachevée. C'est pourquoi, l'étude mentionnée plus haut de la circulation de ce virus et son analyse moléculaire sera poursuivie à l'échelle européenne dans le cadre du réseau ENPEN (European non-polio enterovirus network).

La méthode de séquençage génomique pourra être utilisée à plus grande échelle dans le cadre de cette collaboration et permettra une analyse de la distribution géographique actuelle des souches entre les pays européens et des mouvements à l'origine de leur migration. Cette étude plus vaste permettra éventuellement de détecter de nouvelles lignées ou formes recombinantes du virus C1v2015 et donc de mieux comprendre les mécanismes de son émergence. Avec la circulation potentielle en Afrique de l'ancêtre de l'EVA71 C1v2015 (cette étude) et la détection récente du CVA6 au Gabon associé à 4 cas de maladie PMB (Lekana-Douki et al., 2019), l'émergence de ces virus suscite plusieurs interrogations dont celles de leur large spectre clinique et de leur circulation réelle dans des pays où la surveillance des infections à EV n'est pas encore mise en œuvre. L'accroissement des flux humains sur de longues distances impacte aussi l'évolution des EV, il est possible que des épidémies à EV non-poliomyélitiques en soient une conséquence. Avec une description plus exhaustive des génomes viraux échantillonnés plus largement, il serait possible de recourir à une approche analytique basée sur la théorie des réseaux pour étudier les interactions entre les différents types d'EV. Cette approche permettrait de repérer l'existence ou au contraire l'absence d'interactions préférentielles entre types d'EV pour la recombinaison génétique. Le premier cas de figure serait en faveur de l'existence de facteurs déterministes dans la survenue de ces interactions par recombinaison, le second suggérerait plutôt des interactions entre virus liées au hasard.

De nombreux éléments de la littérature indiquent des liens entre variation génétique (neurovirulence des poliovirus, cardiotropisme des CVB, taux de multiplication, induction ou échappement à l'immunité intracellulaire) et altération du pouvoir pathogène des EV. Pour poursuivre l'étude des lignées mises en évidence dans ce travail et des variations qu'elles portent, une approche fonctionnelle est donc nécessaire, à la condition qu'elle soit adaptée à une comparaison pratique des souches et à une étude pertinente du pouvoir pathogène, plus proche de ce qui est observé *in vivo*. Dans la perspective d'analyser les liens entre les variations moléculaires relevées chez l'EVA71 et les formes neurologiques, j'ai commencé une étude qui est restée à l'état préliminaire et n'a donc pas été intégrée à cette thèse. Son but était de comparer le pouvoir pathogène de souches sélectionnées parmi des lignées virales d'intérêt. Pour cela, nous souhaitions mettre au point un modèle neuronal simple, en utilisant des protocoles de différenciation cellulaire publiés pour la lignée SH-SY5Y. L'étude n'ayant pas pu être conduite à son terme, les résultats sont présentés en annexe. Pour poursuivre dans cette voie, une des perspectives envisagées est de disposer de systèmes cellulaires plus pertinents. Concernant l'étude du pouvoir pathogène des EV associés à la maladie PMB, un projet évoqué plus haut consiste à développer un modèle multicellulaire, tridimensionnel de peau utilisable pour comparer le dermotropisme, le déroulement de l'infection virale et les conséquences de cette infection sur les cellules. Avec ce modèle, il serait possible d'analyser les réponses de l'immunité innée à l'infection et de rechercher les mutations susceptibles d'induire un échappement.

Une autre perspective consiste à développer un modèle de barrière hémato-encéphalique plus adapté que le modèle déjà utilisé dans le laboratoire. Son but serait d'étudier l'hypothèse du franchissement de cette barrière endothéliale par le biais de cellules leucocytaires infectées par les EV. Ces modèles permettraient de se rapprocher des conditions physiologiques de l'infection et de reproduire le cycle infectieux des virus neurotropes et dermotropes et leurs conséquences sur la physiologie neuronale et cutanée.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abe, Y., Fujii, K., Nagata, N., Takeuchi, O., Akira, S., Oshiumi, H., Matsumoto, M., Seya, T., & Koike, S. (2012). The Toll-Like Receptor 3-Mediated Antiviral Response Is Important for Protection against Poliovirus Infection in Poliovirus Receptor Transgenic Mice. *Journal of Virology*, *86*(1), 185–194. https://doi.org/10.1128/jvi.05245-11

Abedi, G. R., Watson, J. T., Nix, W. A., Oberste, M. S., & Gerber, S. I. (2018). Enterovirus and Parechovirus Surveillance — United States, 2014–2016. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, *67*(18), 515–518. https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6718a2

Abzug M.J. The enteroviruses: problems in need of treatments J Infect (Suppl. 1) (2014), pp. S108-S114

Adams, M. J., Lefkowitz, E. J., King, A. M. Q., Bamford, D. H., Breitbart, M., Davison, A. J., Ghabrial, S. A., Gorbalenya, A. E., Knowles, N. J., Krell, P., Lavigne, R., Prangishvili, D., Sanfaçon, H., Siddell, S. G., Simmonds, P., & Carstens, E. B. (2015). Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2015). In *Archives of virology* (Vol. 160, Issue 7, pp. 1837–1850). Springer. https://doi.org/10.1007/s00705-015-2425-z

Agol, V. I. (2012). Cytopathic effects: Virus-modulated manifestations of innate immunity? In *Trends in Microbiology* (Vol. 20, Issue 12, pp. 570–576). https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.09.003

Agol, V. I., Belov, G. A., Bienz, K., Egger, D., Kolesnikova, M. S., Raikhlin, N. T., Romanova, L. I., Smirnova, E. A., & Tolskaya, E. A. (1998). Two types of death of poliovirus-infected cells: Caspase involvement in the apoptosis but not cytopathic effect. *Virology*, *252*(2), 343–353. https://doi.org/10.1006/viro.1998.9438

Agol, V. I., Belov, G. A., Bienz, K., Egger, D., Kolesnikova, M. S., Romanova, L. I., Sladkova, L. V., & Tolskaya, E. A. (2000). Competing Death Programs in Poliovirus-Infected Cells: Commitment Switch in the Middle of the Infectious Cycle. *Journal of Virology*, *74*(12), 5534–5541. https://doi.org/10.1128/jvi.74.12.5534-5541.2000

Alexander, J. P., Baden, L., Pallansch, M. A., & Anderson, L. J. (1994). Enterovirus 71 infections and neurologic disease—united states, 1977–1991. *Journal of Infectious Diseases*, *169*(4), 905–908. https://doi.org/10.1093/infdis/169.4.905

Allan Nix, W., Oberste, M. S., Pallansch, M. A., Nix, W., Oberste, M. S., Pallansch, M. A., Allan Nix, W., Oberste, M. S., & Pallansch, M. A. (2006). Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, *44*(8), 2698–2704. https://doi.org/10.1128/JCM.00542-06

Altan-Bonnet, N., & Chen, Y.-H. (2015). *Intercellular Transmission of Viral Populations with Vesicles*. https://doi.org/10.1128/JVI.01452-15

Amarante-Mendes, G. P., Adjemian, S., Branco, L. M., Zanetti, L. C., Weinlich, R., & Bortoluci, K. R. (2018). Pattern recognition receptors and the host cell death molecular machinery. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 9, Issue OCT). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02379

Ambros, V, & Baltimore, D. (1980). Purification and properties of a HeLa cell enzyme able to remove the 5'-terminal protein from poliovirus RNA. *The Journal of Biological Chemistry*, *255*(14), 6739–6744. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6248532

Ambros, Victor, & Baltimore, D. (1978). *Protein Is Linked to the 5' End of Poliovirus RNA by a Phosphodiester Linkage to Tyrosine**. http://www.jbc.org/

Ammendolia, M. G., Tinari, A., Calcabrini, A., & Superti, F. (1999). Poliovirus infection induces apoptosis in CaCo-2 cells. *Journal of Medical Virology*, *59*(1), 122–129. https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9071(199909)59:1<122::AID-JMV20>3.0.CO;2-9

Anasir, M. I., & Poh, C. L. (2019). Structural vaccinology for viral vaccine design. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 10, Issue MAR). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00738

Andino, R., Böddeker, N., Silvera, D., & Gamarnik, A. V. (1999). Intracellular determinants of picornavirus replication. In *Trends in Microbiology* (Vol. 7, Issue 2, pp. 76–82). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/S0966-842X(98)01446-2

Andrew White, K., & Jack Morris, T. (1995). RNA determinants of junction site selection in RNA virus recombinants and defective interfering RNAs. *RNA*, *1*(10), 1029–1040. /pmc/articles/PMC1369329/?report=abstract

Ang, L., Koh, B., Chan, K., Chua, L., & James, L. (2009). Epidemiology and control of hand, foot and mouth disease in Singapore, 2001–2007. *Ann Acad Med Singapore*, *38*.

Antona, D., Kossorotoff, M., Schuffenecker, I., Mirand, A., Leruez-Ville, M., Bassi, C., Aubart, M., Moulin, F., Lévy-Bruhl, D., Henquell, C., Lina, B., & Desguerre, I. (2016). Severe paediatric conditions linked with EVA71 and EV-D68, France, May to October 2016. *Eurosurveillance*, *21*(46). https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.46.30402

Arita, M., Ami, Y., Wakita, T., & Shimizu, H. (2008). Cooperative Effect of the Attenuation Determinants Derived from Poliovirus Sabin 1 Strain Is Essential for Attenuation of Enterovirus 71 in the NOD/SCID Mouse Infection Model. *Journal of Virology*, *82*(4), 1787–1797. https://doi.org/10.1128/jvi.01798-07

Arita, M., Nagata, N., Sata, T., Miyamura, T., & Shimizu, H. (2006). Quantitative analysis of poliomyelitis-like paralysis in mice induced by a poliovirus replicon. *Journal of General Virology*, *87*(11), 3317–3327. https://doi.org/10.1099/vir.0.82172-0

Arola, A., Santti, J., Ruuskanen, O., Halonen, P., & Hyypiä, T. (1996). Identification of enteroviruses in clinical specimens by competitive PCRr followed by genetic typing using sequence analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, *34*(2), 313–318. https://doi.org/10.1128/jcm.34.2.313-318.1996

Aswathyraj, S., Arunkumar, G., Alidjinou, E. K., & Hober, D. (2016). Hand, foot and mouth disease (HFMD): emerging epidemiology and the need for a vaccine strategy. In *Medical Microbiology and Immunology* (Vol. 205, Issue 5, pp. 397–407). Springer Verlag. https://doi.org/10.1007/s00430-016-0465-y

Austermann-Busch, S., & Becher, P. (2012). RNA Structural Elements Determine Frequency and Sites of Nonhomologous Recombination in an Animal Plus-Strand RNA Virus. *Journal of Virology*, *86*(13), 7393–7402. https://doi.org/10.1128/jvi.00864-12

Badran, S. A., Midgley, S., Andersen, P., & Böttiger, B. (2011). Clinical and virological features of enterovirus 71 infections in Denmark, 2005 to 2008. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, *43*(8), 642–648. https://doi.org/10.3109/00365548.2011.577094

Baek, S., Park, S., Park, H. K., & Chun, B. C. (2020). The epidemiological characteristics and spatio-temporal analysis of childhood hand, foot and mouth disease in Korea, 2011-2017. *PLOS ONE*, *15*(1), e0227803. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227803

Baggen, J., Hurdiss, D. L., Zocher, G., Mistry, N., Roberts, R. W., Slager, J. J., Guo, H., Van Vliet, A. L. W., Wahedi, M., Benschop, K., Duizer, E., De Haan, C. A. M., De Vries, E., Casasnovas, J. M., De Groot, R. J., Arnberg, N., Stehle, T., Ranson, N. A., Thibaut, H. J., & Van Kuppeveld, F. J. M. (2017). Role of enhanced receptor engagement in the evolution of a pandemic acute hemorrhagic conjunctivitis virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(2), 397–402. https://doi.org/10.1073/pnas.1713284115

Bailly, J.-L., Chambon, M., & Peigue-Lafeuille, H. (1999). Diversité et variabilité des entérovirus. *Virologie*, *3*(4), 281–295. http://www.jle.com/fr/revues/vir/e-docs/diversite_et_variabilite_des_enterovirus_260260/article.phtml?tab=texte

Bailly, J. L., Chambon, M., Peigue-Lafeuille, H., Laveran, H., De Champs, C., & Beytout, D. (1991). Activity of glutaraldehyde at low

concentrations (less than 2 %) against poliovirus and its relevance to gastrointestinal endoscope disinfection procedures. *Applied and Environmental Microbiology*, *57*(4).

Bailly, J. L., Mirand, A., Henquell, C., Archimbaud, C., Chambon, M., Charbonné, F., Traoré, O., & Peigue-Lafeuille, H. (2008). Génotypage et épidémiologie moléculaire des entérovirus non poliomyélitiques. In *Virologie* (Vol. 12, Issue 1, pp. 53–65). https://doi.org/10.1684/vir.2008.0149

Baltimore, D. (1964). IN VITRO SYNTHESIS OF VIRAL RNA BY THE POLIOVIRUS RNA POLYMERASE. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *51*(11), 450–456. https://doi.org/10.1073/pnas.51.3.450

Basavappa, R., Filman, D. J., Syed, R., Flore, O., Icenogle, J. P., & Hogle, J. M. (1994). Role and mechanism of the maturation cleavage of VP0 in poliovirus assembly: Structure of the empty capsid assembly intermediate at 2.9 Å resolution. *Protein Science*, *3*(10), 1651–1669. https://doi.org/10.1002/pro.5560031005

Bedard, K. M., & Semler, B. L. (2004). Regulation of picornavirus gene expression. In *Microbes and Infection* (Vol. 6, Issue 7, pp. 702–713). Elsevier Masson SAS. https://doi.org/10.1016/j.micinf.2004.03.001

Belov, G. A., & Ehrenfeld, E. (2007). Involvement of cellular membrane traffic proteins in poliovirus replication. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, *6*(1), 36–38. https://doi.org/10.4161/cc.6.1.3683

Belov, G. A., Romanova, L. I., Tolskaya, E. A., Kolesnikova, M. S., Lazebnik, Y. A., & Agol, V. I. (2003). The Major Apoptotic Pathway Activated and Suppressed by Poliovirus. *Journal of Virology*, *77*(1), 45–56. https://doi.org/10.1128/jvi.77.1.45-56.2003

Ben-Chetrit, E., Wiener-Well, Y., Shulman, L. M., Cohen, M. J., Elinav, H., Sofer, D., Feldman, I., Marva, E., & Wolf, D. G. (2014). Coxsackievirus A6-related hand foot and mouth disease: Skin manifestations in a cluster of adult patients. *Journal of Clinical Virology*, *59*(3), 201–203. https://doi.org/10.1016/j.jcv.2013.12.012

Bergelson, J. M., & Coyne, C. B. (2013). Picornavirus entry. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *790*, 24–41. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7651-1_2

Bessaud, M., Pillet, S., Ibrahim, W., Joffret, M. L., Pozzetto, B., Delpeyroux, F., & Gouandjika-Vasilached, I. (2012). Molecular characterization of human enteroviruses in the central african republic: Uncovering wide diversity and identification of a new human enterovirus A71 genogroup. *Journal of Clinical Microbiology*, *50*(5), 1650–1658. https://doi.org/10.1128/JCM.06657-11

Bessaud, M., Razafindratsimandresy, R., Nougairède, A., Joffret, M. L., Deshpande, J. M., Dubot-Pérès, A., Héraud, J. M., De Lamballerie, X., Delpeyroux, F., & Bailly, J. L. (2014). Molecular comparison and evolutionary analyses of VP1 nucleotide sequences of new African human enterovirus 71 isolates reveal a wide genetic diversity. *PLoS ONE*, *9*(3), e90624. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090624

Bessaud, M., Sadeuh-Mba, S. A., Joffret, M.-L., Razafindratsimandresy, R., Polston, P., Volle, R., Rakoto-Andrianarivelo, M., Blondel, B., Njouom, R., Delpeyroux, F. (2016). Whole Genome Sequencing of Enterovirus species C Isolates by High-Throughput Se-quencing: Development of Generic Primers. *Frontiers in Microbiology*, *7*, 1294. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01294.

Bian, L., Wang, Y., Yao, X., Mao, Q., Xu, M., Liang, Z., L Bian, Y. W. X. Y. Q. M. M. X. Z. L., Bian, L., Wang, Y., Yao, X., Mao, Q., Xu, M., & Liang, Z. (2015). Coxsackievirus A6: A new emerging pathogen causing hand, foot and mouth disease outbreaks worldwide. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, *13*(9), 1061–1071. https://doi.org/10.1586/14787210.2015.1058156

Biedler1, J. L., Roffler-Tarlov, S., Schachner, M., & Freedman, L. S. (1978). *Multiple Neurotransmitter Synthesis by Human Neuroblastoma Cell Lines and Clones*.

Bienz, K., Egger, D., & Wolff, D. A. (1973). Virus Replication, Cytopathology, and Lysosomal Enzyme Response of Mitotic and Interphase Hep-2 Cells Infected with Poliovirus. *Journal of Virology*, *11*(4), 565–574. https://doi.org/10.1128/jvi.11.4.565-574.1973

Bird, S. W., Maynard, N. D., Covert, M. W., & Kirkegaard, K. (2014). Nonlytic viral spread enhanced by autophagy components. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(36), 13081–13086. https://doi.org/10.1073/pnas.1401437111

Blomberg, J., Lycke, E., Ahlfors, K., Johnsson, T., Wolontis, S., & Von Zeipel, G. (1974). NEW ENTEROVIRUS TYPE ASSOCIATED WITH EPIDEMIC OF ASEPTIC MENINGITIS AND/OR HAND, FOOT, AND MOUTH DISEASE. *The Lancet*, *304*(7872), 112. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(74)91684-5

Blomqvist, S., Klemola, P., Kaijalainen, S., Paananen, A., Simonen, M. L., Vuorinen, T., & Roivainen, M. (2010). Co-circulation of coxsackieviruses A6 and A10 in hand, foot and mouth disease outbreak in Finland. *Journal of Clinical Virology*, *48*(1), 49–54. https://doi.org/10.1016/j.jcv.2010.02.002

Blomqvist, S., Paananen, A., Savolainen-Kopra, C., Hovi, T., & Roivainen, M. (2008). Eight years of experience with molecular identification of human enteroviruses. *Journal of Clinical Microbiology*, *46*(7), 2410–2413. https://doi.org/10.1128/JCM.00313-08

Blondel, B, Autret, A., Brisac, C., Pelletier, I., Martin-Latil, S., Jegouic, S., Bessaud, M., Joffret, M. L., Balanant, J., Colbère-Garapin, F., & Delpeyroux, F. (2008). [Genetic evolution of poliovirus: success and difficulties in the eradication of paralytic poliomyelitis]. *Medecine Tropicale : Revue Du Corps de Sante Colonial*, *68*(2), 189–202. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18630055

Blondel, Bruno, Couderc, T., Pavio, N., & Colbère-Garapin, F. (1995). Biologie moléculaire du poliovirus. *Annales de l'Institut Pasteur/Actualites*, *6*(2), 86–99. https://doi.org/10.1016/0924-4204(96)83612-2

Bodman, M. A., & Brlan, M. R. (1995). Superficial white onychomycosis. *Journal of the American Podiatric Medical Association*, *85*(4), 205–208. https://doi.org/10.7547/87507315-85-4-205

Böttcher, S., Obermeier, P. E., Neubauer, K., Diedrich, S., Hofmann, J., Heider, H., Reif, U., Korn, K., Rabenau, H. F., Wille, A., Baillot, A., Pettke, A., Kühn, J., Ackermann, N., Ramelow, C., Hahn, R., Enders, M., Adam, M., Michel, D., … Prifert, C. (2016). Recombinant enterovirus A71 subgenogroup C1 strains, Germany, 2015. In *Emerging Infectious Diseases* (Vol. 22, Issue 10, pp. 1843–1846). Centers for Disease Control and Prevention (CDC). https://doi.org/10.3201/eid2210.160357

Bouckaert, R., Heled, J., Kühnert, D., Vaughan, T., Wu, C. H., Xie, D., Suchard, M. A., Rambaut, A., & Drummond, A. J. (2014). BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis. *PLoS Computational Biology*, *10*(4). https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003537

Bozym, R. A., Patel, K., White, C., Cheung, K. H., Bergelson, J. M., Morosky, S. A., & Coyne, C. B. (2011). Calcium signals and calpain-dependent necrosis are essential for release of coxsackievirus B from polarized intestinal epithelial cells. *Molecular Biology of the Cell*, *22*(17), 3010–3021. https://doi.org/10.1091/mbc.E11-02-0094

Bracho, M. A., González-Candelas, F., Valero, A., Córdoba, J., & Salazar, A. (2011). Enterovirus co-infections and onychomadesis after hand, foot, and mouth disease, Spain, 2008. *Emerging Infectious Diseases*, *17*(12), 2223–2231. https://doi.org/10.3201/eid1712.110395

Brandt, O., Abeck, D., Gianotti, R., & Burgdorf, W. (2006). Gianotti-Crosti syndrome. In *Journal of the American Academy of Dermatology* (Vol. 54, Issue 1, pp. 136–145). Mosby. https://doi.org/10.1016/j.jaad.2005.09.033

Brown, B. A., Oberste, M. S., Alexander, J. P., Kennett, M. L., & Pallansch, M. A. (1999). Molecular Epidemiology and Evolution of Enterovirus 71 Strains Isolated from 1970 to 1998. *Journal of Virology*, *73*(12), 9969–9975. https://doi.org/10.1128/jvi.73.12.9969-9975.1999

Brown, B. A., & Pallansch, M. A. (1995). Complete nucleotide sequence of enterovirus 71 is distinct from poliovirus. *Virus Research*, *39*(2–

3), 195–205. https://doi.org/10.1016/0168-1702(95)00087-9
Brown, B., Oberste, M. S., Maher, K., & Pallansch, M. A. (2003). Complete Genomic Sequencing Shows that Polioviruses and Members of Human Enterovirus Species C Are Closely Related in the Noncapsid Coding Region. *Journal of Virology*, *77*(16), 8973–8984. https://doi.org/10.1128/jvi.77.16.8973-8984.2003
Bureau of Epidemiology Department of Disease Control MoPH. (2019). *Bureau of Epidemiology, Department of Disease Control MoPH, Thailand: Hand Foot and Mouth Disease: Situation update (article in Thai).* http://www.boe.moph.go.th/boedb/surdata/disease.php?dcontent=old&ds=71
Burgon, T. B., Jenkins, J. A., Deitz, S. B., Spagnolo, J. F., & Kirkegaard, K. (2009). Bypass Suppression of Small-Plaque Phenotypes by a Mutation in Poliovirus 2A That Enhances Apoptosis. *Journal of Virology*, *83*(19), 10129–10139. https://doi.org/10.1128/jvi.00642-09
Cabon, L., Martinez-Torres, A. C., & Susin, S. A. (2013). La mort cellulaire programmée ne manque pas de vocabulaire. *Medecine/Sciences*, *29*(12), 1117–1124. https://doi.org/10.1051/medsci/20132912015
Cabrerizo, M., De Miguel, T., Armada, A., Martínez-Risco, R., Pousa, A., & Trallero, G. (2010). Onychomadesis after a hand, foot, and mouth disease outbreak in Spain, 2009. *Epidemiology and Infection*, *138*(12), 1775–1778. https://doi.org/10.1017/S0950268810002219
Cabrerizo, M., Tarragó, D., Muñoz-Almagro, C., del Amo, E., Domínguez-Gil, M., Eiros, J. M. S., López-Miragaya, I., Pérez, C., Reina, J., Otero, A., González, I., Echevarría, J. E., & Trallero, G. (2014a). Molecular epidemiology of enterovirus 71, coxsackievirus A16 and A6 associated with hand, foot and mouth disease in Spain. *Clinical Microbiology and Infection*, *20*(3), 150–156. https://doi.org/10.1111/1469-0691.12361
Cai, Y., Liu, Q., Huang, X., Li, D., Ku, Z., Zhang, Y., & Huang, Z. (2013). Active immunization with a Coxsackievirus A16 experimental inactivated vaccine induces neutralizing antibodies and protects mice against lethal infection. *Vaccine*, *31*(18), 2215–2221. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.03.007
Caine, E. A., Fuchs, J., Das, S. C., Partidos, C. D., & Osorio, J. E. (2015). Efficacy of a trivalent hand, foot, and mouth disease vaccine against enterovirus 71 and coxsackieviruses A16 and A6 in mice. *Viruses*, *7*(11), 5919–5932. https://doi.org/10.3390/v7112916
Calvo, D., Dopazo, J., & Vega, M. A. (1995). The CD36, CLA-1 (CD36L1), and LIMPII (CD36L2) gene family: cellular distribution, chromosomal location, and genetic evolution. *Genomics*, *25*(1), 100–106. https://doi.org/10.1016/0888-7543(95)80114-2
Cao, C., Li, G., Zheng, S., Cheng, J., Lei, G., Tian, K., Wu, Y., Xie, X., Xu, M., & Ji, W. (2012). Research on the environmental impact factors of Hand-Foot-Mouth Disease in Shenzhen, China using RS and GIS technologies. *International Geoscience and Remote Sensing Symposium (IGARSS)*, 7240–7243. https://doi.org/10.1109/IGARSS.2012.6351991
Cao, R., Han, J., Deng, Y., Yu, M., Qin, E., & Qin, C. (2010). Presence of high-titer neutralizing antibodies against enterovirus 71 in intravenous immunoglobulin manufactured from chinese donors. In *Clinical Infectious Diseases* (Vol. 50, Issue 1, pp. 125–126). https://doi.org/10.1086/649012
Caro, V., Guillot, S., Delpeyroux, F., & Crainic, R. (2001). Molecular strategy for 'serotyping' of human enteroviruses. *J Gen Virol*, *82*.
Casas-Alba, D., de Sevilla, M. F., Valero-Rello, A., Fortuny, C., García-García, J. J., Ortez, C., Muchart, J., Armangué, T., Jordan, I., Luaces, C., Barrabeig, I., González-Sanz, R., Cabrerizo, M., Muñoz-Almagro, C., & Launes, C. (2017). Outbreak of brainstem encephalitis associated with enterovirus-A71 in Catalonia, Spain (2016): a clinical observational study in a children's reference centre in Catalonia. *Clinical Microbiology and Infection*, *23*(11), 874–881. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.03.016
Casas, I., Palacios, G. F., Trallero, G., Cisterna, D., Freire, M. C., & Tenorio, A. (2001). Molecular characterization of human enteroviruses in clinical samples: Comparison between VP2, VP1, and RNA polymerase regions using RT nested PCR assays and direct sequencing of products. *Journal of Medical Virology*, *65*(1), 138–148. https://doi.org/10.1002/jmv.2013
Cashman, N. R., Durham, H. D., Blusztajn, J. K., Oda, K., Tabira, T., Shaw, I. T., Dahrouge, S., & Antel, J. P. (1992). Neuroblastoma × spinal cord (NSC) hybrid cell lines resemble developing motor neurons. *Developmental Dynamics*, *194*(3), 209–221. https://doi.org/10.1002/aja.1001940306
Castello, A., Álvarez, E., & Carrasco, L. (2011). The multifaceted poliovirus 2A protease: Regulation of gene expression by picornavirus proteases. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, *2011*. https://doi.org/10.1155/2011/369648
Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2012). Notes from the field: severe hand, foot, and mouth disease associated with coxsackievirus A6 - Alabama, Connecticut, California, and Nevada, November 2011-February 2012. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, *61*(12), 213–214. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22456122/
Chakraborty, Ranaa, d; Iturriza-Gómara, Mirenb; Musoke, Rachelc, d; Palakudy, Theresad; D'Agostino, Angelod; Gray, J. (2004). An epidemic of enterovirus 71 infection among HIV-1-infected orphans in Nairobi. *Aids*, 1965–1970.
Chan, K. P., Goh, K. T., Chong, C. Y., Teo, E. S., Lau, G., & Ling, A. E. (2003). Epidemic hand, foot and mouth disease caused by human enterovirus 71, Singapore. *Emerging Infectious Diseases*, *9*(1), 78–85. https://doi.org/10.3201/eid1301.020112
Chan, L. G., Parashar, U. D., Lye, M. S., Ong, F. G. L., Zaki, S. R., Alexander, J. P., Ho, K. K., Han, L. L., Pallansch, M. A., Suleiman, A. B., Jegathesan, M., & Anderson, L. J. (2000). Deaths of children during an outbreak of hand, foot, and mouth disease in Sarawak, Malaysia: Clinical and pathological characteristics of the disease. *Clinical Infectious Diseases*, *31*(3), 678–683. https://doi.org/10.1086/314032
Chang, H. L., Chio, C. P., Su, H. J., Liao, C. M., Lin, C. Y., Shau, W. Y., Chi, Y. C., Cheng, Y. T., Chou, Y. L., Li, C. Y., Chen, K. L. K. T., & Chen, K. L. K. T. (2012). The Association between Enterovirus 71 Infections and Meteorological Parameters in Taiwan. *PLoS ONE*, *7*(10), e46845. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046845
Chang, L. Y., Huang, L. M., Gau, S. S. F., Wu, Y. Y., Hsia, S. H., Fan, T. Y., Lin, K. L., Huang, Y. C., Lu, C. Y., & Lin, T. Y. (2007). Neurodevelopment and cognition in children after enterovirus 71 infection. *New England Journal of Medicine*, *356*(12), 1226–1234. https://doi.org/10.1056/NEJMoa065954
Chang, L. Y., Huang, Y. C., & Lin, T. Y. (1998). Fulminant neurogenic pulmonary oedema with hand, foot, and mouth disease. *Lancet*, *352*(9125), 367–368. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)24031-1
Chang, L. Y. L., Hsia, S. H., Wu, C. T. C., Huang, Y. C. Y., Lin, K. K. L., Fang, T. T. Y., & Lin, T. Y. (2004). Outcome of enterovirus 71 infections with or without stage-based management: 1998 to 2002. *Pediatric Infectious Disease Journal*, *23*(4), 327–331. https://doi.org/10.1097/00006454-200404000-00010
Chang, L. Y. L., Lin, T. ., Huang, Y. C. Y., Tsao, K. C. K., Shih, S.., Kuo, M. L., Ning, H. C., Chung, P. W., Kang, C. M., LY, C., Chang, ., Huang, Y. C. Y., Tsao, K. C. K., Shih, S. R. S. S. R., Kuo, M. L. M. M. L., Ning, H. C., Chung, P. W., Kang, C. M., … Kang, C. M. (1999). Comparison of enterovirus 71 and coxsackievirus A16 clinical illnesses during the Taiwan enterovirus epidemic, 1998. *Pediatric Infectious Disease Journal*, *18*(12), 1092–1096. https://doi.org/10.1097/00006454-199912000-00013
Chang, L. Y., Lee, C. Y., Kao, C. L., Fang, T. Y., Lu, C. Y., Lee, P. I., & Huang, L. M. (2007). Hand, foot and mouth disease complicated with central nervous system involvement in Taiwan in 1980-1981. *Journal of the Formosan Medical Association*, *106*(2), 173–176. https://doi.org/10.1016/S0929-6646(09)60236-9
Chang, L. Y., Lin, T. Y., Hsu, K. H., Huang, Y. C., Lin, K. L., Hsueh, C., Shih, S. R., Ning, H. C., Hwang, M. S., Wang, H. S., & Lee, C. Y. (1999). Clinical features and risk factors of pulmonary oedema after enterovirus-71-related hand, foot, and mouth disease. *Lancet*,

354(9191), 1682–1686. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(99)04434-7
Chang, L. Y., Tsao, K. C., Hsia, S. H., Shih, S. R., Huang, C. G., Chan, W. K., Hsu, K. H., Fang, T. Y., Huang, Y. C., & Lin, T. Y. (2004). Transmission and Clinical Features of Enterovirus 71 Infections in Household Contacts in Taiwan. *Journal of the American Medical Association*, *291*(2), 222–227. https://doi.org/10.1001/jama.291.2.222
Chang, S. C., Li, W. C., Chen, G. W., Tsao, K. C., Huang, C. G., Huang, Y. C., Chiu, C. H., Kuo, C. Y., Tsai, K. N., Shih, S. R., & Lin, T. Y. (2012). Genetic characterization of enterovirus 71 isolated from patients with severe disease by comparative analysis of complete genomes. *Journal of Medical Virology*, *84*(6), 931–939. https://doi.org/10.1002/jmv.23287
Chang, S. C., Lin, J. Y., Lo, L. Y. C., Li, M. L., & Shih, S. R. (2004). Diverse apoptotic pathways in enterovirus 71-infected cells. *Journal of NeuroVirology*, *10*(6), 338–349. https://doi.org/10.1080/13550280490521032
Chatproedprai, S., Tempark, T., Wanlapakorn, N., Puenpa, J., Wananukul, S., & Poovorawan, Y. (2015). Unusual skin manifestation of hand, foot and mouth disease associated with coxsackievirus A6: cases report. *SpringerPlus*, *4*(1), 0–6. https://doi.org/10.1186/s40064-015-1143-z
Chen, C., Wang, Y., Shan, C., Sun, Y., Xu, P., Zhou, H., Yang, C., Shi, P.-Y., Rao, Z., Zhang, B., & Lou, Z. (2013). Crystal Structure of Enterovirus 71 RNA-Dependent RNA Polymerase Complexed with Its Protein Primer VPg: Implication for a trans Mechanism of VPg Uridylylation. *Journal of Virology*, *87*(10), 5755–5768. https://doi.org/10.1128/jvi.02733-12
Chen, J., Zhang, C., Zhou, Y., Zhang, X., Shen, C., Ye, X., Jiang, W., Huang, Z., Cong, Y., Chen, C. J., & Michael Diamond, E. S. *A 3.0-Angstrom Resolution Cryo-Electron Microscopy Structure and Antigenic Sites of Coxsackievirus A6-Like Particles*. *92*(2), 1257–1274. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29093091/
Chen, K. T., Chang, H. L., Wang, S. T., Cheng, Y. T., & Yang, J. Y. (2007). Epidemiologic features of hand-foot-mouth disease and herpangina caused by enterovirus 71 in Taiwan, 1998-2005. *Pediatrics*, *120*(2). https://doi.org/10.1542/peds.2006-3331
Chen, Tsan Chi, Chen, G. W., Hsiung, C. A., Yang, J. Y., Shih, S. R., Lai, Y. K., & Juang, J. L. (2006). Combining multiplex reverse transcription-PCR and a diagnostic microarray to detect and differentiate enterovirus 71 and coxsackievirus A16. *Journal of Clinical Microbiology*, *44*(6), 2212–2219. https://doi.org/10.1128/JCM.02393-05
Chen, Tzu Chun, Weng, K. F., Chang, S. C., Lin, J. Y., Huang, P. N., & Shih, S. R. (2008). Development of antiviral agents for enteroviruses. In *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (Vol. 62, Issue 6, pp. 1169–1173). https://doi.org/10.1093/jac/dkn424
Chen, Y. H., Du, W., Hagemeijer, M. C., Takvorian, P. M., Pau, C., Cali, A., Brantner, C. A., Stempinski, E. S., Connelly, P. S., Ma, H. C., Jiang, P., Wimmer, E., Altan-Bonnet, G., & Altan-Bonnet, N. (2015). Phosphatidylserine vesicles enable efficient en bloc transmission of enteroviruses. *Cell*, *160*(4), 619–630. https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.032
Chen, Y. J., Chang, S. C., Tsao, K. C., Shih, S. R., Yang, S. L., Lin, T. Y., & Huang, Y. C. (2012). Comparative Genomic Analysis of Coxsackievirus A6 Strains of Different Clinical Disease Entities. *PLoS ONE*, *7*(12). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052432
Cheng, H. Y., Huang, Y. C., Yen, T. Y., Hsia, S. H., Hsieh, Y. C., Li, C. C., Chang, L. Y., & Huang, L. M. (2014). The correlation between the presence of viremia and clinical severity in patients with enterovirus 71 infection: A multi-center cohort study. *BMC Infectious Diseases*, *14*(1), 417. https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-417
Cheng, J., Wu, J., Xu, Z., Zhu, R., Wang, X., Li, K., Wen, L., Yang, H., & Su, H. (2014). Associations between extreme precipitation and childhood hand, foot and mouth disease in urban and rural areas in Hefei, China. *Science of the Total Environment*, *497–498*, 484–490. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.08.006
Chetverin, A. B. (1999). The puzzle of RNA recombination. In *FEBS Letters* (Vol. 460, Issue 1, pp. 1–5). Elsevier. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)01282-X
Chiu, M. L., Luo, S. T., Chen, Y. Y., Chung, W. Y., Duong, V., Dussart, P., Chan, Y. F., Perera, D., Ooi, M. H., Thao, N. T. T., Truong, H. K., & Lee, M. S. (2020). Establishment of Asia-Pacific Network for Enterovirus Surveillance. *Vaccine*, *38*(1), 1–9. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.09.111
Chowdhury, I., Thompson, W. E., & Thomas, K. (2014). Prohibitins role in cellular survival through Ras-Raf-MEK-ERK pathway. In *Journal of Cellular Physiology* (Vol. 229, Issue 8, pp. 998–1004). Wiley-Liss Inc. https://doi.org/10.1002/jcp.24531
Chua, B. H., Phuektes, P., Sanders, S. A., Nicholls, P. K., & McMinn, P. C. (2008). The molecular basis of mouse adaptation by human enterovirus 71. *Journal of General Virology*, *89*(7), 1622–1632. https://doi.org/10.1099/vir.0.83676-0
Chumakov, M., Voroshilova, M., Shindarov, L., Lavrova, I., Gracheva, L., Koroleva, G., Vasilenko, S., Brodvarova, I., Nikolova, M., Gyurova, S., Gacheva, M., Mitov, G., Ninov, N., Tsylka, E., Robinson, I., Frolova, M., Bashkirtsev, V., Martiyanova, L., & Rodin, V. (1979). Enterovirus 71 isolated from cases of epidemic poliomyelitis-like disease in Bulgaria. *Archives of Virology*, *60*(3–4), 329–340. https://doi.org/10.1007/BF01317504
Chumakov, M., Voroshilova, M., Shindarov, L., Lavrova, I., Gracheva, L., Koroleva, G., Vasilenko, S., Brodvarova, I., Nikolova, M., Gyurova, S., Gacheva, M., Mitov, G., Ninov, N., Tsylka, E., Robinson, I., Frolova, M., Bashkirtsev, V., Martiyanova, L., Rodin, V., … Rodin, V. (1979). *Enterovirus 71 Isolated From Cases of Epidemic Poliomyelitis-Like Disease in Bulgaria*. *60*. https://doi.org/10.1007/BF01317504
Chung, W. H., Shih, S. R., Chang, C. F., Lin, T. Y., Huang, Y. C., Chang, S. C., Liu, M. T., Ko, Y. S., Deng, M. C., Liau, Y. L., Lin, L. H., Chen, T. H., Yang, C. H., Ho, H. C., Lin, J. W., Lu, C. F. C. W. C. F., Lu, C. F. C. W. C. F., & Hung, S. L. (2013). Clinicopathologic analysis of coxsackievirus A6 new variant induced widespread mucocutaneous bullous reactions mimicking severe cutaneous adverse reactions. *Journal of Infectious Diseases*, *208*(12), 1968–1978. https://doi.org/10.1093/infdis/jit383
Chung, Y. C., Ho, M. S., Wu, J. C., Chen, W. J., Huang, J. H., Chou, S. T., & Hu, Y. C. (2008). Immunization with virus-like particles of enterovirus 71 elicits potent immune responses and protects mice against lethal challenge. *Vaccine*, *26*(15), 1855–1862. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.01.058
Cobbin, J. C. A., Britton, P. N., Burrell, R., Thosar, D., Selvakumar, K., Eden, J.-S., Jones, C. A., & Holmes, E. C. (2018). A complex mosaic of enteroviruses shapes community-acquired hand, foot and mouth disease transmission and evolution within a single hospital. *Virus Evolution*, *4*(2), 1–11. https://doi.org/10.1093/ve/vey020
Committee on the Enteroviruses. (1957). THE ENTEROVIRUSES; Committee on the Enteroviruses, National Foundation for Infantile Paralysis. *American Journal of Public Health*, *47*(12), 1556–1566. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1551439/
Cong, H., Du, N., Yang, Y., Song, L., Zhang, W., & Tien, P. (2016). Enterovirus 71 2B Induces Cell Apoptosis by Directly Inducing the Conformational Activation of the Proapoptotic Protein Bax. *Journal of Virology*, *90*(21), 9862–9877. https://doi.org/10.1128/jvi.01499-16
Cordey, S., Petty, T. J., Schibler, M., Martinez, Y., Gerlach, D., van Belle, S., Turin, L., Zdobnov, E., Kaiser, L., & Tapparel, C. (2012). Identification of site-specific adaptations conferring increased neural cell tropism during human enterovirus 71 infection. *PLoS Pathogens*, *8*(7), 19. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002826
Coyne, C. B., & Bergelson, J. M. (2006). Virus-induced Abl and Fyn kinase signals permit coxsackievirus entry through epithelial tight junctions. *Cell*, *124*(1), 119–131. https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.10.035
Dalldorf, G., & Sickles, G. M. (1949). A virus recovered from the feces of poliomyelitis patients pathogenic for suckling mice. *The Journal of Experimental Medicine*, *89*(6), 567–582. https://doi.org/10.1084/jem.89.6.567

Das, S., Ravi, V., & Desai, A. (2011). Japanese encephalitis virus interacts with vimentin to facilitate its entry into porcine kidney cell line. *Virus Research*, *160*(1–2), 404–408. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.06.001

Davia, J. L., Bel, P. H., Ninet, V. Z., Bracho, M. A., González-Candelas, F., Salazar, A., Gobernado, M., & Bosch, I. F. (2011). Onychomadesis outbreak in valencia, spain associated with hand, foot, and mouth disease caused by enteroviruses. *Pediatric Dermatology*, *28*(1), 1–5. https://doi.org/10.1111/j.1525-1470.2010.01161.x

de Breyne, S., Bonderoff, J. M., Chumakov, K. M., Lloyd, R. E., & Hellen, C. U. T. (2008). Cleavage of eukaryotic initiation factor eIF5B by enterovirus 3C proteases. *Virology*, *378*(1), 118–122. https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.05.019

De Maio, N., Wu, C.-H., O'Reilly, K. M., & Wilson, D. (2015). New Routes to Phylogeography: A Bayesian Structured Coalescent Approximation. *PLOS Genetics*, *11*(8), e1005421. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005421

de Sena, J., & Mandel, B. (1977). Studies on the in vitro uncoating of poliovirus II. Characteristics of the membrane-modified particle. *Virology*, *78*(2), 554–566. https://doi.org/10.1016/0042-6822(77)90130-1

Deibel, R., Gross, L. L., & Collins, D. N. (1975). Isolation of a new enterovirus. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, *148*(1), 203–207. https://doi.org/10.3181/00379727-148-38506

Di, B., Zhang, Y., Xie, H., Li, X., Chen, C., Ding, P., He, P., Wang, D., Geng, J., Luo, L., Bai, Z., Yang, Z., & Wang, M. (2014). Circulation of Coxsackievirus A6 in hand-foot-mouth disease in Guangzhou, 2010-2012. *Virology Journal*, *11*(1), 1–7. https://doi.org/10.1186/1743-422X-11-157

Domingo, E., Martin, V., Perales, C., & Escarmis, C. (2008). Coxsackieviruses and quasispecies theory: Evolution of enteroviruses. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, *323*, 3–32. https://doi.org/10.1007/978-3-540-75546-3-1

Domingo, E., Sheldon, J., & Perales, C. (2012). Viral Quasispecies Evolution. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *76*(2), 159–216. https://doi.org/10.1128/mmbr.05023-11

Domingo, Esteban. (2006). Quasispecies: Concept and implications for virology. Preface. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, *299*. https://doi.org/10.1007/b137531

Données Santé Publique France. (n.d.). *Données Santé Publique France Entérovirus*. Retrieved December 30, 2020, from https://www.santepubliquefrance.fr/recherche/#search=entérovirus

Douzery, E. J. P., Delsuc, F., Philippe, H., Douzery, E. J. P., Delsuc, F., & Philippe, H. (2006). *Les datations moléculaires à l'heure de la génomique*. *4*. https://doi.org/10.1051/medsci/2006224374

Drake, J. W. (1993). Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *90*(9), 4171–4175. https://doi.org/10.1073/pnas.90.9.4171

Drummond, A. J., Ho, S. Y. W., Phillips, M. J., & Rambaut, A. (2006). Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biology*, *4*(5), 699–710. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040088

Drummond, A. J., & Rambaut, A. (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, *7*(1), 214. https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-214

Drummond, A. J., Suchard, M. A., Xie, D., & Rambaut, A. (2012). Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*, *29*(8), 1969–1973. https://doi.org/10.1093/molbev/mss075

Drummond, A., Pybus, O. G., & Rambaut, A. (2003). Inference of Viral Evolutionary Rates from Molecular Sequences. In *Advances in Parasitology* (Vol. 54, pp. 331–358). Academic Press. https://doi.org/10.1016/S0065-308X(03)54008-8

Du, N., Cong, H., Tian, H., Zhang, H., Zhang, W., Song, L., & Tien, P. (2014). Cell Surface Vimentin Is an Attachment Receptor for Enterovirus 71. *Journal of Virology*, *88*(10), 5816–5833. https://doi.org/10.1128/jvi.03826-13

Duff, M. F. (1968). Hand-foot-and-mouth Syndrome in Humans: Coxsackie A10 Infections in New Zealand. *British Medical Journal*, *2*(5606), 661–664. https://doi.org/10.1136/bmj.2.5606.661

Duong, V., Mey, C., Eloit, M., Zhu, H., Danet, L., Huang, Z., Zou, G., Tarantola, A., Cheval, J., Perot, P., Laurent, D., Richner, B., Ky, S., Heng, S., Touch, S., Sovann, L., Van Doorn, R., Tran, T. T., Farrar, J. J., … Buchy, P. (2016). Molecular epidemiology of human enterovirus 71 at the origin of an epidemic of fatal hand, foot and mouth disease cases in Cambodia. *Emerging Microbes and Infections*, *5*(9), e104. https://doi.org/10.1038/emi.2016.101

Encinas, M., Iglesias, M., Liu, Y., Wang, H., Muhaisen, A., Ceña, V., Gallego, C., & Comella, J. X. (2002). Sequential Treatment of SH-SY5Y Cells with Retinoic Acid and Brain-Derived Neurotrophic Factor Gives Rise to Fully Differentiated, Neurotrophic Factor-Dependent, Human Neuron-Like Cells. *Journal of Neurochemistry*, *75*(3), 991–1003. https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0750991.x

European Centre for Disease Prevention and Control. (2016). *European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC)*. Rapid Risk Assessment. Enterovirus Detection Associated with Severe Neurological Symptoms in Children and Adults in European Countries. 8 August 2016. .

F. Gobara, A. I. Y. I. K. S. T. K. G. K. (1977). Properties of virus isolated from an epidemic of hand-foot-and-mouth disease in 1973 in the city of Matsue. *Microbiol. Immunol.*, *21*, 207–217.

Felsenstein, J. (1973). Maximum likelihood and minimum-steps methods for estimating evolutionary trees from data on discrete characters. *Systematic Biology*, *22*(3), 240–249. https://doi.org/10.1093/sysbio/22.3.240

Felsenstein, J. (1981). EVOLUTIONARY TREES FROM GENE FREQUENCIES AND QUANTITATIVE CHARACTERS: FINDING MAXIMUM LIKELIHOOD ESTIMATES. *Evolution*, *35*(6), 1229–1242. https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1981.tb04991.x

Feng, Q., Langereis, M. A., Lork, M., Nguyen, M., Hato, S. V., Lanke, K., Emdad, L., Bhoopathi, P., Fisher, P. B., Lloyd, R. E., & van Kuppeveld, F. J. M. (2014). Enterovirus 2Apro Targets MDA5 and MAVS in Infected Cells. *Journal of Virology*, *88*(6), 3369–3378. https://doi.org/10.1128/jvi.02712-13

Feng, X., Guan, W., Guo, Y., Yu, H., Zhang, X., Cheng, R., Wang, Z., Zhang, Z., Zhang, J., Li, H., Zhuang, Y., Zhang, H., Lu, Z., Li, M., Yu, H.., Bao, Y., Hu, Y., & Yao, Z. (2015a). A novel recombinant lineage's contribution to the outbreak of coxsackievirus A6-associated hand, foot and mouth disease in Shanghai, China, 2012-2013. *Scientific Reports*, *5*(June), 1–12. https://doi.org/10.1038/srep11700

Fenwick, M. L., & Cooper, P. D. (1962). Early interactions between poliovirus and ERK cells: Some observations on the nature and significance of the rejected particles. *Virology*, *18*(2), 212–223. https://doi.org/10.1016/0042-6822(62)90007-7

Fernandez-Garcia, Maria D., Kebe, O., Fall, A. D., Dia, H., Diop, O. M., Delpeyroux, F., & Ndiaye, K. (2016). Enterovirus A71 genogroups C and E in children with acute flaccid paralysis, West Africa. In *Emerging Infectious Diseases* (Vol. 22, Issue 4, pp. 753–755). Centers for Disease Control and Prevention (CDC). https://doi.org/10.3201/eid2204.151588

Fernandez-Garcia, Maria Dolores, Volle, R., Joffret, M. L., Sadeuh-Mba, S. A., Gouandjika-Vasilache, I., Kebe, O., Wiley, M. R., Majumdar, M., Simon-Loriere, E., Sakuntabhai, A., Palacios, G., Martin, J., Delpeyroux, F., Ndiaye, K., & Bessaud, M. (2018). Genetic characterization of enterovirus A71 circulating in Africa. *Emerging Infectious Diseases*, *24*(4), 754–757. https://doi.org/10.3201/eid2404.171783

Ferrer-Orta, C., Arias, A., Escarmís, C., & Verdaguer, N. (2006). A comparison of viral RNA-dependent RNA polymerases. *Current Opinion in Structural Biology*, *16*(1), 27–34. https://doi.org/10.1016/j.sbi.2005.12.002

Festjens, N., Vanden Berghe, T., & Vandenabeele, P. (2006). Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: Signalling cascades,

important mediators and concomitant immune response. In *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* (Vol. 1757, Issues 9–10, pp. 1371–1387). Biochim Biophys Acta. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2006.06.014
Fitch, W. M., & Margoliash, E. (1967). Construction of phylogenetic trees. In *Science* (Vol. 155, Issue 760, pp. 279–284). American Association for the Advancement of Science. https://doi.org/10.1126/science.155.3760.279
Fitch, Walter M. (1971). Toward Defining the Course of Evolution: Minimum Change for a Specific Tree Topology. *Systematic Zoology*, *20*(4), 406. https://doi.org/10.2307/2412116
Flett, K., Youngster, I., Huang, J., McAdam, A., Sandora, T. J., Rennick, M., Smole, S., Rogers, S. L., Allan Nix, W., Steven Oberste, M., Gellis, S., & Ahmed, A. A. (2012). Hand, foot, and mouth disease caused by coxsackievirus A6. In *Emerging Infectious Diseases* (Vol. 18, Issue 10, pp. 1702–1704). https://doi.org/10.3201/eid1810.120813
Flewett, T. H., WARIN, R. P., & CLARKE, S. K. (1963). "Hand, foot, and mouth disease" associated with Coxsackie A5 virus. *Journal of Clinical Pathology*, *16*(1), 53–55. https://doi.org/10.1136/jcp.16.1.53
Fogg, M. H., Teterina, N. L., & Ehrenfeld, E. (2003). Membrane Requirements for Uridylylation of the Poliovirus VPg Protein and Viral RNA Synthesis In Vitro. *Journal of Virology*, *77*(21), 11408–11416. https://doi.org/10.1128/jvi.77.21.11408-11416.2003
Foley, B. T., Korber, B. T. M., Leitner, T. K., Apetrei, C., Hahn, B., Mizrachi, I., Mullins, J., Rambaut, A., & Wolinsky, S. (2018). *HIV Sequence Compendium 2018*. https://doi.org/10.2172/1458915
Fonseca, M. C., Sarmiento, L., Resik, S., Martínez, Y., Hung, L. H., Morier, L., Piñón, A., Valdéz, O., Kourí, V., & González, G. (2014). Coxsackievirus A6 and enterovirus 71 causing hand, foot and mouth disease in Cuba, 2011-2013. *Archives of Virology*, *159*(9), 2451–2455. https://doi.org/10.1007/s00705-014-2071-x
Foo, D. G. W., Alonso, S., Chow, V. T. K., & Poh, C. L. (2007). Passive protection against lethal enterovirus 71 infection in newborn mice by neutralizing antibodies elicited by a synthetic peptide. *Microbes and Infection*, *9*(11), 1299–1306. https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.06.002
Forster, J. I., Köglsberger, S., Trefois, C., Boyd, O., Baumuratov, A. S., Buck, L., Balling, R., & Antony, P. M. A. (2016). Characterization of differentiated SH-SY5Y as neuronal screening model reveals increased oxidative vulnerability. *Journal of Biomolecular Screening*, *21*(5), 496–509. https://doi.org/10.1177/1087057115625190
Freistadt, M S, Kaplan, G., & Racaniello, V. R. (1990). Heterogeneous expression of poliovirus receptor-related proteins in human cells and tissues. *Molecular and Cellular Biology*, *10*(11), 5700–5706. https://doi.org/10.1128/mcb.10.11.5700
Freistadt, Marion S., Vaccaro, J. A., & Eberle, K. E. (2007). Biochemical characterization of the fidelity of poliovirus RNA-dependent RNA polymerase. *Virology Journal*, *4*. https://doi.org/10.1186/1743-422X-4-44
Fu, Y. C., Chi, C. S., Chiu, Y. T., Hsu, S. L., Hwang, B., Jan, S. L., Chen, P. Y., Huang, F. L., & Chang, Y. (2004). Cardiac complications of enterovirus rhombencephalitis. *Archives of Disease in Childhood*, *89*(4), 368–373. https://doi.org/10.1136/adc.2003.029645
Fujii, K., Nagata, N., Sato, Y., Ong, K. C., Wong, K. T., Yamayoshi, S., Shimanuki, M., Shitara, H., Taya, C., & Koike, S. (2013). Transgenic mouse model for the study of enterovirus 71 neuropathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(36), 14753–14758. https://doi.org/10.1073/pnas.1217563110
Fujimoto, T. (2008). *Detection and Quantification of Enterovirus 71 Genome from Cerebrospinal Fluid of an Encephalitis Patient by PCR Applications*. https://www.researchgate.net/publication/23563403
Fujimoto, T., Iizuka, S., Enomoto, M., Abe, K., Yamashita, K., Hanaoka, N., Okabe, N., Yoshida, H., Yasui, Y., Kobayashi, M., Fujii, Y., Tanaka, H., Yamamoto, M., & Shimizu, H. (2012). Hand, foot, and mouth disease caused by coxsackievirus A6, Japan, 2011. *Emerging Infectious Diseases*, *18*(2), 337–339. https://doi.org/10.3201/eid1802.111147
Galli, A., & Bukh, J. (2014). Comparative analysis of the molecular mechanisms of recombination in hepatitis C virus. In *Trends in Microbiology* (Vol. 22, Issue 6, pp. 354–364). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.02.005
Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J. M., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., Dawson, T. M., Dawson, V. L., El-Deiry, W. S., Fulda, S., Gottlieb, E., Green, D. R., Hengartner, M. O., Kepp, O., Knight, R. A., Kumar, S., Lipton, S. A., Lu, X., Madeo, F., … Kroemer, G. (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. In *Cell Death and Differentiation* (Vol. 19, Issue 1, pp. 107–120). Nature Publishing Group. https://doi.org/10.1038/cdd.2011.96
Gamarnik, AV, & Andino, R. (1998). Switch from translation to RNA replication in a positive-stranded RNA virus. *Genes & Development*, *12*.
Gamarnik, Andrea V., & Andino, R. (2000). Interactions of Viral Protein 3CD and Poly(rC) Binding Protein with the 5′ Untranslated Region of the Poliovirus Genome. *Journal of Virology*, *74*(5), 2219–2226. https://doi.org/10.1128/jvi.74.5.2219-2226.2000
Gaunt, E., Harvala, H., Österback, R., Sreenu, V. B., Thomson, E., Waris, M., Simmonds, P., E Gaunt, H. H. R. O. V. S. E. T. M. W. P. S., Gaunt, E., Harvala, H., Österback, R., Sreenu, V. B., Thomson, E., Waris, M., & Simmonds, P. (2015). Genetic characterization of human coxsackievirus A6 variants associated with atypical hand, foot and mouth disease: A potential role of recombination in emergence and pathogenicity. *Journal of General Virology*, *96*(5), 1067–1079. https://doi.org/10.1099/vir.0.000062
Geoghegan, J. L., & Holmes, E. C. (2018). The phylogenomics of evolving virus virulence. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 19, Issue 12, pp. 756–769). Nature Publishing Group. https://doi.org/10.1038/s41576-018-0055-5
Gibbs, M. J., Armstrong, J. S., & Gibbs, A. J. (2000). Sister-scanning: A Monte Carlo procedure for assessing signals in rebombinant sequences. *Bioinformatics*, *16*(7), 573–582. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/16.7.573
Gifford, R., & Dalldorf, G. (1951). The morbid anatomy of experimental Coxsackie virus infection. *The American Journal of Pathology*, *27*(6), 1047–1063.
Glick, D., Barth, S., & Macleod, K. F. (2010). Autophagy: Cellular and molecular mechanisms. In *Journal of Pathology* (Vol. 221, Issue 1, pp. 3–12). https://doi.org/10.1002/path.2697
Gmyl, A. P., & Agol, V. I. (2005). Diverse mechanisms of RNA recombination. *Molecular Biology*, *39*(4), 529–542. https://doi.org/10.1007/s11008-005-0069-x
Gmyl, Anatoly P., Belousov, E. V., Maslova, S. V., Khitrina, E. V., Chetverin, A. B., & Agol, V. I. (1999). Nonreplicative RNA Recombination in Poliovirus. *Journal of Virology*, *73*(11), 8958–8965. https://doi.org/10.1128/jvi.73.11.8958-8965.1999
Gmyl, Anatoly P., Korshenko, S. A., Belousov, E. V., Khitrina, E. V., & Agol, V. I. (2003). Nonreplicative homologous RNA recombination: Promiscuous joining of RNA pieces? *RNA*, *9*(10), 1221–1231. https://doi.org/10.1261/rna.5111803
Goldman, R. D., Khuon, S., Chou, Y. H., Opal, P., & Steinert, P. M. (1996). The function of intermediate filaments in cell shape and cytoskeletal integrity. *Journal of Cell Biology*, *134*(4), 971–983. https://doi.org/10.1083/jcb.134.4.971
Goto, K., Sanefuji, M., Kusuhara, K., Nishimura, Y., Shimizu, H., Kira, R., Torisu, H., & Hara, T. (2009). Rhombencephalitis and coxsackievirus A16. In *Emerging Infectious Diseases* (Vol. 15, Issue 10, pp. 1689–1691). https://doi.org/10.3201/eid1510.090594
Gradi, A., Svitkin, Y. Y. V., Imataka, H., & Sonenberg, N. (1998). Proteolysis of human eukaryotic translation initiation factor eIF4GII, but not EIF4GI, coincides with the shutoff of host protein synthesis after poliovirus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(19), 11089–11094. https://doi.org/10.1073/pnas.95.19.11089
Grindheim, A. K., Saraste, J., & Vedeler, A. (2017). Protein phosphorylation and its role in the regulation of Annexin A2 function. In

Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects (Vol. 1861, Issue 11, pp. 2515–2529). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.08.024

Gromeier, M., Wimmer, E., & Gorbalenya, A. E. (1999). Genetics, Pathogenesis and Evolution of Picornaviruses. In *Origin and Evolution of Viruses* (pp. 287–343). Elsevier. https://doi.org/10.1016/b978-012220360-2/50013-1

Guan, H., Tian, J., Qin, B., Wojdyla, J. A., Wang, B., Zhao, Z., Wang, M., & Cui, S. (2017). Crystal structure of 2C helicase from enterovirus 71. *Science Advances*, *3*(4). https://doi.org/10.1126/sciadv.1602573

Gui, J., Liu, Z., Zhang, T., Hua, Q., Jiang, Z., Chen, B., Gu, H., Lv, H., & Dong, C. (2015). Epidemiological Characteristics and Spatial-Temporal Clusters of Hand, Foot, and Mouth Disease in Zhejiang Province, China, 2008-2012. *PLOS ONE*, *10*(9), e0139109. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139109

Guindon, S., Dufayard, J. F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., & Gascuel, O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, *59*(3), 307–321. https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010

Guindon, S., & Gascuel, O. (2003). A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. *Systematic Biology*, *52*(5), 696–704. https://doi.org/10.1080/10635150390235520

Guo, W. P., Lin, X. D., Chen, Y. P., Liu, Q., Wang, W., Wang, C. Q., Li, M. H., Sun, X. Y., Shi, M., Holmes, E. C., & Zhang, Y. Z. (2015). Fourteen types of co-circulating recombinant enterovirus were associated with hand, foot, and mouth disease in children from Wenzhou, China. *Journal of Clinical Virology*, *70*, 29–38. https://doi.org/10.1016/j.jcv.2015.06.093

Hadfield James, Colin Megill, Sidney M Bell, John Huddleston, Barney Potter, Charlton Callender, Pavel Sagulenko, Trevor Bedford, Richard A Neher. Nextstrain: real-time tracking of pathogen evolution. Bioinformatics, Volume 34, Issue 23, 01 December 2018, Pages 4121–4123, https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty407

Hambidge, S. J., & Sarnow, P. (1992). Translational enhancement of the poliovirus 5' noncoding region mediated by virus-encoded polypeptide 2A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *89*(21), 10272–10276. https://doi.org/10.1073/pnas.89.21.10272

Hanson, P. J., Ye, X., Qiu, Y., Zhang, H. M., Hemida, M. G., Wang, F., Lim, T., Gu, A., Cho, B., Kim, H., Fung, G., Granville, D. J., & Yang, D. (2016). Cleavage of DAP5 by coxsackievirus B3 2A protease facilitates viral replication and enhances apoptosis by altering translation of IRES-containing genes. *Cell Death and Differentiation*, *23*(5), 828–840. https://doi.org/10.1038/cdd.2015.145

Hanson, Paul J., Hossain, A. R., Qiu, Y., Zhang, H. M., Zhao, G., Li, C., Lin, V., Sulaimon, S., Vlok, M., Fung, G., Chen, V. H., Jan, E., McManus, B. M., Granville, D. J., & Yang, D. (2019). Cleavage and Sub-Cellular Redistribution of Nuclear Pore Protein 98 by Coxsackievirus B3 Protease 2A Impairs Cardioprotection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *9*(July), 1–14. https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00265

Harris, K. G., & Coyne, C. B. (2014). Death waits for no man - Does it wait for a virus? How enteroviruses induce and control cell death. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, *25*(5), 587–596. https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2014.08.002

Harvala, H., Broberg, E., Benschop, K., Berginc, N., Ladhani, S., Susi, P., Christiansen, C., McKenna, J., Allen, D., Makiello, P., McAllister, G., Carmen, M., Zakikhany, K., Dyrdak, R., Nielsen, X., Madsen, T., Paul, J., Moore, C. C. C. C. C. C., von Eije, K., … Fischer, T. K. (2018). Recommendations for enterovirus diagnostics and characterisation within and beyond Europe. In *Journal of Clinical Virology* (Vol. 101, pp. 11–17). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.jcv.2018.01.008

Hashimoto, I., Hagiwara, A., & Kodama, H. (1978). Neurovirulence in cynomolgus monkeys of enterovirus 71 isolated from a patient with hand, foot and mouth disease. *Archives of Virology*, *56*(3), 257–261. https://doi.org/10.1007/BF01317855

Hashimoto, ISAO, & Hagiwara, A. (1982). PATHOGENICITY OF A POLIOMYELITIS-LIKE DISEASE IN MONKEYS INFECTED ORALLY WITH ENTEROVIRUS 71: A MODEL FOR HUMAN INFECTION. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, *8*(2), 149–156. https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.1982.tb00269.x

Hassel, C., Mirand, A., Farkas, A., Diedrich, S., Huemer, H. P., Peigue-Lafeuille, H., Archimbaud, C., Henquell, C., & Bailly, J.-L. (2017). Phylogeography of Coxsackievirus A16 Reveals Global Transmission Pathways and Recent Emergence and Spread of a Recombinant Genogroup. *Journal of Virology*, *91*(18). https://doi.org/10.1128/jvi.00630-17

Hassel, C., Mirand, A., Lukashev, A., TerletskaiaLadwig, E., Farkas, A., Schuffenecker, I., Diedrich, S., Huemer, H. P., Archimbaud, C., Peigue-Lafeuille, H., Henquell, C., Bailly, J.-L., Terletskaia Ladwig, E., Farkas, A., Schuffenecker, I., Diedrich, S., Huemer, H. P., Archimbaud, C., Peigue-Lafeuille, H., … Bailly, J.-L. (2015). Transmission patterns of human enterovirus 71 to, from and among European countries, 2003 to 2013. *Eurosurveillance*, *20*(34), 1–11. https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2015.20.34.30005

He, Q., Ren, S., Xia, Z., Cheng, Z., Peng, N., & Zhu, Y. (2018). Fibronectin Facilitates Enterovirus 71 Infection by Mediating Viral Entry. *Journal of Virology*, *92*(9), JVI.02251-JVI.02217. https://doi.org/10.1128/jvi.02251-17

He, Y., Ong, K. C., Gao, Z., Zhao, X., Anderson, V. M., McNutt, M. A., Wong, K. T., & Lu, M. (2014). Tonsillar crypt epithelium is an important extra-central nervous system site for viral replication in EV71 encephalomyelitis. *American Journal of Pathology*, *184*(3), 714–720. https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.11.009

He, Y. Q., Chen, L., Xu, W. B., Yang, H., Wang, H. Z., Zong, W. P., Xian, H. X., Chen, H. L., Yao, X. J., Hu, Z. L., Luo, M., Zhang, H. L., Ma, H. W., Cheng, J. Q., Feng, Q. J., & Zhao, D. J. (2013). Emergence, circulation, and spatiotemporal phylogenetic analysis of coxsackievirus a6- and coxsackievirus a10-associated hand, foot, and mouth disease infections from 2008 to 2012 in Shenzhen China. *Journal of Clinical Microbiology*, *51*(11), 3560–3566. https://doi.org/10.1128/JCM.01231-13

Heath, L., van der Walt, E., Varsani, A., & Martin, D. P. (2006). Recombination Patterns in Aphthoviruses Mirror Those Found in Other Picornaviruses. *Journal of Virology*, *80*(23), 11827–11832. https://doi.org/10.1128/jvi.01100-06

Heeres, J. T., & Hergenrother, P. J. (2007). Poly(ADP-ribose) makes a date with death. In *Current Opinion in Chemical Biology* (Vol. 11, Issue 6, pp. 644–653). https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.08.038

Henquell, C., Mirand, A., Richter, J., Schuffenecker, I., Bottiger, B., Diedrich, S., Terletskaia-Ladwig, E., Christodoulou, C., Peigue-Lafeuille, H., & Bailly, J.-L. (2013). Phylogenetic Patterns of Human Coxsackievirus B5 Arise from Population Dynamics between Two Genogroups and Reveal Evolutionary Factors of Molecular Adaptation and Transmission. *Journal of Virology*, *87*(22), 12249–12259. https://doi.org/10.1128/jvi.02075-13

Hicks, A. L., & Duffy, S. (2011). Genus-Specific Substitution Rate Variability among Picornaviruses. *Journal of Virology*, *85*(15), 7942–7947. https://doi.org/10.1128/jvi.02535-10

Ho, M. (2000). Enterovirus 71: the virus, its infections and outbreaks. *J Microbiol Immunol Infect*, *33*(33), 205–216. https://europepmc.org/article/med/11269363

Ho, Monto. (1999). An epidemic of enterovirus 71 infection in Taiwan. *New England Journal of Medicine*, *341*(13), 929–935. https://doi.org/10.1056/NEJM199909233411301

Hoang, M. T. Van, Nguyen, T. A., Tran, T. T., Vu, T. T. H., Le, N. T. N., Nguyen, T. H. N., Le, T. H. N., Nguyen, T. T. H., Nguyen, T. H., Le, N. T. N., Truong, H. K., Du, T. Q., Ha, M. T., Ho, L. V., Do, C. V., Nguyen, T. N., Nguyen, T. M. T., Sabanathan, S., Phan, T. Q., … van Doorn, H. R. (2019). Clinical and aetiological study of hand, foot and mouth disease in southern Vietnam, 2013–2015: Inpatients and outpatients. *International Journal of Infectious Diseases*, *80*, 1–9. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2018.12.004

Hogle, James M. (2002). Poliovirus Cell Entry: Common Structural Themes in Viral Cell Entry Pathways. *Annual Review of Microbiology*, *56*(1), 677–702. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160757

Hogle, JM M., Chow, M., & Filman, D. J. D. J. (1985). Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution. *Science*, *229*(4720), 1358–1365. https://doi.org/10.1126/science.2994218

Holland, J. J., & Kiehn, E. D. (1968). Specific cleavage of viral proteins as steps in the synthesis and maturation of enteroviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *60*(3), 1015–1022. https://doi.org/10.1073/pnas.60.3.1015

Holland, John J. (1961). Receptor affinities as major determinants of enterovirus tissue tropisms in humans. *Virology*, *15*(3), 312–326. https://doi.org/10.1016/0042-6822(61)90363-4

Holland, John J., Domingo, E., de la Torre, J. C., & Steinhauer, D. A. (1990). Mutation Frequencies at Defined Single Codon Sites in Vesicular Stomatitis Virus and Poliovirus Can Be Increased Only Slightly by Chemical Mutagenesis. *Journal of Virology*, *64*(8), 3960–3962. https://doi.org/10.1128/jvi.64.8.3960-3962.1990

Horsley, E., Just, E., Torres, C., Huhtinen, E., Forssman, B., & Slade, R. (2014). Enterovirus 71 outbreak in Northern Sydney, 2013: Case series and initial response. *Journal of Paediatrics and Child Health*, *50*(7), 525–530. https://doi.org/10.1111/jpc.12625

Hsiung, G. D., & Wang, J. R. (2000). Enterovirus infections with special reference to enterovirus 71. *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection = Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi*, *33*(1), 1–8. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10806956

Hsu, N. Y., Ilnytska, O., Belov, G., Santiana, M., Chen, Y. H., Takvorian, P. M., Pau, C., van der Schaar, H., Kaushik-Basu, N., Balla, T., Cameron, C. E., Ehrenfeld, E., van Kuppeveld, F. J. M., & Altan-Bonnet, N. (2010). Viral reorganization of the secretory pathway generates distinct organelles for RNA replication. *Cell*, *141*(5), 799–811. https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.050

Huang, H.-W., Chen, Y.-S., Chen, J. Y.-F., Lu, P.-L., Lin, Y.-C., Chen, B.-C., Chou, L.-C., Wang, C.-F., Su, H.-J., Huang, Y.-C., Shi, Y.-Y., Chen, H.-L., Sanno-Duanda, B., Huang, T.-S., Lin, K.-H., Tyan, Y.-C., & Chu, P.-Y. (2015). Phylodynamic reconstruction of the spatiotemporal transmission and demographic history of coxsackievirus B2. *BMC Bioinformatics*, *16*(1), 302. https://doi.org/10.1186/s12859-015-0738-2

Huang, J., Liao, Q., Ooi, M. H., Cowling, B. J., Chang, Z., Wu, P., Liu, F., Li, Y., Luo, L., Yu, S., Yu, H., & Wei, S. (2018). Epidemiology of recurrent hand, foot and mouth disease, China, 2008–2015. *Emerging Infectious Diseases*, *24*(3), 432–442. https://doi.org/10.3201/eid2403.171303

Huang, K.-Y. A., Huang, P.-N., Huang, Y.-C., Yang, S.-L., Tsao, K.-C., Chiu, C.-H., Shih, S.-R., & Lin, T.-Y. (2020). Emergence of genotype C1 Enterovirus A71 and its link with antigenic variation of virus in Taiwan. *PLOS Pathogens*, *16*(9), e1008857. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008857

Huang, S.-W., Hsu, Y.-W., Smith, D. J., Kiang, D., Tsai, H.-P., Lin, K.-H., Wang, S.-M., Liu, C.-C., Su, I.-J., & Wang, J.-R. (2009). Reemergence of Enterovirus 71 in 2008 in Taiwan: Dynamics of Genetic and Antigenic Evolution from 1998 to 2008. *Journal of Clinical Microbiology*, *47*(11), 3653–3662. https://doi.org/10.1128/JCM.00630-09

Huang, S. C., Chang, C. L., Wang, P. S., Tsai, Y., & Liu, H. S. (2009). Enterovirus 71-induced autophagy detected in vitro and in vivo promotes viral replication. *Journal of Medical Virology*, *81*(7), 1241–1252. https://doi.org/10.1002/jmv.21502

Huang, S. W., Wang, Y. F., Yu, C. K., Su, I. J., & Wang, J. R. (2012a). Mutations in VP2 and VP1 capsid proteins increase infectivity and mouse lethality of enterovirus 71 by virus binding and RNA accumulation enhancement. *Virology*, *422*(1), 132–143. https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.10.015

Huang, S. W., Wang, Y. F., Yu, C. K., Su, I. J., & Wang, J. R. (2012b). Mutations in VP2 and VP1 capsid proteins increase infectivity and mouse lethality of enterovirus 71 by virus binding and RNA accumulation enhancement. *Virology*, *422*(1), 132–143. https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.10.015

Huang, W. C., Shih, W. L., Yang, S. C., Yen, T. Y., Lee, J. Te, Huang, Y. C., Li, C. C., Hsieh, Y. C., Lin, T. Y., Chang, L. Y., & Huang, L. M. (2017). Predicting severe enterovirus 71 infection: Age, comorbidity, and parental behavior matter. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, *50*(1), 10–16. https://doi.org/10.1016/j.jmii.2014.11.013

Huemer, H. P., Ortner, B., Huang, C. W., Schmid, D., Mutz, I., Wewalka, G., Yang, J. Y., & Allerberger, F. (2008). Isolating Asian enterovirus 71 subgenogroup C4 in two Austrian clinical samples from 2004. *Euro Surveillance : Bulletin Européen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*, *13*(28), 18922. https://doi.org/10.2807/ese.13.28.18922-en

Hussain, K. M., Leong, K. L. J., Ng, M. M. L., & Chu, J. J. H. (2011). The essential role of clathrin-mediated endocytosis in the infectious entry of human enterovirus 71. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(1), 309–321. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.168468

Hyeon, J. Y., Hwang, S., Kim, H., Song, J., Ahn, J., Kang, B., Kim, K. K., Choi, W., Chung, J. K., Kim, C. H., Cho, K., Jee, Y., Kim, J., Kim, K. K., Kim, S. H., Kim, M. J., & Cheon, D. S. (2013). Accuracy of diagnostic methods and surveillance sensitivity for human enterovirus, South Korea, 1999-2011. *Emerging Infectious Diseases*, *19*(8), 1268–1275. https://doi.org/10.3201/eid1908.130496

Ibrahim, W., Boukhadra, N., Nasri-Zoghlami, D., Berthelot, P., Omar, S., Bourlet, T., Pozzetto, B., & Pillet, S. (2014). Partial sequencing of the VP2 capsid gene for direct enterovirus genotyping in clinical specimens. *Clinical Microbiology and Infection*, *20*(9), O558–O565. https://doi.org/10.1111/1469-0691.12520

Infectious Agent Surveillance Repor HFMD. (2018). *Infectious Agent Surveillance Report. Hand, foot, and mouth disease and herpangina, 2009 to October 2018 (week 41), Japan. 2018*. https://www.niid.go.jp/niid/ja/iasr/510-

Infectious Agent Surveillance Report. Hand foot and mouth disease in Japan, 2017. (2017). *Infectious Agent Surveillance Report. Hand, foot, and mouth disease and herpangina, 2007 to September 2017 (week 38), Japan. 2017*. https://www.niid.go.jp/niid/en/iasr-vol38-e/865-iasr/7617-452te.html

Isaacs, S. R., Kim, K. W., Cheng, J. X., Bull, R. A., Stelzer-Braid, S., Luciani, F., Rawlinson, W. D., & Craig, M. E. (2018). Amplification and next generation sequencing of near full-length human enteroviruses for identification and characterisation from clinical sample. *Scientific Reports*, *8*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-018-30322-y

Ishiko, H., Shimada, Y., Yonaha, M., Hashimoto, O., Hayashi, A., Sakae, K., & Takeda, N. (2002). Molecular diagnosis of human enteroviruses by phylogeny-based classification by use of the VP4 sequence. *Journal of Infectious Diseases*, *185*(6), 744–754. https://doi.org/10.1086/339298

Ishimaru, Y., Nakano, S., Yamaoka, K., & Takami, S. (1980). Outbreaks of hand, foot, and mouth disease by enterovirus 71. High incidence of complication disorders of central nervous system. *Archives of Disease in Childhood*, *55*(8), 583–588. https://doi.org/10.1136/adc.55.8.583

Iturriza-Gómara, M., Megson, B., & Gray, J. (2006). Molecular detection and characterization of human enteroviruses directly from clinical samples using RT-PCR and DNA sequencing. *Journal of Medical Virology*, *78*(2), 243–253. https://doi.org/10.1002/jmv.20533

Iwai, M., Masaki, A., Hasegawa, S., Obara, M., Horimoto, E., Nakamura, K., Tanaka, Y., Endo, K., Tanaka, K., Ueda, J., Shiraki, K., Kurata, T., & Takizawa, T. (2009). Genetic changes of coxsackievirus A16 and enterovirus 71 isolated from hand, foot, and mouth disease patients in Toyama, Japan between 1981 and 2007. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, *62*(4), 254–259.

J Guimbao, P. R. M. A. M. O. (2010). Onychomadesis outbreak linked to hand, foot, and mouth disease, Spain, July 2008. *Euro Surveill*, *15*, 19663.

Jackson, W. T., Giddings, T. H., Taylor, M. P., Mulinyawe, S., Rabinovitch, M., Kopito, R. R., & Kirkegaard, K. (2005). Subversion of cellular autophagosomal machinery by RNA viruses. *PLoS Biology*, *3*(5), 0861–0871. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030156

James, W. D., Odom, R. B., & Hatch, M. H. (1982). Gianotti-Crosti-like eruption associated with coxsackievirus A-16 infection. *Journal of the American Academy of Dermatology*, *6*(5), 862–866. https://doi.org/10.1016/S0190-9622(82)80122-9

Jee, Y. Y. M., Cheon, D. S. D., Kim, K., Cho, J. H. J., Chung, Y. S., Lee, J. H., Lee, S. H., Park, K. S., Lee, J. H., Kim, E. C., Chung, H. J., Kim, D. S., Yoon, J. D., & Cho, H. W. (2003). Genetic analysis of the VP1 region of human enterovirus 71 strains isolated in Korea during 2000. *Archives of Virology*, *148*(9), 1735–1746. https://doi.org/10.1007/s00705-003-0133-6

Jegouic, S., Joffret, M.-L. L., Blanchard, C., Riquet, F. B., Perret, C., Pelletier, I., Colbere-Garapin, F., Rakoto-Andrianarivelo, M., Delpeyroux, F., S, J., Jegouic, S., Joffret, M.-L. L., Blanchard, C., Riquet, F. B., Perret, C., Pelletier, I., Colbere-Garapin, F., Rakoto-Andrianarivelo, M., & Delpeyroux, F. (2009). Recombination between polioviruses and co-circulating coxsackie A viruses: Role in the emergence of pathogenic vaccine-derived polioviruses. *PLoS Pathogens*, *5*(5). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000412

Jenkins, G. M., Rambaut, A., Pybus, O. G., & Holmes, E. C. (2002). Rates of molecular evolution in RNA viruses: A quantitative phylogenetic analysis. *Journal of Molecular Evolution*, *54*(2), 156–165. https://doi.org/10.1007/s00239-001-0064-3

Jiang, P., Liu, Y., Ma, H.-C., Paul, A. V., & Wimmer, E. (2014). Picornavirus Morphogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *78*(3), 418–437. https://doi.org/10.1128/mmbr.00012-14

Joachims, M., Van Breugel, P. C., & Lloyd, R. E. (1999). Cleavage of Poly(A)-Binding Protein by Enterovirus Proteases Concurrent with Inhibition of Translation In Vitro. *Journal of Virology*, *73*(1), 718–727. https://doi.org/10.1128/jvi.73.1.718-727.1999

Joffret, M.-L., Polston, P. M., Razafindratsimandresy, R., Bessaud, M., Heraud, J.-M., & Delpeyroux, F. (2018). Whole Genome Sequencing of Enteroviruses Species A to D by High-Throughput Sequencing: Application for Viral Mixtures. *Frontiers in Microbiology*, *9*(September), 1–10. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02339

Kao, S. J., Yang, F. L., Ksu, Y. H., & Chen, H. I. (2004). Mechanism of fulminant pulmonary edema caused by enterovirus 71. *Clinical Infectious Diseases*, *38*(12), 1784–1788. https://doi.org/10.1086/421021

Kapsenberg, J. G. (1988). Picornaviridae: The Enteroviruses (Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses). In *Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases Principles and Practice* (pp. 692–722). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-3900-0_36

Kapusinszky, B., Szomor, K. N., Farkas, Á., Takács, M., & Berencsi, G. (2010). Detection of non-polio enteroviruses in Hungary 2000-2008 and molecular epidemiology of enterovirus 71, coxsackievirus A16, and echovirus 30. *Virus Genes*, *40*(2), 163–173. https://doi.org/10.1007/s11262-009-0440-4

Kataoka, C., Suzuki, T., Kotani, O., Iwata-Yoshikawa, N., Nagata, N., Ami, Y., Wakita, T., Nishimura, Y., & Shimizu, H. (2015). The Role of VP1 Amino Acid Residue 145 of Enterovirus 71 in Viral Fitness and Pathogenesis in a Cynomolgus Monkey Model. *PLoS Pathogens*, *11*(7), 1–26. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005033

Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., Uematsu, S., Jung, A., Kawai, T., Ishii, K. J., Yamaguchi, O., Otsu, K., Tsujimura, T., Koh, C. S., Reis E Sousa, C., Matsuura, Y., Fujita, T., & Akira, S. (2006). Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature*, *441*(1), 101–105. https://doi.org/10.1038/nature04734

Ke, Y., Liu, W. N., Her, Z., Liu, M., Tan, S. Y., Tan, Y. W., Chan, X. Y., Fan, Y., Huang, E. K., Chen, H., En Chang, K. T., Chan, J. K. Y., Hann Chu, J. J., & Chen, Q. (2018). Enterovirus A71 Infection Activates Human Immune Responses and Induces Pathological Changes in Humanized Mice. *Journal of Virology*, *93*(3). https://doi.org/10.1128/jvi.01066-18

Kehle, J., Roth, B., Metzger, C., Pfitzner, A., & Enders, G. (2003). Molecular characterization of an enterovirus 71 causing neurological disease in Germany. In *Journal of NeuroVirology* (Vol. 9, Issue 1, pp. 126–128). Taylor and Francis Ltd. https://doi.org/10.1080/13550280390173364

Kerkvliet, J., Edukulla, R., & Rodriguez, M. (2010). Novel Roles of the Picornaviral 3D Polymerase in Viral Pathogenesis. *Advances in Virology*, *2010*. https://doi.org/10.1155/2010/368068

Khanh, T. H., Sabanathan, S., Thanh, T. T., Thoa, L. P. K., Thuong, T. C., Hang, V. thi T., Farrar, J., Hien, T. T., Chau, N. van V., & van Doorn, H. R. (2012). Enterovirus 71-associated hand, foot, and mouth disease, southern Vietnam, 2011. *Emerging Infectious Diseases*, *18*(12), 2002–2005. https://doi.org/10.3201/eid1812.120929

A Non-Mouse-Adapted Enterovirus 71 (EV71) Strain Exhibits Neurotropism, Causing Neurological Manifestations in a Novel Mouse Model of EV71 Infection, 86 Journal of Virology 2121 (2012). https://doi.org/10.1128/jvi.06103-11

Kim, H. J., Hyeon, J. Y., Hwang, S., Lee, Y. P., Lee, S. W., Yoo, J. S., Kang, B., Ahn, J. B., Jeong, Y. S., & Lee, J. W. (2016). Epidemiology and virologic investigation of human enterovirus 71 infection in the Republic of Korea from 2007 to 2012: A nationwide cross-sectional study. *BMC Infectious Diseases*, *16*(1). https://doi.org/10.1186/s12879-016-1755-0

Kim, J.-K., Fahad, A.-M., Shanmukhappa, K., & Kapil, S. (2006). Defining the Cellular Target(s) of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Blocking Monoclonal Antibody 7G10. *Journal of Virology*, *80*(2), 689–696. https://doi.org/10.1128/jvi.80.2.689-696.2006

Kirkegaard, K., & Baltimore, D. (1986). The mechanism of RNA recombination in poliovirus. *Cell*, *47*(3), 433–443. https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90600-8

Kirkegaard, K., Taylor, M. P., & Jackson, W. T. (2004). Cellular autophagy: Surrender, avoidance and subversion by microorganisms. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 2, Issue 4, pp. 301–314). https://doi.org/10.1038/nrmicro865

Kisselev, L. L. (1993). Mammalian tryptophanyl-tRNA synthetases. *Biochimie*, *75*(12), 1027–1039. https://doi.org/10.1016/0300-9084(93)90002-A

Klein, M., & Chong, P. (2015). Is a multivalent hand, foot, and mouth disease vaccine feasible? *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, *11*(11), 2688–2704. https://doi.org/10.1080/21645515.2015.1049780

Koh, W. M., Bogich, T., Siegel, K., Jin, J., Chong, E. Y., Tan, C. Y., Chen, M. I. C., Horby, P., & Cook, A. R. (2016). The epidemiology of hand, foot and mouth disease in Asia: A systematic review and analysis. In *Pediatric Infectious Disease Journal* (Vol. 35, Issue 10, pp. e285–e300). Lippincott Williams and Wilkins. https://doi.org/10.1097/INF.0000000000001242

Koike, S., Horie, H., Ise, I., Okitsu, A., Yoshida, M., Iizuka, N., Takeuchi, K., Takegami, T., & Nomoto, A. (1990). The poliovirus receptor protein is produced both as membrane-bound and secreted forms. *EMBO Journal*, *9*(10), 3217–3224. https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb07520.x

Kok, C. C., Phuektes, P., Bek, E., & McMinn, P. C. (2012). Modification of the Untranslated Regions of Human Enterovirus 71 Impairs Growth in a Cell-Specific Manner. *Journal of Virology*, *86*(1), 542–552. https://doi.org/10.1128/jvi.00069-11

Kok, Chee Choy, & Au, G. G. (2013). Novel marker for recombination in the 3′-untranslated region of members of the species Human enterovirus A. *Archives of Virology*, *158*(4), 765–773. https://doi.org/10.1007/s00705-012-1533-2

Komatsu, H., Shimizu, Y., Takeuchi, Y., Ishiko, H., Takada, H., K, K., Y, S., Y, T., H, I., H, T., Komatsu, H., Shimizu, Y., Takeuchi, Y., Ishiko, H., & Takada, H. (1999). Outbreak of severe neurologic involvement associated with Enterovirus 71 infection. *Pediatric Neurology*, *20*(1), 17–23. https://doi.org/10.1016/S0887-8994(98)00087-3

Koudelka, K. J., Destito, G., Plummer, E. M., Trauger, S. A., Siuzdak, G., & Manchester, M. (2009). Endothelial targeting of cowpea mosaic virus (CPMV) via surface vimentin. *PLoS Pathogens*, *5*(5). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000417

Ku, Z., Ye, X., Shi, J., Wang, X., Liu, Q., & Huang, Z. (2015). Single Neutralizing Monoclonal Antibodies Targeting the VP1 GH Loop of Enterovirus 71 Inhibit both Virus Attachment and Internalization during Viral Entry. *Journal of Virology*, *89*(23), 12084–12095. https://doi.org/10.1128/jvi.02189-15

Kundu, P., Raychaudhuri, S., Tsai, W., & Dasgupta, A. (2005). Shutoff of RNA Polymerase II Transcription by Poliovirus Involves 3C Protease-Mediated Cleavage of the TATA-Binding Protein at an Alternative Site: Incomplete Shutoff of Transcription Interferes with Efficient Viral Replication. *Journal of Virology*, *79*(15), 9702–9713. https://doi.org/10.1128/jvi.79.15.9702-9713.2005

Kuo, R. L., Kao, L. T., Lin, S. J., Wang, R. Y. L., & Shih, S. R. (2013). MDA5 Plays a Crucial Role in Enterovirus 71 RNA-Mediated IRF3 Activation. *PLoS ONE*, *8*(5), e63431. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063431

Kuyumcu-Martinez, N. M., Van Eden, M. E., Younan, P., & Lloyd, R. E. (2004). Cleavage of Poly(A)-Binding Protein by Poliovirus 3C Protease Inhibits Host Cell Translation: a Novel Mechanism for Host Translation Shutoff. *Molecular and Cellular Biology*, *24*(4), 1779–1790. https://doi.org/10.1128/mcb.24.4.1779-1790.2004

Lai, J. K. F., Sam, I. C., & Chan, Y. F. (2016). The autophagic machinery in Enterovirus infection. In *Viruses* (Vol. 8, Issue 2, p. 32). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/v8020032

Lai, Y., Wang, M., Cheng, A., Mao, S., Ou, X., Yang, Q., Wu, Y., Jia, R., Liu, M., Zhu, D., Chen, S., Zhang, S., Zhao, X.-X. X., Huang, J., Gao, Q., Wang, Y., Xu, Z., Chen, Z., Zhu, L., … Chen, X. (2020). Regulation of Apoptosis by Enteroviruses. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 1145. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01145

Landry, M. L., Fonseca, S. N. S., Cohen, S., & Bogue, C. W. (1995). Fatal enterovirus type 71 infection: rapid detection and diagnostic pitfalls. *Pediatric Infectious Disease Journal*, *14*(12), 1095–1100. https://doi.org/10.1097/00006454-199512000-00013

Lang, M., Mirand, A., Savy, N., Henquell, C., Maridet, S., Perignon, R., Labbé, A., & Peigue-Lafeuille, H. (2014). Acute flaccid paralysis following enterovirus D68 associated pneumonia, France, 2014. *Eurosurveillance*, *19*(44), 1–5. https://doi.org/10.2807/1560-7917.es2014.19.44.20952

Laszik, Z., Jansen, P. J., Cummings, R. D., Tedder, T. F., McEver, R. P., & Moore, K. L. (1996). P-selectin glycoprotein ligand-1 is broadly expressed in cells of myeloid, lymphoid, and dendritic lineage and in some nonhematopoietic cells. *Blood*, *88*(8), 3010–3021. https://doi.org/10.1182/blood.v88.8.3010.bloodjournal8883010

LB Ivashkiv, L. D. (2014). Regulation of type I interferon responses. *Nat. Rev. Immunol.*, *14*, 36–49.

Lee, C. C. D., Tang, J. H., Hwang, J. S., Shigematsu, M., & Chan, T. C. (2015). Effect of meteorological and geographical factors on the epidemics of hand, foot, and mouth disease in island-type territory, East Asia. *BioMed Research International*, *2015*. https://doi.org/10.1155/2015/805039

Lee, M.-S., Tseng, F.-C., Wang, J.-R., Chi, C.-Y., Chong, P., & Su, I.-J. (2012). Challenges to Licensure of Enterovirus 71 Vaccines. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *6*(8), e1737. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001737

Lee, M. M.-S. S., Tseng, F.-C. F. F. C., Wang, J. J.-R. R., Chi, C. C.-Y. Y., Chong, P., & Su, I.-J. J. (2012). *Etiology of Multiple Non-EV71 and Non- CVA16 Enteroviruses Associated with Hand, Foot and Mouth Disease in Jinan, China, 2009—June 2013*. *6*(8), e1737. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001737

Lee, M. S., Tseng, F. C., Wang, J. R., Chi, C. Y., Chong, P., & Su, I. J. (2012). Challenges to Licensure of Enterovirus 71 Vaccines. In *PLoS Neglected Tropical Diseases* (Vol. 6, Issue 8, p. e1737). https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001737

Lee, J. Te, Yen, T. Y., Shih, W. L., Lu, C. Y., Liu, D. P., Huang, Y. C., Chang, L. Y., Huang, L. M., & Lin, T. Y. (2019). Enterovirus 71 seroepidemiology in Taiwan in 2017 and comparison of those rates in 1997, 1999 and 2007. *PLoS ONE*, *14*(10). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224110

Lee, Y. P., Wang, Y. F., Wang, J. R., Huang, S. W., & Yu, C. K. (2012). Enterovirus 71 blocks selectively type I interferon production through the 3C viral protein in mice. *Journal of Medical Virology*, *84*(11), 1779–1789. https://doi.org/10.1002/jmv.23377

Lei, X., Han, N., Xiao, X., Jin, Q., He, B., & Wang, J. (2014). Enterovirus 71 3C Inhibits Cytokine Expression through Cleavage of the TAK1/TAB1/TAB2/TAB3 Complex. *Journal of Virology*, *88*(17), 9830–9841. https://doi.org/10.1128/jvi.01425-14

Lei, Xiaobo, Liu, X., Ma, Y., Sun, Z., Yang, Y., Jin, Q., He, B., & Wang, J. (2010). The 3C Protein of Enterovirus 71 Inhibits Retinoid Acid-Inducible Gene I-Mediated Interferon Regulatory Factor 3 Activation and Type I Interferon Responses. *Journal of Virology*, *84*(16), 8051–8061. https://doi.org/10.1128/jvi.02491-09

Lei, Xiaobo, Sun, Z., Liu, X., Jin, Q., He, B., & Wang, J. (2011). Cleavage of the adaptor protein TRIF by enterovirus 71 3C inhibits antiviral responses mediated by Toll-like receptor 3. *Journal of Virology*, *85*(17), 8811–8818. https://doi.org/10.1128/JVI.00447-11

Lei, Xiaobo, Xiao, X., Xue, Q., Jin, Q., He, B., & Wang, J. (2013). Cleavage of Interferon Regulatory Factor 7 by Enterovirus 71 3C Suppresses Cellular Responses. *Journal of Virology*, *87*(3), 1690–1698. https://doi.org/10.1128/jvi.01855-12

Leitch, E. C. M. W., Harvala, H., Robertson, I., Ubillos, I., Templeton, K., & Simmonds, P. (2009). Direct identification of human enterovirus serotypes in cerebrospinal fluid by amplification and sequencing of the VP1 region. *Journal of Clinical Virology*, *44*(2), 119–124. https://doi.org/10.1016/j.jcv.2008.11.015

Lekana-Douki, S. E., Mombo, I. M., 'dilimabaka, N., Banga-Mve-Ella, N., & Sangoye, O. (2019). Emerging Coxsackievirus A6 Causing Hand-Foot-and-Mouth Disease in Children in Gabon. In *Journal of Health Science Studies* (Vol. 1, Issue 2). www.annexpublishers.com

Leѵêque, N., Renois, F., Talmud, D., Nguyen, Y., Lesaffre, F., Boulagnon, C., Bruneval, P., Fornes, P., & Andréolettia, 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*(10), 3378–3380. https://doi.org/10.1128/JCM.01612-12

Li, J. L., Yuan, J., Yang, F., Wu, Z. Q., Hu, Y. F., Xue, Y., Zhou, B. P., & Jin, Q. (2014). Epidemic characteristics of hand, foot, and mouth disease in southern China, 2013: Coxsackievirus A6 has emerged as the predominant causative agent. In *Journal of Infection* (Vol. 69, Issue 3, pp. 299–303). W.B. Saunders Ltd. https://doi.org/10.1016/j.jinf.2014.04.001

Li, Li, Yin, H., An, Z., & Feng, Z. (2015). Considerations for developing an immunization strategy with enterovirus 71 vaccine. In *Vaccine* (Vol. 33, Issue 9, pp. 1107–1112). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.10.081

A spatiotemporal mixed model to assess the influence of environmental and socioeconomic factors on the incidence of hand, foot and mouth disease, 18 BMC Public Health 274 (2018). https://doi.org/10.1186/s12889-018-5169-3

Li, M. L., Hsu, T. A., Chen, T. C., Chang, S. C., Lee, J. C., Chen, C. C., Stollar, V., & Shih, S. R. (2002). The 3C protease activity of enterovirus 71 induces human neural cell apoptosis. *Virology*, *293*(2), 386–395. https://doi.org/10.1006/viro.2001.1310

Li, R., Zou, Q., Chen, L., Zhang, H., & Wang, Y. (2011). Molecular analysis of virulent determinants of enterovirus 71. *PLoS ONE*, *6*(10), e26237-e. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026237

Li, S., Cai, C., Feng, J., Li, X., Wang, Y., Yang, J., & Chen, Z. (2014). Peripheral T lymphocyte subset imbalances in children with enterovirus 71-induced hand, foot and mouth disease. *Virus Research*, *180*, 84–91. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.11.021

Li, Z., Yu, J., Liu, L., Wei, Z., Ehrlich, E. S., Liu, G., Li, J., Liu, X., Wang, H., Yu, X. F., & Zhang, W. (2014). Coxsackievirus A16 infection induces neural cell and non-neural cell apoptosis in vitro. *PLoS ONE*, *9*(10). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111174

Librado, P., & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, *25*(11), 1451–1452. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187

Liebig, H. D., Ziegler, E., Hartmuth, K., Klump, H., Kowalski, H., Blaas, D., Frasel, L., Kuechler, E., Skern, T., Yan, R., Lamphear, B., Rhoads, R., & Sommergruber, W. (1993). Purification of Two Picornaviral 2A Proteinases: Interaction with eIF-4γ and Influence on in Vitro Translation. *Biochemistry*, *32*(29), 7581–7588. https://doi.org/10.1021/bi00080a033

Lim, K. A., & Benyesh-Melnick, M. (1960). Typing of Viruses by Combinations of Antiserum Pools. Application to Typing of Enteroviruses (Coxsackie and Echo). *The Journal of Immunology*, *84*(3).

Lim, X. F., Jia, Q., Chow, V. T. K., & Kwang, J. (2013). Characterization of a novel monoclonal antibody reactive against the N-terminal region of Enterovirus 71 VP1 capsid protein. *Journal of Virological Methods*, *188*(1–2), 76–82. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.11.038

Lin, H.-Y., Yang, Y.-T., Yu, S.-L., Hsiao, K.-N., Liu, C.-C., Sia, C., & Chow, Y.-H. (2013). Caveolar Endocytosis Is Required for Human PSGL-1-Mediated Enterovirus 71 Infection. *Journal of Virology*, *87*(16), 9064–9076. https://doi.org/10.1128/jvi.00573-13

Lin, Jhao Yin, & Huang, H. I. (2020). Autophagy is induced and supports virus replication in Enterovirus A71-infected human primary neuronal cells. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–16. https://doi.org/10.1038/s41598-020-71970-3

Lin, Mei-Ling Li, Peng-Nien Huang, Kun-Yi Chien, Jim-Tong Horng, Shin-Ru Shih Heterogeneous nuclear ribonuclear protein K interacts with the enterovirus 71 5′ untranslated region and participates in virus replication, 89 Journal of General Virology 2540 (2008). https://doi.org/10.1099/vir.0.2008/003673-0

Lin, Jing Yi, & Shih, S. R. (2014). Cell and tissue tropism of enterovirus 71 and other enteroviruses infections. In *Journal of Biomedical Science* (Vol. 21, Issue 1, p. 18). BioMed Central Ltd. https://doi.org/10.1186/1423-0127-21-18

Lin, T. Y., Chang, L. Y., Hsia, S. H., Huang, Y. C., Chiu, C. H., Hsueh, C., Shih, S. R., Liu, C. C., & Wu, M. H. (2002). The 1998 enterovirus 71 outbreak in Taiwan: Pathogenesis and management. In *Clinical Infectious Diseases* (Vol. 34, pp. S52–S57). https://doi.org/10.1086/338819

Lin, T. Y., Twu, S. J., Ho, M. S., Chang, L. Y., & Lee, C. Y. (2003). Enterovirus 71 outbreaks, Taiwan: Occurrence and recognition. In *Emerging Infectious Diseases* (Vol. 9, Issue 3, pp. 291–293). Centers for Disease Control and Prevention (CDC). https://doi.org/10.3201/eid0903.020285

Lin, Y.-W., Chang, K.-C., Kao, C.-M., Chang, S.-P., Tung, Y.-Y., & Chen, S.-H. (2009). Lymphocyte and Antibody Responses Reduce Enterovirus 71 Lethality in Mice by Decreasing Tissue Viral Loads. *Journal of Virology*, *83*(13), 6477–6483. https://doi.org/10.1128/jvi.00434-09

Lin, Yi Wen, Lin, H. Y., Tsou, Y. L., Chitra, E., Hsiao, K. N., Shao, H. Y., Liu, C. C., Sia, C., Chong, P., & Chow, Y. H. (2012). Human SCARB2-mediated entry and endocytosis of EV71. *PLoS ONE*, *7*(1), e30507. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030507

Lin, Yi Wen, Yu, S. L., Shao, H. Y., Lin, H. Y., Liu, C. C., Hsiao, K. N., Chitra, E., Tsou, Y. L., Chang, H. W., Sia, C., Chong, P., & Chow, Y. H. (2013). Human SCARB2 Transgenic Mice as an Infectious Animal Model for Enterovirus 71. *PLoS ONE*, *8*(2). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057591

Lin, Yu Wen, Wang, S. W., Tung, Y. Y., & Chen, S. H. (2009). Enterovirus 71 infection of human dendritic cells. *Experimental Biology and Medicine*, *234*(10), 1166–1173. https://doi.org/10.3181/0903-RM-116

Linsuwanon, P., Puenpa, J., Huang, S. W., Wang, Y. F., Mauleekoonphairoj, J., Wang, J. R., & Poovorawan, Y. (2014). Epidemiology and seroepidemiology of human enterovirus 71 among Thai populations. *Journal of Biomedical Science*, *21*(1), 16. https://doi.org/10.1186/1423-0127-21-16

Liu, C.-C. C., Chou, A.-H. H., Lien, S.-P. P., Lin, H.-Y. Y., Liu, S.-J. J., Chang, J.-Y. Y., Guo, M.-S. S., Chow, Y.-H. H., Yang, W.-S. S., Chang, K. H.-W. W., Sia, C., & Chong, P. (2011). Identification and characterization of a cross-neutralization epitope of Enterovirus 71. *Vaccine*, *29*(26), 4362–4372. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.04.010

Liu, C.-C., Wang, S.-M., Tseng, H.-W., Wang, J.-R., Huang, C.-C., Chen, Y.-J., Lin, S.-J., & Yeh, T.-F. (1999). Clinical Spectrum of an Outbreak of Enterovirus 71 (EV71) Infection in Southern Taiwan: Emphasis on the Neurological Complications. *Pediatric Research*, *45*(4, Part 2 of 2), 167A-167A. https://doi.org/10.1203/00006450-199904020-00992

Liu, C. C., Chow, Y. H., Chong, P., & Klein, M. (2014). Prospect and challenges for the development of multivalent vaccines against hand, foot and mouth diseases. In *Vaccine* (Vol. 32, Issue 47, pp. 6177–6182). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.08.064

Liu, Fengfeng, Ren, M., Chen, S., Nie, T., Cui, J., Ran, L., Li, Z., & Chang, Z. (2020). Pathogen Spectrum of Hand, Foot, and Mouth Disease Based on Laboratory Surveillance — China, 2018. *China CDC Weekly*, *2*(11), 167–171. https://doi.org/10.46234/ccdcw2020.044

Liu, Fuxiao, Wu, X., Li, L., Liu, Z., & Wang, Z. (2013). Use of baculovirus expression system for generation of virus-like particles: Successes and challenges. In *Protein Expression and Purification* (Vol. 90, Issue 2, pp. 104–116). Academic Press Inc. https://doi.org/10.1016/j.pep.2013.05.009

Liu, J., Dong, W., Quan, X., Ma, C., Qin, C., & Zhang, L. (2012). Transgenic expression of human P-selectin glycoprotein ligand-1 is not sufficient for enterovirus 71 infection in mice. *Archives of Virology*, *157*(3), 539–543. https://doi.org/10.1007/s00705-011-1198-2

Liu, K., Ma, Y., Zhang, C., Chen, Y., Ye, X., Bai, G., Yu, Z., & Yan, Z. (2012). [Neurologic complications in children with enterovirus 71-infected hand-foot-mouth disease : clinical features, MRI findings and follow-up study]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, *92*(25), 1742–1746. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22944180

Liu, M. M. L., Lee, Y. P. Y., Wang, Y. Y. F., Lei, H. H. Y., Liu, C. C. C., Wang, S. M. S., Su, I. J., Wang, J. R., Yeh, T. M., Chen, S. H., & Yu, C. K. (2005). Type I interferons protect mice against enterovirus 71 infection. *Journal of General Virology*, *86*(12), 3263–3269. https://doi.org/10.1099/vir.0.81195-0

Liu, S. L., Pan, H., Liu, P., Amer, S., Chan, T. C., Zhan, J., Huo, X., Liu, Y., Teng, Z., Wang, L., & Zhuang, H. (2015). Comparative epidemiology and virology of fatal and nonfatal cases of hand, foot and mouth disease in mainland China from 2008 to 2014. In *Reviews in Medical Virology* (Vol. 25, Issue 2, pp. 115–128). John Wiley and Sons Ltd. https://doi.org/10.1002/rmv.1827

Liu, W., Ji, H., Shan, J., Bao, J., Sun, Y., Li, J., Bao, C., Tang, F., Yang, K., Bergquist, R., Peng, Z., & Zhu, Y. (2015). Spatiotemporal dynamics of hand-foot-mouth disease and its relationship with meteorological factors in Jiangsu Province, China. *PLoS ONE*, *10*(6), e0131311. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131311

Liu, Y. C., Kuo, R. L., Lin, J. Y., Huang, P. N., Huang, Y., Liu, H., Arnold, J. J., Chen, S. J., Wang, R. Y. L., Cameron, C. E., & Shih, S. R. (2014). Cytoplasmic Viral RNA-Dependent RNA Polymerase Disrupts the Intracellular Splicing Machinery by Entering the Nucleus and Interfering with Prp8. *PLoS Pathogens*, *10*(6). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004199

Liu, Y., Wang, C., Mueller, S., Paul, A. V., Wimmer, E., & Jiang, P. (2010). Direct interaction between two viral proteins, the nonstructural protein 2CATPase and the capsid protein VP3, is required for enterovirus morphogenesis. *PLoS Pathogens*, *6*(8), 75–76. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001066

Liu, Z. W., Zhuang, Z. C., Chen, R., Wang, X. R., Zhang, H. L., Li, S. H., Wang, Z. Y., & Wen, H. L. (2019). Enterovirus 71 VP1 protein regulates viral replication in SH-SY5Y cells via the mTOR autophagy signaling pathway. *Viruses*, *12*(1). https://doi.org/10.3390/v12010011

Lo, S. H., Huang, Y. C. Y., Huang, C. C. G., Tsao, K. C. K. K. C., Li, W. C. W., Hsieh, Y. C., Chiu, C. H., & Lin, T. Y. (2011). Clinical and epidemiologic features of Coxsackievirus A6 infection in children in northern Taiwan between 2004 and 2009. *Journal of*

Microbiology, Immunology and Infection, *44*(4), 252–257. https://doi.org/10.1016/j.jmii.2011.01.031
Lole, K. S., Bollinger, R. C., Paranjape, R. S., Gadkari, D., Kulkarni, S. S., Novak, N. G., Ingersoll, R., Sheppard, H. W., & Ray, S. C. (1999). Full-Length Human Immunodeficiency Virus Type 1 Genomes from Subtype C-Infected Seroconverters in India, with Evidence of Intersubtype Recombination. *Journal of Virology*, *73*(1), 152–160. https://doi.org/10.1128/jvi.73.1.152-160.1999
Lopes, F. M., da Motta, L. L., De Bastiani, M. A., Pfaffenseller, B., Aguiar, B. W., de Souza, L. F., Zanatta, G., Vargas, D. M., Schönhofen, P., Londero, G. F., de Medeiros, L. M., Freire, V. N., Dafre, A. L., Castro, M. A. A., Parsons, R. B., & Klamt, F. (2017). RA Differentiation Enhances Dopaminergic Features, Changes Redox Parameters, and Increases Dopamine Transporter Dependency in 6-Hydroxydopamine-Induced Neurotoxicity in SH-SY5Y Cells. *Neurotoxicity Research*, *31*(4), 545–559. https://doi.org/10.1007/s12640-016-9699-0
López-Guerrero, J. A., Alonso, M., Martín-Belmonte, F., & Carrasco, L. (2000). Poliovirus induces apoptosis in the human U937 promonocytic cell line. *Virology*, *272*(2), 250–256. https://doi.org/10.1006/viro.2000.0405
Lott, J. P., Liu, K., Landry, M. L., Nix, W. A., Oberste, M. S., Bolognia, J., & King, B. (2013). Atypical hand-foot-and-mouth disease associated with coxsackievirus A6 infection. *Journal of the American Academy of Dermatology*, *69*(5), 736–741. https://doi.org/10.1016/j.jaad.2013.07.024
Lu, Q. Bin, Zhang, X. A., Wo, Y., Xu, H. M., Li, X. J., Wang, X. J., Ding, S. J., Chen, X. D., He, C., Liu, L. J., Li, H., Yang, H., Li, T. Y., Liu, W., & Cao, W. C. (2012). Circulation of Coxsackievirus A10 and A6 in Hand-Foot-Mouth Disease in China, 2009-2011. *PLoS ONE*, *7*(12), e52073. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052073
Lu, G., Qi, J., Chen, Z., Xu, X., Gao, F., Lin, D., Qian, W., Liu, H., Jiang, H., Yan, J., & Gao, G. F. (2011). Enterovirus 71 and Coxsackievirus A16 3C Proteases: Binding to Rupintrivir and Their Substrates and Anti-Hand, Foot, and Mouth Disease Virus Drug Design. *Journal of Virology*, *85*(19), 10319–10331. https://doi.org/10.1128/jvi.00787-11
Lu, J. R., Lu, W. W., Lai, J. Z., Tsai, F. L., Wu, S. H., Lin, C. W., & Kung, S. H. (2013). Calcium flux and calpain-mediated activation of the apoptosis-inducing factor contribute to enterovirus 71-induced apoptosis. *Journal of General Virology*, *94*(PART7), 1477–1485. https://doi.org/10.1099/vir.0.047753-0
Lu, J., Zeng, H., Zheng, H., Yi, L., Guo, X., Liu, L., Sun, L., Tan, X., Li, H., Ke, C., & Lin, J. (2014). Hand, foot and mouth disease in Guangdong, China, in 2013: NEW trends in the continuing epidemic. *Clinical Microbiology and Infection*, *20*(7), O442-445. https://doi.org/10.1111/1469-0691.12468
Luchs, A., Cilli, A., Russo, D. H., Costa, F. F., Carmona, R. de C. C., & Timenetsky, M. do C. S. T. (2010). Avaliação da situação imunitária contra enterovírus 71 no estado de são Paulo, Brasil. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, *52*(6), 339–341. https://doi.org/10.1590/S0036-46652010000600010
Lukashev, A. N. (2005). Role of recombination in evolution of enteroviruses. In *Reviews in Medical Virology* (Vol. 15, Issue 3, pp. 157–167). https://doi.org/10.1002/rmv.457
Lukashev, A. N. A., Lashkevich, V. A., Ivanova, O. E. O. O. E., Koroleva, G. A., Hinkkanen, A. E. A. A. E., & Ilonen, J. (2003). Recombination in Circulating Enteroviruses. *Journal of Virology*, *77*(19), 10423–10431. https://doi.org/10.1128/jvi.77.19.10423-10431.2003
Lukashev, A. N., Elena, Y., Belalov, I. S., Ivanova, O. E., Eremeeva, T. P., Reznik, V. I., Trotsenko, O. E., Drexler, J. F., Drosten, C., Shumilina, E. Y., Belalov, I. S., Ivanova, O. E., Eremeeva, T. P., Reznik, V. I., Trotsenko, O. E., Drexler, J. F., Drosten, C., Elena, Y., Belalov, I. S., … Drosten, C. (2014). Recombination strategies and evolutionary dynamics of the Human enterovirus A global gene pool. *Journal of General Virology*, *95*(PART 4), 868–873. https://doi.org/10.1099/vir.0.060004-0
Lum, L. C. S., Wong, K. T., Lam, S. K., Chua, K. B., & Goh, A. Y. T. (1998). Neurogenic pulmonary oedema and enterovirus 71 encephalomyelitis [8]. In *Lancet* (Vol. 352, Issue 9137, p. 1391). Elsevier Limited. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)60789-1
Luo, Z., Dong, X., Li, Y., Zhang, Q., Kim, C., Song, Y., Kang, L., Liu, Y., Wu, K., & Wu, J. (2014). PolyC-binding protein 1 interacts with 5′-untranslated region of enterovirus 71 RNA in membrane-associated complex to facilitate viral replication. *PLoS ONE*, *9*(1), e87491. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087491
Lyu, K., Ding, J., Han, J.-F., Zhang, Y., Wu, X.-Y., He, Y.-L., Qin, C.-F., & Chen, R. (2014). Human enterovirus 71 uncoating captured at atomic resolution. *Journal of Virology*, *88*(6), 3114–3126. https://doi.org/10.1128/JVI.03029-13
M. Kennet, C. B. F. L. A. Y. S. L. J. G. (1974). Enterovirus type 71 in Melbourne. *Bull. Wrld. Hlth. Org.*, *51*(6), 609.
Mao, Q. Y., Wang, Y., Bian, L., Xu, M., & Liang, Z. (2016). EV71 vaccine, a new tool to control outbreaks of hand, foot and mouth disease (HFMD). In *Expert Review of Vaccines* (Vol. 15, Issue 5, pp. 599–606). Taylor and Francis Ltd. https://doi.org/10.1586/14760584.2016.1138862
Martin, D. P., Posada, D., Crandall, K. A., & Williamson, C. (2005). A modified bootscan algorithm for automated identification of recombinant sequences and recombination breakpoints. *AIDS Research and Human Retroviruses*, *21*(1), 98–102. https://doi.org/10.1089/aid.2005.21.98
Martin, D., & Rybicki, E. (2000). RDP: Detection of recombination amongst aligned sequences. *Bioinformatics*, *16*(6), 562–563. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/16.6.562
Martin, Darren P., Murrell, B., Golden, M., Khoosal, A., & Muhire, B. (2015). RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evolution*, *1*(1). https://doi.org/10.1093/ve/vev003
Mathes, E. F., Oza, V., Frieden, I. J., Cordoro, K. M., Yagi, S., Howard, R., Kristal, L., Ginocchio, C. C., Schaffer, J., Maguiness, S., Bayliss, S., Lara-Corrales, I., Garcia-Romero, M. T., Kelly, D., Salas, M., Oberste, M. S., Nix, A., CarolGlaser, & Antaya, R. (2013). Eczema coxsackium and unusual cutaneous findings in an enterovirus outbreak. *Pediatrics*, *132*(1), e149. https://doi.org/10.1542/peds.2012-3175
McEver, R. P., & Cummings, R. D. (1997). Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. In *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 100, Issue 3, pp. 485–492). American Society for Clinical Investigation. https://doi.org/10.1172/jci119556
McMinn, P. C. (2002). An overview of the evolution of enterovirus 71 and its clinical and public health significance. *FEMS Microbiology Reviews*, *26*(1), 91–107. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00601.x
McMinn, P. C. (2012). *Recent advances in the molecular epidemiology and control of human enterovirus 71 infection*. *2*(2), 199–205. https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.02.009
McMinn, P., Stratov, I., Nagarajan, L., & Davis, S. (2001). Neurological Manifestations of Enterovirus 71 Infection in Children during an Outbreak of Hand, Foot, and Mouth Disease in Western Australia. *Clinical Infectious Diseases*, *32*(2), 236–242. https://doi.org/10.1086/318454
McWilliam Leitch, E. C., Cabrerizo, M., Cardosa, J., Harvala, H., Ivanova, O. E. O. E., Koike, S., Kroes, A. C. M., Lukashev, A., Perera, D., Roivainen, M., Susi, P., Trallero, G., Evans, D. J., Simmonds, P., McWilliam, E., Cabrerizo, M., Cardosa, J., Harvala, H., Ivanova, O. E. O. E., … Simmonds, P. (2012). The Association of Recombination Events in the Founding and Emergence of Subgenogroup Evolutionary Lineages of Human Enterovirus 71. *Journal of Virology*, *86*(5), 2676–2685. https://doi.org/10.1128/jvi.06065-11
Medici, M. C., Tummolo, F., Arcangeletti, M. C., De Conto, F., Chezzi, C., Dodi, I., & Calderaro, A. (2016). *A cluster of Enterovirus 71 subgenogroup C2 in a nursery school, Italy, 2014* (Vol. 39).
Melnick, J. (1996). *Enteroviruses : Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses, and Newer Enteroviruses.* Lippincott -Raven Publishers.

Melnick, J. L. (1984). Enterovirus type 71 infections: a varied clinical pattern sometimes mimicking paralytic poliomyelitis. *Reviews of Infectious Diseases*, *6 Suppl 2*(Suppl 2), S387–S390. https://doi.org/10.1093/clinids/6.supplement_2.s387
Melnick, J. L., Rennick, V., Hampil, B., Schmidt, N. J., & Ho, H. H. (1973). Lyophilized combination pools of enterovirus equine antisera: preparation and test procedures for the identification of field strains of 42 enteroviruses. *Bulletin of the World Health Organization*, *48*(3), 263–268. /pmc/articles/PMC2481070/?report=abstract
Melnick, J.L., Schmidt, N. J., Mirkovic, R. R., Chumakov, M. P., Lavrova, I. K., & Voroshilova, M. K. (1979). Identification of Bulgarian Strain 258 of Enterovirus 71. *Intervirology*, *12*(6), 297–302. https://doi.org/10.1159/000149088
Melnick, Joseph L. (1996). Current status of poliovirus infections. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 9, Issue 3, pp. 293–300). American Society for Microbiology. https://doi.org/10.1128/cmr.9.3.293-300.1996
Melnick, Joseph L., Chanock, R. M., Gelfand, H., Hammon, W. M. D., Huebner, R. J., Rosen, L., Sabin, A. B., & Wenner, H. A. (1963). Picornaviruses: Classification of nine new types. *Science*, *141*(3576), 153–154. https://doi.org/10.1126/science.141.3576.153
Melnick, Joseph L., Schmidt, N. J., Hampil, B., & Ho, H. H. (1977). Lyophilized Combination Pools of Enterovirus Equine Antisera: Preparation and Test Procedures for the Identification of Field Strains of 19 Group A Coxsackievirus Serotypes. *Intervirology*, *8*(3), 172–181. https://doi.org/10.1159/000148892
Melnick, Joseph L., Shaw, E. W., & Curnen, E. C. (1949). A Virus Isolated from Patients Diagnosed as Non-Paralytic Poliomyelitis or Aseptic Meningitis. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, *71*(3), 344–349. https://doi.org/10.3181/00379727-71-17186
Mendelsohn, C. C. L., Wimmer, E., & Racaniello, V. R. V. (1989). Cellular receptor for poliovirus: Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. *Cell*, *56*(5), 855–865. https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90690-9
Meng, T., & Kwang, J. (2014). Attenuation of Human Enterovirus 71 High-Replication-Fidelity Variants in AG129 Mice. *Journal of Virology*, *88*(10), 5803–5815. https://doi.org/10.1128/jvi.00289-14
Merovitz, L., Demers, A. M., Newby, D., & McDonald, J. (2000). Enterovirus 71 infections at a canadian center. *Pediatric Infectious Disease Journal*, *19*(8), 755–757. https://doi.org/10.1097/00006454-200008000-00017
Messacar, K., Schreiner, T. L., Maloney, J. A., Wallace, A., Ludke, J., Oberste, M. S., Nix, W. A., Robinson, C. C., Glodé, M. P., Abzug, M. J., & Dominguez, S. R. (2015). A cluster of acute flaccid paralysis and cranial nerve dysfunction temporally associated with an outbreak of enterovirus D68 in children in Colorado, USA. *The Lancet*, *385*(9978), 1662–1671. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)62457-0
Messacar, K., Spence-Davizon, E., Osborne, C., Press, C., Schreiner, T. L., Martin, J., Messer, R., Maloney, J., Burakoff, A., Barnes, M., Rogers, S., Lopez, A. S., Routh, J., Gerber, S. I., Oberste, M. S., Nix, W. A., Abzug, M. J., Tyler, K. L., Herlihy, R., & Dominguez, S. R. (2020). Clinical characteristics of enterovirus A71 neurological disease during an outbreak in children in Colorado, USA, in 2018: an observational cohort study. *The Lancet Infectious Diseases*, *20*(2), 230–239. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30632-2
Midgley, S. E., Nielsen, A. G., Trebbien, R., Poulsen, M. W., Andersen, P. H., Fischer, T. K., Wieczorek, M., Purzyńska, M., Krzysztoszek, A., Ciąćka, A., Figas, A., Szenborn, L., Midgley, S. E., Nielsen, A. G., Trebbien, R., Poulsen, M. W., Andersen, P. H., Fischer, T. K., Böttcher, S., … Prifert, C. (2018). Co-circulation of multiple subtypes of enterovirus A71 (EV- A71) genotype C, including novel recombinants characterised by use of whole genome sequencing (WGS), Denmark 2016. *Journal of Medical Virology*, *22*(26), 1843–1846. https://doi.org/10.3201/eid2210.160357
Miller, S., & Krijnse-Locker, J. (2008). Modification of intracellular membrane structures for virus replication. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 6, Issue 5, pp. 363–374). Nature Publishing Group. https://doi.org/10.1038/nrmicro1890
Minor, P. (2009). Vaccine-derived poliovirus (VDPV): Impact on poliomyelitis eradication. In *Vaccine* (Vol. 27, Issue 20, pp. 2649–2652). https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.02.071
Minor, P. D. (1990). Antigenic structure of picornaviruses. In *Current Topics in Microbiology and Immunology* (Vol. 161, pp. 121–154). https://doi.org/10.1007/978-3-642-75602-3_5
Mirand, A. (2016). Ambulatory pediatric surveillance of hand, foot and mouth disease as signal of an outbreak of coxsackievirus A6 infections, France, 2014-2015. *Emerging Infectious Diseases*, *22*(11), 1884–1893. https://doi.org/10.3201/eid2211.160590
Mirand, A., Bailly, J. L., Henquell, C., & Peigue-Lafeuille, H. (2008). Génotypage direct rapide des entérovirus dans le liquide céphalorachidien : étude prospective de deux ans au sein d'un laboratoire de virologie clinique. *Pathologie Biologie*, *56*(7–8), 471–481. https://doi.org/10.1016/j.patbio.2008.08.005
Mirand, A., Henquell, C., Archimbaud, C., Ughetto, S., Antona, D., Bailly, J. L., & Peigue-Lafeuille, H. (2012). Outbreak of hand, foot and mouth disease/herpangina associated with coxsackievirus A6 and A10 infections in 2010, France: A large citywide, prospective observational study. *Clinical Microbiology and Infection*, *18*(5). https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03789.x
Mirand, A., & Peigue-Lafeuille, H. (2017). Clinical characteristics and course of hand, foot, and mouth disease. *Archives de Pediatrie*, *24*(10), 1036–1046. https://doi.org/10.1016/j.arcped.2017.08.001
Mirand, A., Schuffenecker, I., Henquell, C., Billaud, G., Jugie, G., Falcon, D., Mahul, A., Archimbaud, C., Terletskaia-Ladwig, E., Diedrich, S., Huemer, H. P., Enders, M., Lina, B., Peigue-Lafeuille, H., & Bailly, J. L. (2010). Phylogenetic evidence for a recent spread of two populations of human enterovirus 71 in European countries. *Journal of General Virology*, *91*(9), 2263–2277. https://doi.org/10.1099/vir.0.021741-0
Mirand, A., Vié le Sage, F., Pereira, B., Cohen, R., Levy, C., Archimbaud, C., Peigue-Lafeuille, H., Bailly, J. L., & Henquell, C. (2016). Ambulatory pediatric surveillance of hand, foot and mouth disease as signal of an outbreak of coxsackievirus A6 infections, France, 2014-2015. *Emerging Infectious Diseases*, *22*(11), 1884–1893. https://doi.org/10.3201/eid2211.160590
Mirand, Audrey, Molet, L., Hassel, C., Peigue-Lafeuille, H., Rozenberg, F., Bailly, J. L., & Henquell, C. (2015). Enterovirus A71 subgenotype B5, France, 2013. *Emerging Infectious Diseases*, *21*(4), 707–709. https://doi.org/10.3201/eid2104.141093
Montes, M., Artieda, J., Piñeiro, L. D., Gastesi, M., Diez-Nieves, I., & Cilla, G. (2013). Hand, foot, and mouth disease outbreak and coxsackievirus A6, Northern Spain, 2011. *Emerging Infectious Diseases*, *19*(4), 676–677. https://doi.org/10.3201/eid1904.121589
Muehlenbachs, A., Bhatnagar, J., & Zaki, S. R. (2015). *Tissue tropism, pathology and pathogenesis of enterovirus infection*. *235*(2), 217–228. https://doi.org/10.1002/path.4438
Mueller, S., Wimmer, E., & Cello, J. (2005). Poliovirus and poliomyelitis: A tale of guts, brains, and an accidental event. In *Virus Research* (Vol. 111, Issue 2 SPEC. ISS., pp. 175–193). Elsevier. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2005.04.008
Muir, P., Kämmerer, U., Korn, K., Mulders, M. N., Pöyry, T., Weissbrich, B., Kandolf, R., Cleator, G. M., & Van Loon, A. M. (1998). Molecular typing of enteroviruses: Current status and future requirements. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 11, Issue 1, pp. 202–227). American Society for Microbiology. https://doi.org/10.1128/cmr.11.1.202
Murray, K. E., Steil, B. P., Roberts, A. W., & Barton, D. J. (2004). Replication of Poliovirus RNA with Complete Internal Ribosome Entry Site Deletions. *Journal of Virology*, *78*(3), 1393–1402. https://doi.org/10.1128/jvi.78.3.1393-1402.2004
Nagata, N., Iwasaki, T., Ami, Y., Tano, Y., Harashima, A., Suzaki, Y., Sato, Y., Hasegawa, H., Sata, T., Miyamura, T., & Shimizu, H. (2004). Differential localization of neurons susceptible to enterovirus 71 and poliovirus type 1 in the central nervous system of cynomolgus

monkeys after intravenous inoculation. *Journal of General Virology*, *85*(10), 2981–2989. https://doi.org/10.1099/vir.0.79883-0
Nagata, N., Shimizu, H., Ami, Y., Tano, Y., Harashima, A., Suzaki, Y., Sato, Y., Miyamura, T., Sata, T., & Iwasaki, T. (2002). Pyramidal and extrapyramidal involvement in experimental infection of cynomolgus monkeys with enterovirus 71. *Journal of Medical Virology*, *67*(2), 207–216. https://doi.org/10.1002/jmv.2209
Nagy, G., Takatsy, S., Kukan, E., Mihaly, I., Domok, I., Takátsy, S., Kukán, E., Mihály, I., Dömök, I., G, N., Nagy, G., Takátsy, S., Kukán, E., Mihály, I., Dömök, I., Takatsy, S., Kukan, E., Mihaly, I., Domok, I., … Dömök, I. (1982). Virological diagnosis of enterovirus type 71 infections: Experiences gained during an epidemic of acute CNS diseases in Hungary in 1978. *Archives of Virology*, *71*(3), 217–227. https://doi.org/10.1007/BF01314873
Nakano, K., Shiroma, A., Shimoji, M., Tamotsu, H., Ashimine, N., Ohki, S., Shinzato, M., Minami, M., Nakanishi, T., Teruya, K., Satou, K., & Hirano, T. (2017). Advantages of genome sequencing by long-read sequencer using SMRT technology in medical area. In *Human Cell* (Vol. 30, Issue 3, pp. 149–161). Springer Tokyo. https://doi.org/10.1007/s13577-017-0168-8
Nasri, D., Bouslama, L., Omar, S., Saoudin, H., Bourlet, T., Aouni, M., Pozzetto, B., & Pillet, S. (2007). Typing of human enterovirus by partial sequencing of VP2. *Journal of Clinical Microbiology*, *45*(8), 2370–2379. https://doi.org/10.1128/JCM.00093-07
Newcombe, N., Andersson, P., Johansson, E., Au, G., & Lindberg, A. (2003). Cellular receptor interactions of C-cluster human group A coxsackieviruses. *J Gen Virol*, *84*.
Neznanov, N., Kondratova, A., Chumakov, K. M., Angres, B., Zhumabayeva, B., Agol, V. I., & Gudkov, A. V. (2001). Poliovirus Protein 3A Inhibits Tumor Necrosis Factor (TNF)-Induced Apoptosis by Eliminating the TNF Receptor from the Cell Surface. *Journal of Virology*, *75*(21), 10409–10420. https://doi.org/10.1128/jvi.75.21.10409-10420.2001
Ng, Q., He, F., & Kwang, J. (2015). Recent progress towards novel EV71 anti-therapeutics and vaccines. In *Viruses* (Vol. 7, Issue 12, pp. 6441–6457). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/v7122949
Nguyen, V. H., Sibounheuang, B., Phommasone, K., Vongsouvath, M., Newton, P. N., Piorkowski, G., Baronti, C., de Lamballerie, X., & Dubot-Pérès, A. (2014). First isolation and genomic characterization of enterovirus A71 and coxsackievirus A16 from hand foot and mouth disease patients in the Lao PDR. *New Microbes and New Infections*, *2*(6), 170–172. https://doi.org/10.1002/nmi2.63
Nhan, L. N. T., Hong, N. T. T., Nhu, L. N. T., Nguyet, L. A., Ny, N. T. H., Thanh, T. T., Han, D. D. K., Tu Van, H. M., Thwaites, C. L., Hien, T. T., Qui, P. T., Van Quang, P., Minh, N. N. Q., van Doorn, H. R., Khanh, T. H., Chau, N. V. V., Thwaites, G., Hung, N. T., & Van Tan, L. (2018). Severe enterovirus A71 associated hand, foot and mouth disease, Vietnam, 2018: Preliminary report of an impending outbreak. *Eurosurveillance*, *23*(46), 1–5. https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.46.1800590
Nicklin, M. J. H., Kräusslich, H. G., Toyoda, H., Dunn, J. J., & Wimmer, E. (1987). Poliovirus polypeptide precursors: Expression in vitro and processing by exogenous 3C and 2A proteinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *84*(12), 4002–4006. https://doi.org/10.1073/pnas.84.12.4002
Niknadia, N., Chee, |, Tan, W., Kien, |, Ong, C., Sam, | I-Ching, Yoke, |, & Chan, F. (2018). *Identification and characterization of neutralization epitopes at VP2 and VP1 of enterovirus A71; Identification and characterization of neutralization epitopes at VP2 and VP1 of enterovirus A71*. https://doi.org/10.1002/jmv.25061
NikNadia, N. M. N., Sam, I. C., Rampal, S., WanNorAmalina, W. M. Z., NurAtifah, G., Verasahib, K., Ong, C. C., MohdAdib, M. A., & Chan, Y. F. (2016). Cyclical Patterns of Hand, Foot and Mouth Disease Caused by Enterovirus A71 in Malaysia. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *10*(3), e0004562. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004562
Nishimura, Y., Lee, H., Hafenstein, S., Kataoka, C., Wakita, T., Bergelson, J. M., & Shimizu, H. (2013). Enterovirus 71 Binding to PSGL-1 on Leukocytes: VP1-145 Acts as a Molecular Switch to Control Receptor Interaction. *PLoS Pathogens*, *9*(7), e1003511. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003511
Nishimura, Y., Shimojima, M., Tano, Y., Miyamura, T., Wakita, T., & Shimizu, H. (2009). Human P-selectin glycoprotein ligand-1 is a functional receptor for enterovirus 71. *Nature Medicine*, *15*(7), 794–797. https://doi.org/10.1038/nm.1961
Nishimura, Y., Wakita, T., & Shimizu, H. (2010). Tyrosine sulfation of the amino terminus of PSGL-1 is critical for enterovirus 71 infection. *PLoS Pathogens*, *6*(11), e1001174. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001174
Nolan, M. A., Craig, M. E., Lahra, M. M., Rawlinson, W. D., Prager, P. C., Williams, G. D., Bye, A. M. E., & Andrews, P. I. (2003). Survival after pulmonary edema due to enterovirus 71 encephalitis. *Neurology*, *60*(10), 1651–1656. https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000066810.62490.FF
Norder, H., Bjerregaard, L., & Magnius, L. O. (2001). Homotypic echoviruses share aminoterminal VP1 sequence homology applicable for typing. *Journal of Medical Virology*, *63*(1), 35–44. https://doi.org/10.1002/1096-9071(200101)63:1<35::AID-JMV1005>3.0.CO;2-Q
Oberste, M. S. M., Maher, K., Kilpatrick, D. D. R., & PALLANSCH, M. A. (1999). Molecular Evolution of the Human Enteroviruses: Correlation of Serotype with VP1 Sequence and Application to Picornavirus Classification. *Journal of Virology*, *73*(3), 1941–1948. https://doi.org/10.1128/jvi.73.3.1941-1948.1999
Oberste, M. Steven, Maher, K., Kilpatrick, D. R., Flemister, M. R., Brown, B. A., & Pallansch, M. A. (1999). Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. *Journal of Clinical Microbiology*, *37*(5), 1288–1293. https://doi.org/10.1128/jcm.37.5.1288-1293.1999
Oberste, M. Steven, 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*(2), 855–867. https://doi.org/10.1128/jvi.78.2.855-867.2004
Oberste, M. Steven, Maher, K., Pallansch, M. A., MS Oberste, K Maher, M. P., 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*. *78*(2), 855–867. https://doi.org/10.1128/jvi.78.2.855-867.2004
Oberste, M. Steven, Michele, S. M., Maher, K., Schnurr, D., Cisterna, D., Junttila, N., Uddin, M., Chomel, J. J., Lau, C. S., Ridha, W., Al-Busaidy, S., Norder, H., Magnius, L. O., & Pallansch, M. A. (2004). Molecular identification and characterization of two proposed new enterovirus serotypes, EV74 and EV75. *Journal of General Virology*, *85*(11), 3205–3212. https://doi.org/10.1099/vir.0.80148-0
Oberste, M. Steven, Weaver, S. C., Watts, D. M., & Smith, J. F. (1998). Identification and genetic analysis of Panama-genotype Venezuelan equine encephalitis virus subtype ID in Peru. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *58*(1), 41–46. https://doi.org/10.4269/ajtmh.1998.58.41
Oberste, MS Steven, Maher, K., Flemister, M. M. R., Marchetti, G., Kilpatrick, D. D. R., & Pallansch, M. A. (2000). Comparison of classic and molecular approaches for the identification of untypeable enteroviruses. *Journal of Clinical Microbiology*, *38*(3), 1170–1174. https://doi.org/10.1128/jcm.38.3.1170-1174.2000
OMS. (2011). *A Guide to Clinical Management and Public Health Response for Hand, Foot and Mouth Disease (HFMD)*. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/207490/9789290615255_eng.pdf
OMS. (2018). *World Health Organization (WHO) - Western Pacific Region: Hand, Foot and Mouth Disease Situation Update (Archives 2015, 2016, 2017 and 2018).* https://iris.wpro.who.int/handle/10665.1/14191?show=full&locale-attribute=fr
Ooi, E. E., Phoon, M. C., Ishak, B., & Chan, S. H. (2002). Seroepidemiology of human enterovirus 71, Singapore. *Emerging Infectious Diseases*, *8*(9), 995–997. https://doi.org/10.3201/eid0809.010397
Ooi, M. H., Wong, S. C., Lewthwaite, P., Cardosa, M. J., & Solomon, T. (2010). Clinical features, diagnosis, and management of enterovirus

71. In *The Lancet Neurology* (Vol. 9, Issue 11, pp. 1097–1105). https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70209-X
Ooi, M. H., Wong, S. C., Mohan, A., Podin, Y., Perera, D., Clear, D., del Sel, S., Chieng, C. H., Tio, P. H., Cardosa, M. J., & Solomon, T. (2009). Identification and validation of clinical predictors for the risk of neurological involvement in children with hand, foot, and mouth disease in Sarawak. *BMC Infectious Diseases*, *9*, 3–3. https://doi.org/10.1186/1471-2334-9-3
Ooi, M. H., Wong, S. C., Podin, Y., Akin, W., Del Sel, S., Mohan, A., Chieng, C. H., Perera, D., Clear, D., Wong, D., Blake, E., Cardosa, J., & Solomon, T. (2007). Human enterovirus 71 disease in Sarawak, Malaysia: A prospective clinical, virological, and molecular epidemiological study. *Clinical Infectious Diseases*, *44*(5), 646–656. https://doi.org/10.1086/511073
Ooi, M., Solomon, T., Podin, Y., Mohan, A., Akin, W., Yusuf, M., Sel, S., Kontol, K., Lai, B., Clear, D., Chieng, C., Blake, E., Perera, D., Wong, S., & Cardosa, J. (2007). Evaluation of different clinical sample types in diagnosis of human enterovirus 71-associated hand-foot-and-mouth disease. *Journal of Clinical Microbiology*, *45*(6), 1858–1866. https://doi.org/10.1128/JCM.01394-06
Österback, R., Vuorinen, T., Linna, M., Susi, P., Hyypiä, T., Waris, M., Osterback, R., Vuorinen, T., Linna, M., Susi, P., Hyypia, T., Österback, R., Vuorinen, T., Linna, M., Susi, P., Hyypiä, T., & Waris, M. (2009). Coxsackievirus A6 and hand, foot, and mouth disease, Finland. *Emerging Infectious Diseases*, *15*(9), 1485–1488. https://doi.org/10.3201/eid1509.090438
Owino, C. O., & Chu, J. J. H. (2019). Recent advances on the role of host factors during non-poliovirus enteroviral infections. *Journal of Biomedical Science*, *26*(1), 1–17. https://doi.org/10.1186/s12929-019-0540-y
Padidam, M., Sawyer, S., & Fauquet, C. M. (1999). Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology*, *265*(2), 218–225. https://doi.org/10.1006/viro.1999.0056
Palacios, G., Casas, I., Tenorio, A., & Freire, C. (2002). Molecular identification of enterovirus by analyzing a partial VP1 genomic region with different methods. *Journal of Clinical Microbiology*, *40*(1), 182–192. https://doi.org/10.1128/JCM.40.1.182-192.2002
Pallansch, M. A., Oberste, M. S., & Lindsay Whitton, J. (2013). Enteroviruses: Polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. In D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, & et al. Roizman, B. (Eds.), *Fields Virology: Sixth Edition* (4th Editio, Vol. 1, pp. 723–775). Lippencott Williams & Wilkins. https://doi.org/10.1002/0470857285.ch6
Pallansch, M., & Roos, R. (2007). *Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses and newer enteroviruses* (pp. 840–893). Lippincoit Williams & Wilkins.
Pallansch MA, Oberste MS, W. J. (2013). *Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses and newer enteroviruses* (D. Knipe & P. Howley (eds.); Fields Vir).
Pankov, R., & Yamada, K. M. (2002). Fibronectin at a glance. *Journal of Cell Science*, *115*(20), 3861–3863. https://doi.org/10.1242/jcs.00059
Park, N., Katikaneni, P., Skern, T., & Gustin, K. E. (2008). Differential Targeting of Nuclear Pore Complex Proteins in Poliovirus-Infected Cells. *Journal of Virology*, *82*(4), 1647–1655. https://doi.org/10.1128/jvi.01670-07
Park, N., Skern, T., & Gustin, K. E. (2010). Specific cleavage of the nuclear pore complex protein Nup62 by a viral protease. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(37), 28796–28805. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.143404
Peersen, O. B. (2017). Picornaviral polymerase structure, function, and fidelity modulation. In *Virus Research* (Vol. 234, pp. 4–20). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.01.026
Peigue-Lafeuille, H, Mirand, A., Bailly, J., & Henquell, C. (2016). Entérovirus et parechovirus. *EMC - Maladies Infectieuses*, *33*(4), 1–19. https://doi.org/10.1016/S1166-8598(16)73752-5
Peigue-Lafeuille, Hélène, Mirand, A., Archimbaud, C., Bailly, J. L., & Henquell, C. (2014). Émergence et réémergence chez les entérovirus: De la poliomyélite à la maladie pieds-mains-bouche. In *Virologie* (Vol. 18, Issue 2, pp. 87–104). https://doi.org/10.1684/vir.2014.0563
Perlman, S., & Gallagher, T. (2018). Not your usual tRNA synthetase: HWARS serves as an enterovirus entry factor. *Journal of Clinical Investigation*, *128*(11), 4767–4769. https://doi.org/10.1172/JCI124582
Pfeiffer, J. K., & Kirkegaard, K. (2005). Increased fidelity reduces poliovirus fitness and virulence under selective pressure in mice. *PLoS Pathogens*, *1*(2), 0102–0110. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0010011
Pfister, T., & Wimmer, E. (1999). Characterization of the nucleoside triphosphatase activity of poliovirus protein 2C reveals a mechanism by which guanidine inhibits poliovirus replication. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(11), 6992–7001. https://doi.org/10.1074/jbc.274.11.6992
Phyu, W. K., Ong, K. C., Kong, C. K., Alizan, A. K., Ramanujam, T. M., & Wong, K. T. (2017). Squamous epitheliotropism of Enterovirus A71 in human epidermis and oral mucosa. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–10. https://doi.org/10.1038/srep45069
Pilipenko, E. V., Gmyl, A. P., & Agol, V. I. (1995). A model for rearrangements in RNA genomes. *Nucleic Acids Research*, *23*(11), 1870–1875. https://doi.org/10.1093/nar/23.11.1870
Plevka, P., Perera, R., Cardosa, J., Kuhn, R. J., & Rossmann, M. G. (2012). Crystal structure of human enterovirus 71. *Science*, *336*(6086), 1274. https://doi.org/10.1126/science.1218713
Plotkin, S. A. (2010). Correlates of protection induced by vaccination. In *Clinical and Vaccine Immunology* (Vol. 17, Issue 7, pp. 1055–1065). American Society for Microbiology. https://doi.org/10.1128/CVI.00131-10
Podin, Y., Gias, E. L. M., Ong, F., Leong, Y. W., Yee, S. F., Yusof, M. A., Perera, D., Teo, B., Wee, T. Y., Yao, S. C. K., Yao, S. C. K., Kiyu, A., Arif, M. T., & Cardosa, M. J. (2006). Sentinel surveillance for human enterovirus 71 in Sarawak, Malaysia: Lessons from the first 7 years. *BMC Public Health*, *6*, 180. https://doi.org/10.1186/1471-2458-6-180
Pons-Salort, M., Oberste, M. S., Pallansch, M. A., Abedi, G. R., Takahashi, S., Grenfell, B. T., & Grassly, N. C. (2018). The seasonality of nonpolio enteroviruses in the United States: Patterns and drivers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(12), 3078–3083. https://doi.org/10.1073/pnas.1721159115
Posada, D., & Crandall, K. A. (2001). Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: Computer simulations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(24), 13757–13762. https://doi.org/10.1073/pnas.241370698
Pöyry, T., Kinnunen, L., Hyypiä, T., Brown, B., Horsnell, C., Hovi, T., & Stanway, G. (1996). Genetic and phylogenetic clustering of enteroviruses. *Journal of General Virology*, *77*(8), 1699–1717. https://doi.org/10.1099/0022-1317-77-8-1699
Prager, P., Nolan, M., Andrews, I. P., & Williams, G. D. (2003). Neurogenic pulmonary edema in enterovirus 71 encephalitis is not uniformly fatal but causes severe morbidity in survivors. *Pediatric Critical Care Medicine*, *4*(3), 377–381. https://doi.org/10.1097/01.PCC.0000074274.58997.FE
Puenpa, J., Auphimai, C., Korkong, S., Vongpunsawad, S., & Poovorawan, Y. (2018). Enterovirus A71 infection, Thailand, 2017. *Emerging Infectious Diseases*, *24*(7), 1386–1387. https://doi.org/10.3201/eid2407.171923
Puenpa, J., Chieochansin, T., Linsuwanon, P., Korkong, S., Thongkomplew, S., Vichaiwattana, P., Theamboonlers, A., Poovorawan, Y., Fujimoto, T., Iizuka, S., Enomoto, M., Abe, K., Yamashita, K., Hanaoka, N., Okabe, N., Yoshida, H., Yasui, Y., Kobayashi, M., Fujii, Y., … Poovorawan, Y. (2012). Hand, foot, and mouth disease caused by Coxsackievirus A6, Thailand, 2012. *Emerging Infectious Diseases*, *18*(4), 641–643. https://doi.org/10.3201/eid1904.121666
Puenpa, J., Wanlapakorn, N., Vongpunsawad, S., & Poovorawan, Y. (2019). The History of Enterovirus A71 Outbreaks and Molecular Epidemiology in the Asia-Pacific Region. *Journal of Biomedical Science*, *26*(1), 1–11. https://doi.org/10.1186/s12929-019-0573-2

Putnak, J. R., & Phillips, B. A. (1981). Picornaviral structure and assembly. In *Microbiological Reviews* (Vol. 45, Issue 2, pp. 287–315). https://doi.org/10.1128/mmbr.45.2.287-315.1981
Qing, J., Wang, Y., Sun, Y., Huang, J., Yan, W., Wang, J., Su, D., Ni, C., Li, J., Rao, Z., Liu, L., & Lou, Z. (2014). Cyclophilin A Associates with Enterovirus-71 Virus Capsid and Plays an Essential Role in Viral Infection as an Uncoating Regulator. *PLoS Pathogens*, *10*(10). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004422
Racaniello, V. R. (2006). One hundred years of poliovirus pathogenesis. In *Virology* (Vol. 344, Issue 1, pp. 9–16). https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.09.015
Racaniello, V. R. (2007). Picornaviridae, The virus and their replication. *Fields Virology*, 795–838. https://ci.nii.ac.jp/naid/10029419365
Racaniello, V. R., & Denison, M. R. (2013). *Picornaviruses and coronaviruses*. https://covid19.elsevierpure.com/en/publications/picornaviruses-and-coronaviruses-2
Rambaut, A., Drummond, A. J., Xie, D., Baele, G., & Suchard, M. A. (2018). Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic Biology*, *67*(5), 901–904. https://doi.org/10.1093/sysbio/syy032
Rambaut, A., Lam, T. T., Carvalho, L. M., & Pybus, O. G. (2016). Exploring the temporal structure of heterochronous sequences using TempEst (formerly Path-O-Gen). *Virus Evolution*, *2*(1). https://doi.org/10.1093/ve/vew007
Rapport d'activités CNREVPEV. (2013). *Rapport d'activités Centre National De Reference Des Enterovirus Et Parechovirus, 2013*.
Rapport d'activités CNREVPEV. (2016). *Rapport d'activités Centre National De Reference Des Enterovirus Et Parechovirus, 2016*
Rapport d'activités CNREVPEV. (2013). *Rapport d'activités Centre National De Reference Des Enterovirus Et Parechovirus, 2019*
Redondo Granado, M. J., Torres Hinojal, M. C., & Izquierdo López, B. (2009). Brote de onicomadesis posvírica en Valladolid. *Anales de Pediatria*, *71*(5), 436–439. https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2009.07.033
Reed, Z., & Cardosa, M. J. (2016). Status of research and development of vaccines for enterovirus 71. *Vaccine*, *34*(26), 2967–2970. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.02.077
Rémic. (2018). SOCIÉTE FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE : Rémic -Référentiel en microbiologie médicale, 2018. *Référentiel En Microbiologie Médicale*.
Ren, J., Wang, X., Hu, Z., Gao, Q., Sun, Y., Li, X., Porta, C., Walter, T. S., Gilbert, R. J., Zhao, Y., Axford, D., Williams, M., McAuley, K., Rowlands, D. J., Yin, W., Wang, J., Stuart, D. I., Rao, Z., & Fry, E. E. (2013). Picornavirus uncoating intermediate captured in atomic detail. *Nature Communications*, *4*, 1929. https://doi.org/10.1038/ncomms2889
Ren, X. X., Ma, L., Liu, Q. W., Li, C., Huang, Z., Wu, L., Xiong, S. D., Wang, J. H., & Wang, H. B. (2014). The molecule of DC-SIGN captures enterovirus 71 and confers dendritic cell-mediated viral trans-infection. *Virology Journal*, *11*(1), 47. https://doi.org/10.1186/1743-422X-11-47
Richter, J., Koptides, D., Tryfonos, C., & Christodoulou, C. (2006). Molecular typing of enteroviruses associated with viral meningitis in Cyprus, 2000-2002. *Journal of Medical Microbiology*, *55*(8), 1035–1041. https://doi.org/10.1099/jmm.0.46447-0
ROBINSON, C. R., DOANE, F. W., & RHODES, A. J. (1958). Report of an outbreak of febrile illness with pharyngeal lesions and exanthem: Toronto, summer 1957; isolation of group A Coxsackie virus. *Canadian Medical Association Journal*, *79*(8), 615–621. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1830188/
Robinson, S. M., Tsueng, G., Sin, J., Mangale, V., Rahawi, S., McIntyre, L. L., Williams, W., Kha, N., Cruz, C., Hancock, B. M., Nguyen, D. P., Sayen, M. R., Hilton, B. J., Doran, K. S., Segall, A. M., Wolkowicz, R., Cornell, C. T., Whitton, J. L., Gottlieb, R. A., & Feuer, R. (2014). Coxsackievirus B Exits the Host Cell in Shed Microvesicles Displaying Autophagosomal Markers. *PLoS Pathogens*, *10*(4), e1004045. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004045
Rodriguez, P. L., & Carrasco, L. (1993). Poliovirus protein 2C has ATPase and GTPase activities. *Journal of Biological Chemistry*, *268*(11), 8105–8110. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8385138/
Romanova, L. I., Blinov, V. M., Tolskaya, E. A., Viktorova, E. G., Kolesnikova, M. S., Guseva, E. A., & Agol, V. I. (1986). The primary structure of crossover regions of intertypic poliovirus recombinants: A model of recombination between RNA genomes. *Virology*, *155*(1), 202–213. https://doi.org/10.1016/0042-6822(86)90180-7
Rossmann, M. G., Arnold, E., Erickson, J. W., Frankenberger, E. A., Griffith, J. P., Hecht, H. J., Johnson, J. E., Kamer, G., Luo, M., Mosser, A. G., Rueckert, R. R., Sherry, B., & Vriend, G. (1985). Structure of a human common cold virus and functional relationship to other picornaviruses. *Nature*, *317*(6033), 145–153. https://doi.org/10.1038/317145a0
Rossmann, M. G., He, Y., & Kuhn, R. J. (2002). Picornavirus-receptor interactions. In *Trends in Microbiology* (Vol. 10, Issue 7, pp. 324–331). Elsevier Current Trends. https://doi.org/10.1016/S0966-842X(02)02383-1
Rui, Y., Su, J., Wang, H., Chang, J., Wang, S., Zheng, W., Cai, Y., Wei, W., Gordy, J. T., Markham, R., Kong, W., Zhang, W., & Yu, X.-F. (2017). Disruption of MDA5-Mediated Innate Immune Responses by the 3C Proteins of Coxsackievirus A16, Coxsackievirus A6, and Enterovirus D68. *Journal of Virology*, *91*(13). https://doi.org/10.1128/jvi.00546-17
S Duffy, L. S. E. H. (2008). Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. *Nat Rev Genet*, *9*(4), 267–276.
Sadeuh-Mba, S. A., Bessaud, M., Massenet, D., Joffret, M. L., Endegue, M. C., Njouom, R., Reynes, J. M., Rousset, D., & Delpeyroux, F. (2013). High frequency and diversity of species C enteroviruses in Cameroon and neighboring countries. *Journal of Clinical Microbiology*, *51*(3), 759–770. https://doi.org/10.1128/JCM.02119-12
Sahoo, M. K., Holubar, M., Huang, C. H., Mohamed-Hadley, A., Liu, Y., Waggoner, J. J., Troy, S. B., Garcia-Garcia, L., Ferreyra-Reyes, L., Maldonado, Y., & Pinskya, B. A. (2017). Detection of emerging vaccine-related polioviruses by deep sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, *55*(7), 2162–2171. https://doi.org/10.1128/JCM.00144-17
Samuda, G. M., Chang, W. K., Yeung, C. Y., & Tang, P. S. (1987). Monoplegia caused by Enterovirus 71: An outbreak in Hong Kong. In *Pediatric Infectious Disease Journal* (Vol. 6, Issue 2, pp. 206–208). https://doi.org/10.1097/00006454-198702000-00013
Sanders, S. A., Herrero, L. J., McPhie, K., Chow, S. S. W., Craig, M. E., Dwyer, D. E., Rawlinson, W., & McMinn, P. C. (2006). Molecular epidemiology of enterovirus 71 over two decades in an Australian urban community. *Archives of Virology*, *151*(5), 1003–1013. https://doi.org/10.1007/s00705-005-0684-9
Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *74*(12), 5463–5467. https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463
Santti, J., Hyypiä, T., Kinnunen, L., Salminen, M., Hyypia, T., Kinnunen, L., Salminen, M., Hyypiä, T., Kinnunen, L., & Salminen, M. (1999). Evidence of Recombination among Enteroviruses. *Journal of Virology*, *73*(10), 8741–8749. https://doi.org/10.1128/jvi.73.10.8741-8749.1999
Saxena, V. K., Sane, S., Nadkarni, S. S., Sharma, D. K., & Deshpande, J. M. (2015). Genetic diversity of enterovirus A71, India. *Emerging Infectious Diseases*, *21*(1), 123–126. https://doi.org/10.3201/eid2101.140743
Schlegel, A., Giddings, T. H., Ladinsky, M. S., & Kirkegaard, K. (1996). Cellular origin and ultrastructure of membranes induced during poliovirus infection. *Journal of Virology*, *70*(10), 6576–6588. https://doi.org/10.1128/jvi.70.10.6576-6588.1996
Schmidt, N. J., Lennette, E. H., & Ho, H. H. (1974). An apparently new enterovirus isolated from patients with disease of the central nervous system. *Journal of Infectious Diseases*, *129*(3), 304–309. https://doi.org/10.1093/infdis/129.3.304
Schuffenecker, I., Henquell, C., Mirand, A., Coste-Burel, M., Marque-Juillet, S., Desbois, D., Lagathu, G., Bornebusch, L., Bailly, J. L., &

Lina, B. (2014). New introductions of enterovirus 71 subgenogroup C4 strains, France, 2012. *Emerging Infectious Diseases*, *20*(8), 1343–1346. https://doi.org/10.3201/eid2008.131858
Schuffenecker, I., Mirand, A., Antona, D., Henquell, C., Chomel, J. J., Archimbaud, C., Billaud, G., Peigue-Lafeuille, H., Lina, B., & Bailly, J. L. (2011). Epidemiology of human enterovirus 71 infections in France, 2000-2009. *Journal of Clinical Virology*, *50*(1), 50–56. https://doi.org/10.1016/j.jcv.2010.09.019
Second, J., Velter, C., Calès, S., Truchetet, F., Lipsker, D., & Cribier, B. (2017). Clinicopathologic analysis of atypical hand, foot, and mouth disease in adult patients. *Journal of the American Academy of Dermatology*, *76*(4), 722–729. https://doi.org/10.1016/j.jaad.2016.10.022
Seth, R. B., Sun, L., Ea, C. K., & Chen, Z. J. (2005). Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-κB and IRF3. *Cell*, *122*(5), 669–682. https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.012
Sharma, R., Raychaudhuri, S., & Dasgupta, A. (2004). Nuclear entry of poliovirus protease-polymerase precursor 3CD: Implications for host cell transcription shut-off. *Virology*, *320*(2), 195–205. https://doi.org/10.1016/j.virol.2003.10.020
Shen, Y., Igo, M., Yalamanchili, P., Berk, A. J., & Dasgupta, A. (1996). DNA binding domain and subunit interactions of transcription factor IIIC revealed by dissection with poliovirus 3C protease. *Molecular and Cellular Biology*, *16*(8), 4163–4171. https://doi.org/10.1128/mcb.16.8.4163
Shieh, W. J., Jung, S. M., Hsueh, C., Kuo, T. T., Mounts, A., Parashar, U., Yang, C. F., Guarner, J., Ksiazek, T. G., Dawson, J., Goldsmith, C., Chang, G. J. J., Oberste, S. M., Pallansch, M. A., Anderson, L. J., & Zaki, S. R. (2001). Pathologic studies of fatal cases in outbreak of hand, foot, and mouth disease, Taiwan. *Emerging Infectious Diseases*, *7*(1), 146–148. https://doi.org/10.3201/eid0701.700146
Shih, S.-R., Chiang, C., Chen, T.-C., Wu, C.-N., Hsu, J. T.-A., Lee, J.-C., Hwang, M.-J., Li, M.-L., Chen, G.-W., & Ho, M.-S. (2004). Mutations at KFRDI and VGK domains of enterovirus 71 3C protease affect its RNA binding and proteolytic activities. *Journal of Biomedical Science*, *11*(2), 239–248. https://doi.org/10.1007/bf02256567
Shindarov, L., Chumakov, M., Voroshilova, M., & al., et. (1979). Epidemiological, clinical and pathomorphological characteristics of epidemic poliomyelitis-like disease caused by enterovirus 71. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol*, *23*, 284–295.
Shipley, M. M., Mangold, C. A., Kuny, C. V., & Szpara, M. L. (2017). Differentiated Human SH-SY5Y Cells Provide a Reductionist Model of Herpes Simplex Virus 1 Neurotropism. *Journal of Virology*, *91*(23), 1–19. https://doi.org/10.1128/jvi.00958-17
Simon-Loriere, E., & Holmes, E. C. (2011). Why do RNA viruses recombine? *Nature Reviews Microbiology*, *9*(8), 617–626. https://doi.org/10.1038/nrmicro2614
Sinclair, C., Gaunt, E., Simmonds, P., Broomfield, D., Nwafor, N., Wellington, L., Templeton, K., Willocks, L., Schofield, O., & Harvala, H. (2014a). Atypical hand, foot, and mouth disease associated with coxsackievirus A6 infection, Edinburgh, United Kingdom, January To February 2014. *Eurosurveillance*, *19*(12), 20745. https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2014.19.12.20745
Sinclair, C., Gaunt, E., Simmonds, P., Broomfield, D., Nwafor, N., Wellington, L., Templeton, K., Willocks, L., Schofield, O., & Harvala, H. (2014b). Atypical hand, foot, and mouth disease associated with coxsackievirus A6 infection, Edinburgh, United Kingdom, January To February 2014. *Eurosurveillance*, *19*(12), 1–5. https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2014.19.12.20745
Smith, J. M. (1992). Analyzing the mosaic structure of genes. *Journal of Molecular Evolution*, *34*(2), 126–129. https://doi.org/10.1007/BF00182389
Sohier, R. (1979). *Enterovirus type 71 surveillance: France* (Issue 8). https://apps.who.int/iris/handle/10665/222610
Solomon, T., Lewthwaite, P., Perera, D., Cardosa, M. J., McMinn, P., & Ooi, M. H. (2010). Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of enterovirus 71. *The Lancet Infectious Diseases*, *10*(11), 778–790. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70194-8
Song, F., Yu, X., Zhong, T., Wang, Z., Meng, X., Li, Z., Zhang, S., Huo, W., Liu, X., Zhang, Y., Zhang, W., & Yu, J. (2018). Caspase-3 inhibition attenuates the cytopathic effects of EV71 infection. *Frontiers in Microbiology*, *9*(APR), 817. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00817
Song, J., Hu, Y., Li, J., Zheng, H., Wang, J., Guo, L., Shi, H., & Liu, L. (2018). Suppression of the toll-like receptor 7-dependent type I interferon production pathway by autophagy resulting from enterovirus 71 and coxsackievirus A16 infections facilitates their replication. *Archives of Virology*, *163*(1), 135–144. https://doi.org/10.1007/s00705-017-3592-x
Staring, J., van den Hengel, L. G., Raaben, M., Blomen, V. A., Carette, J. E., & Brummelkamp, T. R. (2018). KREMEN1 Is a Host Entry Receptor for a Major Group of Enteroviruses. *Cell Host and Microbe*, *23*(5), 636-643.e5. https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.03.019
Stark, G. R., & Darnell, J. E. (2012). The JAK-STAT Pathway at Twenty. In *Immunity* (Vol. 36, Issue 4, pp. 503–514). Cell Press. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.03.013
Steil, B. P., & Barton, D. J. (2009). Conversion of VPg into VPgpUpUOH before and during Poliovirus Negative-Strand RNA Synthesis. *Journal of Virology*, *83*(24), 12660–12670. https://doi.org/10.1128/jvi.01676-08
Strauss, M., Filman, D. J., Belnap, D. M., Cheng, N., Noel, R. T., & Hogle, J. M. (2015). Nectin-Like Interactions between Poliovirus and Its Receptor Trigger Conformational Changes Associated with Cell Entry. *Journal of Virology*, *89*(8), 4143–4157. https://doi.org/10.1128/jvi.03101-14
Su, P.-Y., Wang, Y.-F. Y.-H., Huang, S.-W., Lo, Y.-C., Wang, Y.-F. Y.-H., Wu, S.-R., Shieh, D.-B., Chen, S.-H., Wang, J.-R., Lai, M.-D., & Chang, C.-F. (2015). Cell Surface Nucleolin Facilitates Enterovirus 71 Binding and Infection. *Journal of Virology*, *89*(8), 4527–4538. https://doi.org/10.1128/jvi.03498-14
Suhy, D. A., Giddings, T. H., & Kirkegaard, K. (2000). Remodeling the Endoplasmic Reticulum by Poliovirus Infection and by Individual Viral Proteins: an Autophagy-Like Origin for Virus-Induced Vesicles. *Journal of Virology*, *74*(19), 8953–8965. https://doi.org/10.1128/jvi.74.19.8953-8965.2000
Sun, D., Wen, X., Wang, M., Mao, S., Cheng, A., Yang, X., Jia, R., Chen, S., Yang, Q., Wu, Y., Zhu, D., Liu, M., Zhao, X., Zhang, S., Wang, Y., Xu, Z., Chen, Z., Zhu, L., Luo, Q., … Chen, X. (2019). Apoptosis and Autophagy in Picornavirus Infection. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 2032. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02032
Sun, S., Jiang, L., Liang, Z., Mao, Q., Su, W., Zhang, H., Li, X., Jin, J., Xu, L., Zhao, D., Fan, P., An, D., Yang, P., Lu, J., Lv, X., Sun, B., Xu, F., Kong, W., & Jiang, C. (2014). Evaluation of monovalent and bivalent vaccines against lethal Enterovirus 71 and Coxsackievirus A16 infection in newborn mice. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, *10*(10), 2885–2895. https://doi.org/10.4161/hv.29823
Sun, Y., Wang, Y., Shan, C., Chen, C., Xu, P., Song, M., Zhou, H., Yang, C., Xu, W., Shi, P.-Y., Zhang, B., & Lou, Z. (2012). Enterovirus 71 VPg Uridylation Uses a Two-Molecular Mechanism of 3D Polymerase. *Journal of Virology*, *86*(24), 13662–13671. https://doi.org/10.1128/jvi.01712-12
Tajrishi, M. M., Tuteja, R., & Tuteja, N. (2011). Nucleolin: The most abundant multifunctional phosphoprotein of nucleolus. In *Communicative and Integrative Biology* (Vol. 4, Issue 3, pp. 267–275). https://doi.org/10.4161/cib.4.3.14884
Takeuchi, O., & Akira, S. (2009). Innate immunity to virus infection. In *Immunological Reviews* (Vol. 227, Issue 1, pp. 75–86). Immunol Rev. https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00737.x
Takeuchi, O., & Akira, S. (2010). Pattern Recognition Receptors and Inflammation. In *Cell* (Vol. 140, Issue 6, pp. 805–820). Cell Press.

https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022
Takimoto, S., Waldman, E. A., Moreira, R. C., Kok, F., De Paula Pinheiro, F., Gonsalez Saes, S., Hatch, M., Correa De Souza, D. F., De Cassia Compagnoli Carmona, R., Shout, D., Cassio De Moraes, J., & Costa, A. M. (1998). Enterovirus 71 infection and acute neurological disease among children in Brazil (1988-1990). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *92*(1), 25–28. https://doi.org/10.1016/S0035-9203(98)90939-7
Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, *28*(10), 2731–2739. https://doi.org/10.1093/molbev/msr121
Tan, C. W., Poh, C. L., Sam, I.-C., & Chan, Y. F. (2013). Enterovirus 71 Uses Cell Surface Heparan Sulfate Glycosaminoglycan as an Attachment Receptor. *Journal of Virology*, *87*(1), 611–620. https://doi.org/10.1128/jvi.02226-12
Tan, L. Van, Tuyen, N. T. K., Thanh, T. T., Ngan, T. T., Van, H. M. T., Sabanathan, S., Van, T. T. M., Thanh, L. T. M., Nguyet, L. A., Geoghegan, J. L., Ong, K. C., Perera, D., Hang, V. T. T., Ny, N. T. H., Anh, N. T., Ha, D. Q., Qui, P. T., Viet, D. C., Tuan, H. M., … van Doorn, H. R. (2015). A generic assay for whole-genome amplification and deep sequencing of enterovirus A71. *Journal of Virological Methods*, *215–216*, 30–36. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.02.011
Tan, X., Huang, X., Zhu, S., Chen, H., Yu, Q., Wang, H., Huo, X., Zhou, J., Wu, Y., Yan, D., Zhang, Y., Wang, D., Cui, A., An, H., & Xu, W. (2011). The persistent circulation of enterovirus 71 in people's republic of China: Causing emerging nationwide epidemics since 2008. *PLoS ONE*, *6*(9), e25662. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025662
Tan, X., Li, L., Zhang, B., Jorba, J., Su, X., Ji, T., Yang, D., Lv, L., Li, J., & Xu, W. (2015). Molecular epidemiology of coxsackievirus A6 associated with outbreaks of hand, foot, and mouth disease in Tianjin, China, in 2013. *Archives of Virology*, *160*(4), 1097–1104. https://doi.org/10.1007/s00705-015-2340-3
Tang, W. F., Yang, S. Y., Wu, B. W., Jheng, J. R., Chen, Y. L., Shih, C. H., Lin, K. H., Lai, H. C., Tang, P., & Horng, J. T. (2007). Reticulon 3 binds the 2C protein of enterovirus 71 and is required for viral replication. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(8), 5888–5898. https://doi.org/10.1074/jbc.M611145200
Tayyari, F., Marchant, D., Moraes, T. J., Duan, W., Mastrangelo, P., & Hegele, R. G. (2011). Identification of nucleolin as a cellular receptor for human respiratory syncytial virus. *Nature Medicine*, *17*(9), 1132–1135. https://doi.org/10.1038/nm.2444
Teoh, H. L., Mohammad, S. S., Britton, P. N., Kandula, T., Lorentzos, M. S., Booy, R., Jones, C. A., Rawlinson, W., Ramachandran, V., Rodriguez, M. L., Ian Andrews, P., Dale, R. C., Farrar, M. A., & Sampaio, H. (2016). Clinical characteristics and functional motor outcomes of enterovirus 71 neurological disease in children. *JAMA Neurology*, *73*(3), 300–307. https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2015.4388
Thoelen, I., Lemey, P., Van der Donck, I., Beuselinck, K., Lindberg, A. M., & Van Ranst, M. (2003). Molecular typing and epidemiology of enteroviruses identified from an outbreak of aseptic meningitis in Belgium during the summer of 2000. *Journal of Medical Virology*, *70*(3), 420–429. https://doi.org/10.1002/jmv.10412
Thompson, S. R., & Sarnow, P. (2003). Enterovirus 71 contains a type I IRES element that functions when eukaryotic initiation factor eIF4G is cleaved. *Virology*, *315*(1), 259–266. https://doi.org/10.1016/S0042-6822(03)00544-0
Thorne, J. L., Kishino, H., & Painter, I. S. (1998). Estimating the Rate of Evolution of the Rate of Molecular Evolution. *Mol. Biol. Evol*, *15*(12), 1647–1657. https://academic.oup.com/mbe/article/15/12/1647/963101
Tian, H., Zhang, Y., Sun, Q., Zhu, S., Li, X., Pan, Z., Xu, W., & Xu, B. (2014). Prevalence of Multiple Enteroviruses Associated with Hand, Foot, and Mouth Disease in Shijiazhuang City, Hebei Province, China: Outbreaks of Coxsackieviruses A10 and B3. *PLoS ONE*, *9*(1), e84233. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084233
Tian, X. L., Zhang, Y., Yan, S. H., Ma, X. E., & Wang, W. R. (2013). [The pathogenic spectrum of hand, foot and mouth disease and molecular characterizations of human enterovirus 71 in Inner Mongolia autonomous region in 2010]. *Bing Du Xue Bao = Chinese Journal of Virology / [Bian Ji, Bing Du Xue Bao Bian Ji Wei Yuan Hui]*, *29*(3), 304–309.
Tolskaya, E A, Romanova, L. I., Kolesnikova, M. S., Ivannikova, T. A., Smirnova, E. A., Raikhlin, N. T., & Agol, V. I. (1995). Apoptosis-inducing and apoptosis-preventing functions of poliovirus. *Journal of Virology*, *69*(2), 1181–1189. https://doi.org/10.1128/jvi.69.2.1181-1189.1995
Tolskaya, Elena A., Romanova, L. I., Blinov, V. M., Viktorova, E. G., Sinyakov, A. N., Kolesnikova, M. S., & Agol, V. I. (1987). Studies on the recombination between RNA genomes of poliovirus: The primary structure and nonrandom distribution of crossover regions in the genomes of intertypic poliovirus recombinants. *Virology*, *161*(1), 54–61. https://doi.org/10.1016/0042-6822(87)90170-X
Toma, B., & Thiry, E. (2003). *QU'EST CE QU'UNE MALADIE EMERGENTE ?** (Vol. 44).
Too, I. H. K., Bonne, I., Tan, E. L., Chu, J. J. H., & Alonso, S. (2018). Prohibitin plays a critical role in Enterovirus 71 neuropathogenesis. *PLoS Pathogens*, *14*(1). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006778
Too, I. H. K., Yeo, H., Sessions, O. M., Yan, B., Libau, E. A., Howe, J. L. C., Lim, Z. Q., Suku-Maran, S., Ong, W. Y., Chua, K. B., Wong, B. S., Chow, V. T. K., & Alonso, S. (2016). Enterovirus 71 infection of motor neuron-like NSC-34 cells undergoes a non-lytic exit pathway. *Scientific Reports*, *6*, 36983. https://doi.org/10.1038/srep36983
Toyoda, H., Nicklin, M. J. H., Murray, M. G., Anderson, C. W., Dunn, J. J., Studier, F. W., & Wimmer, E. (1986). A second virus-encoded proteinase involved in proteolytic processing of poliovirus polyprotein. In *Cell* (Vol. 45, Issue 5, pp. 761–770). Cell Press. https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90790-7
Trabelsi, A., Grattard, F., Nejmeddine, M., Aouni, M., Bourlet, T., & Pozzetto, B. (1995). Evaluation of an enterovirus group-specific anti-VP1 monoclonal antibody, 5-D8/1, in comparison with neutralization and PCR for rapid identification of enteroviruses in cell culture. *Journal of Clinical Microbiology*, *33*(9), 2454–2457. https://doi.org/10.1128/jcm.33.9.2454-2457.1995
Tsou, Y. L., Lin, Y. W., Chang, H. W., Lin, H. Y., Shao, H. Y., Yu, S. L., Liu, C. C., Chitra, E., Sia, C., & Chow, Y. H. (2013). Heat Shock protein 90: Role in Enterovirus 71 Entry and Assembly and Potential Target for Therapy. *PLoS ONE*, *8*(10). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077133
Tu, P. P. Van, Thao, N. N. T. T., Perera, D., Huu, T. T. K., Tien, N. N. T. K., Thuong, T. T. C., How, O. M., Cardosa, M. J., & McMinn, P. C. (2007). *Epidemiologic and virologic investigation of hand, foot, and mouth disease, southern Vietnam, 2005*. *13*, 1733–1741. https://doi.org/10.3201/eid1311.070632
Upala, P., Apidechkul, T., Suttana, W., Kullawong, N., Tamornpark, R., & Inta, C. (2018). Molecular epidemiology and clinical features of hand, foot and mouth disease in northern Thailand in 2016: a prospective cohort study. *BMC Infectious Diseases*, *18*(1), 630. https://doi.org/10.1186/s12879-018-3560-4
Van Der Sanden, S., Koopmans, M., Uslu, G., Van Der Avoort, H., Sanden, S. van der, Koopmans, M., Uslu, G., Avoort, H. van der, Van Der Sanden, S., Koopmans, M., Uslu, G., Van Der Avoort, H., Sanden, S. van der, Koopmans, M., Uslu, G., & Avoort, H. van der. (2009). Epidemiology of enterovirus 71 in the Netherlands, 1963 to 2008. *Journal of Clinical Microbiology*, *47*(9), 2826–2833. https://doi.org/10.1128/JCM.00507-09
Van Der Sanden, S. M. G., Sachs, N., Koekkoek, S. M., Koen, G., Pajkrt, D., Clevers, H., & Wolthers, K. C. (2018). Enterovirus 71 infection of human airway organoids reveals VP1-145 as a viral infectivity determinant article. *Emerging Microbes and Infections*, *7*(1).

https://doi.org/10.1038/s41426-018-0077-2
Van Der Sanden, S., Van Der Avoort, H., Lemey, P., Uslu, G., & Koopmans, M. (2010). Evolutionary trajectory of the VP1 gene of human enterovirus 71 genogroup B and C viruses. *Journal of General Virology*, *91*(8), 1949–1958. https://doi.org/10.1099/vir.0.019695-0
Van der Sanden, S., van Eek, J., Martin, D. P., van der Avoort, H., Vennema, H., & Koopmans, M. (2011). Detection of recombination breakpoints in the genomes of human enterovirus 71 strains isolated in the Netherlands in epidemic and non-epidemic years, 1963-2010. *Infection, Genetics and Evolution*, *11*(5), 886–894. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.02.011
Ventarola, D., Bordone, L., & Silverberg, N. (2015). Update on hand-foot-and-mouth disease. *Clinics in Dermatology*, *33*(3), 340–346. https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2014.12.011
Verboon-Maciolek, M. A., Krediet, T. G., Van Loon, A. M., Kaan, J., Galama, J. M. D., Gerards, L. J., & Fleer, A. (2002). Epidemiological survey of neonatal non-polio enterovirus infection in the Netherlands. *Journal of Medical Virology*, *66*(2), 241–245. https://doi.org/10.1002/jmv.2136
Virgen-Slane, R., Rozovics, J. M., Fitzgerald, K. D., Ngo, T., Chou, W., Van Der Heden Van Noort, G. J., Filippov, D. V., Gershon, P. D., & Semler, B. L. (2012). An RNA virus hijacks an incognito function of a DNA repair enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(36), 14634–14639. https://doi.org/10.1073/pnas.1208096109
Vogt, M. R., & Crowe, J. E. (2018). Current Understanding of Humoral Immunity to Enterovirus D68. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*, *7*, S49–S53. https://doi.org/10.1093/jpids/piy124
Volle, R., Nourrisson, C., Mirand, A., Regagnon, C., Chambon, M., Henquell, C., Bailly, J. L., Peigue-Lafeuille, H., & Archimbaud, C. (2012). Quantitative real-time RT-PCR assay for research studies on enterovirus infections in the central nervous system. *Journal of Virological Methods*, *185*(1), 142–148. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.06.019
Volle, R., Razafindratsimandresy, R., Joffret, M.-L., Bessaud, M., Rabemanantsoa, S., Andriamamonjy, S., Raharinantoanina, J., Blondel, B., Heraud, J.-M., Bailly, J.-L., & Delpeyroux, F. (2019). High Permissiveness for Genetic Exchanges between Enteroviruses of Species A, including Enterovirus 71, Favors Evolution through Intertypic Recombination in Madagascar. *Journal of Virology*, *93*(6). https://doi.org/10.1128/jvi.01667-18
Walker, P. J., Siddell, S. G., Lefkowitz, E. J., Mushegian, A. R., Dempsey, D. M., Dutilh, B. E., Harrach, B., Harrison, R. L., Hendrickson, R. C., Junglen, S., Knowles, N. J., Kropinski, A. M., Krupovic, M., Kuhn, J. H., Nibert, M., Rubino, L., Sabanadzovic, S., Simmonds, P., Varsani, A., … Davison, A. J. (2019). Changes to virus taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2019). *Archives of Virology*, *164*(9), 2417–2429. https://doi.org/10.1007/s00705-019-04306-w
Wang, B., Xi, X., Lei, X., Zhang, X., Cui, S., Wang, J., Jin, Q., & Zhao, Z. (2013). Enterovirus 71 Protease 2Apro Targets MAVS to Inhibit Anti-Viral Type I Interferon Responses. *PLoS Pathogens*, *9*(3), e1003231. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003231
Wang C, Lianfu Ji,Xinhui Yuan,Yu Jin. Differential Regulation of TLR Signaling on the Induction of Antiviral Interferons in Human Intestinal Epithelial Cells Infected with Enterovirus 71, 11 PLOS ONE e0152177 (2016). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152177
Wang, H., Lei, X., Xiao, X., Yang, C., Lu, W., Huang, Z., Leng, Q., Jin, Q., He, B., Meng, G., & Wang, J. (2015). Reciprocal Regulation between Enterovirus 71 and the NLRP3 Inflammasome. *Cell Reports*, *12*(1), 42–48. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.05.047
Wang, J. P., Cerny, A., Asher, D. R., Kurt-Jones, E. A., Bronson, R. T., & Finberg, R. W. (2010). MDA5 and MAVS Mediate Type I Interferon Responses to Coxsackie B Virus. *Journal of Virology*, *84*(1), 254–260. https://doi.org/10.1128/jvi.00631-09
Wang, S., Liu, C., Tseng, H., Wang, J., Huang, C., Chen, Y., Yang, Y., Lin, S., & Yeh, T. (1999). Clinical Spectrum of Enterovirus 71 Infection in Children in Southern Taiwan, with an Emphasis on Neurological Complications. *Clinical Infectious Diseases*, *29*(1), 184–190. https://doi.org/10.1086/520149
Wang, S. M., Lei, H. Y., Huang, K. J., Wu, J. M., Wang, J. R., Yu, C. K., Su, I. J., & Liu, C. C. (2003). Pathogenesis of enterovirus 71 brainstem encephalitis in pediatric patients: Roles of cytokines and cellular immune activation in patients with pulmonary edema. *Journal of Infectious Diseases*, *188*(4), 564–570. https://doi.org/10.1086/376998
Wang, S. M., Lei, H. Y., Huang, M. C., Su, L. Y., Lin, H. C., Yu, C. K., Wang, J. L., & Liu, C. C. (2006). Modulation of cytokine production by intravenous immunoglobulin in patients with enterovirus 71-associated brainstem encephalitis. *Journal of Clinical Virology*, *37*(1), 47–52. https://doi.org/10.1016/j.jcv.2006.05.009
Wang, S. M., Lei, H. Y., Huang, M. C., Wu, J. M., Chen, C. T., Wang, J. R. J..., Wang, J. R.., & Liu, C. C. (2005). Therapeutic efficacy of milrinone in the management of enterovirus 71-induced pulmonary edema. *Pediatric Pulmonology*, *39*(3), 219–223. https://doi.org/10.1002/ppul.20157
Wang, S. M., Lei, H. Y., Yu, C. K., Wang, J. R., Su, I. J., & Liu, C. C. (2008). Acute chemokine response in the blood and cerebrospinal fluid of children with enterovirus 71-associated brainstem encephalitis. *Journal of Infectious Diseases*, *198*(7), 1002–1006. https://doi.org/10.1086/591462
Wang, S. M., & Liu, C. C. (2009). Enterovirus 71: Epidemiology, pathogenesis and management. In *Expert Review of Anti-Infective Therapy* (Vol. 7, Issue 6, pp. 735–742). Expert Rev Anti Infect Ther. https://doi.org/10.1586/ERI.09.45
Wang, W., Sun, J., Wang, N., Sun, Z., Ma, Q., Li, J., Zhang, M., & Xu, J. (2020). Enterovirus A71 capsid protein VP1 increases blood–brain barrier permeability and virus receptor vimentin on the brain endothelial cells. *Journal of NeuroVirology*, *26*(1), 84–94. https://doi.org/10.1007/s13365-019-00800-8
Wang, Xiangxi, Peng, W., Ren, J., Hu, Z., Xu, J., Lou, Z., Li, X., Yin, W., Shen, X., Porta, C., Walter, T. S., Evans, G., Axford, D., Owen, R., Rowlands, D. J., Wang, J., Stuart, D. I., Fry, E. E., & Rao, Z. (2012). A sensor-adaptor mechanism for enterovirus uncoating from structures of EV71. *Nature Structural and Molecular Biology*, *19*(4), 424–429. https://doi.org/10.1038/nsmb.2255
Wang, Xiaomei, Zhu, C., Bao, W., Zhao, K., Niu, J., Yu, X. F., & Zhang, W. (2012). Characterization of full-length enterovirus 71 strains from severe and mild disease patients in northeastern China. *PLoS ONE*, *7*(3), 1–9. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032405
Wang, Y. F., & Yu, C. K. (2014). Animal models of enterovirus 71 infection: Applications and limitations. In *Journal of Biomedical Science* (Vol. 21, Issue 1, p. 31). BioMed Central Ltd. https://doi.org/10.1186/1423-0127-21-31
Wei, S. S. H., Huang, Y. P. Y., Liu, M. C. M. M. C., Tsou, T. P. T., Lin, H. C. H., Lin, T. L., Tsai, C. Y., Chao, Y. N., Chang, L. Y., & Hsu, C. M. (2011). An outbreak of coxsackievirus A6 hand, foot, and mouth disease associated with onychomadesis in Taiwan, 2010. *BMC Infectious Diseases*, *11*(1), 346. https://doi.org/10.1186/1471-2334-11-346
Weng, K. F., Li, M. L., Hung, C. T., & Shih, S. R. (2009). Enterovirus 71 3C protease cleaves a novel target CstF-64 and inhibits cellular polyadenylation. *PLoS Pathogens*, *5*(9). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000593
Wileman, T. (2006). Aggresomes and autophagy generate sites for virus replication. In *Science* (Vol. 312, Issue 5775, pp. 875–878). https://doi.org/10.1126/science.1126766
Wimmer, E. (1982). Genome-linked proteins of viruses. In *Cell* (Vol. 28, Issue 2, pp. 199–201). https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90335-x
Witsø, E., Palacios, G., Cinek, O., Stene, L. C., Grinde, B., Janowitz, D., Lipkin, W. I., & Rønningen, K. S. (2006). High prevalence of human enterovirus A infections in natural circulation of human enteroviruses. *Journal of Clinical Microbiology*, *44*(11), 4095–4100. https://doi.org/10.1128/JCM.00653-06

Witsø, E., Palacios, G., Rønningen, K. S., Cinek, O., Janowitz, D., Rewers, M., Grinde, B., & Lipkin, W. I. (2007). Asymptomatic circulation of HEV71 in Norway. *Virus Research*, *123*(1), 19–29. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2006.07.015

Wong, J., Zhang, J., Si, X., Gao, G., Mao, I., McManus, B. M., & Luo, H. (2008). Autophagosome Supports Coxsackievirus B3 Replication in Host Cells. *Journal of Virology*, *82*(18), 9143–9153. https://doi.org/10.1128/jvi.00641-08

Wong, K. T., Lum, L. C. S., Lam, K., Huang, C. C., Liu, C. C., & Chang, Y. C. (2000). Enterovirus 71 infection and neurologic complications [3] (multiple letters). In *New England Journal of Medicine* (Vol. 342, Issue 5, pp. 356–358). Massachusetts Medical Society . https://doi.org/10.1056/NEJM200002033420514

World Health Organization. (2004). Polio laboratory manual. *WHO Library*, *August*, 157.

Wu, W.-H., Kuo, T.-C., Lin, Y.-T., Huang, S.-W., Liu, H.-F., Wang, J., & Chen, Y.-M. A. (2013). Molecular Epidemiology of Enterovirus 71 Infection in the Central Region of Taiwan from 2002 to 2012. *PLoS ONE*, *8*(12), e83711. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083711

Wu, Yan, Yeo, A., Phoon, M. C., Tan, E. L. E. L., Poh, C. L. C., Quak, S. H., & Chow, V. T. K. K. (2010). The largest outbreak of hand; foot and mouth disease in Singapore in 2008: The role of enterovirus 71 and coxsackievirus A strains. *International Journal of Infectious Diseases*, *14*(12), e1076–e1081. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2010.07.006

Wu, Yang, Lou, Z., Miao, Y., Yu, Y., Dong, H., Peng, W., Bartlam, M., Li, X., & Rao, Z. (2010). *Structures of EV71 RNA-dependent RNA polymerase in complex with substrate and analogue provide a drug target against the hand-foot-and-mouth disease pandemic in China*. *1*(5), 491–500. https://doi.org/10.1007/s13238-010-0061-7

Xie, S., Wang, K., Yu, W., Lu, W., Xu, K., Wang, J., Ye, B., Schwarz, W., Jin, Q., & Sun, B. (2011). DIDS blocks a chloride-dependent current that is mediated by the 2B protein of enterovirus 71. In *Cell Research* (Vol. 21, Issue 8, pp. 1271–1275). https://doi.org/10.1038/cr.2011.112

Xing, W., Liao, Q., Viboud, C., Zhang, J., Sun, J., Wu, J. T., Chang, Z., Liu, F., Fang, V. J., Zheng, Y., Cowling, B. J., Varma, J. K., Farrar, J. J., Leung, G. M., & Yu, H. (2014a). Hand, foot, and mouth disease in China, 2008-12: An epidemiological study. *The Lancet Infectious Diseases*, *14*(4), 308–318. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70342-6

Xu, L., Zheng, Q., Li, S. S., He, M., Wu, Y., Li, Y., Zhu, R., Yu, H., Hong, Q., Jiang, J., Li, Z., Li, S. S., Zhao, H., Yang, L., Hou, W., Wang, W., Ye, X., Zhang, J., Baker, T. S., … Xia, N. (2017). Atomic structures of Coxsackievirus A6 and its complex with a neutralizing antibody. *Nature Communications*, *8*(1), 505. https://doi.org/10.1038/s41467-017-00477-9

Xu, M., Su, L., Cao, L., Zhong, H., Dong, N., Dong, Z., & Xu, J. (2015). *Genotypes of the Enterovirus Causing Hand Foot and Mouth Disease in Shanghai, China, 2012-2013*. *10*(9), e0138514. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138514

Xu, M., Su, L., Cao, L., Zhong, H., Dong, N., & Xu, J. (2013). Enterovirus genotypes causing hand foot and mouth disease in Shanghai, China: A molecular epidemiological analysis. *BMC Infectious Diseases*, *13*(1), 489. https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-489

Xu, Y., & Eissa, N. T. (2010). Autophagy in innate and adaptive immunity. In *Proceedings of the American Thoracic Society* (Vol. 7, Issue 1, pp. 22–28). https://doi.org/10.1513/pats.200909-103JS

Xu, Z., Shen, H., Wang, Z., Altmeyer, R., Xia, A., Mao, S., Zhen, Y., Li, W., Zhao, Y., Su, H., Zhan, L., Wang, X., Pan, H., Hu, J., & Zeng, M. (2014). The population-based health effect of hand, foot and mouth disease in children in shanghai. *Pediatric Infectious Disease Journal*, *33*(5), 448–452. https://doi.org/10.1097/INF.0000000000000136

Yalamanchili, P., Datta, U., & Dasgupta, A. (1997). Inhibition of host cell transcription by poliovirus: cleavage of transcription factor CREB by poliovirus-encoded protease 3Cpro. *Journal of Virology*, *71*.

Yamayoshi, S., Iizuka, S., Yamashita, T., Minagawa, H., Mizuta, K., Okamoto, M., Nishimura, H., Sanjoh, K., Katsushima, N., Itagaki, T., Nagai, Y., Fujii, K., & Koike, S. (2012). Human SCARB2-Dependent Infection by Coxsackievirus A7, A14, and A16 and Enterovirus 71. *Journal of Virology*, *86*(10), 5686–5696. https://doi.org/10.1128/jvi.00020-12

Yamayoshi, S., Ohka, S., Fujii, K., & Koike, S. (2013). Functional Comparison of SCARB2 and PSGL1 as Receptors for Enterovirus 71. *Journal of Virology*, *87*(6), 3335–3347. https://doi.org/10.1128/jvi.02070-12

Yamayoshi, Seiya, Fujii, K., & Koike, S. (2014). Receptors for enterovirus 71. *Emerging Microbes & Infections*, *3*(7), e53. https://doi.org/10.1038/emi.2014.49

Yamayoshi, Seiya, Yamashita, Y., Li, J., Hanagata, N., Minowa, T., Takemura, T., & Koike, S. (2009). Scavenger receptor B2 is a cellular receptor for enterovirus 71. *Nature Medicine*, *15*(7), 798–801. https://doi.org/10.1038/nm.1992

Yan, J. J. J., Wang, J. J. R., Liu, C. C. C., Yang, H. H. B., & Su, I. I. J. (2000). An outbreak of enterovirus 71 infection in Taiwan 1998: A comprehensive pathological, virological, and molecular study on a case of fulminant encephalitis. *Journal of Clinical Virology*, *17*(1), 13–22. https://doi.org/10.1016/S1386-6532(00)00067-6

Yan, N., & Chen, Z. J. (2012). Intrinsic antiviral immunity. In *Nature Immunology* (Vol. 13, Issue 3, pp. 214–222). Nat Immunol. https://doi.org/10.1038/ni.2229

Yang, Betsy, Chuang, H., & Yang, K. D. (2009). Sialylated glycans as receptor and inhibitor of enterovirus 71 infection to DLD-1 intestinal cells. *Virology Journal*, *6*, 141. https://doi.org/10.1186/1743-422X-6-141

Yang, Bingyi, Liu, F., Liao, Q., Wu, P., Chang, Z., Huang, J., Long, L., Luo, L., Li, Y., Leung, G. M., Cowling, B. J., & Yu, H. (2017). Epidemiology of hand, foot and mouth disease in China, 2008 to 2015 prior to the introduction of EVA71 vaccine. *Eurosurveillance*, *22*(50), 16–00824. https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.50.16-00824

Yang, C. H., Li, H. C., Jiang, J. G., Hsu, C. F., Wang, Y. J., Lai, M. J., Juang, Y. L., & Lo, S. Y. (2010). Enterovirus type 71 2A protease functions as a transcriptional activator in yeast. *Journal of Biomedical Science*, *17*(1). https://doi.org/10.1186/1423-0127-17-65

Yang, J., Xia, H., Qian, Q., & Zhou, X. (2015). RNA chaperones encoded by RNA viruses. In *Virologica Sinica* (Vol. 30, Issue 6, pp. 401–409). Science Press. https://doi.org/10.1007/s12250-015-3676-2

Yang, S.-L., Chou, Y.-T., Wu, C.-N., & Ho, M.-S. (2011). Annexin II Binds to Capsid Protein VP1 of Enterovirus 71 and Enhances Viral Infectivity. *Journal of Virology*, *85*(22), 11809–11820. https://doi.org/10.1128/jvi.00297-11

Yang, S. D., Li, P. Q., Huang, Y. G., Li, W., Ma, L. Z., Wu, L., Wang, N., Lu, J. M., Chen, W. Q., Liu, G. M., Xiong, Y. M., Chen, Y. L., & Zhang, Y. (2018). Factors associated with fatal outcome of children with enterovirus A71 infection: A case series. *Epidemiology and Infection*, *146*(6), 788–798. https://doi.org/10.1017/S0950268818000468

Yeh, M. Te, Wang, S. W., Yu, C. K., Lin, K. H., Lei, H. Y., Su, I. J., & Wang, J. R. (2011). A single nucleotide in stem loop II of 5′-untranslated region contributes to virulence of Enterovirus 71 in mice. *PLoS ONE*, *6*(10), e27082-e. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027082

Yeung, M. L., Jia, L., Yip, C. C. Y., Chan, J. F. W., Teng, J. L. L., Chan, K. H., Cai, J. P., Zhang, C., Zhang, A. J., Wong, W. M., Kok, K. H., Lau, S. K. P., Woo, P. C. Y., Lo, J. Y. C., Jin, D. Y., Shih, S. R., & Yuen, K. Y. (2018). Human tryptophanyl-tRNA synthetase is an IFN-γ-inducible entry factor for Enterovirus. *Journal of Clinical Investigation*, *128*(11), 5163–5177. https://doi.org/10.1172/JCI99411

Yeung, M. L., Shih, S., Yuen, K., Yeung, M. L., Jia, L., Yip, C. C. Y., Chan, J. F. W., Teng, J. L. L., Chan, K., & Cai, J. (2018). *Human tryptophanyl-tRNA synthetase is an IFN- g – inducible entry factor for Enterovirus Find the latest version : Human tryptophanyl-tRNA synthetase is an IFN- γ – inducible entry factor for Enterovirus*. *128*(11), 5163–5177.

Yi, L., Lu, J., Kung, H. H. F., & He, M. L. M.-L. (2011). The virology and developments toward control of human enterovirus 71. *Critical Reviews in Microbiology*, *37*(4), 313–327. https://doi.org/10.3109/1040841X.2011.580723

Yip, C. C. Y. C. C. C. Y., Lau, S. K. P. S., Zhou, B., Zhang, M. X. M. M. X., Tsoi, H. W. H. H. W., Chan, K. H., Chen, X. C., Woo, P. C. Y., & Yuen, K. Y. (2010). Emergence of enterovirus 71 "double-recombinant" strains belonging to a novel genotype D originating from southern China: First evidence for combination of intratypic and intertypic recombination events in EV71. *Archives of Virology*, *155*(9), 1413–1424. https://doi.org/10.1007/s00705-010-0722-0

Ylipaasto, P., Eskelinen, M., Salmeda, K., Hovi, T., & Roivainen, M. (2010). Vitronectin receptors, αv integrins, are recognized by several non-RGD-containing echoviruses in a continuous laboratory cell line and also in primary human Langerhans' islets and endothelial cells. *Journal of General Virology*, *91*(1), 155–165. https://doi.org/10.1099/vir.0.012450-0

YM Loo, M. G. (2011). Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity*, *34*, 680–692.

Yogo, Y., & Wimmer, E. (1972). Polyadenylic acid at the 3'-terminus of poliovirus RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *69*(7). https://doi.org/10.1073/pnas.69.7.1877

Yu, H., Chen, W., Chang, H., Tang, R., Zhao, J., Gan, L., Liu, B., Chen, J., & Wang, M. (2010). Genetic analysis of the VP1 region of enterovirus 71 reveals the emergence of genotype A in central China in 2008. *Virus Genes*, *41*(1), 1–4. https://doi.org/10.1007/s11262-010-0472-9

Zander, A., Britton, P. N., Navin, T., Horsley, E., Tobin, S., & McAnulty, J. M. (2014). An outbreak of enterovirus 71 infection in metropolitan Sydney: Enhanced surveillance and lessons learnt. *Medical Journal of Australia*, *201*(11), 663–666. https://doi.org/10.5694/mja14.00014

Zell, R., & Stelzner, A. (1997). Application of genome sequence information to the classification of bovine enteroviruses: The importance of 5'- and 3'-nontranslated regions. *Virus Research*, *51*(2), 213–229. https://doi.org/10.1016/S0168-1702(97)00096-8

Zeng, H., Lu, J., Zheng, H., Yi, L., Guo, X., Liu, L., Rutherford, S., Sun, L., Tan, X., Li, H., Ke, C., & Lin, J. (2015). The epidemiological study of Coxsackievirus A6 revealing hand, foot and mouth disease epidemic patterns in Guangdong, China. *Scientific Reports*, *5*(April), 1–8. https://doi.org/10.1038/srep10550

Zhang, Q., MacDonald, N. E., Smith, J. C., Cai, K., Yu, H., Li, H., & Lei, C. (2014). Severe enterovirus type 71 nervous system infections in children in the Shanghai region of China: Clinical manifestations and implications for prevention and care. *Pediatric Infectious Disease Journal*, *33*(5), 482–487. https://doi.org/10.1097/INF.0000000000000194

Zhang, S., Yu, X., Meng, X., Huo, W., Su, Y., Liu, J., Liu, Y., Zhang, J., Wang, S., & Yu, J. (2020). Coxsackievirus A6 Induces Necroptosis for Viral Production. *Frontiers in Microbiology*, *11*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00042

Zhang, T., Du, J., Xue, Y., Su, H., Yang, F., & Jin, Q. (2013). Epidemics and Frequent Recombination within Species in Outbreaks of Human Enterovirus B-Associated Hand, Foot and Mouth Disease in Shandong China in 2010 and 2011. *PLoS ONE*, *8*(6). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067157

Zhang, W., Dai, W., Zhang, C., Zhou, Y., Xiong, P., Wang, S., Ye, X., Liu, Q., Zhou, D., & Huang, Z. (2018). A virus-like particle-based tetravalent vaccine for hand, foot, and mouth disease elicits broad and balanced protective immunity article. *Emerging Microbes and Infections*, *7*(1). https://doi.org/10.1038/s41426-018-0094-1

Zhang, Y. Y., Zhu, Z., Yang, W., Ren, J., Tan, X., Wang, Y., Mao, N., Xu, S., Zhu, S., Cui, A., Zhang, Y. Y., Yan, D., Li, Q., Dong, X., Zhang, J., Zhao, Y., Wan, J., Feng, Z., Sun, J., … Xu, W. (2010). An emerging recombinant human enterovirus 71 responsible for the 2008 outbreak of Hand Foot and Mouth Disease in Fuyang city of China. *Virology Journal*, *7*(1), 94–94. https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-94

Zhang, Y. Z., Gan, X., Song, J., Sun, P., Song, Q. Q., Li, G. Q., Sheng, L. J., Wang, B. D., Lu, M. Z., Li, L. M., & Han, J. (2013). [The 2A protease of enterovirus 71 cleaves nup62 to inhibit nuclear transport]. *Bing Du Xue Bao = Chinese Journal of Virology / [Bian Ji, Bing Du Xue Bao Bian Ji Wei Yuan Hui]*, *29*(4), 421–425. http://europepmc.org/article/med/23895008

Zhang, Yan, Zhu, Z., Yang, W., Ren, J., Tan, X., Wang, Y., Mao, N., Xu, S., Zhu, S., Cui, A., Zhang, Y., Yan, D., Li, Q., Dong, X., Zhang, J., Zhao, Y., Wan, J., Feng, Z., Sun, J., … Xu, W. (2010). An emerging recombinant human enterovirus 71 responsible for the 2008 outbreak of Hand Foot and Mouth Disease in Fuyang city of China. *Virology Journal*, *7*, 94. https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-94

Zhang, Yong, Tan, X.-., Wang, H.-Y., Yan, D.., Zhu, S.-L.., Wang, D.-Y.., Ji, F., Wang, X.-J., Gao, Y.-J. J., Chen, L., An, H.-Q Li, D.-X. X., Wang, S.-W., Xu, A.-Q. Q., Wang, Z.-J. J., Xu, W.-B. B., Y Zhang, X. T. H. W. D. Y. S. Z. D. W. F. J. X. W. Y. G. L. C. H. A. D. L. S. W. A. X. Z. W. W. X., Zhang, Y., Tan, X.-J. J. X., Xu, W.-B. B. (2009). An outbreak of hand, foot, and mouth disease associated with subgenotype C4 of human enterovirus 71 in Shandong, China. *Journal of Clinical Virology*, *44*(4), 262–267. https://doi.org/10.1016/j.jcv.2009.02.002

Zhang, Z., Dong, Z., Wei, Q., Carr, M. J., Li, J., Ding, S., Tong, Y., Li, D., & Shi, W. (2017). A Neonatal Murine Model of Coxsackievirus A6 Infection for Evaluation of Antiviral and Vaccine Efficacy. *Journal of Virology*, *91*(9). https://doi.org/10.1128/jvi.02450-16

Zhao, K., Han, X., Wang, G., Hu, W., Zhang, W., & Yu, X. F. (2011). Circulating coxsackievirus a16 identified as recombinant type a human enterovirus, China. *Emerging Infectious Diseases*, *17*(8), 1537–1540. https://doi.org/10.3201/eid1708.101719

Zhao, X., Zhang, G., Liu, S., Chen, X., Peng, R., Dai, L., Qu, X., Li, S., Song, H., Gao, Z., Yuan, P., Liu, Z., Li, C., Shang, Z., Li, Y., Zhang, M., Qi, J., Wang, H., Du, N., … Gao, G. F. (2019). Human Neonatal Fc Receptor Is the Cellular Uncoating Receptor for Enterovirus B. *Cell*, *177*(6), 1553-1565.e16. https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.04.035

Zheng, Z. -M, He, P. -J, Caueffield, D., Neumann, M., Specter, S., Baker, C. C., & Bankowski, M. J. (1995). Enterovirus 71 isolated from China is serologically similar to the prototype E71 BrCr strain but differs in the 5′-noncoding region. *Journal of Medical Virology*, *47*(2), 161–167. https://doi.org/10.1002/jmv.1890470209

Zhou, D., Zhao, Y., Kotecha, A., Fry, E. E., Kelly, J. T., Wang, X., Rao, Z., Rowlands, D. J., Ren, J., & Stuart, D. I. (2019). Unexpected mode of engagement between enterovirus 71 and its receptor SCARB2. *Nature Microbiology*, *4*(3), 414–419. https://doi.org/10.1038/s41564-018-0319-z

Zhou, S. L., Ying, X. L., Han, X., Sun, X. X., Jin, Q., & Yang, F. (2015). Characterization of the enterovirus 71 VP1 protein as a vaccine candidate. *Journal of Medical Virology*, *87*(2), 256–262. https://doi.org/10.1002/jmv.24018

Zhou, S., Zhang, S., Wang, M., Cheng, A., Zhu, D., Chen, S., Liu, M., Zhao, X., Jia, R., Yang, Q., Wu, Y., Zhang, S., Liu, Y., Yu, Y., Zhang, L., & Chen, X. (2019). Development and evaluation of an indirect ELISA based on recombinant nonstructural protein 3A to detect antibodies to duck hepatitis A virus type 1. *Journal of Virological Methods*, *268*, 56–61. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2019.03.012

Zhu Junping, Zhen Luo, Juan Wang, Zigang Xu, Hui Chen, Dongying Fan, Na Gao, Guoling Ping, Zhen Zhou, Yan Zhang, Jing An. Phylogenetic Analysis of Enterovirus 71 Circulating in Beijing, China from 2007 to 2009, 8 PLoS ONE 56318 (2013). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056318

Zhu, R., Xu, L., Zheng, Q., Cui, Y., Li, S., He, M., Yin, Z., Liu, D., Li, S., Li, Z., Chen, Z., Yu, H., Que, Y., Liu, C., Kong, Z., Zhang, J., Baker, T. S., Yan, X., Hong Zhou, Z., … Xia, N. (2018). Discovery and structural characterization of a therapeutic antibody against coxsackievirus A10. *Science Advances*, *4*(9), eaat7459. https://doi.org/10.1126/sciadv.aat7459

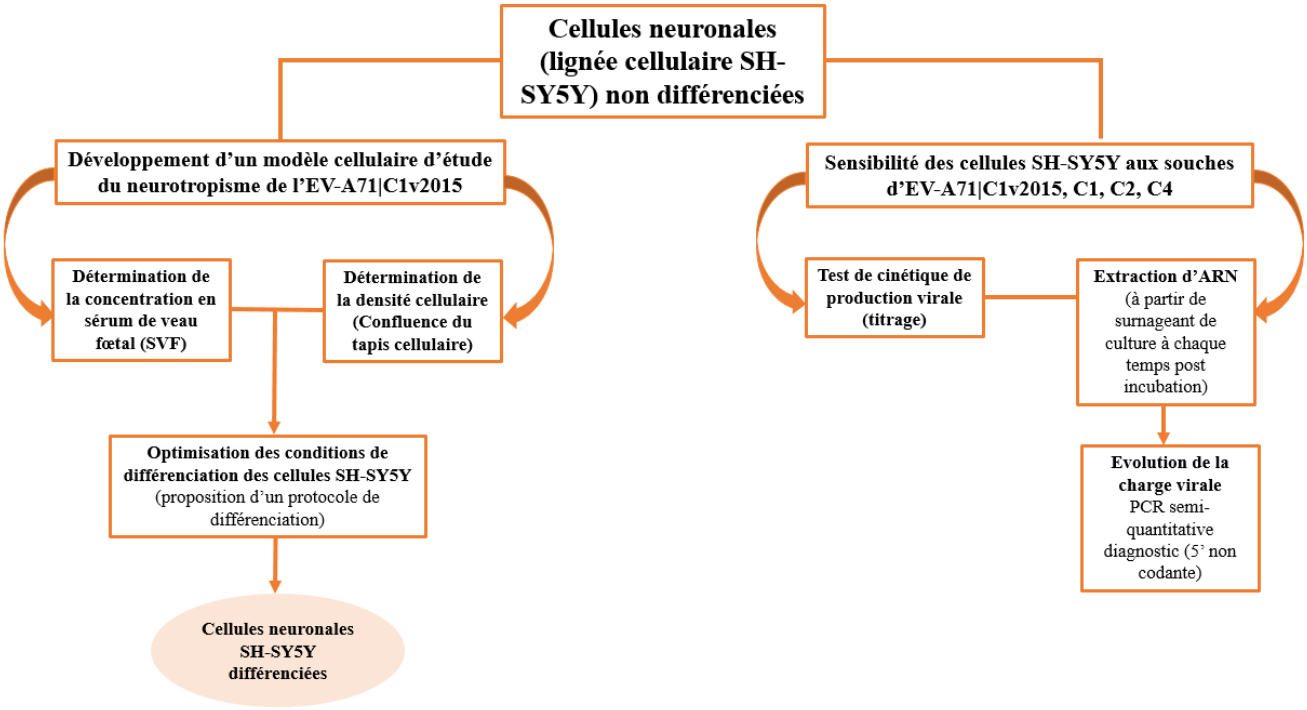
Zoll, J., Heus, H. A., van Kuppeveld, F. J. M., & Melchers, W. J. G. (2009). The structure-function relationship of the enterovirus 3′-UTR. *Virus Research*, *139*(2), 209–216. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2008.07.014

Zong, W. X. W., & Thompson, C. C. B. (2006). *Necrotic death as a cell fate*. *20*(1), 1–15. https://doi.org/10.1101/gad.1376506

ANNEXES

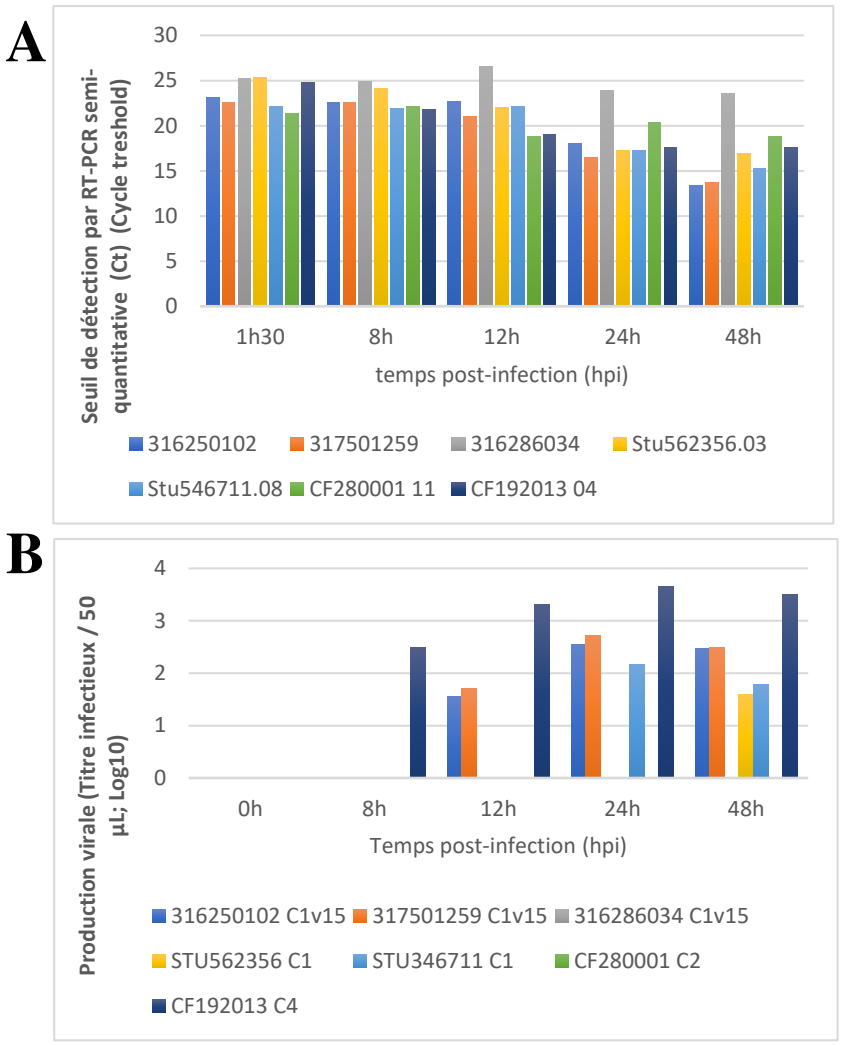
Annexe 1 : Etude du pouvoir infectieux

- **Figure 1 : Algorithme des différentes phases techniques de l'étude.**



- **Test de sensibilité des cellules SH-SY5Y aux souches d'EV-A71**

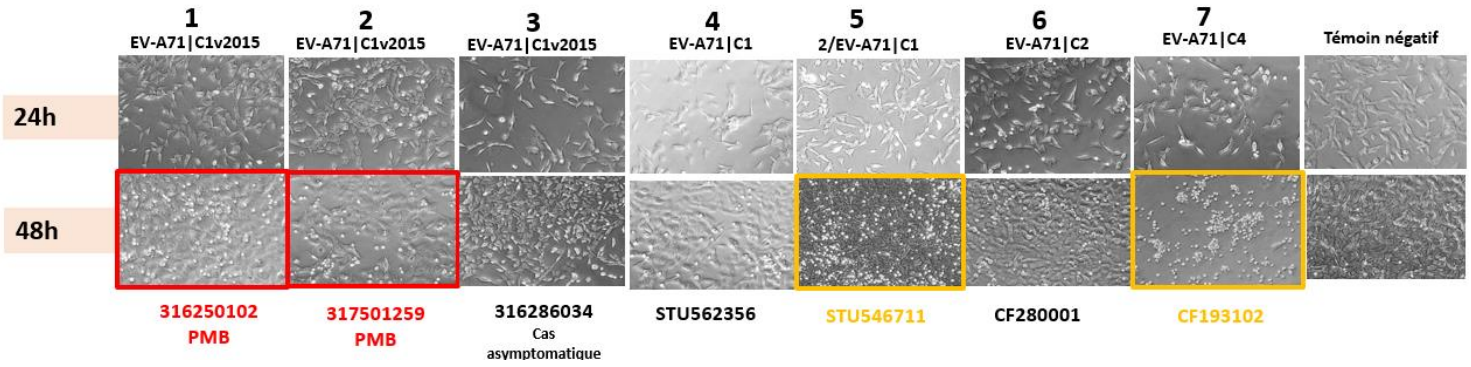
La sensibilité de la lignée cellulaire SH-SY5Y à l'état non différentié et l'efficacité de la multiplication virale ont été étudiées avec les 7 souches d'EV-A71. Les cultures cellulaires ont été traitées dans les conditions décrites ci-dessus. Un extrait cellulaire total a été collecté à différents temps après l'inoculation pour extraire les acides nucléiques et estimer la charge virale par RT-PCR semi-quantitative. Ce test a été réalisé une seule fois **(Figure 2)**. Le seuil de détection (valeur seuil ou Ct) a été utilisé pour représenter la charge virale dans chaque échantillon. La valeur Ct est inversement proportionnelle à la quantité d'ARN viral présent dans les échantillons. Une variation des seuils de détection (ΔCt) ≥ 3 est considérée significative entre les essais entre les différents points de cinétique. Les valeurs déterminées pour les différents points de cinétique ont été comparées. La charge virale n'était pas significativement différente à 1,5 hpi après incubation.



<u>Figure 2</u> : Comparaison de la sensibilité des cellules neuronales (lignée cellulaire SH-SY5Y) à l'EV-A71 C1v2015.

Pour deux souches **C1v2015 (316250102** et **317501259)** associées à des cas de maladie PMB, la charge virale reste stable jusqu'à 12 hpi, puis augmente considérablement jusqu'à 48 hpi. Pour la 3ème souche **C1v2015 (316286034)** isolée d'un enfant asymptomatique, la charge virale reste stable (pas de variation de plus de 3 Ct entre 1,5 hpi et 48 hpi). Pour les deux souches d'EV-A71 C1, la charge virale reste stable jusqu'à 12 hpi. Ensuite, la charge virale augmente à 48 hpi (souche **STU546711.08**) et pour la souche **STU562356.03**, elle augmente progressivement jusqu'à 24 hpi et se stabilise à 48 hpi. La charge virale ne varie pas à plus de 3 Ct entre 1,5 hpi et 48 hpi pour la souche **d'EV-A71 C2 (CF280001)** contrairement à la souche **EV-A71 C4 (CF192013)** dont la charge virale augmente considérablement entre 1,5 hpi et 12 hpi avant de se stabiliser jusqu'à 48 hpi. Les cellules neuronales SH-SY5Y sont sensibles aux souches d'EV-A71 C1v2015. Un ECP a été caractérisé par la dégradation du tapis cellulaire observé en microscopie optique à contraste de phase et la présence de cellules mortes en suspension **(Figure 3).** Cette altération des

cellules par le virus a été marquée à partir de 48 hpi pour les deux souches (**316250102** et **317501259)** associées à des cas de maladie PMB. Aucun ECP n'a été observé pour la 3ème souche C1v2015 (cas asymptomatique). Les souches des sous-génogroupes C1 et C4 ont un ECP plus marqué. Le titre infectieux (Log10 nombre de particules infectieuses pour 50 µL de suspension virale) a été déterminé par titrage dans les échantillons. La concentration de virus infectieux a été déterminée par une seule série de titrage. Les titres infectieux déterminés pour les différentes suspensions virales ne sont pas élevés et varient entre 1,56 et 3,66 particules infectieuses/mL (**Figure 2B**).

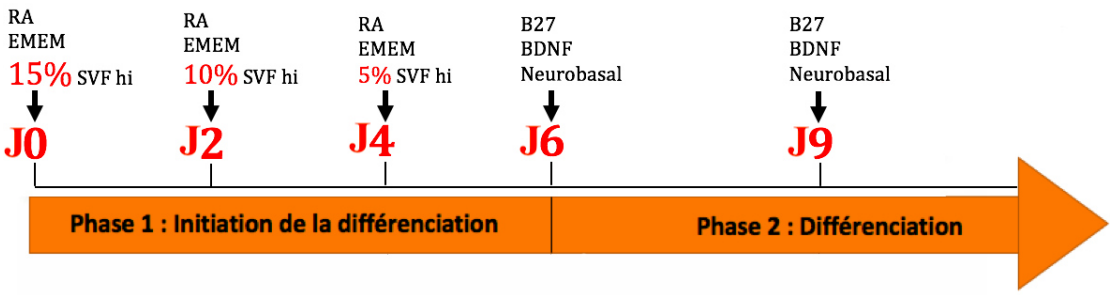


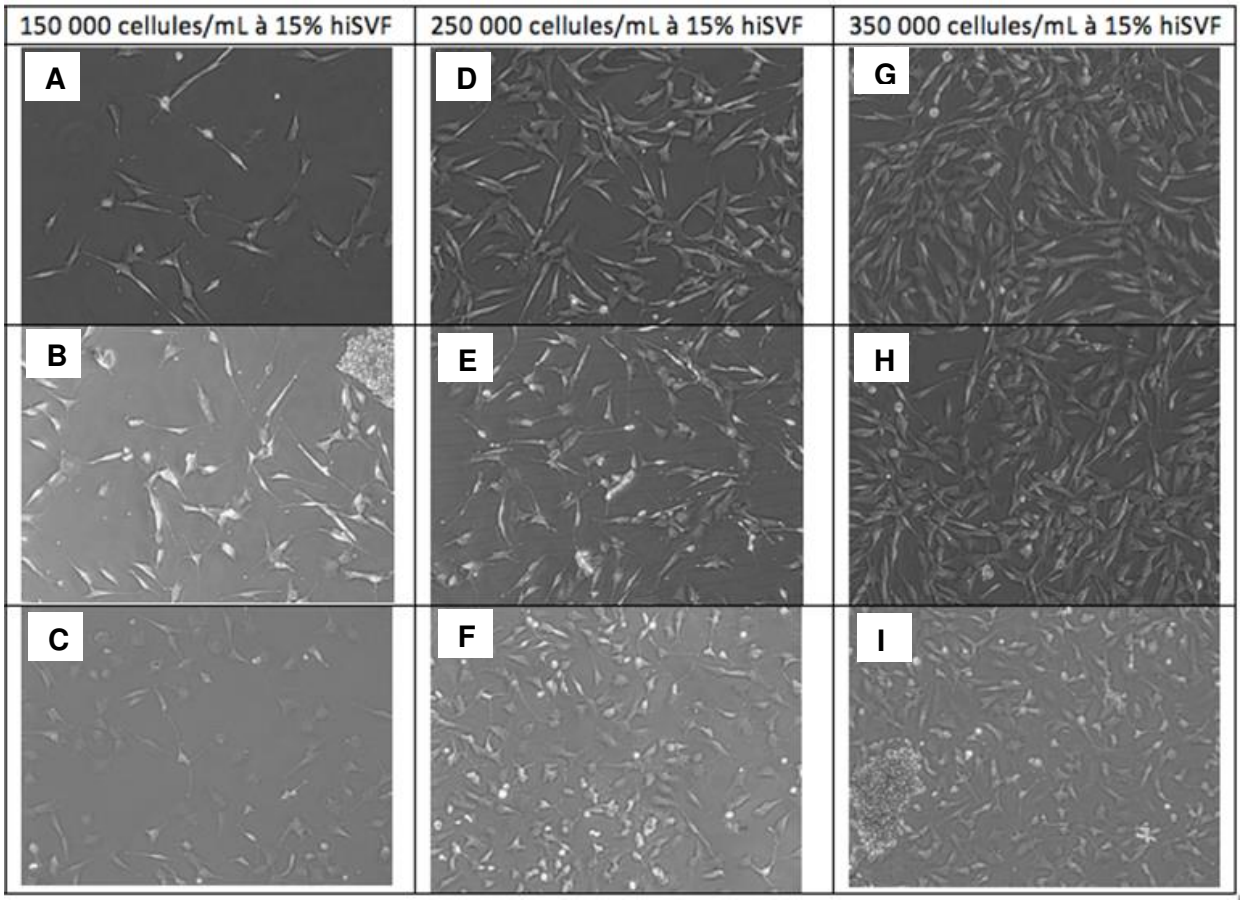
<u>Figure 3</u> : Test de sensibilité des cellules SH-SY5Y aux différentes souches d'EV-A71.

Un ECP a été caractérisé par la dégradation du tapis cellulaire observé en microscopie optique à contraste de phase et la présence de cellules mortes en suspension. Un ECP a été remarqué à partir de 48h pour les souches de C1v2015 associées à la maladie PMB (316250102 et 317501259 (en rouge)). Aucun ECP n'a été observé pour le cas asymptomatique du C1v2015. Les souches des sous-génogroupes C1 et C4 (en jaune) ont un ECP plus marqué.

- **<u>Optimisation des conditions de différenciation des cellules SH-SY5Y</u>**

Les cellules SH-SY5Y ont été ensemencées à trois concentrations différentes en présence d'acide rétinoïque et la première phase a consisté à effectuer une privation en SVF (**Figure 4)**. Nous avons choisi le protocole sur la base d'essais antérieurs : J0 avec 15%, puis J2 avec 10% et J4 avec 5%. La diminution de cette concentration permet d'augmenter le nombre de cellules différenciées. La concentration initiale d'ensemencement des puits à J0 **(Figure 4A, 4D, 4G)** influence la densité finale des cellules à l'issue de la phase 1, à J4 **(Figure 4B, 4E, 4H)**.





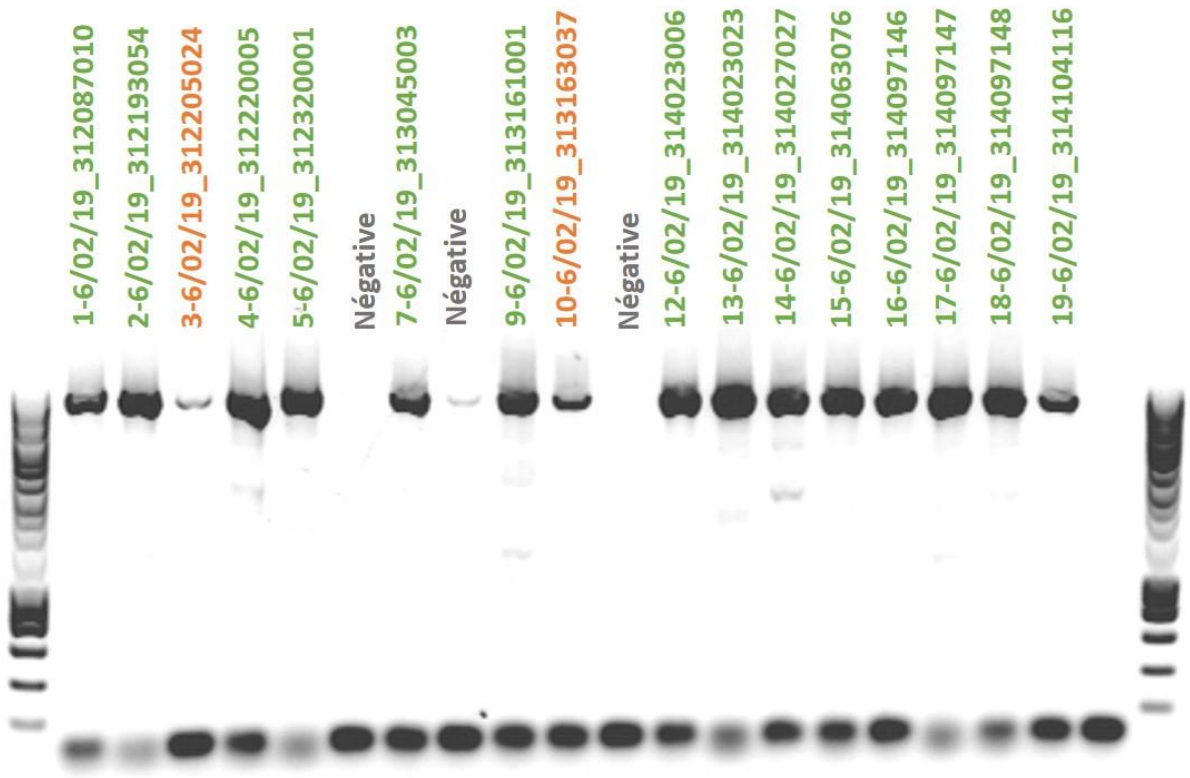
<u>Figure 4</u> : Protocole de différenciation des cellules SH-SY5Y.

Les cellules SH-SY5Y ont été ensemencées à trois densités différentes (150000, 250000 et 350000 cellules/mL) et avec trois concentrations différentes de hi SVF en présence d'acide rétinoïque : 15% à J0, 10% à J2 et 5% à J4. La concentration initiale d'ensemencement des puits à J0 **(A, D et G)** influence la densité finale des cellules à J4 **(B, E et H)**. La phase 2 est commencée à J6 et est poursuivie jusqu'à l'obtention de l'aspect cellulaire souhaité. Après la suppression complète du SVF et l'adjonction de facteurs de croissance neuronaux, la nappe cellulaire obtenue à J6 est très peu dense lorsque les puits ont été ensemencés initialement à 150 000 cellules/mL **(C)**. Pour les deux autres concentrations cellulaires testées les nappes cellulaires sont subconfluentes **(F et I)**.

La phase 2 (supplémentation en facteurs de croissance) est commencée à J6 et elle est poursuivie jusqu'à l'obtention de l'aspect cellulaire souhaité, c'est-à-dire que les cellules soient reliées entre-elles par des neurites et qu'elles présentent un phénotype neuronal. Après la suppression complète du SVF et l'adjonction de facteurs de croissance neuronaux, la nappe cellulaire obtenue à J6 est très peu dense lorsque les puits ont été ensemencés initialement à 150 000 cellules/mL **(Figure 4C)**. Pour les deux autres concentrations cellulaires testées les nappes cellulaires sont subconfluentes **(Figure 4F, 4I)**. A l'issu de la 2ème phase de différenciation, les cellules SH-SY5Y développent des projections axonales diffuses (neurites) qui permettent des connexions aux cellules voisine. Une fois que les cellules ont été différenciées en neurones matures, ils peuvent être maintenus pendant jusqu'à 15 jours de différenciation post-terminale et utilisés pour l'expérimentation. À la suite de la différenciation terminale, les milieux doivent être changés tous les 3-4 jours.

Annexe 2: Classification des résultats de l'amplification du génome complet en un seul amplicon selon l'intensité de l'amplicon attendu (positif, faible et négatif)

Vert, amplification génomique positive ; orange, amplification génomique faible ; gris, amplification génomique négative.



Annexe 3 :

Multirecombinant Enterovirus A71 Subgenogroup C1 Isolates Associated with Neurologic Disease, France, 2016–2017

Multirecombinant Enterovirus A71 Subgenogroup C1 Isolates Associated with Neurologic Disease, France, 2016–2017

Stéphanie Tomba Ngangas, Alexander Lukashev, Gwendoline Jugie, Olga Ivanova, Jean-Michel Mansuy, Catherine Mengelle, Jacques Izopet, Anne-Sophie L'honneur, Flore Rozenberg, David Leyssene, Denise Hecquet, Stéphanie Marque-Juillet, David Boutolleau, Sonia Burrel, Hélène Peigue-Lafeuille, Christine Archimbaud, Kimberley Benschop, Cécile Henquell, Audrey Mirand, Jean-Luc Bailly

In 2016, an upsurge of neurologic disease associated with infection with multirecombinant enterovirus A71 subgenogroup C1 lineage viruses was reported in France. These viruses emerged in the 2000s; 1 recombinant is widespread. This virus lineage has the potential to be associated with a long-term risk for severe disease among children.

Enterovirus A71 (EV-A71) comprises 7 genogroups (A–G) and various subgenogroups (e.g., B0–B5, C1–C5) (*1*). B4, B5, and C4 viruses circulate mainly in Asia, and C1 and C2 viruses have been detected in Europe (*2*). In 2016, an upsurge in neurologic manifestations of enterovirus infection was reported in France (*3*). These cases were associated with an emerging lineage of subgenogroup C1 enteroviruses first reported in 2015 in Germany and later in Spain and 4 other countries (Figure 1, panel A) (*4*–*8*). Our aim was to obtain the full genomes of the viruses from the specimens collected in France and track down the origin of this emerging lineage, hereafter referred to as C1v2015.

Author affiliations: Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand, France (S. Tomba Ngangas, G. Jugie, H. Peigue-Lafeuille, C. Archimbaud, C. Henquell, A. Mirand, J.-L. Bailly); Sechenov University, Moscow, Russia (A. Lukashev); Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products, Moscow (O. Ivanova); Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse, Toulouse, France (J.-M. Mansuy, C. Mengelle, J. Izopet); Assistance Publique-Hôspitaux de Paris Cochin, Paris, France (A.-S. L'honneur, F. Rozenberg); Centre Hospitalier de la Côte Basque, Bayonne, France (D. Leyssene); Centre Hospitalier Universitaire Amiens, Amiens, France (D. Hecquet); Centre Hospitalier de Versailles, Le Chesnay, France (S. Marque-Juillet); Assistance Publique-Hôspitaux de Paris Pitié-Salpêtrière-Charles Foix, Paris (D. Boutolleau, S. Burrel); CHU Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand (H. Peigue-Lafeuille, C. Archimbaud, C. Henquell, A. Mirand, J.-L. Bailly); National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven, the Netherlands (K. Benschop)

DOI: https://doi.org/10.3201/eid2506.181460

The Study

According to consolidated data recorded from the French Enterovirus Surveillance Network, 77 laboratory-confirmed cases of C1v2015 infection occurred during March–October 2016; in comparison, 136 EV-A71 infections of all genogroups combined were recorded during 2010–2015. The C1v2015 cases were widespread throughout France and associated with various clinical manifestations, including meningitis, cerebellitis, encephalitis, and myelitis, as well as hand, foot and mouth disease (HFMD) (Figure 1, panels B, C). One fatal case resulted from HFMD and cardiorespiratory failure. We analyzed 32 clinical specimens available from 25 patients reported as having a C1v2015 infection in 2016 and 2017 (Table 1; Appendix Table 1, https://wwwnc.cdc.gov/EID/article/25/6/18-1460-App1.pdf). Specimens and clinical data were collected during routine clinical work-up and epidemiologic surveillance, and patient data were deidentified before this study was conducted. The study was approved by the review board Comité de Protection des Personnes Sud-Est VI (no. 2018/CE44) in Clermont-Ferrand, France. The study population comprised 16 hospitalized children (median age 0.1 years), 4 children seen via ambulatory care (median age 1.8 years), and 5 children with asymptomatic infection (median age 1.4 years) in a childcare facility placed under community surveillance. We obtained the complete genomes, including the full 5′ and 3′ untranslated regions (UTRs), of 18 of 20 specimens and partial genomes of 2 of 20 specimens (2,893-nt and 4,380-nt long) acquired from 18 children (Appendix) (*2*). We also determined the genomes of 12 isolates recovered during routine enterovirus surveillance to investigate their genetic relationships with C1v2015 (Appendix Table 2); we selected these viruses on the basis of previous exploratory investigations of their partial sequences (*2*,*9*,*10*).

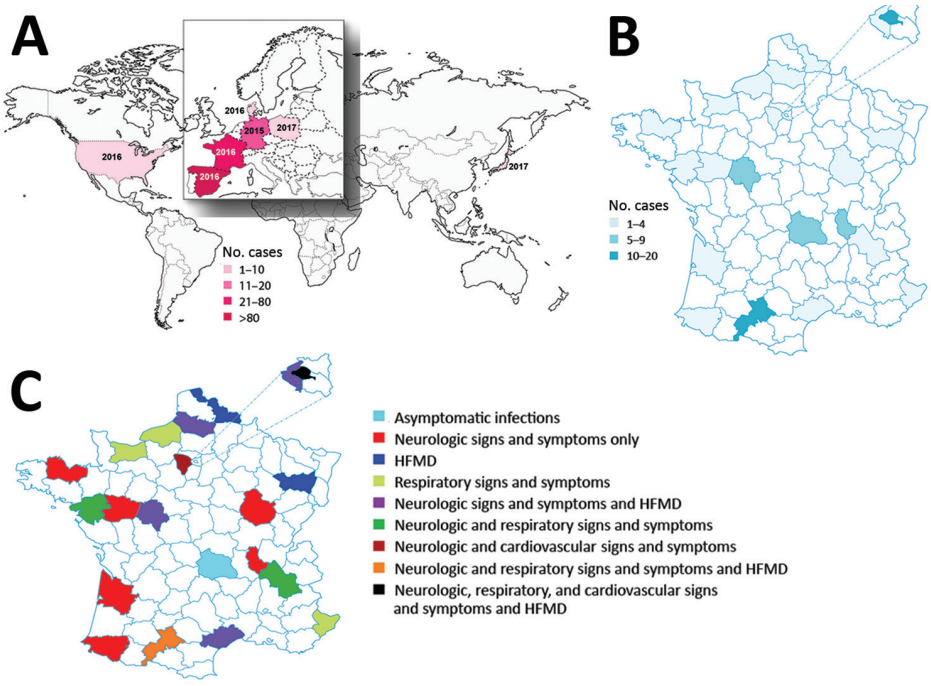


Figure 1. Geographic locations and numbers of enterovirus A71 (EV-A71) subgenogroup C1v2015 infections reported during 2015–2017. A) Countries in which EV-A71 C1v2015 was reported. The year the virus was first reported is indicated. The size of Europe is increased for easier visualization. B) Geographic distribution and number of cases of EV-A71 C1v2015 infection reported in hospitals, by department, France, 2016–2017. C) Geographic distribution of clinical manifestations associated with EV-A71 C1v2015 infection reported in hospitals, by department, France, 2016–2017. The size of a select set of departments is enlarged for easier visualization. HFMD, hand, foot and mouth disease.

Table 1. Characteristics of patients with EV-A71 subgenogroup C1v2015 infection, France, 2016–2017*

Patient no.	Specimen no.	Care setting (City)	Clinical diagnosis	Specimen material	Collection date	C_t
01	01†	Hospital (Toulouse)	Acute meningitis	Throat swab	2016 May 3	25
02	02	Hospital (Toulouse)	Fever	Nasopharyngeal aspirate	2016 May 19	30
02	03	Hospital (Toulouse)	Fever	Feces	2016 May 19	31
03	04	Hospital (Paris)‡	Fever	Plasma	2016 Jun 7	37
04	05	Hospital (Paris)‡	Fever	Plasma	2016 Jun 10	32
05	06	Hospital (Bayonne)	Encephalitis	Cerebrospinal fluid	2016 Jun 12	35
05	07†	Hospital (Bayonne)	Encephalitis	Throat swab	2016 Jun 24	35
05	08	Hospital (Bayonne)	Encephalitis	Rectal swab	2016 Jun 24	35
06	09	Hospital (Toulouse)	Infant fever	Feces	2016 Jul 10	31
07	10†	Hospital (Toulouse)	Sepsis-like disease	Throat swab	2016 Aug 10	24
07	11†	Hospital (Toulouse)	Sepsis-like disease	Nasopharyngeal aspirate	2016 Aug 10	NR
08	12†	Hospital (Paris)‡	Convulsions	Nasopharyngeal aspirate	2016 Aug 11	28
09	13§	Ambulatory (Mirecourt)	HFMD	Mouth swab	2016 Aug 30	32
10	14†	Ambulatory (Mirecourt)	HFMD	Throat swab	2016 Aug 30	29
11	15†	Hospital (Paris)‡	Fever, hypotonia	Blood	2016 Sep 5	30
12	16§	Hospital (Toulouse)	Acute meningitis, HFMD	Throat swab	2016 Sep 7	33
13	17†	Ambulatory (Toulouse)	HFMD	Mouth swab	2016 Sep 14	29
14	18†	Hospital (Paris)‡	Fever	Feces	2016 Sep 27	20
15¶	19†	Daycare (Volvic)	NR	Feces	2016 Oct 4	29
16¶	20†	Daycare (Volvic)	NR	Feces	2016 Oct 4	31
17¶	21†	Daycare (Volvic)	NR	Feces	2016 Oct 4	31
18¶	22†	Daycare (Volvic)	NR	Feces	2016 Oct 4	29
19¶	23†	Daycare (Volvic)	NR	Feces	2016 Oct 4	31
20	24	Hospital (Toulouse)	Sepsis-like disease	Throat swab	2016 Oct 5	33
21	25	Hospital (Versailles)	Diarrhea	Cerebrospinal fluid	2016 Oct 9	35
22	26	Hospital (Toulouse)	Acute meningitis, cerebellitis	Throat swab	2016 Oct 10	36
22	27	Hospital (Toulouse)	Acute meningitis, cerebellitis	Feces	2016 Oct 10	30
23	28†	Hospital (Toulouse)	Fever	Throat swab	2016 Oct 11	27
23	29	Hospital (Toulouse)	Fever	Feces	2016 Oct 12	29
24	30†	Hospital (Amiens)	Myelitis	Nasopharyngeal swab	2016 Oct 18	30
24	31†	Hospital (Amiens)	Myelitis	Feces	2016 Oct 20	33
25	32†	Ambulatory (Montesson)	Atypical HFMD, herpangina	Throat swab	2017 Jul 3	22

*See Appendix Table 1 (https://wwwnc.cdc.gov/EID/article/25/6/18-1460-App1.pdf) for extended data, including GenBank accession nos. C_t, cycle threshold; EV-A71, enterovirus A71; HFMD, hand, foot and mouth disease; NR, not reported.
†Specimens for which the complete viral genomes (including the full 5′ and 3′ untranslated regions) were obtained.
‡Assistance Publique-Hôpitaux de Paris Cochin, Paris, France.
§Specimens for which partial genomes were obtained.
¶Patients 15–19 were children in the same daycare facility who had no evidence of clinical disease.

We performed whole-genome sequence analyses as previously described (*11*) to identify which viruses were the closest relatives of C1v2015. The C1v2015 genome appears to be a mosaic comprising 4 modules defined by distinct patterns of similarity possibly arising through recombination (Figure 2, panel A). The nucleotide similarity patterns for module 2 (genomic region P1 comprising 4 capsid protein genes) suggest this region was inherited en bloc from an earlier subgenogroup C1 lineage. We used genomic region P1 to determine the evolutionary

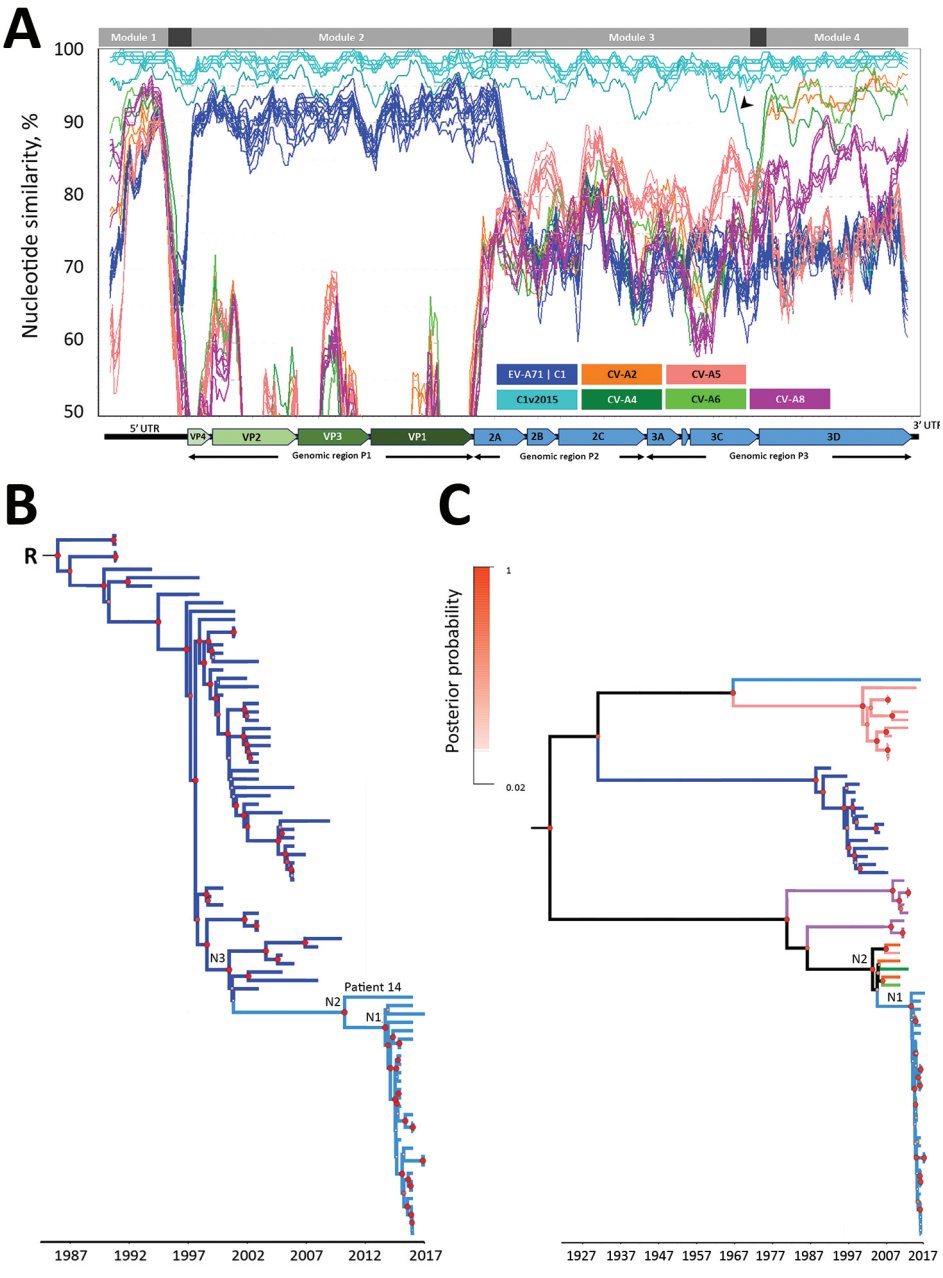


Figure 2. Nucleotide similarity and phylogenetic analyses of EV-A71 subgenogroup C1v2015 isolates, France, 2016–2017, constructed to determine temporal origin of C1v2015 lineage. A) Nucleotide similarity patterns between EV-A71 C1v2015 and other EV-A lineages indicate the C1v2015 genome has a mosaic structure. A schematic diagram of the enterovirus genome is shown at the bottom of the panel. Four genomic modules (labeled at top of panel) with different genetic origins are identified; genomic modules are indicated in dark gray. The arrowhead indicates a previously undescribed recombinant lineage of C1v2015 (Appendix Figure 2, https://wwwnc.cdc.gov/EID/article/25/6/18-1460-App1.pdf). B) Phylogenetic tree constructed by using genomic region P1, encoding capsid proteins VP1–VP4, and methods described earlier (*11*). We performed this analysis with 85 sequences assigned to the EV-A71 C1 and C1v2015 lineages. Tree shows the temporal distribution of lineages, including the emergence of lineage C1v2015. C) Phylogenetic tree constructed by using 3Dpol, encoding the viral RNA polymerase common to C1v2015 and several CV-A strains. The dataset comprised 70 sequences: 24 CV-A (including 5 from this study), 14 EV-A71 C1 (including 6 from this study), 12 publicly available C1v2015, and 20 C1v2015 from this study. Recombination analyses provided no evidence of internal breakpoints within the sequences. N1 represents the time to most recent common ancestor (MRCA) of all included EV-A71 C1v2015 isolates except the virus from patient 14; N2 in panel B represents the MRCA of all EV-A71 C1v2015 isolates, including the virus from patient 14; N2 in panel C represents the MRCA of EV-A71 C1v2015 and its parent C1 lineage; and N3 represents the MRCA of EV-A71 C1v2015 and its parent C1 lineage (see Table 2). Diameters of circles at nodes reflect posterior probability. Branches of trees are color coded according to virus lineage as indicated in panel A. C1v2015, enterovirus subgenogroup C1 strain discovered in 2015; CV-A, coxsackievirus genogroup A; EV-A71C1, enterovirus A71 subgenogroup C1; N, node; UTR, untranslated region; VP, viral protein. An expanded version of this figure and legend describing complete methods and providing details of the trees in panels B and C is available online (https://wwwnc.cdc.gov/EID/article/25/6/18-1460-F2.htm).

relatedness between C1v2015 and earlier C1 viruses and to date when the upsurge of C1v2015 infections began in Europe (Figure 2, panel B). All C1v2015 viruses clustered in a lineage distinct from that comprising the C1 viruses reported during 1991–2010. The nucleotide substitution rate of C1v2015 (5.2238 [95% highest probability density HPD interval 4.124–6.3737] × 10^{-3} nt substitutions/y) and earlier C1 lineages (4.6302 [95% HPD interval 4.1769–5.1353] × 10^{-3} nt substitutions/y) was similar. All of the P1 sequences from these viruses, except that of the virus from patient 14, had a maximum nucleotide sequence difference from each other of 2%; the P1 sequence of the virus from patient 14 differed from that of other C1v2015 viruses by 4.8%. The close genetic relatedness between the C1v2015 sequences reported during 2015–2017 in France, Germany, Japan, and the United States was indicative of rapid widespread transmission. We estimated that interpersonal transmission of this lineage began during 2009–2011 (Table 2; Figure 2, panel B) and that its spread was sustained during 2013–2014, just 1–2 years before C1v2015 was first reported. The most recent common ancestor between C1v2015 and earlier C1 viruses was dated to 2000–2002. Seven EV-A71 subgenogroup C1 viruses from Africa and Europe were located at the base of the C1v2015 lineage (Figure 2, panel B), suggesting that the C1 strain involved in the emergence of C1v2015 was circulating in this region during the 2000s.

The C1v2015 genomic module 4 comprises the entire 3Dpol gene and has a 90%–95% nucleotide similarity with 4 distinct EV-A genomes: coxsackievirus A2 (CV-A2) and CV-A5 from Russia, CV-A4 from China, and CV-A6 from Turkmenistan (Figure 2, panel A). We performed another phylogenetic analysis to assess the temporal origin of C1v2015 using this module. With the 3Dpol phylogenetic analysis, we estimated that C1v2015 began spreading in 2010–2014 (Table 2; Figure 2, panel C), an estimate similar to that calculated with the P1 phylogeny. The nucleotide substitution rates with this analysis were also similar (C1v2015 3.7689 [95% HPD interval 1.3003–6.5838] × 10^{-3} nt substitutions/y and C1 3.6318 [95% HPD interval 1.6064–6.2072] × 10^{-3} nt substitutions/y). Whole-genome sequencing analysis showed that the isolate from patient 14 (14|COC286037|FRA|2016) shared distinct 3Dpol genes with other C1v2015 viruses (Appendix Figure 1). Overall, data indicate that the virus from patient 14 was an early recombinant of the C1v2015 lineage (Appendix Figure 2).

Within genomic module 1 (5′ UTR, first 600 nt), we found areas of moderate nucleotide similarity (90%–95%) between the C1v2015 genome and the CV-A6 and CV-A8 genomes and lower similarity (<88%) with the EV-A71 subgenogroup C1 genomes (Figure 2, panel A). The C1v2015 5′ UTR was therefore inherited from an EV-A lineage virus but not from the C1 ancestors that provided the capsid region. The pattern of sequence variation in the 5′ UTR precludes the possibility of analysis with a molecular clock.

Table 2. Estimation of year of MRCA of EV-A71 subgenogroup C1v2015 lineage by using different enteroviruses*

	Year of MRCA (95% HPD interval)	
Node†	Genomic region P1	3Dpol gene
1‡	2013.6 (2013.2–2014.1)	2013.6 (2012.9–2014.3)
2§	2010.2 (2009–2011.3)	2004.1 (2001.7–2006.2)
3¶	2000.5 (2000.1–2001.6)	ND
Root	1986 (1984.7–1987.3)	ND

*EV-A71, enterovirus A71; HPD, highest probability density; MRCA, most recent common ancestor; ND, not done.
†MRCAs were determined for nodes and root in Figure 2.
‡Node 1 represents the MRCA of all included EV-A71 C1v2015 isolates except the virus from patient 14.
§For genomic region P1, node 2 represents the MRCA of all EV-A71 C1v2015 isolates, including the virus from patient 14. For 3Dpol gene, node 2 represents the MRCA of EV-A71 C1v2015 and its parent C1 lineage.
¶Node 3 represents the MRCA of EV-A71 C1v2015 and its parent C1 lineage.

The genomic module 3 of C1v2015 had low similarity with all the publicly available EV-A genomes; thus, the precise origin remains unknown (Figure 2, panel A). The highest nucleotide similarity scores (<90% with CV-A5 genomes) indicate only a distant genetic relationship. We conclude that genes 2A (except the 5′ terminus), 2B, 2C, and 3A–3C were transferred into the C1v2015 genome from a previously unreported lineage.

Conclusions

Thirty years after the outbreaks in central Europe (*12*,*13*), the 2016 upsurge of infections is a reminder that EV-A71 is of growing public health concern. After the B5 and C4 subgenogroup upsurges, C1v2015 is the latest example of an emerging recombinant EV-A71 associated with neurologic manifestations. Recombination, which frequently occurs in enteroviruses, is considered a factor driving this viral emergence (*14*,*15*). Compared with earlier circulating lineages of EV-A71, C1v2015 is a multirecombinant that arose through complete shuffling of all nonstructural genomic regions, although the capsid genes are phylogenetically typical of C1 viruses. Shuffling involved ≥2 recombination events with EV-A genomes before the emergence of C1v2015 as a life-threatening pathogen (Appendix Figure 2). From a public health perspective, the spread of C1v2015 could have resulted from acquired genomic features, notably a unique combination of the 5′ UTR and 3Dpol gene, because recombination events clearly preceded the extensive circulation of C1v2015. The mosaic structure of the genome indicates that C1v2015 is an integral part of a large recombination network including multiple EV-A viruses transmitted in Eurasia. Given the propensity of enteroviruses to recombine their genomes and spread rapidly across distant countries (*2*,*11*) and that C1v2015 circulation continued throughout

2017 and 2018 in France, we need to determine if this virus is associated with a long-term recurrent risk for severe disease in the pediatric population through sharing data from global surveillance.

Acknowledgments

The authors are indebted to Patrice Bouissou, Annick Givois, and Martine Wagner-Vaucard, who obtained samples in children with hand, foot and mouth disease. We acknowledge the technical contribution of Jeroen Cremer, Adeline Duard, Nathalie Rodde, and Isabelle Simon for helpful assistance with molecular typing and sequencing. We thank Jeffrey Watts for help in preparing the manuscript in English.

Financial support was provided by the University Clermont Auvergne, France.

About the Author

Ms. Tomba Ngangas is a doctoral candidate at the Université Clermont Auvergne in Clermont-Ferrand, France. Her research interests are in characterizing viruses that cause neurologic disease and hand, foot and mouth disease.

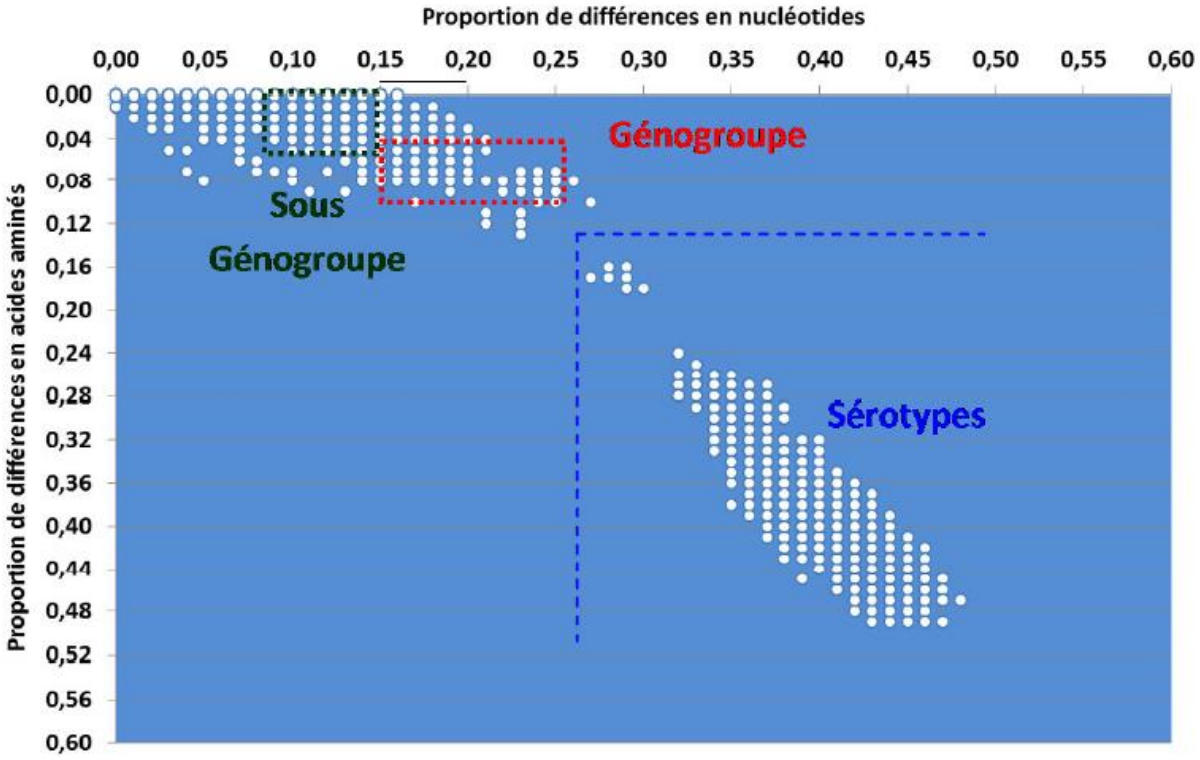
References

1. Bessaud M, Razafindratsimandresy R, Nougairède A, Joffret ML, Deshpande JM, Dubot-Pérès A, et al. Molecular comparison and evolutionary analyses of VP1 nucleotide sequences of new African human enterovirus 71 isolates reveal a wide genetic diversity. PLoS One. 2014;9:e90624. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0090624
2. Hassel C, Mirand A, Lukashev A, TerletskaiaLadwig E, Farkas A, Schuffenecker I, et al. Transmission patterns of human enterovirus 71 to, from, and among European countries, 2003 to 2013. Euro Surveill. 2015;20:30005. http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2015.20.34.30005
3. Antona D, Kossorotoff M, Schuffenecker I, Mirand A, Leruez-Ville M, Bassi C, et al. Severe paediatric conditions linked with EV-A71 and EV-D68, France, May to October 2016. Euro Surveill. 2016;21:30402. http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.46.30402
4. Böttcher S, Obermeier PE, Neubauer K, Diedrich S; Laboratory Network for Enterovirus Diagnostics. Recombinant enterovirus A71 subgenogroup C1 strains, Germany, 2015. Emerg Infect Dis. 2016;22:1843–6. http://dx.doi.org/10.3201/eid2210.160357
5. Karrasch M, Fischer E, Scholten M, Sauerbrei A, Henke A, Renz DM, et al. A severe pediatric infection with a novel enterovirus A71 strain, Thuringia, Germany. J Clin Virol. 2016;84:90–5. http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2016.09.007
6. Casas-Alba D, de Sevilla MF, Valero-Rello A, Fortuny C, García-García JJ, Ortez C, et al. Outbreak of brainstem encephalitis associated with enterovirus-A71 in Catalonia, Spain (2016): a clinical observational study in a children's reference centre in Catalonia. Clin Microbiol Infect. 2017;23:874–81. http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2017.03.016
7. Wieczorek M, Purzyńska M, Krzysztoszek A, Ciąćka A, Figas A, Szenborn L. Genetic characterization of enterovirus A71 isolates from severe neurological cases in Poland. J Med Virol. 2018;90:372–6. http://dx.doi.org/10.1002/jmv.24958
8. Midgley SE, Nielsen AG, Trebbien R, Poulsen MW, Andersen PH, Fischer TK. Co-circulation of multiple subtypes of enterovirus A71 (EV-A71) genotype C, including novel recombinants characterised by use of whole genome sequencing (WGS), Denmark 2016. Euro Surveill. 2017;22:30565. http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.26.30565
9. Lukashev AN, Shumilina EY, Belalov IS, Ivanova OE, Eremeeva TP, Reznik VI, et al. Recombination strategies and evolutionary dynamics of the human enterovirus A global gene pool. J Gen Virol. 2014;95:868–73. http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.060004-0
10. van der Sanden S, van der Avoort H, Lemey P, Uslu G, Koopmans M. Evolutionary trajectory of the VP1 gene of human enterovirus 71 genogroup B and C viruses. J Gen Virol. 2010;91:1949–58. http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.019695-0
11. Hassel C, Mirand A, Farkas A, Diedrich S, Huemer HP, Peigue-Lafeuille H, et al.; HFMD French Study Network. Phylogeography of coxsackievirus A16 reveals global transmission pathways and recent emergence and spread of a recombinant genogroup. J Virol. 2017;91:e00630-17. http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00630-17
12. Chumakov M, Voroshilova M, Shindarov L, Lavrova I, Gracheva L, Koroleva G, et al. Enterovirus 71 isolated from cases of epidemic poliomyelitis-like disease in Bulgaria. Arch Virol. 1979;60:329–40. http://dx.doi.org/10.1007/BF01317504
13. Nagy G, Takátsy S, Kukán E, Mihály I, Dömök I. Virological diagnosis of enterovirus type 71 infections: experiences gained during an epidemic of acute CNS diseases in Hungary in 1978. Arch Virol. 1982;71:217–27. http://dx.doi.org/10.1007/BF01314873
14. McWilliam Leitch EC, Cabrerizo M, Cardosa J, Harvala H, Ivanova OE, Koike S, et al. The association of recombination events in the founding and emergence of subgenogroup evolutionary lineages of human enterovirus 71. J Virol. 2012;86:2676–85. http://dx.doi.org/10.1128/JVI.06065-11
15. Kyriakopoulou Z, Pliaka V, Amoutzias GD, Markoulatos P. Recombination among human non-polio enteroviruses: implications for epidemiology and evolution. Virus Genes. 2015;50:177–88. http://dx.doi.org/10.1007/s11262-014-1152-y

Address for correspondence: Jean-Luc Bailly, Université Clermont Auvergne, LMGE UMR 6023, Clermont-Ferrand, France; email: j-luc.bailly@uca.fr

Annexe 4 :

- **<u>Analyse graphique des différences nucléotidiques en fonction des différences protéiques du gène 1DVP1 parmi les souches d'entérovirus A (Hassel, 2015)</u>**

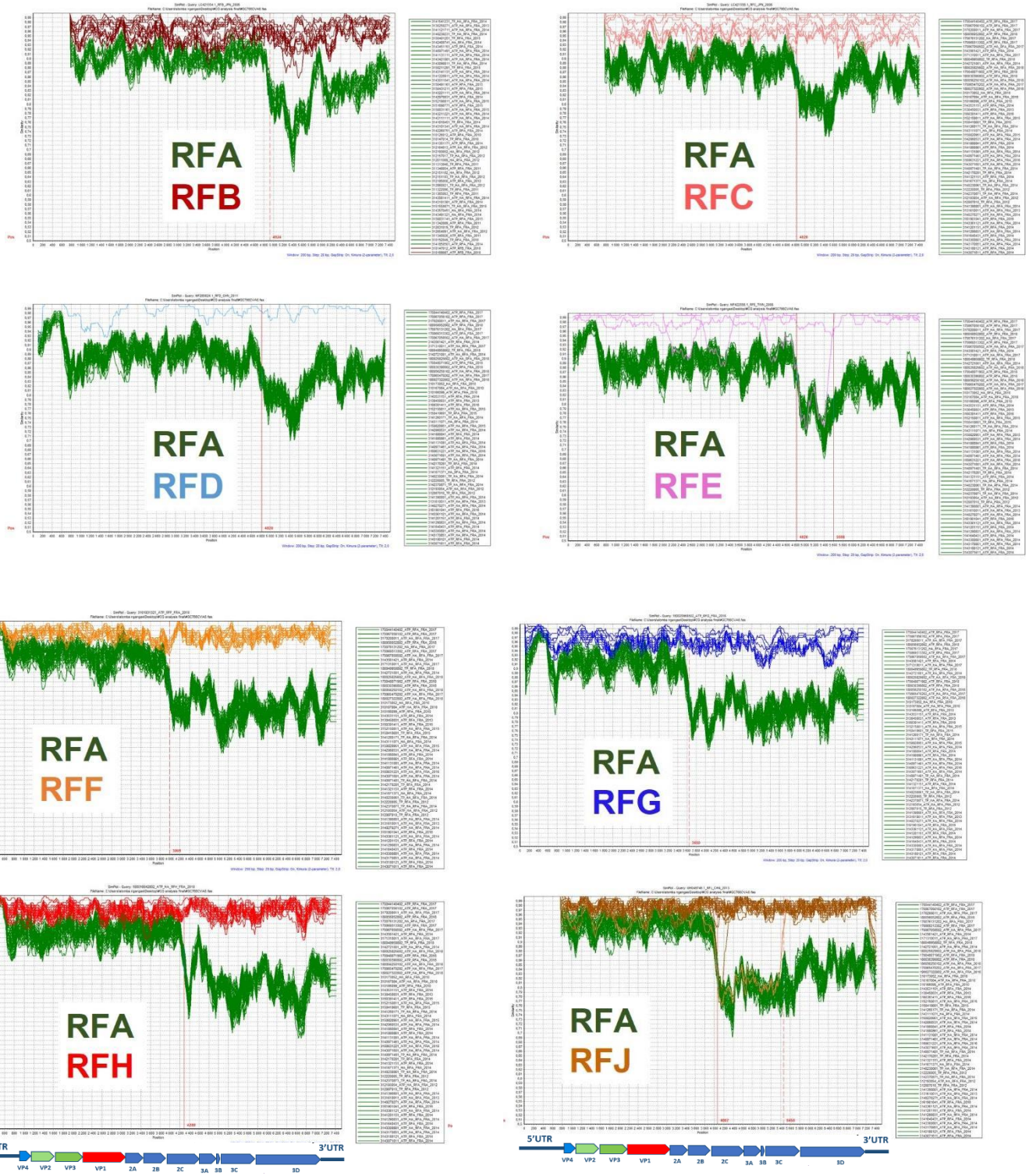


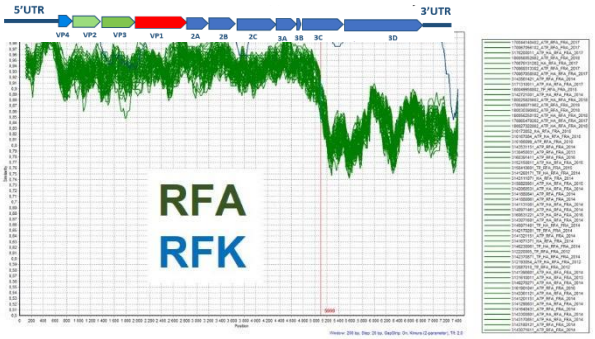
Les séquences du gène $1D^{VP1}$ ont été comparées pour un échantillon de 315 souches d'entérovirus A. Une matrice des proportions de différences nucléotidiques (p-distance) et une autre matrice des proportions de différences en acides ont été obtenues avec le logiciel MEGA5 (Tamura *et al,* 2007) pour comparer les souches deux à deux. La distribution des valeurs a été analysée graphiquement afin d'identifier l'existence de groupe (populations) parmi les souches et d'établir les seuils de différenciation entre sérotypes, génogroupes et sous génogroupes.

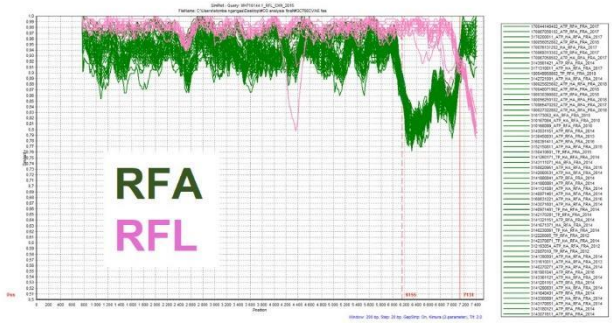
- **<u>Valeurs seuils pour différencier les niveaux de classifications taxonomiques</u>**

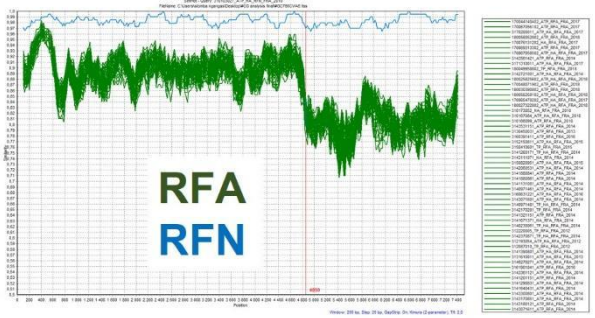
	Pourcentage de différences nucléotidiques	**Pourcentage de différences protéiques**
Sous génogroupes	**10 - 14 %**	**0 - 6 %**
Génogroupes	**15 – 25%**	**2 - 10 %**
Sérotypes	**26 - 50 %**	**13 - 50 %**

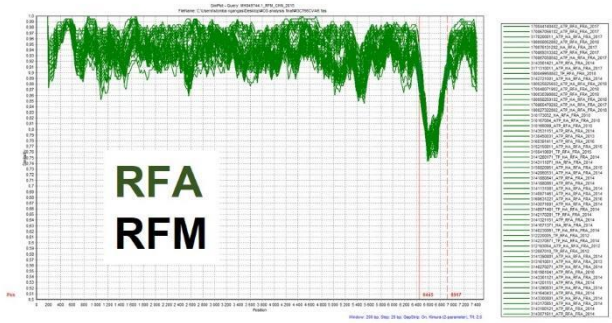
Annexe 6 : Analyses de similitude des séquences génomiques de la forme recombinante RFA, avec la séquence génomique de chaque RF identifiées comme référence. Un schéma indiquant l'organisation génomique du CVA6 et les régions structurales et non structurales est présenté. Les profils de similitude sont codés en couleur selon le type d'EV.



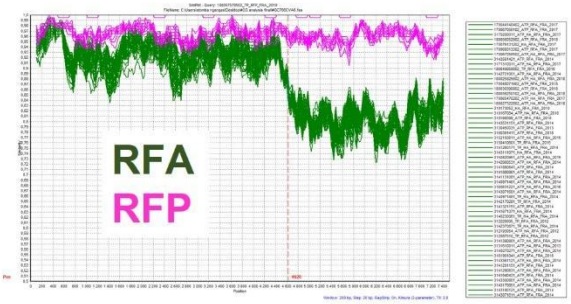

5'UTR
3'UTR
VP4
VP2
VP3
VP1
2A
2B
2C
3A
3B
3C
3D
RFA
RFK

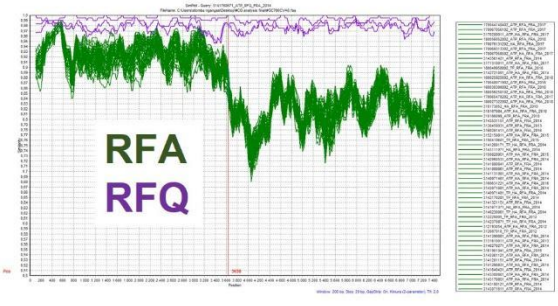

RFA
RFL

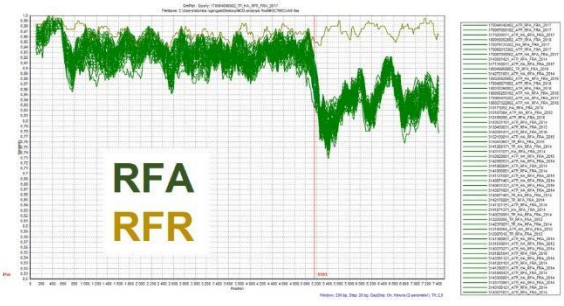

RFA
RFN

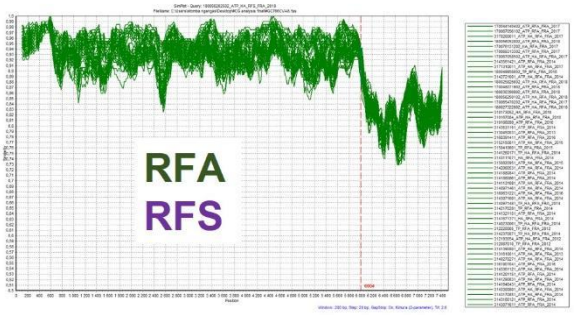

RFA
RFM

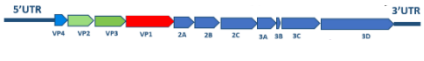
RFA
RFO


RFA
RFP

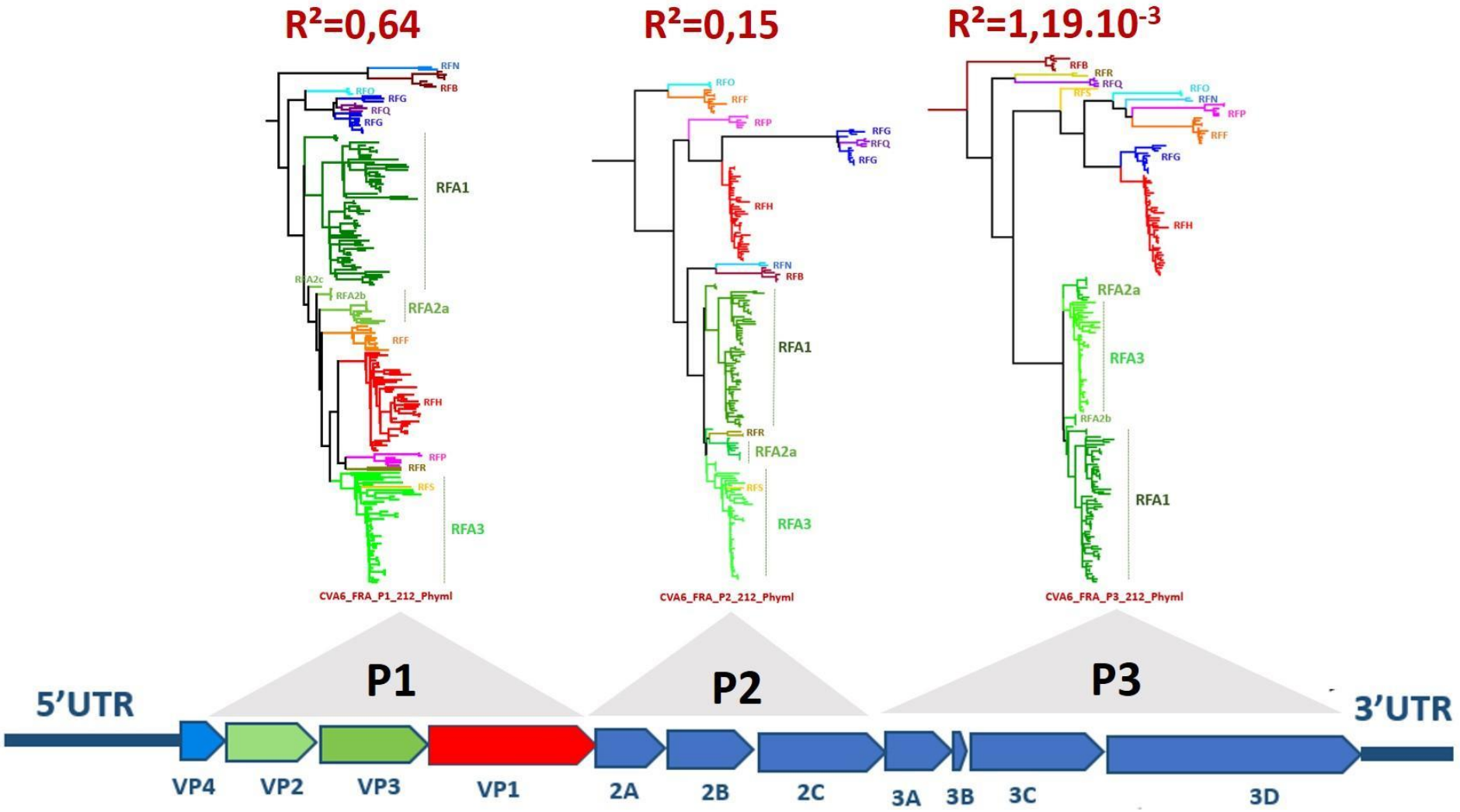

RFA
RFQ


RFA
RFR


RFA
RFS


5'UTR
3'UTR
VP4
VP2
VP3
VP1
2A
2B
2C
3A
3B
3C
3D

Annexe 7 : Arbres phylogénétiques construits à partir d'un jeu de données de 213 séquences génomiques complètes de coxsackievirus A6



Résumé

Les EV (EV) sont des virus entériques (famille des Picornaviridae) classés parmi quatre espèces taxonomiques (A à D). Les infections à EV symptomatiques sont associées à des atteintes neurologiques, respiratoires, cardiaques, musculaires, cutanéomuqueuses. La maladie pieds-mains-bouche (PMB) se caractérise par une éruption cutanée et des ulcérations buccales chez les enfants de moins 5 ans. L'EVA71 (EVA71) et le coxsackievirus A6 (CVA6) sont parmi les types d'EV de l'espèce A, les plus fréquemment associés à la maladie PMB. En France, l'EVA71 est associé à la recrudescence d'atteintes neurologiques depuis 2016, et le CVA6 est relié à la survenue d'épidémies régulières de maladie PMB. L'objectif de la thèse est de comparer les réémergences épidémiques de ces deux virus par l'analyse comparative des génomes. L'épidémie d'atteintes neurologiques sévères en 2016 a été associée au variant C1v2015 classé dans le sous-génogroupe C1 d'EVA71 et dont l'émergence a été datée en 2010. Le génome de ce virus présente une structure chimérique caractéristique de multiples évènements de recombinaison. Le génome du virus C1v2015 montre des variations notables par rapport à celui des virus antérieurs dans des segments codant des épitopes exposés à la surface des protéines de capside. Nous avons daté en 2013 la survenue d'un évènement de recombinaison qui a remplacé le gène de la polymérase 3Dpol précédant de peu la propagation épidémique du virus en Europe à partir de 2015. Pour étudier le CVA6, nous avons mis au point une méthode de séquençage NGS que nous avons appliquée à des échantillons cliniques recueillis en France entre 2010 et 2018. En France, depuis 2014, les épidémies sont liées au sous-génogroupe D4 qui a émergé globalement en 2004. L'étude du gène 3Dpol permet d'identifier 5 nouvelles formes recombinantes. Les caractéristiques épidémio-cliniques des cas de maladie PMB rapportés en France montrent que l'émergence du CVA6 a été contemporaine de l'augmentation de formes atypiques de la maladie, une tendance aussi observée à l'échelle mondiale. En conclusion, nos travaux montrent l'intérêt de l'analyse des génomes complets d'EV pour comparer les variations moléculaires et retracer l'histoire évolutive et épidémique des virus réémergents.

Mots clés : Entérovirus A, maladie PMB, séquençage du génome complet par NGS, recombinaison génétique, réémergence virale

Abstract

Enteroviruses (EVs) are enteric viruses assigned to the Picornaviridae family and classified into four taxonomic species (A to D). Symptomatic EV infections can be associated with diseases of the nervous system, lung, heart, muscle, and skin. Hand-foot-and-mouth disease (HFMD) is characterized by a rash and oral ulcerations in children under 5 years. Enterovirus A71 (EVA71) and coxsackievirus A6 (CVA6) are the two most frequent EV types of species A reported in HFMD cases. In France, EVA71 was associated with an increasing number of neurological diseases since 2016, and CVA6 was associated with regular HFMD outbreaks. The main aim of the thesis is to investigate and compare the epidemic reemergences of these two viruses by using whole-genome analysis. The outbreak of neurological diseases in 2016 was associated with the virus C1v2015 assigned to the EVA71 subgenogroup C1, which emerged in 2010. This virus has a chimeric genome characterized by multiple recombination events. Compared with the genomes of the earlier C1 viruses, the C1v2015 genome displays characteristic changes within epitopes exposed at the capsid surface. The recombination event that changed in 2013 the 3Dpol gene occurred shortly before the epidemic spread in Europe in 2015. To investigate CVA6, we designed a whole-genome amplification technique and used high throughput sequencing to determine viral genomes in buccal specimens collected in France between 2010 and 2018. We did not find major variations in structural genes, but we identified five recombinant forms not previously reported by the study of the 3Dpol gene. Paralleling the worldwide shifts, the clinical and epidemiological features of HFMD cases reported in France indicated the epidemic reemergence of CVA6 was contemporaneous of the increasing frequency of an atypical disease. To conclude, our data highlight the value of whole-genome analysis to compare molecular variations and trace the evolutionary and epidemic histories of reemerging enteroviruses.

Keywords : Enterovirus species A, whole genome sequencing by NGS, genetic recombination, viral reemergence