

# THÈSE

en vue de l'obtention du : **DOCTORAT**

Centre de Recherche : Biotechnologies Végétales et Microbiennes, Biodiversité et Environnement

Structure de Recherche : Équipe de Microbiologie et Biologie Moléculaire

Discipline : Biologie

Spécialité : Virologie et Epidémiologie Moléculaire

*Présentée et Soutenue le : 13 /11/2023*

*par :*

***Sanae LEMRABET***

## **Profil épidémiologique et virologique des paralysies flasques aigües chez les enfants au Maroc**

### **Devant le JURY :**

Youssef BAKRI	PES, Université Mohammed V, Faculté des Sciences, Rabat.	Président/ Rapporteur
Bouchra BELKADI	PES, Université Mohammed V, Faculté des Sciences, Rabat.	Rapportrice/Examinatrice
Abdellah NAYA	PES, Université Hassan II, Faculté des Sciences Ain Chock, Casa.	Rapporteur/Examinateur
Hicham EL ANNAZ	PES, Université Mohammed V, Faculté de Médecine et de Pharmacie.	Examinateur
Leila BENBACIR	Experte, Unité de recherche médicale et biologie moléculaire - CNESTEN	Invitée
Hicham OUMZIL	Expert, Université Mohammed V, Faculté de Médecine et de Pharmacie.	Co-Encadrant
Abdelkarim FILALI MALTOUF	Expert, Académie Hassan II des Sciences et Techniques de Rabat	Co-Directeur de thèse
Leila MEDRAOUI	PH, Université Mohammed V, Faculté des Sciences, Rabat.	Directrice de thèse

**Année Universitaire : 2023 - 24**

# Dédicace

**A la mémoire de mon cher père,**  
*un homme extraordinaire dont l'amour et le soutien inconditionnels ont été les fondations de ma réussite. Que tu sois dans un lieu de paix, sache que ton impact positif sur ma vie perdurera éternellement.*

**A ma merveilleuse mère,**  
*une source infinie d'amour, de soutien et de force. Ton dévouement et ta bienveillance inconditionnels ont façonné la personne que je suis aujourd'hui.*

**A ma chère belle-mère,**  
*Je tiens à exprimer ma reconnaissance d'avoir une belle-mère aussi merveilleuse que vous. Votre gentillesse, votre soutien et votre présence dans ma vie ont été une véritable bénédiction.*

**A mon partenaire de vie,**  
*Tu es bien plus qu'un conjoint, tu es mon meilleur ami, mon confident et mon soutien inébranlable. Tu as été mon pilier tout au long de ce parcours, avec ta présence tu as rendu ce voyage plus significatif et moins solitaire. Je te dédie cette reconnaissance pour tout ce que tu es et tout ce que tu fais.*

**A mes chers enfants : Med Taha et Abderrahmane,**  
*Vous êtes ma plus grande source d'inspiration, ma motivation incessante et ma raison de persévérer dans toutes les facettes de ma vie, y compris mes études. Je veux que vous sachiez que vous êtes ma priorité absolue et je dédie ce travail à vous, en espérant qu'elle serve d'inspiration pour vous montrer que tout est possible avec détermination, travail acharné et passion.*

**A mes sœurs bien-aimées,**  
*Vous êtes des personnes exceptionnelles qui ont apporté tant de joie, de soutien et de bonheur dans ma vie. je suis profondément reconnaissante de vous avoir à mes côtés.*

**A ma très chère amie Imane Chaoui,**  
*Tu as toujours été présente et tu m'as soutenue d'une manière si extraordinaire. Ta générosité, ton écoute bienveillante et ton soutien inébranlable ont été un cadeau précieux dans ma vie.*

**A mes chères nièces et adorables neveux**

**A ma belle-famille**

**A mes collègues de travail et chers amis**

# Remerciements

*Je tiens à remercier très chaleureusement **Mr Abdelkarim FILALI-MALTOUF**, je vous exprime ma profonde gratitude pour tout ce que vous avez fait pour moi. Je suis honoré(e) d'avoir eu l'opportunité de travailler sous votre supervision. Et je présente ma gratitude à **Mme Leila MEDRAOUI**, Professeur Habilitée, pour avoir accepté d'être mon encadrante pendant les deux dernières années de mes études doctorales et pour m'avoir apporté toute l'aide possible afin que la transition se fasse en douceur. Je vous remercie pour votre clairvoyance, vos conseils, votre compréhension et pour avoir mis à ma disposition tous les outils et ressources nécessaires à la réalisation de mon projet de thèse.*

*A **Mr Hicham OUMZIL**, Professeur Assistant, je souhaite exprimer ma profonde gratitude et mes sincères remerciements pour votre accompagnement précieux tout au long de ma thèse. Votre expertise, votre dévouement et votre soutien inestimable ont été essentiels à la réussite de mon parcours de recherche.*

*Je tiens également à remercier tous les membres de jury qui ont accepté d'évaluer mon projet de thèse :*

*Je remercie **Mr Youssef BAKRI**, Professeur de l'Enseignement Supérieur, pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de présider le jury de ma thèse, ainsi que pour le temps et l'attention qu'il a consacrés à la lecture de mon travail en tant que rapporteur.*

*J'adresse mes plus sincères remerciements à **Mme Bouchra BELKADI**, Professeur de l'Enseignement Supérieur, pour son rôle crucial en tant que rapporteur de ma thèse, dont ses précieuses observations et conseils ont grandement contribué à enrichir mon travail.*

*Je remercie chaleureusement **Mr Abdellah NAYA**, Professeur de l'Enseignement Supérieur, pour son rôle de rapporteur, dont l'expertise et les conseils avisés ont été déterminants pour la qualité de ma thèse.*

*Je tiens à exprimer ma sincère gratitude à **Mr Hicham EL ANNAZ**, Professeur de l'Enseignement Supérieur, pour le temps, l'attention et l'expertise consacrés à l'évaluation de ma thèse.*

*Je remercie vivement **Mme Leila BENBACER** d'avoir accepté de juger ce modeste travail et dont les insights précieux ont grandement enrichi ma réflexion et mon travail de recherche.*

*Je remercie **Pr Maël BESSAUD** et **Pr Marie-Line JOFFRET** pour m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire à l'Institut Pasteur de Paris. Votre hospitalité et votre ouverture m'ont permis de vivre une expérience enrichissante et formatrice.*

## Résumé

Le poliovirus, responsable de la poliomyélite, est le mieux étudié parmi les entérovirus, et sa circulation est actuellement restreinte à l'Afghanistan et au Pakistan. Le programme de la surveillance de la paralysie flasque aiguë (PFA) est crucial dans l'initiative mondiale d'éradication de la poliomyélite. Au Maroc, le Laboratoire National de Référence pour la Poliomyélite a contribué de manière significative en isolant et identifiant les souches de poliovirus dans le cadre de ce programme. Cependant, avec l'éradication du poliovirus, les entérovirus non poliomyélitiques (EVNP) sont devenus une cause de PFA.

La recherche du poliovirus et des EVNP se fait traditionnellement par culture cellulaire, un processus long pouvant prendre jusqu'à trois semaines. Pour surmonter cette limitation, une méthode de détection moléculaire par PCR en temps réel a été évaluée. Cette approche a montré une sensibilité plus élevée, confirmée par un taux d'entérovirus de 13% dans les cas de PFA considérés négatifs par culture cellulaire.

L'étude moléculaire des entérovirus a révélé des résultats significatifs. Le typage a été réalisé par séquençage Sanger, identifiant plusieurs sous-types tels que A, B et C montrant une diversité importante soulignant l'importance du typage moléculaire pour comprendre la diversité des entérovirus. Les Echovirus et les Coxsackievirus étaient les plus dominants parmi les entérovirus chez les cas de PFA. L'analyse moléculaire a également révélé des cas de poliomyélite paralytique associée au vaccin polio oral, soulignant la nécessité de surveiller les conséquences indésirables du vaccin. L'utilisation de la technologie de séquençage NGS a montré une plus grande spécificité et sensibilité par rapport au séquençage Sanger.

En conclusion, la mise en place d'un système de surveillance des entérovirus, associés à des maladies graves ou dans l'environnement, est essentielle pour comprendre leur épidémiologie et distribution géographique, permettant une riposte adéquate en cas d'épidémies.

**Mots-clés:** *Paralysie flasque aiguë- Poliomyélite - Poliovirus- -Entérovirus – Typage moléculaire*

## Abstract

The poliovirus, responsible for poliomyelitis, is the most studied among enteroviruses, and its circulation is currently restricted to Afghanistan and Pakistan. The Acute Flaccid Paralysis (AFP) surveillance program is crucial in the global initiative to eradicate poliomyelitis. In Morocco, the National Reference Laboratory for Poliomyelitis has significantly contributed by isolating and identifying poliovirus strains as part of this program. However, with the eradication of the poliovirus, non-polio enteroviruses (NPEVs) have become a cause of AFP. The search for poliovirus and NPEVs is traditionally done through cell culture, a lengthy process that can take up to three weeks. To overcome this limitation, a real-time PCR molecular detection method has been evaluated. This approach has shown higher sensitivity, confirmed by a 13% enterovirus rate in cases of AFP considered negative by cell culture.

The molecular study of enteroviruses revealed significant results. Typing was carried out by Sanger sequencing, identifying several subtypes such as A, B and C showing significant diversity underlining the importance of molecular typing for understanding enterovirus diversity. Echoviruses and Coxsackieviruses were the most dominant enteroviruses in AFP cases. Molecular analysis also revealed cases of paralytic poliomyelitis associated with the oral polio vaccine, underlining the need to monitor the adverse consequences of the vaccine. The use of Next-Generation Sequencing (NGS) technology has shown greater specificity and sensitivity compared to Sanger sequencing.

In conclusion, establishing a surveillance system for enteroviruses, associated with severe diseases or in the environment, is essential to understand their epidemiology and geographical distribution, enabling an appropriate response in the event of epidemics.

**Keywords:** *Acute flaccid paralysis – Poliomyelitis – Poliovirus – Enterovirus– Molecular typing*

## Avant-Propos

Le travail présenté dans cette thèse a été réalisé au sein du laboratoire national de référence de la poliomyélite (LNRP) – Institut National d’Hygiène (INH) dans le cadre de la surveillance virologique des paralysies flasque aigües : stratégie principale du programme mondial de l’éradication du poliovirus. Une partie de ce travail a été menée en collaboration avec le centre collaborateur OMS de l’Institut Pasteur de Paris.

Ces travaux de recherche ont été dirigés par le Pr Hicham Oumzil au niveau du LNRP, et par le Pr Abdelkarim Filali-Maltouf et le Pr Leila Medraoui à la faculté des sciences – Université Mohammed V de Rabat.



## Productions Scientifiques

### Publications scientifiques dans des revues internationales à comité de lecture :

**Lemrabet Sanae**, Filali-Maltouf Abdelkarim, Medraoui Leila and Oumzil Hicham. Eradicating polio: progress affected by Covid 19 pandemic. *International Journal of Biology Pharmacy and Allied Sciences*. July, 2023, 12(7): 3408-3415.

**Sanae Lemrabet**, Maria El Qazoui, Lalla Meryem Idrissi Azzouzi, Ahmed Rguig, Malika Elhamdaoui, Abdelkarim Filali-Maltouf, Leila Medraoui and Hicham Oumzil. Evaluation of the Acute Flaccid Paralysis Virological Surveillance System in Polio-Free Morocco, 2010–2018. *Advances in public health*. Volume 2022 | Article ID 2729937.

**Lemrabet Sanae**, Zaher Houda, RaissNoureddin, Annan Azzeddine , Idrissi Azzouzi Lalla Meriem, Filali-Maltouf Abdelkarim, Medraoui Leila and Oumzil Hicham. Detection of Enteroviruses and Adenovirus by Real-time polymerase chain reaction in cell culture negative stool specimens of patients with acute flaccid paralysis in Morocco. *International Journal of Biology Pharmacy and allied sciences*; April, 2023, 12(4): 1596-1602.

**SanaeLemrabet**, Marie-Line Joffret, Houda Zaher, Noureddine Raiss, Azzeddine Annan, Abdelkarim Filali-Maltouf, Leila Medraoui, MaelBessaud and Hicham Oumzil. Molecular detection and identification of Enteroviruses from children with acute flaccid paralysis in Morocco 2017-2021. Draft d'article

**Sanae Lemrabet**, Abdelkarim Filali-Maltouf, Leila Medraoui, Hicham Oumzil. A case of vaccine associated paralytic poliomyelitis in an immunocompetent child in Morocco. Article accepté pour publication à la revue *Journal of medical, pharmaceutical and allied sciences (Volume Septembre- Octobre 2023)*.

### Participation aux travaux de recherche au niveau du département de virologie

Raiss Noureddine, Annan Azzeddine, **Lemrabet Sanae**, Medraoui Leila, Oumzil Hicham. C316N Polymorphism associated with resistance to HCV polymerase NS5B in treatment-naïve patient with chronic hepatitis C. *Journal of Medical Pharmaceutical and Allied Sciences*, 2023, 12(2), pp. 5736–5739.

Raiss Noureddine, Annan Azzeddine, **Lemrabet Sanae**, Touria Benamar, Medraoui Leila, Oumzil Hicham. NS5B sequencing to assess the most popular HCV genotypes in Moroccan patients. *International Journal of Biology Pharmacy and Allied Sciences*. July, 2023, 12(7): 3310-3324.

Annan, Azzeddine; Raiss, Noureddine; **Lemrabet, Sanae** ; Elomari, Nouzha; Elharti, Elmir; Filali-Maltouf, Abdelkarim; Medraoui, Leila; Oumzil, Hicham. Proposal of Pharmacophore Model for HIV Reverse Transcriptase Inhibitors: combined Mutational Effect analysis, molecular dynamics, Molecular Docking, and Pharmacophore Modeling Study. Article soumis à la revue : *International Journal of immunopathology and pharmacology*.

### **CommunicationOrale**

**Lemrabet Sanae**, Zaher Houda, RaissNoureddine, Annan Azzeddine, Filali Maltouf Abdelkarim, Medraoui Leila And Oumzil Hicham. Détection des Entérovirus par PCR en temps réel dans les selles négatifs par culture cellulaire chez les enfants de moins de 15 ans atteints de paralysie flasque aiguë au Maroc. *Doctoriales FSR 2022 du 18 au 22 Juillet 2022*.

### **Communications affichées**

**Sanae Lemrabet**, Imane Belbacha, Jihane Zerrouk, Rajae Mengad, Ouafae Bennani, Mustapha Berrada, Imad Cherkaoui, Leila Medraoui, Hicham Oumzil. Immune response to hepatitis b vaccine in a group of health care workers at the National Institute of Hygiene, Rabat, Morocco. P3.199, Sexually Transmitted Infections 2017;93:A167. World STI & HIV in Rio de Janeiro Brazil from July 9 to 12, 2017.

**Sanae Lemrabet**, Meriem Idrissi ; Maria Elqazoui, Abdelkarim Filali Maltouf, Hicham Oumzil. Place des Enterovirus non polio dans l'investigation des paralysies flasques aiguës chez les enfants de moins de 15 ans au Maroc ». *XXIIe Journées Francophones de Virologie 2 et 3 Avril 2020 à l'Institut Pasteur de Paris*.

**Sanae Lemrabet**, Houda Zaher, Noureddine Raiss, Azzeddine Annan, Abdelkarim Filali Maltouf, Leila Medraoui, Hicham Oumzil. Détection d'Enterovirus et d'Adénovirus par la PCR en temps réel dans les échantillons de selles négatifs en culture cellulaire chez des enfants de moins de 15 ans atteints de paralysie flasque aiguë au Maroc. *XXIIIe Journées Francophones de Virologie 11 et 12 Avril 2022 à l'Université de Strasbourg (participation en ligne)*

**Sanae Lemrabet**, Marie-Line Joffret, Houda Zaher, Noureddine Raiss, Azzeddine Annan, Abdelkarim Filali-Maltouf, Leila Medraoui, Mael Bessaud and Hicham Oumzil. Characterization of non-polio Enteroviruses isolates from acute flaccid paralysis children in Morocco reflects rare genotypes: EV-A76, EV-B74 and EV-C99. *Doctoriales FSR 2023 du 15 au 20 Mai 2023*

## Abréviations

ADN	: Acide Désoxyribonucléique
ADNc	: Acide Désoxyribonucléique complémentaire
AG	: Appareil de golgi
Arg-Gly-Asp	: Arginyl-Glycyl-L-Aspartic acid
ARN	: Acide ribonucléique
Caco-2	: lignée cellulaire tumorale humaine d'origine intestinale isolée d'un adénocarcinome colique
CAH	: conjonctivite aiguë hémorragique
CAR	: Coxsackievirus-Adenovirus Receptor
CD	: Clusters de differentiation
Covid 19	: Maladie due au SARS-CoV-2 (Coronavirus disease)
CRE	: Élément cis-régulateur
CV	: Coxsackievirus
DAF	: Decay Accelerating factor
DELM	: Direction d'Epidémiologie et de Lutte contre les Maladies
ECP	: Effet cytopathique
EMRO	: Bureau régional de l'OMS pour la Méditerranée orientale (Eastern Mediterranean Regional office)
EVs	: Entérovirus
HeLa	: Première lignée cellulaire immortelle d'origine humaine
ICAM-1	: Inter Cellular Adhesion Molecule
IMEP	: Initiative mondiale de l'éradication de la poliomyélite
INH	: Institut National d'Hygiène
IRES	: site interne d'entrée des ribosomes (Internal Ribosome Entry Site)
L20B	: lignée cellulaire d'origine murine génétiquement modifiée spécifique aux Poliovirus
LDLR	: Low Density Lipoprotein Receptor
LNRP	: Laboratoire National de Référence de la poliomyélite
MEV	: Maladies évitables par la vaccination

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> Arbre phylogénétique de la région du gène P1 présentant les différentes espèces d'Entérovirus (EVs) et de Rhinovirus (RVs) aujourd'hui reconnues. ....	5
<b>Figure 2:</b> Organisation et caractéristiques de la capsidie des EVs (23). ....	6
<b>Figure 3:</b> Représentation schématique de l'organisation du génome des EVs. ....	7
<b>Figure 4:</b> Représentation schématique du génome des EVs, des produits polyprotéiques et de leurs principales fonctions. ....	9
<b>Figure 5:</b> Cycle de réplication des EVs dans la cellule cible permissive ....	11
<b>Figure 6:</b> Structures schématiques des molécules de la superfamille des immunoglobulines (IgSF), molécules d'adhésion intercellulaire (ICAM-1), le récepteur du Coxsackievirus-Adénovirus (CAR) et le récepteur du poliovirus (PVR) ....	13
<b>Figure 7:</b> Schéma du mécanisme de la réplication des EVs.....	15
<b>Figure 8:</b> Effet cytopathique d'un Poliovirus sur les cellules RD et L20B. ....	19
<b>Figure 9:</b> Mutations ponctuelles chez les virus à ARN ....	20
<b>Figure 10:</b> Mécanismes de recombinaison des virus à ARN ....	21
<b>Figure 11:</b> Modes de transmission des EVs ....	23
<b>Figure 12:</b> Physiopathologie de l'infection par les EVs ....	24
<b>Figure 13:</b> Angine vésiculeuse ou herpangine ....	24
<b>Figure 14:</b> Lésions caractéristiques du Syndrome main-bouche-pieds ....	25
<b>Figure 15:</b> épanchement sanguin au niveau des conjonctives lors d'une conjonctivite hémorragique aigüe.....	25
<b>Figure 16:</b> Images de personnes présentant des séquelles de la poliomyélite.....	27
<b>Figure 17:</b> stèle égyptienne de -1400 années avant notre ère l'attitude caractéristique d'un scribe présentant une atrophie asymétrique d'un membre inférieur probablement à cause de la polio. ....	29
<b>Figure18:</b> Situation de la poliomyélite dans le monde en 1988 et en 2023 ....	30
<b>Figure 19:</b> Structure hiérarchisée du réseau mondial de laboratoires pour la poliomyélite ....	32
<b>Figure 20:</b> Régions de l'OMS ayant une certification "sans polio" ou "polio-free" ....	33

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Différents récepteurs cellulaires des EVs .....	12
<b>Tableau 2</b> : Comparaison entre le vaccin antipoliomyélitique oral VPO et inactivé VPI.....	35
<b>Tableau 3</b> : Composition du Phosphate Buffer Saline pour la préparation des suspensions de selles	114
<b>Tableau 4</b> : Composition du milieu de croissance et du milieu de maintien pour la culture cellulaire.	115
<b>Tableau 5</b> : Préparation des réactifs pour extraction de l'ARN viral.....	119
<b>Tableau 6</b> : Séquences des primers et de la sonde utilisés pour la rRT-PCR détection des EVs par amplification de la région 5'UTR.....	120
<b>Tableau 7</b> : Séquences des primers et de la sonde utilisés pour la rRT-PCR de la région 5'UTR et la VP1 .....	121
<b>Tableau 8</b> : Séquences des primers utilisés pour la Nested PCR de la VP1 .....	122
<b>Tableau 9</b> : Séquences des primers utilisés pour la PCR1 des EVs pour NGS.....	123
<b>Tableau 10</b> : Séquences des primers utilisés pour la nested PCR du génome entier des EVs .....	124

## Table des matières

Dédicace.....	i
Remerciements.....	ii
Résumé.....	iv
Abstract.....	v
Avant-Propos .....	vi
Productions Scientifiques.....	vii
Abréviations.....	ix
Liste des figures .....	x
Liste des tableaux.....	xi
<b>Introduction</b> .....	1
Chapitre I : Synthèse Bibliographique .....	4
I- Caractéristiques virologiques des Entérovirus .....	5
1- Structure des Entérovirus.....	5
1-1- La capside .....	6
1-2- Le génome viral .....	7
2- Multiplication des EVs .....	10
2-1- Entrée dans la cellule et décapsidation .....	11
2-2- Récepteurs cellulaires .....	12
2-3- Traduction et Réplication.....	14
2-4- Maturation et libération des virions .....	16
2-5- Maturation et libération des virions .....	16
3- Effets de la multiplication virale sur la cellule hôte .....	17
3-1- Inhibition de la synthèse des protéines cellulaires .....	17
3-2- Inhibition de la synthèse de l'ARN cellulaire .....	17
3-3- Modulation de la maturation et de l'excrétion protéique.....	17
3-4- Effet cytopathique.....	18
3-5- Apoptose .....	18
II- Evolution et diversité génétique.....	19
1-Les mutations.....	19
2- Recombinaison .....	20

III- Epidémiologie des EVs .....	22
1- Mode de transmission.....	22
2- Physiopathologie des EVs .....	23
2-1- Les atteintes cutanéomuqueuses .....	24
2-2- Les atteintes musculaires.....	25
2-3 les atteintes neurologiques.....	26
IV- Paralysie flasque aiguë et Poliomyélite .....	28
1-Définitions .....	28
1-1-Paralysie flasque aiguë .....	28
1-2-Poliomyélite .....	28
2- Histoire de la maladie .....	28
3- L'Initiative Mondiale pour l'Eradication de la Poliomyélite .....	30
3-1- Définition .....	30
3-2- Surveillance des PFA .....	31
3-3- Réseau mondial des laboratoires de la poliomyélite (RMPL).....	31
3-4-La certification «sans poliomyélite» .....	32
4- Agent causal de la poliomyélite.....	33
4-1- Le Poliovirus sauvage .....	33
4-2- Le Poliovirus dérivé du vaccin.....	34
5- Vaccination anti polio.....	34
5-1- Le vaccin anti-poliomyélitique inactivé (VPI) :.....	34
5-2- Le vaccin anti-poliomyélitique oral (VPO) :.....	35
V-Diagnostic des infections à poliovirus et EVs non poliomyélitiques .....	36
1- Isolement du virus par culture cellulaire .....	36
2- Sérologie.....	36
3- Diagnostic moléculaire .....	37
Chapitre 2 : Fondements Éthiques et Méthodologiques .....	39
I. Considération éthique .....	40
II. Population de l'étude.....	40
III. Conception de l'étude.....	41
VI. Approche méthodologique: .....	41
1- Extraction de l'ARN et de l'ADN viraux .....	41
2- Détection Moléculaire des Entérovirus et Adénovirus .....	42

3- Séquençage Sanger des Entérovirus .....	42
4- Séquençage Haut Débit (NGS) .....	43
5- Analyse des séquences .....	43
Chapite 3: Etude épidémiologique des paralysies flasques aigües .....	44
I- Etat des lieux de la poliomyélite et impact de la Covid19 sur l'éradication du poliovirus..	45
II-Evaluation de la surveillance virologique des paralysies flasques aigües au Maroc .....	55
Chapitre 4: Profil virologique des paralysies flasques aigües chez les enfants au Maroc .....	63
I- Détection des EVs et Adénovirus dans les selles négatifs en culture cellulaire par PCR en temps réel.....	64
II- Typage moléculaire des EVs détectés chez les enfants atteints de PFA.....	73
Discussion Générale.....	87
Conclusion Et Perspectives.....	101
Références Bibliographiques .....	103
Annexes.....	113

## Introduction

La paralysie flasque aiguë (PFA) est un syndrome clinique complexe avec un large éventail d'étiologies potentielles, caractérisée par l'apparition rapide d'une faiblesse, y compris une faiblesse des muscles de la respiration et de la déglutition, évoluant vers une sévérité maximale en quelques jours à quelques semaines chez les enfants de moins de 15 ans(1). Un diagnostic précis de la cause de la PFA a des implications majeures pour la thérapie et le pronostic. Des agents infectieux et non infectieux (par exemple, des troubles métaboliques), des traumatismes, la toxicité des métaux ainsi que des conditions auto-immunes post-infectieuses comme le syndrome de Guillain-Barré peuvent être impliqués dans l'apparition de ce syndrome chez les patients(2). Ces paralysies peuvent se rétablir ou engendrer une paralysie résiduelle. Parmi les agents infectieux détectés chez les patients présentant une paralysie résiduelle : des virus de différentes familles, tels que les Entérovirus, les Adénovirus, les Flavivirus, les Herpès virus, le virus de la rage et certains Arbovirus, ont été fréquemment isolés à partir d'échantillons de selles de patients atteints de PFA(3). Les différents cas de PFA causés par divers agents ne peuvent pas être distingués uniquement par leurs symptômes cliniques.

La poliomyélite, également connue sous le nom de polio, est reconnue comme la cause principale de la PFA. Cette maladie virale, causée par le poliovirus, infecte principalement les enfants de moins de 5 ans et provoque une paralysie dans un cas sur 200 à 1 000 infections(4). L'infection se fait principalement par voie fécale-orale, généralement chez des enfants sensibles qui n'ont pas été préalablement ou suffisamment vaccinés avec des vaccins antipoliomyélitiques puissants et efficaces, et qui vivent dans des zones où l'hygiène et l'assainissement sont insuffisants. Près de subissent une répllication virale dans le système nerveux central, ce qui peut entraîner des lésions neuronales permanentes et la paralysie(5).

L'effort mondial d'éradication de la poliomyélite est devenu la plus grande initiative de santé publique qui pourrait potentiellement reproduire l'histoire à succès de l'éradication de la variole. Le chemin vers l'éradication de la poliomyélite a été beaucoup plus long et beaucoup plus difficile que prévu depuis le lancement, en 1988, de l'initiative mondiale de l'éradication de la poliomyélite (IMEP), mais les progrès réalisés et l'infrastructure construite pour l'éradication de la poliomyélite informent et soutiennent déjà d'autres initiatives mondiales de lutte contre les maladies infectieuses, en particulier les maladies évitables par la vaccination(MEV)(6). Les cas de poliomyélite ont diminué de 380.000 en 1988 à seulement 6 cas en 2023 (5 cas en

Afghanistan et 1 cas au Pakistan) correspondant au poliovirus de type 1 puisque le poliovirus de type 2 a été déclaré éradiqué en 2015, et le poliovirus de type 3 a été déclaré éradiqué en 2019(7).

La principale stratégie d'éradication de la poliomyélite se base sur une utilisation intensive des vaccins. Deux types sont disponibles : le vaccin antipoliomyélique inactivé (VPI), développé par Salk en 1955(8), et le vaccin antipoliomyélique oral vivant et atténué (VPO), créé par Sabin et ses collègues(9) quelques années seulement après l'introduction du VPI. En parallèle, la surveillance de la PFA constitue une stratégie clé pour l'éradication de la poliomyélite, car c'est un instrument sensible permettant de détecter les cas potentiels de poliomyélite et les infections par le poliovirus.

Au fil des ans, les cas de poliomyélite ont été réduits dans le monde entier et éradiqués dans une grande partie du monde. Cette avancée a engendré une nouvelle réalité, l'émergence des EVs non poliomyélitiques (EVNP). Ces derniers ont été reconnus comme l'une des causes majeures associées à la PFA(10). Dans les pays ne disposant pas de systèmes spécifiques de surveillance des EVs, la surveillance de la PFA est donc la seule source de données permettant de mieux comprendre la circulation des EVNP.

En réponse au potentiel des EVs à causer des maladies neurologiques graves, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a pris en compte les EVNP dans son plan directeur pour la recherche et le développement pour la première fois en 2018 (10), faisant des EVNP un problème majeur de santé à prioriser au cours de l'investigation des cas de PFA.

En effet, le typage des EVs est essentiel pour identifier les souches à l'origine d'infections graves, comprendre les modes de circulation et de transmission spécifiques à chaque génotype, ainsi que détecter de nouveaux variants épidémiques. En général, l'identification des EVs repose sur la culture cellulaire et la séroneutralisation des isolats viraux à l'aide d'antisérums polyclonaux(10). Or, aucune lignée cellulaire ne permet d'isoler tous les types d'EVs. De plus, la culture cellulaire est une technique lourde, coûteuse et qui manque de sensibilité(11,12). Pour résoudre ces problèmes, des solutions alternatives basées sur la biologie moléculaire ont été proposées pour typage rapide des infections à EVs.

Le principal obstacle aux techniques de typage moléculaire est la nécessité de travailler à partir de virus isolés en culture cellulaire malgré ses inconvénients de manque de sensibilité et de lourdeur de réalisation. Cependant, l'amplification directe à partir d'échantillons cliniques ou environnementaux a été proposée par des auteurs(12,13). Cela permet une réponse d'être résolutive très rapidement face à des cas cliniques évocateurs d'une PFA d'éthologie virale.

La région 5'UTR du génome viral s'avère être le choix le plus efficace lors de la détection moléculaire de tous les sérotypes d'EVs dans les échantillons cliniques, en raison de sa haute conservation entre les diverses souches d'EVs. Cependant, malgré son efficacité pour la détection, la région 5'UTR se révèle inadéquate pour le typage des différents sérotypes d'EVs(14). La protéine de capsid VP1 abrite les principaux sites antigéniques, présentant une corrélation absolue entre le sérotype et le génotype dans cette région génomique spécifique. Cette caractéristique a été efficacement utilisée pour l'identification moléculaire des EVs et les études épidémiologiques. Le séquençage nucléotidique du gène VP1, suivi de l'analyse phylogénétique des séquences, représente la méthode privilégiée pour distinguer les variations au sein d'un sérotype et pour confirmer les liens entre les isolats lors d'une épidémie(15–17). Ce travail de thèse a pour principal objet la caractérisation moléculaire des EVs chez les enfants de moins de 15 ans atteints de PFA au Maroc directement à partir des prélèvements cliniques des patients. Il constitue la première contribution référencée sur l'épidémiologie moléculaire des EVs dans un programme de santé public au Maroc.

Pour atteindre cet objectif, ce travail de thèse s'est déroulé en deux parties :

La première partie porte sur une évaluation du programme de l'éradication de la poliomyélite et les défis rencontrés pendant la pandémie de Covid 19, puis une évaluation du système de surveillance virologique des PFA au Maroc par analyse des différents indicateurs de performance de ce système.

Dans la seconde partie de notre étude, nous avons évalué l'approche classique de détection des entérovirus basée sur la culture cellulaire, par l'adoption d'une approche moléculaire de détection directe des EVs par rRT-PCR à partir des échantillons de selles des enfants présentant une PFA. L'approche adoptée visait également à évaluer l'implication des Adénovirus dans l'apparition du syndrome de paralysie flasque aiguë.

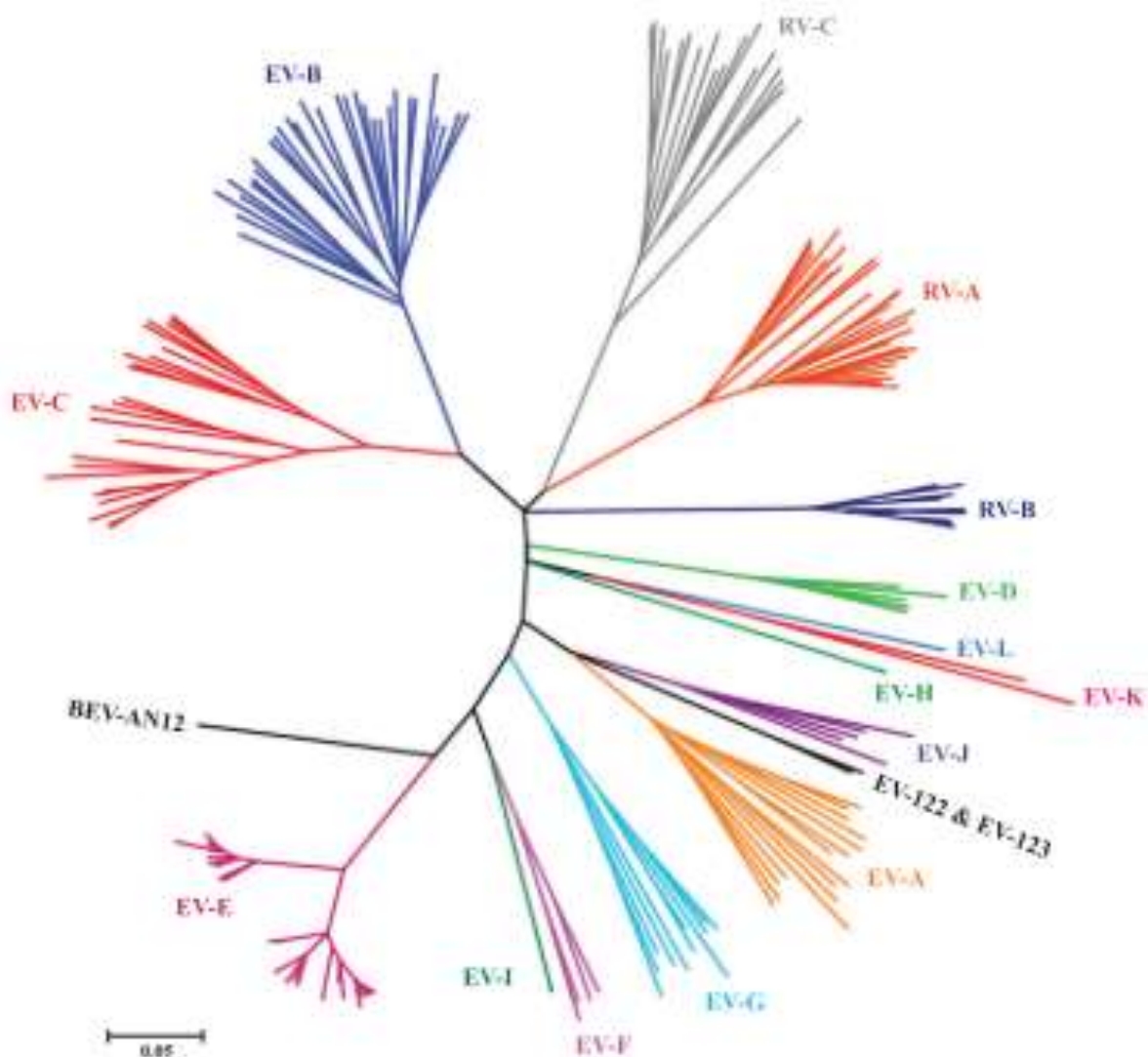
Les EVs détectés via la culture cellulaire ont été ensuite soumis au typage moléculaire par séquençage Sanger de la région non codante 5'UTR ainsi que d'une partie du gène codant pour la protéine VP1. Et le séquençage complet du génome de ces EVs a été réalisé en utilisant le séquençage haut débit (NGS).

## **Chapitre I : Synthèse Bibliographique**

## I- Caractéristiques virologiques des Entérovirus

### 1. Structure des Entérovirus

Les Entérovirus (EVs) appartiennent à la famille des Picornaviridae (Figure 1). Ce sont des virus de 30 nm de diamètre contenant de l'ARN positif simple brin dans des capsides à symétrie icosaédrique(18). Comme les EVs ne sont pas enveloppés, ils sont relativement résistants à l'action des agents physico-chimiques, peuvent survivre dans des environnements acides et peuvent traverser l'estomac, jouant ainsi un rôle important dans la transmission féco-orale. Ils sont détruits par les agents oxydants (hypochlorite de sodium), le formol 0,3%, la bétapropionlactone, la lumière ultraviolette(11).

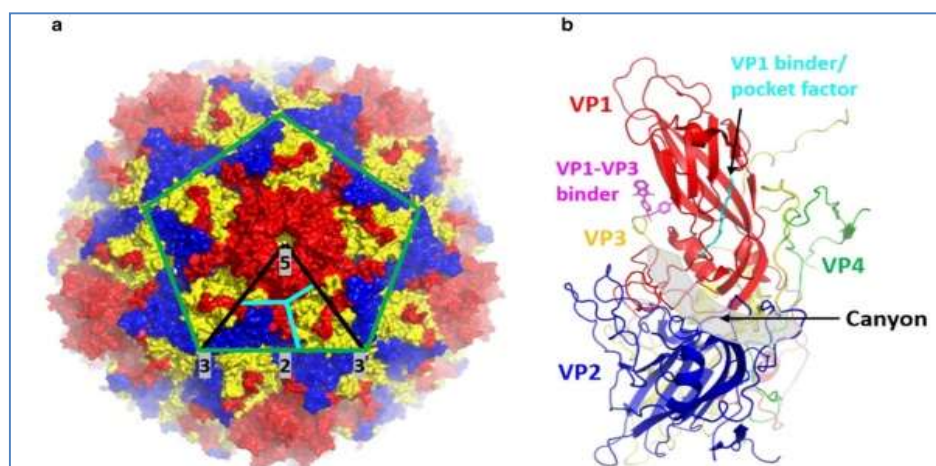


**Figure 1:** Arbre phylogénétique de la région du gène P1 présentant les différentes espèces d'Entérovirus (EVs) et de Rhinovirus (RVs) aujourd'hui reconnues (<https://www.picornaviridae.com/ensavirinae/enterovirus/enterovirus.htm>).

## 1-1- La capsid

Les EVs ont une capsid icosaédrique composée de 60 protomères. Chacun de ces protomères est formé à partir d'une copie de chaque protéine structurale VP1, VP2, VP3, VP4 (Figure 2). Les protéines VP1, VP2 et VP3 sont exposées en surface et ont une structure tridimensionnelle serrée, tandis que VP4 réside dans la capsid, assurant une stabilité structurelle et une interaction avec le génome viral(19).

VP1, VP2 et VP3 forment une dépression entre elles appelée "canyon". Ce canyon renferme les sites d'attache aux récepteurs cellulaires de la superfamille des immunoglobulines pour certains EVs comme le Poliovirus (PV) (20) ou le Coxsackievirus A-21 (CV-A21) (21). Chez d'autres EVs (l'EV-A71 par exemple), le "canyon" n'est pas assez profond pour assurer la fixation du récepteur. D'autres récepteurs comme le ligand 1 de la P-sélectine, peuvent se lier aux deux régions formées par la VP2 et la VP3. L'extrémité sud du 'canyon' est formée par une boucle particulièrement proéminente de la VP2 appelée 'puff', tandis que la boucle de VP3 forme une protrusion importante appelée 'knob'(22).



**Figure 2:** Organisation et caractéristiques de la capsid des EVs (23).

**a:** Vue d'ensemble de la capsid de l'EVs comprenant les VP1 (rouge), VP2 (bleu) et VP3 (jaune). Les lignes vertes indiquent les limites d'un pentamère. Les lignes noires indiquent la sous-unité à symétrie icosaédrique. Les chiffres cinq, trois et deux correspondent aux axes de symétrie et sont marqués et surlignés en gris. Les lignes cyan séparent VP1 (rouge), VP2 (bleu) et VP3 (jaune). Les flèches noires indiquent la région du canyon et la région de l'axe fvefold formée par fve VP1.

**b:** Protomère canonique de l'EVs formé par VP1 (rouge), VP2 (bleu), VP3 (jaune) et VP4 (vert). Le canyon est mis en évidence en gris transparent et est indiqué par une flèche noire. Composés antiviraux qui se lient aux deux poches de liaison que sont la poche hydrophobe de VP1 et la poche interprotomère de VP1-VP3 sont représentés en cyan et magenta, respectivement.

La capsid a un rôle important dans la protection du génome viral contre les nucléases environnementales, et la reconnaissance des récepteurs cellulaires spécifiques via le 'canyon' et les boucles VP2 et VP3 pour assurer la libération du génome viral dans la cellule hôte. Elle

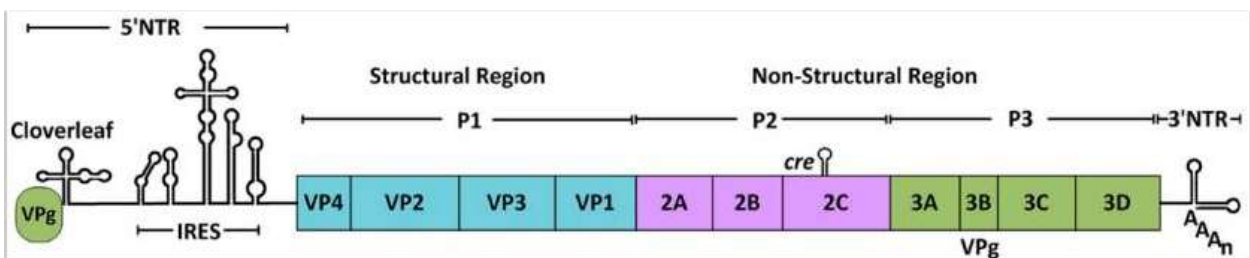
porte des déterminants antigéniques à sa surface et contient des informations pour l'encapsidation du génome viral et la maturation des virions (19).

## 1-2- Le génome viral

Le génome des EVs est une molécule d'ARN simple brin, linéaire, de polarité positive d'environ 7500 nucléotides. Dès sa libération dans la cellule, le génome viral est directement traduit en protéines virales nécessaires à la réplication lui assurant sa propriété infectieuse. Cette molécule d'ARN comprend un large cadre ouvert de lecture (ORF : Open reading Frame) entouré de deux régions non codantes : 5' NC et 3'NC(19,23). La région 3' qui est d'environ 300 nt de long est polyadénylé, et l'extrémité 5' qui est d'environ 800 nt a une structure secondaire complexe et est liée de façon covalente à une petite protéine virale VPg (virion protein genome) (Figure 3).

La traduction du cadre de lecture aboutit à une seule polyprotéine qui subit une série de clivages par protéolyse en trois précurseurs : P1, P2 et P3. P1 est le précurseur des quatre protéines structurales VP4, VP2, VP3 et VP1 qui forment la capsid virale.

Le premier génome de picornavirus qui a été cloné et séquencé a été celui du PV-1(25). L'organisation génomique alors décrite s'est avérée par la suite extrêmement conservée au sein de cette famille virale, avec cependant une grande variabilité dans la taille du génome et les séquences nucléotidiques (19).



**Figure3:** Représentation schématique de l'organisation du génome des EVs. La région codante est entourée de 2 régions non codantes en 5' et 3' impliquées dans la régulation de la réplication et de la traduction. Elle code, elle-même, des protéines structurales (les 4 protéines de capsid) et des protéines non structurales (protéases et polymérase) (19).

### 1-2-1 Région 5' non codante (5'NC)

La région 5'NC des EVs est particulièrement plus longue que celle des autres picornavirus et elle est caractérisée par la présence de 6 structures secondaires (I à VI), formées par les repliements de l'ARN en tige boucle « stem-loop ». La première tige boucle en forme de feuille de trèfle « cloverleaf » a un rôle important en association avec la région 3'NC dans la réplication et la traduction du génome viral (26).

Les domaines II à VI englobent une structure appelée IRES (Internal Ribosome Entry Site) qui contrôle la traduction du génome en une polyprotéine du fait de l'absence de coiffe en 5'. La structure primaire des 650 premiers nucléotides de la région 5' NC est hautement conservée parmi les EVs, ce qui confère à cette région une grande importance dans le diagnostic moléculaire (27). L'IRES, spécifiquement le domaine V de cette structure, porte les trois mutations impliquées dans l'atténuation du pouvoir répliquatif du Poliovirus contenu dans le vaccin (mutations en position 480, 481 et 472 dans le génome Sabin de types 1, 2, et 3, respectivement) (28).

### 1.2.2. Région 3' non codante (3'NC)

La région 3'NC est courte et porte en son extrémité une queue polyadénylée de taille variable. Cette région a une structure secondaire complexe (3 domaines en « épingle à cheveux ») et est impliquée dans l'initiation de la réplication de l'ARN viral (29). La région 3'NC forme un élément hautement conservé au sein de la même espèce d'EVs qui agit en cis et qui contrôle la polyadénylation des brins positifs nouvellement synthétisés et l'initiation de la synthèse du brin négatif.

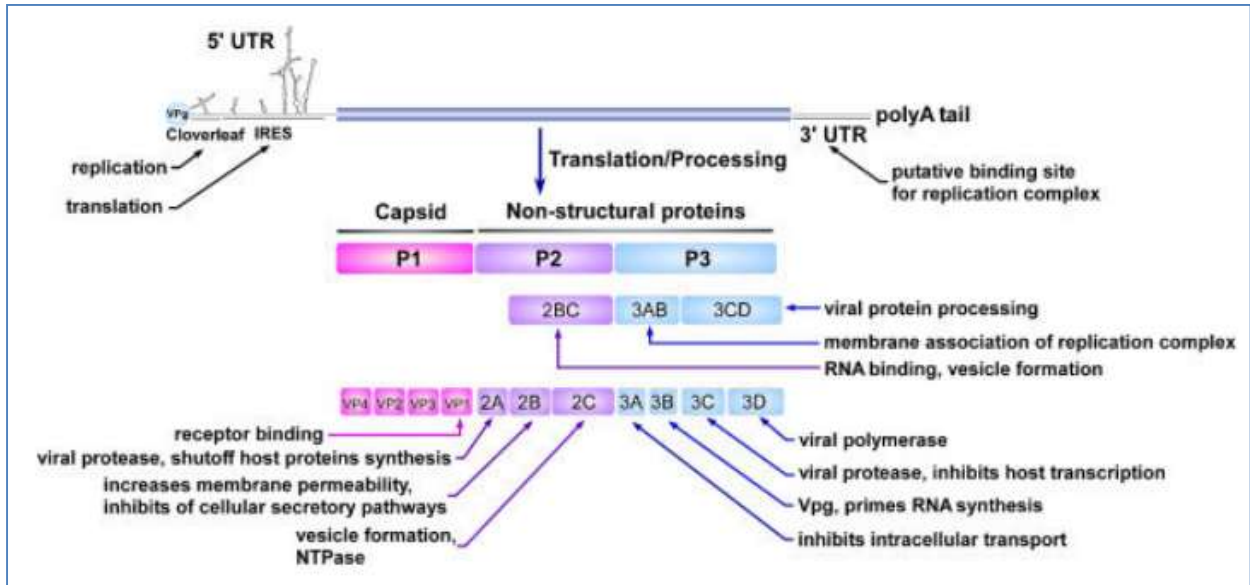
Elle forme également des repliements complexes en tige boucle. Deux tiges boucles appelées X et Y dont la longueur est de 8 et 12 paires de bases respectivement, forment des interactions en « pseudoknot » ou « kissing » (30).

### 1.2.3. Cadre ouvert de lecture (ORF)

La région codante consiste en un long cadre de lecture ouvert qui code une polyprotéine d'environ 250 kDa de taille relativement conservée chez les espèces d'EVs. Cette polyprotéine est clivée en 3 régions P1, P2 et P3 (figure 4).

- La région P1 code les 4 protéines structurales composant la capsid : VP4, VP2, VP3, VP1.
- La région P2 code 3 protéines non structurales : 2A<sup>pro</sup>, 2B, 2C.
- La région P3 code 4 protéines non structurales : 3A, 3B (VPg), 3C<sup>pro</sup>, 3D<sup>pol</sup>.
- Les protéines 2A<sup>pro</sup> et 3C<sup>pro</sup> sont des protéases qui vont cliver la polyprotéine virale en plusieurs sites pendant la traduction. 2A<sup>pro</sup> inhibe la synthèse des protéines de la cellule hôte et régule la traduction et la réplication du génome (31).
- Les protéines 2B, 2C sont des protéines hydrophobes qui intègrent les membranes des organites cellulaires et altèrent leur composition. Il s'agit d'un rôle important car il permet de fabriquer des structures vésiculaires, à partir de la membrane intracellulaire, nécessaires à la réplication et également de produire des viroporines. Par un mécanisme concentration-dépendant, elles altèrent la perméabilité de la membrane plasmique provoquant sa déstabilisation et par conséquent la lyse de la cellule. Elles entraînent une diminution de la

concentration de calcium dans le complexe formé par l'appareil de golgi (AG) et par le réticulum endoplasmique (ER) résultant un blocage du transport des protéines. Cette capacité à abaisser les niveaux de calcium est également responsable de ses propriétés anti-apoptotiques (32).



**Figure 4:** Représentation schématique du génome des EVs, des produits polyprotéiques et de leurs principales fonctions. Les 11 polypeptides matures sont représentés, ainsi que les trois principaux intermédiaires de clivage. Les principales fonctions biologiques sont indiquées pour chaque polypeptide (49).

UTR, région non traduite ; IRES, site interne d'entrée des ribosomes ; VPg, protéine virale liée au génome.

- Les protéines 2A<sup>pro</sup> et 3C<sup>pro</sup> sont des protéases qui vont cliver la polyprotéine virale en plusieurs sites pendant la traduction. 2A<sup>pro</sup> inhibe la synthèse des protéines de la cellule hôte et régule la traduction et la réplication du génome(31).
- Les protéines 2B, 2C sont des protéines hydrophobes qui intègrent les membranes des organites cellulaires et altèrent leur composition. Il s'agit d'un rôle important car il permet de fabriquer des structures vésiculaires, à partir de la membrane intracellulaire, nécessaires à la réplication et également de produire des viroporines. Par un mécanisme concentration-dépendant, elles altèrent la perméabilité de la membrane plasmique provoquant sa déstabilisation et par conséquent la lyse de la cellule. Elles entraînent une diminution de la concentration de calcium dans le complexe formé par l'appareil de golgi (AG) et par le réticulum endoplasmique (ER) résultant un blocage du transport des protéines. Cette capacité à abaisser les niveaux de calcium est également responsable de ses propriétés anti-apoptotiques (32).

- La protéine 3A est une protéine hydrophobe qui a pour rôle l'inhibition de la sécrétion de protéines cellulaires et l'interruption des transports entre l'ER et l'AG.
- La protéine 3D<sup>pol</sup> est une ARN polymérase ARN-dépendante responsable de la synthèse des ARN positifs et négatifs. Elle est impliquée dans la réaction d'uridylation de la protéine VPg qui, sous cette forme, sert comme amorce pour la réplication de l'ARN. C'est aussi un acteur majeur de la diversité génétique des EVs Vs(33).
- 3B ou VPg est une protéine liée de façon covalente à l'extrémité 5' du génome. Elle est uridyliée en VPg-pU(pU), et, sous cette forme, elle est impliquée dans la réplication du génome viral en servant d'amorce à l'ARN polymérase-ARN dépendante(34).

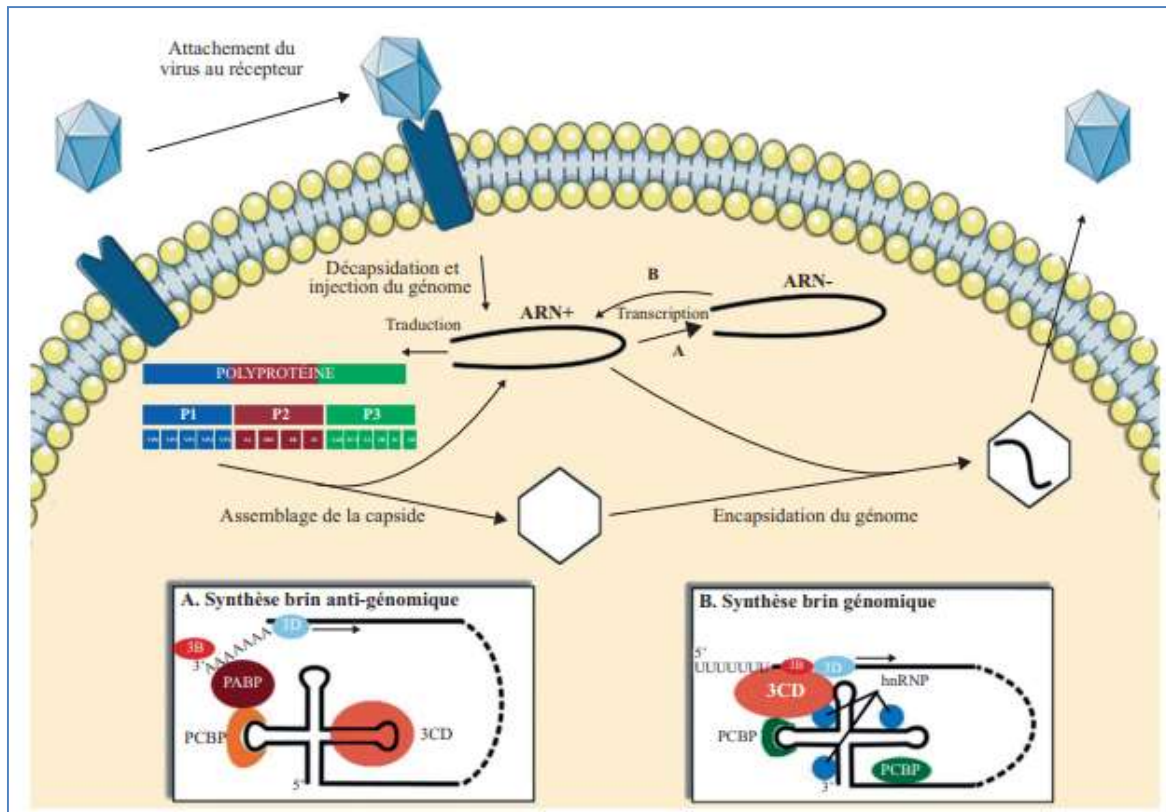
Le cadre ouvert de lecture représente également élément cis-régulateur (séquence CRE ou Oril) de la réplication du génome viral. Cet élément forme une structure secondaire d'ARN en tête d'épingle « hairpin » située dans la région codante 2C. Il sert de matrice pour l'uridylation de la protéine VPg(28, 29).

## **2- Multiplication des EVs**

La réplication virale se produit dans le cytoplasme de la cellule hôte. La durée du cycle de réplication est estimée à 5-10 heures, selon la virulence de la souche, la température, le pH, la cellule hôte et la multiplicité de l'infection. Le cycle de réplication de l'EVs se termine par la lyse cellulaire et la libération de nouveaux virions.

Le cycle infectieux peut être décrit en plusieurs phases successives (figure5) :

- L'attachement du virus à l'aide d'un ou plusieurs récepteurs à la surface cellulaire. La nature de ces récepteurs détermine en partie les hôtes, les tissus et les types de cellules que les EVs peuvent infecter(35).
- L'entrée du virion par la formation d'un pore membranaire suivie par
- la libération du génome après décapsidation.
- La traduction directe de l'ARN génomique (ARN+) en protéines virales par un mécanisme impliquant la fixation de la sous-unité 40 S du ribosome à la structure de l'IRES du virus (36).
- La réplication du génome des EVs qui nécessite la synthèse d'un intermédiaire de réplication: ARN- ou brin anti-génomique.



**Figure 5:** Cycle de réplication des EVs dans la cellule cible permissive (36)

Les EVs se fixent à leurs récepteurs membranaires puis le matériel génétique est libéré dans le cytoplasme après décapsidation. L'ARN positif libre est traduit en une polyprotéine, qui sera maturée pour donner les protéines structurales et non structurales permettant, avec l'aide de facteurs cellulaires, la transcription d'un brin antigénomique (ARN-) intermédiaire de réplication (A). Le brin néo-synthétisé (ARN-) servira ensuite de matrice pour la génération de brin génomique (ARN+) en quantité importante (B). L'ARN+ sera ensuite encapsidé, puis libéré pour donner un virion infectieux, capable d'infecter une nouvelle cellule cible.

## 2-1- Entrée dans la cellule et décapsidation

La première étape est l'adsorption du virus à la surface de la membrane cellulaire. Les particules virales s'attachent à un récepteur membranaire spécifique. Ce récepteur est une protéine appartenant à la famille des immunoglobulines. C'est au niveau d'un domaine extracellulaire du récepteur que se fixe le virus. Cela entraîne des changements de conformation, avec des modifications des protéines VP1 et VP4 permettant ainsi la décapsidation à l'intérieur de la cellule infectée. Le virus est internalisé dans la cellule par endocytose (37). Les voies d'endocytose incluent : a- la macropinocytose, b- la voie dépendante de la clathrine et de la dynamine, c- la voie indépendante de la clathrine et de la dynamine, d- la voie dépendante des radeaux lipidiques seuls, e- la voie dépendante des radeaux lipidiques, de la cavéoline et de la dynamine (caveolar), f- la voie dépendante des radeaux lipidiques et de la dynamine. L'activation d'une voie par rapport à une autre dépend à la fois du virus, du récepteur et du type cellulaire.

## 2-2- Récepteurs cellulaires

Ces récepteurs appartiennent à la superfamille des immunoglobulines. Ce sont des glycoprotéines transmembranaires constituées d'une répétition de 2 à 5 domaines extracellulaires de type immunoglobuline dont le domaine N-terminal libre, le plus éloigné de la cellule et donc le plus exposé (domaine D1) contient le site de reconnaissance du virus, et interagit avec l'EVs en s'insérant dans le canyon (37).

On distingue deux catégories de facteurs d'attachement pour les EVs : les récepteurs et les co-récepteurs (Tableau1).

**Tableau 1 : Différents récepteurs cellulaires des EVs**

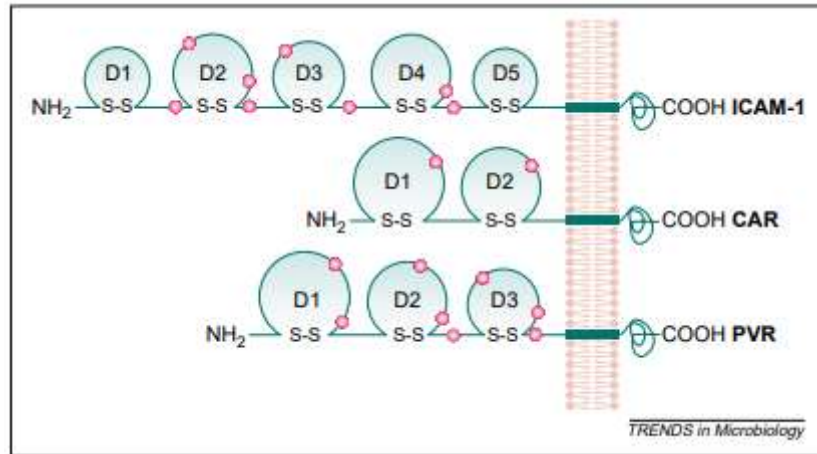
Nature	Récepteur	Virus	Co-récepteur connu
Famille immunoglobulines	PVR (CD155)	PV 1-3	
	ICAM-1 (CD54)	CV A11, 13, 18, 20 CV A21	DAF (CD55)
	CAR	CV B1, 3, 5 CV B2, 4	DAF
Facteur du complément	DAF	E3, 6, 7, 12, 13, 20, 21, 24, 29, 33 E11, 25, 30 EV70	$\alpha$ V $\beta$ 3
Intégrines	$\alpha$ V $\beta$ 3	E11, 25, 30 CV A9, E7, 9, 32	
	$\alpha$ V $\beta$ 6	CV A9	$\alpha$ V $\beta$ 3
	$\alpha$ 2 $\beta$ 1	E1, 8	
Effecteur voie endolysosomale	SCARB2	CV A7, 14, 16 EV A71	PSGL1
Molécule d'adhésion cellulaire	PSGL1	EV A71	SCARB2

### 2-2-1 Les récepteurs principaux des EV

On distingue trois récepteurs principaux pour les EVs: Poliovirus receptor (PVR), Inter Cellular AdhesionMolecule 1 (ICAM-1) et Coxsackievirus-AdenovirusReceptor(CAR) (figure6).

- **PVR ou CD155** : récepteur spécifique des trois génotypes de poliovirus PV1, PV2 et PV3. Il est exprimé dans les cellules du système nerveux central (SNC).
- **ICAM-1 ou CD54** : récepteur de Coxsackievirus A21, A18 et A13. Il est aussi le récepteur cellulaire pour la majorité des sérotypes de rhinovirus. ICAM-1 est exprimé à la surface de nombreux tissus, notamment l'épithélium nasal et de nombreuses localisations du SNC.

- **CAR** : récepteur commun des Coxsackievirus B et des Adénovirus. CAR est exprimé dans de nombreux tissus. Il n'est pas exprimé à la partie apicale des cellules épithéliales mais est un composant des jonctions serrées (TJ) au niveau des épithéliums digestif et respiratoire.



**Figure 6:** Structures schématiques des molécules de la superfamille des immunoglobulines (IgSF) molécules d'adhésion intercellulaire (ICAM-1), le récepteur du Coxsackievirus-Adénovirus (CAR) et le récepteur du poliovirus (PVR) utilisés comme récepteurs par les rhinovirus humains et le Coxsackievirus A21 (CAV21) ; les virus coxsackie B (CVB) et les poliovirus (PV), respectivement.(37)

### 2-2-2 Les récepteurs alternatifs

- Récepteur « ScavengerReceptor Class B Member 2 » (SCARB-2 ou LIMP2 ou CD36L2) : Cette protéine se trouve principalement dans la membrane des lysosomes et joue un rôle important dans la stabilité de ses structures. Ce récepteur est utilisé par l'EV-A71 et les Coxsackievirus A7, A14 et A16(38).
- Récepteur « P-selectinglycoprotein ligand-1 » (PSGL1 ou CD162) : il s'agit d'une protéine membranaire leucocytaire de type sialomucine exprimée sous forme d'un homodimère de sous-unités liées par des disulfures et qui peut se lier à trois sélectines différentes (P, E et L). C'est le récepteur spécifique des EV-A71(5)
- Récepteurs de la famille des intégrines : Ces récepteurs se caractérisent par la reconnaissance du motif tripeptidique Arg-Gly-Asp (RGD) sur la capsid virale.
- « LowDensityLipoproteinReceptor » (LDLR) : Ils ont été identifiés comme des récepteurs pour le groupe mineur des rhinovirus humains (Rh).
- Sulfates d'héparane et acides sialiques : Les sulfates d'héparane sont des polysaccharides de répartition ubiquitaire(40). Les acides sialiques sont des sucres chargés négativement présents à la surface de la plupart des cellules (41).

### 2-2-3- Les co-recepteurs

Pour certains EVs, un seul récepteur est suffisant pour assurer leur entrée à l'intérieur de la cellule ; pour d'autres, la présence d'un corécepteur est essentielle.

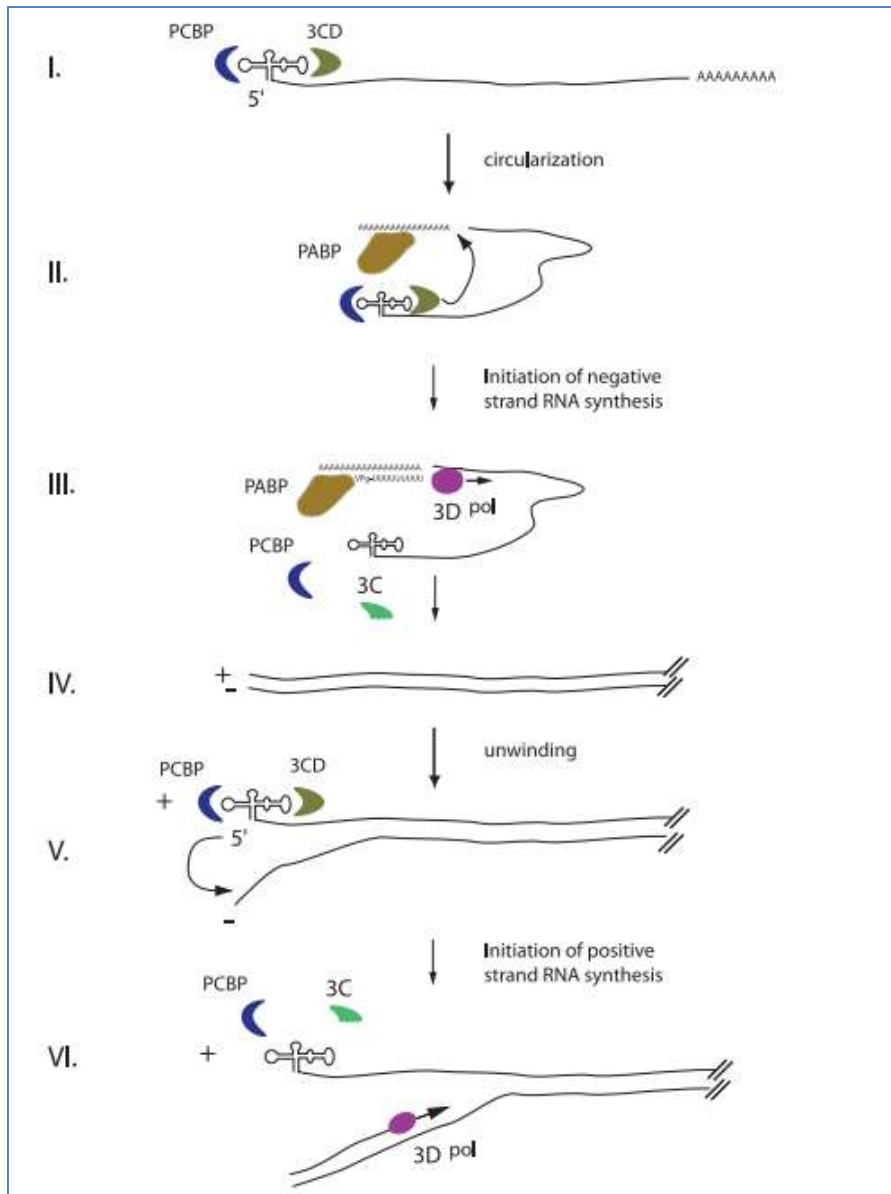
« DecayAccelerating factor » (DAF ou CD 55) est un récepteur pour un grand nombre de génotype d'EVs(40,41). La fixation du virus seulement au DAF ne permet pas son internalisation mais elle provoque un réarrangement de l'actine qui entraîne le mouvement du virus jusqu'à la jonction serrée où il peut se fixer à son récepteur principal tel PVR, ICAM-1 ou CAR et pénétrer ensuite au sein de la cellule. DAF est considéré alors comme co-récepteur.

### 2-3- Traduction et Réplication

Une fois l'ARN viral est libéré dans le cytoplasme cellulaire, il est traduit en protéines virales après clivage de VPg par une protéase cellulaire. Par ailleurs, aucune protéine virale n'est importée dans la cellule via la capsid virale (42). Comme tous les picornavirus, les EVs synthétisent leurs protéines par traduction d'une longue phase ouverte de lecture (ORF) suivie de clivages protéolytiques séquentiels des polyprotéines virale ainsi produites. L'ARN viral est différent de l'ARNm cellulaire puisque ce premier ne possède pas de coiffe en 5' pour initier la traduction. C'est pourquoi un autre mécanisme est utilisé, et qui dépend du recrutement de la sous-unité 40S du ribosome cellulaire au niveau de l'IRES dans la région 5'(43).

Des études ont montré que la traduction et la réplication ne peuvent pas avoir lieu simultanément. Ainsi, lorsque des protéines virales sont produites en quantité suffisante, un phénomène de commutation va survenir(44).

La réplication met en jeu plusieurs éléments : la structure en feuille de trèfle située à l'extrémité 5', le CRE situé dans l'ORF, la région 3'NC et la queue poly-adénylée (Figure 7).



**Figure 7: Schéma du mécanisme de la réplication des EVs.** La synthèse du brin négatif est initiée par la circularisation du génome à brin positif via un pont protéine-protéine par l'interaction du complexe ternaire à l'extrémité 5' (3CD et PCBP liés à la structure en trèfle) et PABP lié à la queue 3'-poly(A) (I. + II.). Le VPg-pUpU médié par la CRE agit comme amorce de la réaction et la polymérase 3D synthétise le nouveau brin négatif (III.), ce qui donne un intermédiaire double brin (RF) (IV.). L'intermédiaire ARN duplex positif-négatif se déroule, de sorte que la structure en trèfle à l'extrémité 5' du brin positif peut se former. Le 3CD et le PCBP se lient au trèfle pour former un complexe ternaire qui, à son tour, va initier la synthèse du brin positif à l'extrémité 3' du brin négatif (V.). L'amorce, VPg-pUpU, est recrutée et se lie à l'AA 39-terminal du brin négatif, et le nouveau brin positif est synthétisé par la polymérase, 3D (VI)(45).

- La structure en feuille de trèfle ou «cloverleaf» forme un complexe contenant la PCBP (Poly(rC)-binding protein) et l'ARN polymérase.
- CRE sert de matrice à l'uridylation de la protéine VPg par 3D.

- La protéine VPg poly-uridylée s'hybride à la queue poly-A située en région 3'NC, servant ainsi d'amorce à la synthèse du brin complémentaire.
- L'ARN bicaténaire formé est ensuite séparé par la protéine virale 2C.
- A partir de l'ARN négatif, VPg-pUpU est recrutée à l'extrémité 3', servant ainsi d'amorce à la réplication des ARN viraux de polarité positive par la polymérase 3D.

#### **2-4- Maturation et libération des virions**

La capsidite des EVs est constituée de 60 protomères, composés chacun d'un exemplaire des protéines structurales VP1, VP2, VP3 et VP4. Après la libération du précurseur P1 wjb la protéase 2A, des motifs reconnus par la protéase 3CDpro aux jonctions interprotéiques permettent la séparation des protéines VP0, VP3 et VP1. Ces 3 protéines de capsidite s'associent pour former une protomère (5S) et 5 protomères forment un pentamère de 14S. 14 pentamères s'associent pour former la capsidite. Le virion immature est ensuite formé par association directe de la capsidite avec l'ARN viral ou bien par formation d'une capsidite vide dans laquelle l'ARN viral est injecté(46). Une étape de maturation au cours de laquelle VP0 est clivée en VP4 et VP2 permet de produire le virion mature. L'encapsidation de l'ARN génomique est un processus spécifique ne ciblant que les ARN viraux positifs.

Les particules virales s'accumulent dans le cytoplasme sous forme de vésicules. Deux mécanismes de libérations existent : un mode lytique dans lequel la lyse des cellules infectées entraîne la libération des virions, l'autre mode se ferait à partir d'un détournement des mécanismes d'autophagie par les EV permettant l'inclusion des virions dans des vésicules autophagiques qui seraient secondairement expulsées(46).

#### **2-5- Maturation et libération des virions**

La capsidite des EVs est constituée de 60 protomères, composés chacun d'un exemplaire des protéines structurales VP1, VP2, VP3 et VP4. Après que la protéase 2A a libéré les composants du précurseur P1, des motifs spécifiques situés aux jonctions entre les protéines sont reconnus par la protéase 3CDpro, ce qui entraîne la dissociation des protéines VP0, VP3 et VP1. Ces trois protéines de capsidite se regroupent pour former une unité de base appelée protomère de 5S, et cinq de ces protomères s'assemblent pour former un pentamère de 14S. Les pentamères s'associent pour former la structure capsidique complète du virus. Dans le contexte des picornavirus, la formation du virion immature se produit généralement par l'association directe de la capsidite avec l'ARN viral lors de l'assemblage(46). Une étape de maturation au cours de laquelle VP0 est clivée en VP4 et VP2 permet de produire le virion mature.

Les particules virales s'accumulent dans le cytoplasme sous forme de vésicules, et il existe deux mécanismes de libération : l'un implique une rupture des cellules infectées, libérant ainsi les virions par un processus lytique, tandis que l'autre mécanisme s'opère en détournant les processus d'autophagie par les EVs, permettant ainsi l'incorporation des virions dans des vésicules autophagiques qui sont ensuite expulsées (47).

### **3- Effets de la multiplication virale sur la cellule hôte**

#### **3-1- Inhibition de la synthèse des protéines cellulaires**

L'infection des cellules par les EV a pour résultat l'inhibition de la synthèse des protéines cellulaires. Ce phénomène est appelé : mécanisme de « shut-off ». La protéase 2A bloque l'initiation de la traduction cellulaire en clivant les facteurs d'initiation eIF4GI et II. De plus, la déphosphorylation de la protéine cellulaire 4E-BP1 pourrait également contribuer à l'inhibition de la traduction des protéines cellulaires(48).

#### **3-2- Inhibition de la synthèse de l'ARN cellulaire**

L'infection des cellules par des EV entraîne l'inhibition de la transcription de l'ARN cellulaire. Les trois classes d'ARN polymérase ADN-dépendantes (ARN polymérase I, II et III) qui catalysent cette réaction sont actives enzymatiquement dans les cellules infectées, ce qui suggère que les protéines accessoires peuvent être la cible de l'inhibition de la transcription cellulaire. En effet, la protéase 3C clive les facteurs de transcription TFIID et TFIIC. Comme le cycle viral est entièrement cytoplasmique et la transcription cellulaire a lieu dans le noyau, seul le précurseur 3CD entre dans le noyau et libère, par un mécanisme autocatalytique, la protéase 3C qui inactive alors les facteurs de transcription. De plus, le 3Cpro interfère avec l'expression de l'hôte en inhibant la traduction et la transcription afin de fournir des ressources supplémentaires pour la réplication virale.

#### **3-3- Modulation de la maturation et de l'excrétion protéique.**

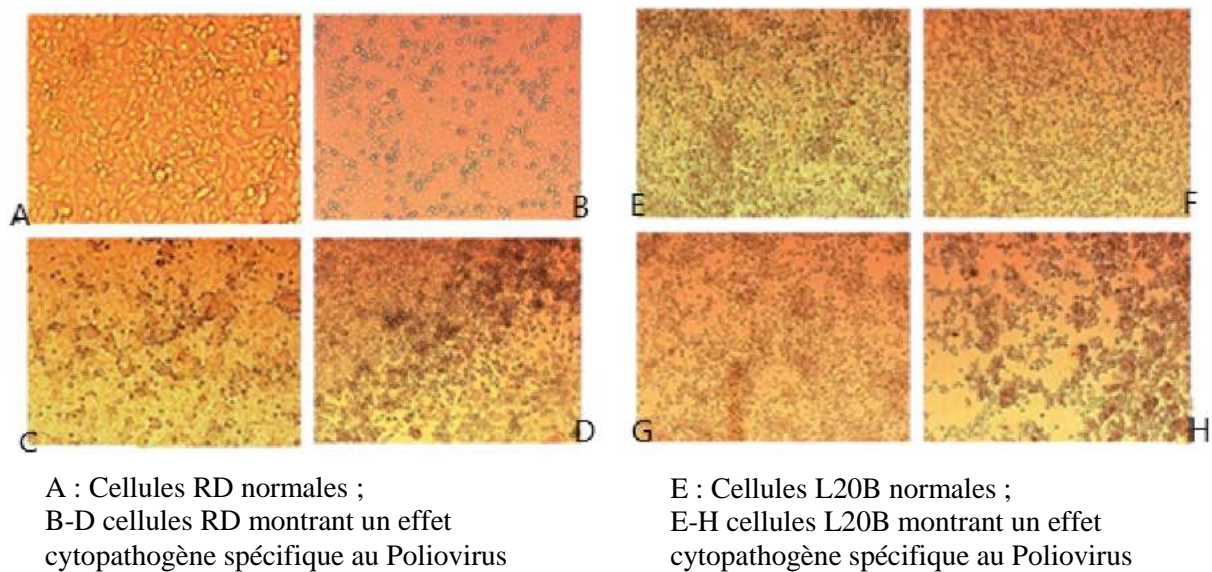
Le système de maturation et de sécrétion protéique est perturbé par les protéines 3A, 2B et le précurseur 2BC. Elles se fixent par l'intermédiaire de domaines hydrophobes, dans les membranes lipidiques des organites, bloquant ainsi le transport entre l'ER et l'AG(48). De plus, la protéine 2B forme une « viroporine » en s'intégrant dans les membranes des organites, modifiant ainsi la perméabilité de la membrane. Cette perméabilisation entraîne la diminution de la concentration de Calcium dans l'ER et l'AG par un efflux de  $Ca^{2+}$ . La perturbation de l'homéostasie du  $Ca^{2+}$  induit un blocage du transport des protéines de l'ER vers l'AG(49).

### 3-4- Effet cytopathique

Les cellules infectées par les EVs développent d'importants changements morphologiques caractéristiques appelés effets cytopathiques (ECP). Ces changements qui apparaissent dès les premières heures de l'infection incluent une condensation de la chromatine, une déformation du noyau, la prolifération des vésicules membranaires par accumulation des lipides dont la synthèse est stimulée, le changement de la perméabilité membranaire suite à l'augmentation de la concentration intracellulaire de  $Ca^{2+}$ , la fuite des composants intracellulaires et le dessèchement de la cellule entière. En microscopie optique, les changements morphologiques les plus notables sont l'arrondissement et le détachement des cellules adhérentes du récipient de culture cellulaire (Figure 8). Ces modifications pourraient favoriser la lyse cellulaire et faciliter la propagation virale (50). La cause de ces ECP demeure à ce jour inconnu. L'inhibition de la synthèse des ARN, des ADN et des protéines cellulaires à un stade précoce de l'infection ne contribue pas à l'apparition de ces effets(19).

### 3-5- Apoptose

Les infections à EVs provoquent la mort cellulaire par apoptose. Bien que certaines manifestations de ce processus telles que la condensation de la chromatine et la déformation du noyau soient similaires à celles de l'ECP, l'induction de ces deux phénomènes implique deux voies différentes. L'apoptose est un phénomène d'auto-destruction actif et régulé dont les inducteurs viraux sont les protéines 2Apro et 3Cpro (51). Elle est, en revanche, inhibée par les protéines 2B, 3A et 2BC (52). Des études in vitro ont mis en évidence la capacité du PV et le CV-B3 d'induire l'apoptose sur des lignées de cellules intestinales Caco-2 et des cellules humaines HeLa(53). Par ailleurs, en utilisant un modèle murin de poliomyélite paralytique, il a été démontré que les motoneurons infectés subissaient une apoptose et mouraient(54).



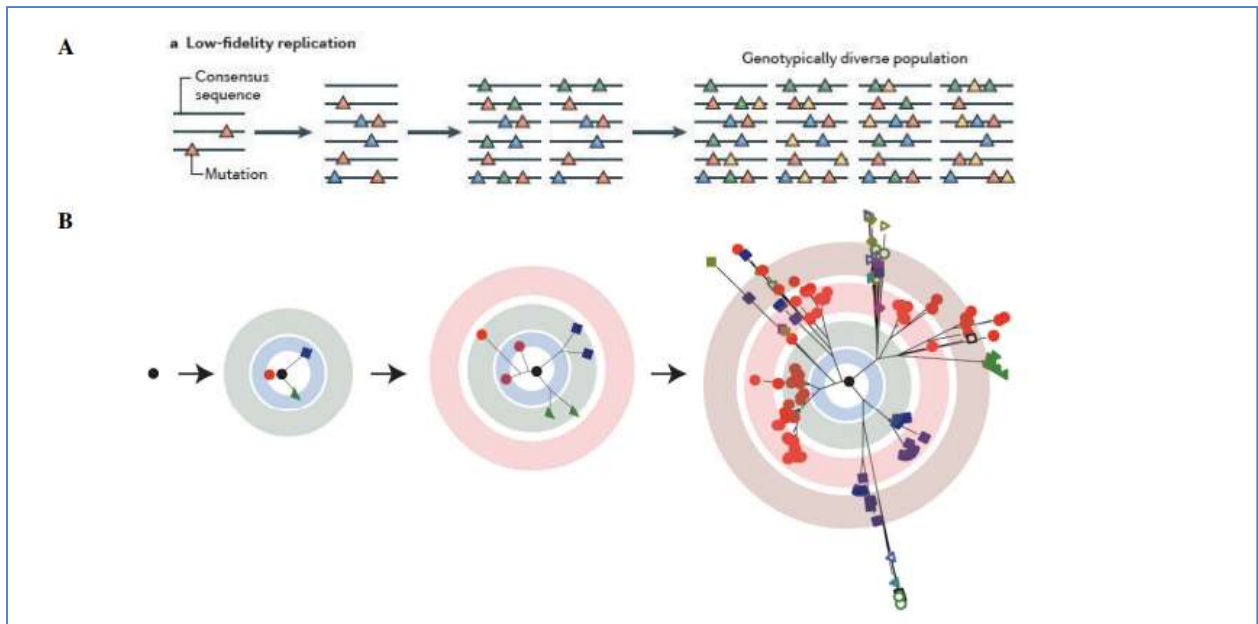
**Figure 8:** Effet cytopathique d'un Poliovirus sur les cellules RD et L20B.

## II- Evolution et diversité génétique

La variabilité génétique des VE est illustrée à la fois par le grand nombre de types distincts et par la diversité des syndromes cliniques associés. Cette diversité est due à deux forces coexistantes : le taux d'erreur élevé de la polymérase virale lors de la réplication du génome viral et la fréquence élevée des événements de recombinaison suite à un échange d'éléments génétiques entre deux virus durant leur réplication à l'intérieur d'une même cellule.

### 1-Les mutations

La nature erronée de l'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp) du virus ARN induit une fréquence de mauvaise incorporation des nucléotides estimée entre  $10^{-3}$  et  $10^{-5}$  mutations par nucléotide, ce qui correspond pour un EV à environ une mutation par cycle de réplication. Ces mutations conduisent à une hétérogénéité génétique de la population virale lors de l'infection, chaque génome différant par des mutations ponctuelles distinctes et créant des "quasi-espèces" (Figure 9). Le grand avantage de cette population composée de divers individus est que certains génomes pourraient être déjà bien adaptés à un certain changement environnemental et seraient alors sélectionnés positivement.



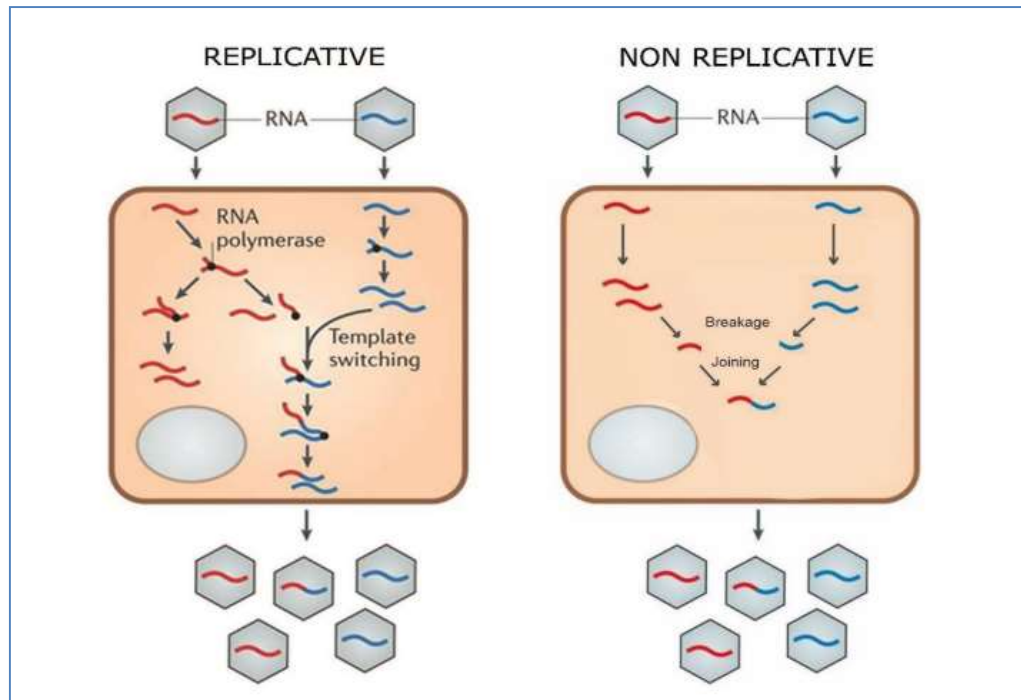
**Figure 9:** Mutations ponctuelles chez les virus à ARN (55)..

**A)** Chaque ligne représente un génome viral. Les mutations acquises lors de chaque cycle de réplication sont représentées par les triangles colorés. Au fur et à mesure des cycles viraux, de nouveaux variants viraux émergent et perdurent selon leur avantage sélectif

**B)** Un virus avec un taux de mutations élevé (centre) peut générer un répertoire important de mutants (branches) au fur et à mesure des générations (chaque cercle représente un cycle de réplication). Chaque branche indique deux variants reliés entre eux par une mutation ponctuelle.

## 2- Recombinaison

Les événements de recombinaison sont particulièrement fréquents dans les EVs, et sont générés par deux mécanismes moléculaires distincts, dont l'importance relative reste incertaine (Figure 10). La recombinaison homologue répliquative, également appelée " copy-choice " ou " template-switching model " est le premier mécanisme bien décrit, dans lequel le template-switching de la RdRp se produit pendant la réplication virale et conduit à des recombinants homologues. Un autre mécanisme alternatif de recombinaison a été récemment découvert et consiste en la coupure et la jonction de fragments d'ARN viral pendant l'infection d'une cellule, créant des recombinants non homologues hébergeant des duplications de séquence aux frontières. Ce processus, appelé "recombinaison non-répliquative", reste à ce jour assez peu clair et les enzymes cellulaires responsables sont encore inconnues.



**Figure 10:** Mécanismes de recombinaison des virus à ARN (56).  
Modèles de recombinaison répllicative (à gauche) et non répllicative (à droite).

Les hotspots de recombinaison se situent le plus souvent aux jonctions P1 (5'UTR-VP4 et VP1-2A), mais on peut également les trouver près de la jonction 3C/3D, à l'intérieur de la 3D ou à l'extrémité de la 2C. Un exemple intéressant et problématique de recombinaison des EV est l'engagement dans la recombinaison des souches vaccinales de poliovirus (souches " Sabin ") avec des membres EV-C non poliovirus co-circulants, conduisant à des épidémies de PV pathogènes dérivés de vaccins (VDPV) et de poliomyélite(57). Alors que la recombinaison intraspécifique est une force motrice de l'évolution des EVs, les événements de recombinaison interspécifiques sont beaucoup moins fréquents parmi les souches en circulation et on pense qu'ils constituent principalement des événements ancestraux. Cependant, la région 5'UTR pourrait constituer une exception car des souches résultant d'échanges supposés de 5'UTR ont été récemment rapportées(43).

### **III- Épidémiologie des EVs**

La distribution des EVs demeure ubiquitaire et globale. L'homme est le seul réservoir des souches d'EVs humaines. Certains sérotypes d'EVs sont plus épidémiques que d'autres. Plusieurs sérotypes peuvent co-circuler pendant une même période et au sein d'une même population. Certains persistent pendant quelques années, d'autres sont plus responsables de cas sporadiques. Certaines souches peuvent survivre sous formes quiescentes pendant une certaine durée selon le degré d'immunisation de la population puis resurgir quelques années plus tard après avoir subi des modifications génétiques.

L'investigation continue des EVs s'inscrit dans une démarche globale de surveillance épidémiologique, de recherche médicale et de prévention, avec pour objectif d'assurer la santé publique en détectant rapidement les épidémies, en comprenant l'évolution génétique des virus, et en développant des stratégies efficaces pour prévenir la résurgence de maladies potentiellement graves spécialement dans les zones déclarées exemptes de poliovirus. En effet, il est pertinent de souligner que le réseau mondial des laboratoires polio (GPLN) a confirmé l'isolement du poliovirus dérivé du vaccin de type 2 (VDPV2) à partir d'échantillons environnementaux collectés entre Février et Mai 2022 à Londres, au Royaume-Uni. Les personnes atteintes d'immunodéficience primaire (DIP) peuvent excréter des poliovirus pendant des périodes prolongées, ce qui pourrait servir de source de transmission cryptique de virus susceptibles de causer des maladies neurologiques. Dans ce contexte, il a été rapporté la détection de VDPV associés à l'immunodéficience (iVDPV) chez deux enfants présentant un DIP asymptomatiques au Royaume-Uni en 2019. Ces cas soulignent l'importance de maintenir une vigilance continue en matière de surveillance et de recherche sur les EVs poliomyélitiques et non poliomyélitiques, en particulier compte tenu de leur persistance potentielle et des risques associés, même dans des régions dotées de mesures de santé publique bien établies.

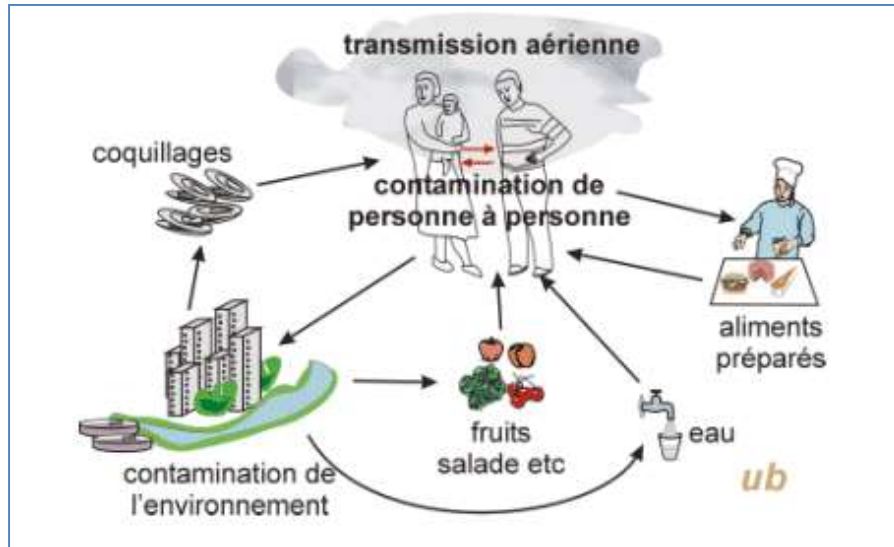
Bien que les EVs soient associés à plusieurs maladies, il est notable qu'il n'existe pas de données nationales consolidées sur la situation épidémiologique clinique ou environnementale de ces virus.

#### **1- Mode de transmission**

Les EVs sont résistants dans l'environnement du fait de l'absence d'enveloppe, ainsi ils peuvent garder leur pouvoir infectieux pendant des mois dans des conditions de température et de pH favorables.

La transmission hydrique ou d'origine alimentaire représente la voie oro-fécale classique, où l'eau contaminée par des selles constitue un réservoir intermédiaire. L'infection peut être transmise par consommation d'eau contaminée, ou d'aliments préparés avec de l'eau

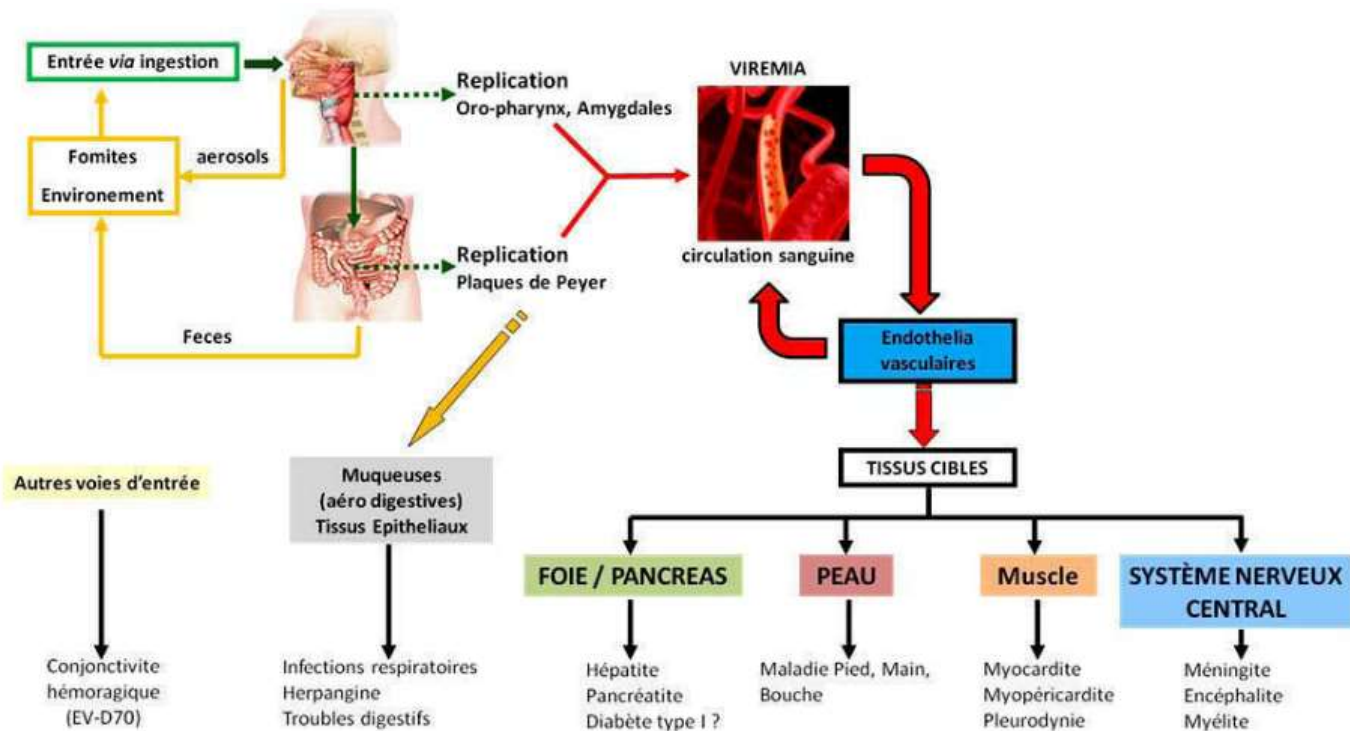
contaminée ou directement par des personnes porteuses du virus. La transmission des EVs est fréquente dans les communautés urbaines denses et/ou fermées principalement les crèches, les écoles et les foyers. Ces virus peuvent aussi être responsables d'infections nosocomiales en particulier dans les unités pédiatriques(58).



**Figure 11:** Modes de transmission des EVs  
(<http://www.microbes-edu.org/etudiant/picornaviridae2.html>)

## 2- Physiopathologie des EVs

Les EVs peuvent engendrer une variété de maladies, dont la plupart sont asymptomatiques ou bénignes. Ces virus contaminent le corps par la bouche et les voies respiratoires, puis les premiers sites de réplication sont établis dans les tissus lymphoïdes de la muqueuse intestinale (plaques de Peyer) et du pharynx (amygdales). À partir de ces sites, les EVs se propagent dans le sang à partir des ganglions lymphatiques cervicaux et mésentériques pour atteindre divers organes et tissus. L'infection provoque des manifestations cliniques de gravité variable (Figure 12). Les atteintes tissulaires consécutives à la virémie nécessitent un franchissement par le virus de l'endothélium vasculaire irriguant ces tissus.



**Figure 12:** Physiopathologie de l'infection par les EVs : L'infection se déroule en quatre phases principales : digestive, lymphatique, virémique et neurologique (48).

## 2-1- Les atteintes cutanéomuqueuses

### 2-1-1- Les herpangines

Ce sont des infections de la gorge caractérisées par la présence de vésicules et ulcérations sur les piliers amygdaliens, la luette et le palais mou, douloureuses lors de la déglutition. Ce sont des angines vésiculeuses aiguës, fébriles et très contagieuses(59).



**Figure 13:** Angine vésiculeuse ou herpangine (<https://www.msmanuals.com/fr/professional/maladies-infectieuses/ent%C3%A9rovirus/herpangine>)

### 2-1-2- Le syndrome pied-main-bouche

Le syndrome pied-main-bouche se caractérise par des éruptions de vésicules sur la plante des pieds, la paume des mains et dans la cavité buccale. Cette maladie bénigne semble plus particulièrement associée aux EVs de l'espèce A. Lorsqu'elle est causée par l'EV-A71, elle peut être associée à des manifestations sévères voire mortelles : encéphalite, paralysie flasque, détresse cardio respiratoire(59).



**Figure 14:** Lésions caractéristiques du Syndrome main-bouche-pieds  
 (<https://www.lecourrierdudentiste.com/lepatient/blog/la-maladie-des-pieds-mains-bouche.html>)

### 2-1-3-La conjonctivite hémorragique aiguë

La conjonctivite aiguë hémorragique (CAH) est une forme épidémique extrêmement contagieuse de conjonctivite caractérisée cliniquement par l'apparition brutale, en moins de 24 heures, d'un épanchement sanguin au niveau des conjonctives (Figure 14). Dans de rares cas, les CAH s'accompagnent d'hyperthermie correspondant tout au plus à un fébricule qui n'excède pas 38°C. L'évolution favorable et sans séquelles survient dans un délai de trois à cinq jours(60). Contrairement aux autres infections à EVs, la conjonctivite hémorragique aiguë est presque exclusivement associée aux génotypes EV-D70 et CV-A24 (61). La durée de cette maladie auto résolutive et sans séquelle est de 1 à 2 semaines.



**Figure 15:** épanchement sanguin au niveau des conjonctives lors d'une conjonctivite hémorragique aiguë (61)

## 2-2- Les atteintes musculaires

### 2-2-1- les affections cardiaques

Les atteintes cardiaques sont le reflet du cardiotropisme des EVs, en particulier des Coxsackievirus B. Ces derniers sont reconnus comme responsables des myocardites aiguës

nécrosantes (62). L'inflammation peut évoluer vers une myocardite chronique aboutissant à une cardiomyopathie dilatée.

### **2-2-2-la pleurodynie épidémique**

La pleurodynie épidémique ou maladie de Bornholm est une infection caractérisée par des douleurs aiguës et spasmodiques dans la poitrine ou l'abdomen supérieur accompagnées de fièvre. Elle est généralement associée au Coxsackievirus B qui a été le premier virus identifié comme agent causal. D'autres agents ont été impliqués dans des épidémies de pleurodynie, notamment les Echovirus et les Coxsackievirus A (63).

### **2-3 les atteintes neurologiques**

Les EVs peuvent causer des dommages neurologiques en raison de leurs propriétés neurotropes. Cette neurovirulence est plus ou moins marquée selon le type d'EVs en cause. Les infections neuroméningées touchent principalement les enfants de moins de 15 ans et se manifestent sous forme de trois pathologies cliniques : la méningite aiguë, l'encéphalite et la myélite.

#### **2-3-1- Méningite aiguë**

La méningite aiguë, aussi appelée méningite aseptique, présente le tableau neurologique le plus fréquent parmi les infections neuroméningées dues aux EVs chez les enfants mais aussi les adolescents et les adultes(64,65). Elle se traduit par un syndrome méningé le plus souvent accompagné de fièvre, de maux de tête ou de raideur de la nuque. D'autres signes non spécifiques peuvent être présents, tels que : anorexie, éruptions cutanées vésiculaires (certaines sont très spécifiques, comme le syndrome main-pied-bouche), atteintes respiratoires ou douleurs abdominales.

#### **2-3-2- Encéphalite**

L'encéphalite correspond à des cas sporadiques dont le nombre est probablement sous-estimé. Ces infections sont souvent associées à une méningo-encéphalite. Contrairement aux méningites, elles peuvent être mortelles ou laisser des séquelles neurologiques graves. L'encéphalite à EVs correspond à une inflammation du parenchyme cérébral et se manifeste cliniquement par une fièvre, une altération de la conscience et du comportement (allant parfois jusqu'au coma) et des convulsions. Les EVs sont la deuxième cause d'encéphalite virale après le virus de l'herpès. Des cas d'encéphalite à EVs ont également été rapportés chez des patients immunodéprimés ou sous traitement immunosuppresseur(66).

#### **2-3-3-Myélite et poliomyélite**

La myélite survient à cause de l'infection des neurones et provoque une fièvre, des céphalées ; des douleurs abdominales et une paralysie. Il s'agit d'un processus pathologique proche de l'infection par les souches du poliovirus: la poliomyélite et qui est la plus ancienne des

entérovirose humaine connue. Classiquement associée aux trois sérotypes de poliovirus, seulement 1 à 2 % des personnes infectées par voie digestive développent une forme nerveuse au cours de laquelle le poliovirus gagne les motoneurones situés dans la corne antérieure de la moelle épinière. La destruction de ces motoneurones va aboutir à la survenue d'une paralysie flasque aiguë irréversible d'un ou de plusieurs membres suivie d'une atrophie musculaire, par ailleurs la destruction des neurones associés aux muscles respiratoires entraîne une paralysie respiratoire et par conséquent le décès du malade(2,66).

Des études ont reportés une diversité importante des espèces d'EVs potentiellement responsables de paralysies flasques par analyse des génotypes retrouvés dans les selles des patients (67,68)



**Figure 16:** Images de personnes présentant des séquelles de la poliomyélite. A) : Un jeune homme avec une paralysie du bras causée par une infection à poliovirus. B) : Une enfant présentant une déformation de la jambe droite causée par une infection à poliovirus. Source : CDC (<https://www.cdc.gov/polio/what-is-polio/photos.html>)

## **IV- Paralysie Flasque aiguë et Poliomyélite**

### **1-Définitions**

#### **1-1- Paralysie Flasque aiguë**

La paralysie flasque aiguë ou PFA, est une maladie rare mais grave qui touche principalement les enfants entre 2 et 8 ans. Elle affecte le système nerveux en particulier la moelle épinière aboutissant à une faiblesse des muscles et des réflexes du corps(2). La PFA est l'un des symptômes de la poliomyélite, néanmoins elle peut aussi être le signe de certaines autres maladies paralysantes, comme la polyradiculonévrite ou la névrite traumatique. Le syndrome Guillain Barré, la myélite transverse, l'infection par le poliovirus et d'autres infections (p. ex., autres EVs, Campylobacter, etc.) sont des diagnostics différentiels de la PFA. Les enfants se rétablissent généralement en quelques semaines, mais dans certains cas, la paralysie est permanente(70).

#### **1-2-Poliomyélite**

Le mot « poliomyélite » vient du grec « polios » (gris), « myelos » (médullaire) et du latin « itis » (inflammation). Il s'agit d'une infection aiguë des cellules de la corne antérieure de la moelle épinière et de la matière grise du cerveau. Causée par le poliovirus, un EVs (EVs) de la famille des Picornaviridae à structure polyédrique. Ces virus sont extrêmement résistants et se propagent facilement. La cible principale est les enfants de moins de 5 ans. C'est un syndrome clinique qui peut se présenter sous la forme d'une infection subtile ou paralytique. Elle se caractérise par l'apparition soudaine d'une maladie fébrile aiguë avec des symptômes gastro-intestinaux, divers degrés de dyskinésie, des céphalées et des lésions du motoneurone spinal conduisant à une paralysie, impliquant généralement les membres inférieurs, les réflexes nerveux et le maintien de la sensibilité (71)

### **2- Histoire de la maladie**

L'ère égyptienne de la poliomyélite a été démontrée par la découverte de séquelles osseuses évocatrices de paralysie poliomyélitique chez deux momies : la première appartenant à un vieil homme de la classe dirigeante retrouvée au sud du Caire et qui date de 3700 av. JC ; la deuxième momie est celle du pharaon MinephtahSiptah et qui a régné sur l'Égypte vers 1200 av. JC(72). Une ancienne stèle égyptienne datant de 1350 av. J.C. illustrant un homme vraisemblablement en santé mais qui a une jambe amincie probablement due à la polio (figure 17).



**Figure 17:** stèle égyptienne de -1400 années avant notre ère l'attitude caractéristique d'un scribe présentant une atrophie asymétrique d'un membre inférieur probablement à cause de la polio.

Source : <http://openi.nlm.nih.gov>

Par ailleurs, ce n'est qu'en 1789 que la maladie a été décrite pour la première fois par Michael Underwood, chirurgien pédiatre anglais le premier à donner une description clinique de la poliomyélite sous le terme « a debility of the lower extremities ». La maladie a été ensuite appelée « maladie de Heine-Medin » suite à la publication du premier compte-rendu médical sur la polio rédigé par Jakob Heine (1840) et la première étude par Karl Oskar Medin (1890). Elle a aussi été appelée « paralysie infantile » puisque les épidémies touchaient principalement les enfants de très jeune âge.

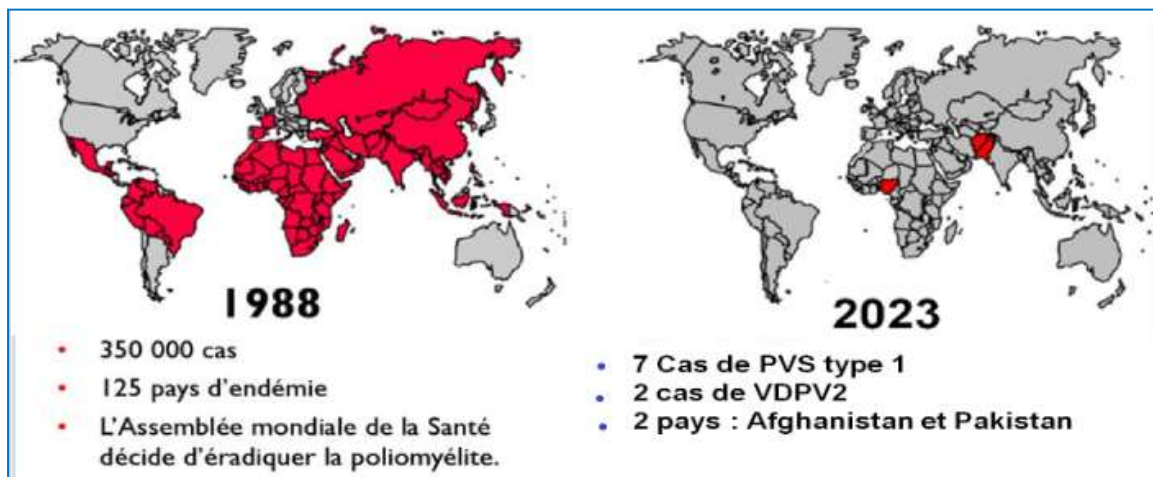
La poliomyélite doit sa première description clinique et pathologique à G.Duchenne, médecin neurologue français, qui en 1855 produisit des coupes de la moelle épinière montrant l'atrophie des cellules de la corne antérieure dans cette condition(73,74). L'hypothèse de Duchenne devint bientôt une réalité prouvée par de nombreux examens microscopiques et c'est grâce au professeur Prévost, neurologue suisse, que le siège de la maladie a été localisé dans les grandes cellules ganglionnaires des cornes antérieures(75).

Le poliovirus a été découvert en 1908 par Karl Landsteiner et Erwin Popper. Le virus a été cultivé la première fois en 1949 par culture cellulaire réalisée par John Franklin Enders, Frederick Chapman Robbins et Thomas Huckle Weller et pour laquelle ils avaient remporté le Prix Nobel en 1954(76). Le génome viral a été cloné et séquencé en 1981, et cela a permis, pour la première fois, d'établir des liens entre les cas de poliomyélite et de retracer les trajectoires du virus ainsi déterminé(48).

### 3- L'Initiative Mondiale pour l'Éradication de la Poliomyélite

#### 3-1- Définition

L'Initiative Mondiale pour l'Éradication de la Poliomyélite (IMEP) est un partenariat public-privé, créé suite à la résolution adoptée par l'Assemblée mondiale pour la Santé d'éradiquer la poliomyélite, en 1988. Globalement, depuis le lancement de l'IMEP, le nombre de cas de poliomyélite a baissé de plus de 99 % (Figure 18). De nos jours, le poliovirus sauvage est en circulation dans seulement deux pays : le Pakistan et l'Afghanistan.



**Figure18:** Situation de la poliomyélite dans le monde en 1988 et en 2023 (<https://ourworldindata.org/polio>)

Parmi les principales missions de l'Initiative Mondiale pour l'Éradication de la Poliomyélite :

a- Immunisation des populations : L'IMEP promeut la vaccination de tous les enfants dès la première année de leur vie. Elle organise aussi des campagnes de vaccination à grande échelle dans les zones où l'accès aux soins est difficile pour atteindre une couverture optimale afin d'arrêter la transmission du poliovirus. En situation d'épidémie, des professionnels de santé sont mobilisés pour faire du « porte à porte » dans les zones vulnérables afin de sensibiliser la population à l'importance de la vaccination et d'administrer le vaccin antipoliomyélique oral aux sujets non vaccinés.

b- Surveillance épidémiologique de la poliomyélite : elle permet de déterminer les zones de circulation du virus, que ce soit dans les derniers pays endémiques ou dans les régions où, en raison de l'affaiblissement du système de santé ou de la faible couverture vaccinale, des flambées épidémiques de poliovirus dérivés de souche vaccinale (PVDV) ont été enregistrées.

### 3-2- Surveillance des PFA

La surveillance de la PFA est une stratégie importante pour suivre les progrès de l'éradication de la poliomyélite et une mesure sensible pour détecter les cas potentiels de poliomyélite et d'infection par le poliovirus. L'Organisation mondiale de la santé (OMS) a mis au point un ensemble d'indicateurs de performance sur la base desquels elle évalue la sensibilité de la surveillance des cas de PFA dont la définition est comme suit:

«Tout enfant de moins de 15 ans présentant une paralysie flasque aiguë, y compris le syndrome de Guillain-Barré, ou toute personne souffrant d'une pathologie avec paralysie, quel que soit son âge, si l'on suspecte la poliomyélite.»

Cette stratégie, qui consiste à examiner tous les cas de PFA, permet d'augmenter la sensibilité du système de surveillance par la détection de toutes les maladies paralytiques, qu'il s'agisse de cas typiques de poliomyélite ou non, et de fournir des données objectives dont le but est d'évaluer la qualité de la surveillance pour un pays donné. Les principaux indicateurs du fonctionnement de la surveillance pour la PFA sont les suivants:

a) Exhaustivité des rapports: au moins 80% des rapports attendus (hebdomadaires ou mensuels) sur la surveillance de la PFA doivent être reçus, y compris « les notifications zéro » si aucun cas n'est observé. La répartition des sites doit être représentative de la géographie et de la démographie du pays.

b) Sensibilité de la surveillance : chaque année, il faut déclarer au moins 1 cas de PFA non polio pour 100 000 enfants de moins de 15 ans.

c) Enquête complète sur les cas : tous les cas de PFA doivent faire l'objet d'une enquête clinique et virologique complète et, pour au moins 80% de ces cas, les échantillons de selles recueillis pour la recherche des EVs doivent être adéquats (deux prélèvements de selles sont adéquats s'ils sont prélevés en quantité suffisante à au moins 24 heures d'intervalle dans les 14 jours qui suivent le début de la paralysie et acheminés vers le laboratoire en respectant la chaîne de froid et accompagnés de la documentation appropriée).

d) Complétude du suivi: au moins 80% des cas de PFA doivent être réexaminés pour détecter une paralysie résiduelle 60 jours après le début de la paralysie.

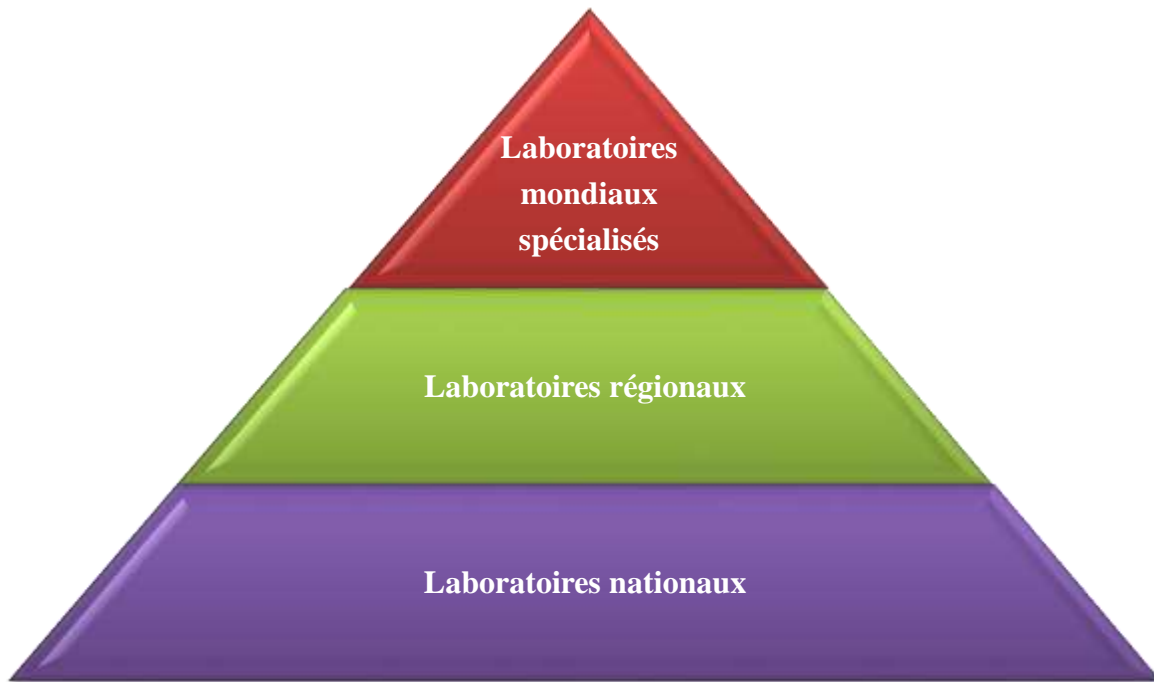
e) Fonctionnement des laboratoires : toutes les études virologiques portant sur les cas de PFA doivent être effectuées par un laboratoire agréé par le réseau mondial de laboratoires pour la surveillance de la poliomyélite.

### 3-3- Réseau mondial des laboratoires de la poliomyélite (RMPL)

Si la surveillance sur le terrain permet de prélever et de transporter les échantillons des cas de PFA vers le laboratoire, la surveillance en laboratoire permet, quant à elle, de confirmer le type

de poliovirus, et de fournir les données nécessaires pour étudier le lien entre les virus et les épidémies et évaluer les progrès réalisés pour interrompre la transmission du poliovirus.

Le RMLP est composé de 145 laboratoires dans 92 pays hiérarchisés en trois niveaux spécialisés répartis dans les six régions de l’OMS (figure 19)



**Figure 19:** Structure hiérarchisée du réseau mondial de laboratoires pour la poliomyélite

Le laboratoire national de la poliomyélite de l’INH appartient au RMLP et suit les procédures recommandées par l’OMS pour la détection et la caractérisation des poliovirus provenant des prélèvements de selles des cas de PFA et de leurs contacts. Cette recherche se fait par l’isolement des poliovirus par culture cellulaire et la différenciation intratypique (DIT) des poliovirus isolés. Les résultats sont ensuite communiqués au service de la surveillance épidémiologique de la Direction d’épidémiologie et de lutte contre les maladies et l’OMS.

Les laboratoires du RMLP sont soutenus par un solide programme d’Assurance Qualité, qui comprend les tests d’aptitude et l’accréditation annuelle par l’OMS.

### **3-4-La certification «sans poliomyélite»**

Cette certification confirme que la région est exempte de transmission du poliovirus. Les États membres de l’OMS sont divisés en six régions. La certification est accordée pour une région mondiale spécifique si tous les pays de cette région ne présentent aucune transmission du virus. Pour qu’une région soit certifiée sans poliomyélite, trois conditions essentielles sont requises (77):

- Aucun PVS n'a été retrouvé dans la région depuis au moins trois ans;
- Pendant cette période de trois ans, le système de surveillance en place répondait aux critères de qualité définis par l'OMS ;
- durant cette période de trois ans tous les pays doivent répondre aux normes de la certification, et ce après la surveillance
- l'achèvement du confinement biologique pour tous les stocks de PVS présents dans les établissements.

Ces critères témoignent d'une organisation efficace pour détecter toute importation de poliovirus et parer à toute réémergence dans la région certifiée.

A ce jour, plus de 80% de la population mondiale vit dans des régions qui ont obtenu la certification « exempte de poliomyélite ». Seule la région EMRO héberge toujours le virus qui continue à circuler en Afghanistan et au Pakistan.



**Figure 20:** Régions de l'OMS ayant une certification "sans polio" ou "polio-free"

Au Maroc, la poliomyélite a été pendant longtemps, la cause principale des handicaps physiques, 289 cas de poliomyélite ont été déclarés entre 1980 et 1989. Depuis, de grands progrès ont été accomplis dans la lutte contre la maladie, mais le risque persistant d'importation nous impose une grande vigilance à côté d'une bonne couverture vaccinale contre la poliomyélite, ces dernières mesures sont les principaux moyens pour garder notre pays « polio free ».

#### **4- Agent causal de la poliomyélite**

Les virus responsables de la poliomyélite sont classés en deux catégories : les virus sauvages et les virus dérivés de vaccins.

##### **4-1- Le Poliovirus sauvage**

Il existe trois souches immunologiquement distinctes de poliovirus sauvage : le poliovirus sauvage de type 1 (WPV1), le poliovirus sauvage de type 2 (WPV2) et le poliovirus sauvage de type 3 (WPV3). Même si les trois souches entraînent les mêmes symptômes et engendrent une paralysie irréversible, elles sont toutefois différentes génétiquement ce qui en fait trois virus

distincts. De ce fait, le programme d'éradication de la poliomyélite a jugé que chaque souche du poliovirus doit être éradiquée individuellement(78).

Le poliovirus sauvage de type 2 (WPV2) a été détecté pour la dernière fois en 1999 en Inde, et le dernier cas de poliovirus sauvage de type 3 a été notifié en 2012 au Nigeria. C'est ainsi que La Commission mondiale de certification pour l'éradication de la poliomyélite (GCC) a officiellement déclaré que ces deux virus WPV2 et le WPV3 ont été éradiqués et ce en 2015 et 2019 respectivement(79).

Seul le WPV1 continue à circuler en Afghanistan et au Pakistan en raison de l'insécurité, de l'inaccessibilité et d'autres problèmes (80).

#### **4-2- Le Poliovirus dérivé du vaccin**

Les virus contenus dans le vaccin antipoliomyélitique renferme des virus vivants atténués, qui lors des cycles de réplication, peuvent subir des mutations : la formation de poliovirus dérivés du vaccin (PVDV) qui vont être excrétés dans la nature. La circulation de ces poliovirus dérivés du vaccin dans une population à faible couverture vaccinale peut engendrer, dans de rares circonstances, des cas de poliomyélite paralytique le plus souvent associés aux PVDV circulants de type 2 (81).

### **5- Vaccination anti polio**

Deux vaccins antipoliomyélitiques sont utilisés à travers le monde : le vaccin antipoliomyélitique inactivé (VPI) produit en 1955 et le vaccin antipoliomyélitique oral vivant atténué (VPO) produit en 1961.

#### **5-1- Le vaccin anti-poliomyélitique inactivé (VPI) :**

Le vaccin anti-poliomyélite inactivé (VPI) est le premier vaccin synthétisé par Jonas Salk et renferme des souches inactivées des trois sérotypes de poliovirus. Salk a utilisé le formaldéhyde pour tuer le poliovirus sans détruire ses propriétés antigéniques. Ce vaccin existe en monodoses et multidoses adaptés à la vaccination de masse.

Le VPI génère une immunité humorale capable de protéger les sujets auxquels ce vaccin a été administré mais ne leur confère pas une protection gastro-intestinale cohérente et efficace. Par conséquent, après une exposition ultérieure, les personnes ayant reçu le VPI peuvent devenir des porteurs sains du poliovirus qui sera excrété dans les selles, et ainsi contribuer à sa propagation (tableau 2). Les pays qui utilisent uniquement le VPI dans leur calendrier vaccinal sont ceux où le virus de la poliomyélite n'est plus endémique.


## 5-2- Le vaccin anti-poliomyélitique oral (VPO) :

À partir du début des années 1960, le VPI a été remplacé par le vaccin vivant atténué oral (VPO) fabriqué par Albert Sabin. Le VPO contenait un mélange des trois sérotypes du poliovirus atténués : le virus contenu dans le vaccin est vivant capable de stimuler le système immunitaire de l'enfant vacciné mais ne peut causer la paralysie car il a perdu son pouvoir pathogène.

Malgré son innocuité bien établie, le VPO peut rarement causer une poliomyélite paralytique associée au vaccin à raison d'environ un cas pour 2,7 millions de doses de VPO(82).

L'utilisation du VPO peut également être associée à l'émergence rare de poliovirus dérivés de vaccins (PVDV) ayant une circulation prolongée. Les poliovirus circulants dérivés du vaccin (PVDVc) peuvent émerger dans les zones où la couverture vaccinale par le VPO est faible. Depuis l'an 2000, le type 2 du vaccin oral est responsable de la majorité des cas du virus dérivés du vaccin (cPVDV2) suivi par le type 1 puis en dernier lieu le type 3. En avril 2016, l'organisation mondiale de la santé (OMS) a retiré le VPO trivalent et l'a remplacé par le VPO bivalent renfermant les deux poliovirus type 1 et 3.

**Tableau 2:** Comparaison entre le vaccin antipoliomyélitique oral VPO et inactivé VPI (83)

Vaccin antipoliomyélitique oral (VPO)	Vaccin antipoliomyélitique inactivé (VPI)
<ul style="list-style-type: none"><li>• Virus vivant, atténué (affaibli)</li><li>• Administré en <b>gouttes</b></li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Virus tué</li><li>• Administré par <b>injection</b></li></ul>
	
<ul style="list-style-type: none"><li>• Très efficace pour réduire la transmission dans les pays en développement dans le cadre de la stratégie d'éradication</li><li>• Bon marché</li><li>• Facile à administrer</li><li>• Assure une immunité muqueuse et intestinale</li><li>• Protège les personnes en contact qui ne sont pas vaccinées</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Extrêmement efficace</li><li>• Utilisé couramment dans les pays développés</li><li>• Plus cher que le VPO</li><li>• Exige des agents de santé formés</li><li>• L'immunité est assurée par voie sanguine</li><li>• Aucun risque de PPPV ou de PVDV</li></ul>

Au Maroc, la vaccination par le VPO trivalent a commencé en 1964 et concernait la population âgée de 3 mois à 40 ans. Depuis 2015, le VPI a été introduit pour éviter les cas de paralysies associées au VPO (83) et en 2016 le VPO trivalent a été remplacé par le VPO bivalent(84).

## **V-Diagnostic des infections à poliovirus et EVs non poliomyelitiques**

Le diagnostic virologique repose sur la mise en évidence d'un des composants de la structure du virus (diagnostic virologique direct) ou de la réponse du système immunitaire de l'hôte à l'infection virale (diagnostic virologique indirect). Le diagnostic indirect n'a pas d'intérêt pour les infections à EVs en raison de la diversité antigénique importante des EVs et du risque de survenue de réactions croisées. Par ailleurs, une meilleure connaissance de la structure du génome des EVs a abouti au développement de techniques directes par détection du génome viral. L'avènement de techniques moléculaires ayant une meilleure sensibilité et spécificité et plus rapides a conduit à des avancées majeures aussi bien dans les pathologies aiguës que dans les infections chroniques liées aux EVs.

### **1- Isolement du virus par culture cellulaire**

La culture cellulaire permet d'isoler les souches virales sur les échantillons cliniques (LCR, selles, prélèvement naso-pharyngé). Les échantillons possédant la sensibilité la plus élevée sont les échantillons de selles et les prélèvements rectaux. L'excrétion fécale est souvent intermittente et plusieurs échantillons doivent être collectés à 24-48h d'intervalle, elle commence quelques jours après l'infection et peut se poursuivre pendant des semaines, en particulier avec les virus de la polio et de la coxsackie, bien qu'elle dépasse rarement un mois avec les échovirus.

Les EVs ne peuvent être facilement différenciés par leur croissance en culture cellulaire, tous produisant un effet cytopathique similaire. Une fois qu'un agent cytopathique a été isolé en culture cellulaire, des tests sérologiques ou un séquençage d'ADN doit être réalisé afin d'identifier le sérotype. En raison du nombre de souches potentielles, les tests de neutralisation à l'aide d'anticorps spécifiques sont peu satisfaisants.

Les tests de neutralisation sont généralement utilisés à des fins épidémiologiques tels que la détermination de l'exposition et de l'immunité d'un groupe de population à différents EVs, y compris les réponses à la vaccination contre la poliomyélite. Ces tests demandent beaucoup de travail et les résultats sont rarement disponibles en moins de 3-4 jours. Ils ne sont plus très répandus, bien que les tests spécifiques du poliovirus peuvent être utilisés pour enquêter sur des cas possibles de cas de poliomyélite.

### **2- Sérologie**

La sérologie consiste à rechercher des anticorps spécifiques contre les EVs. Ceci est limité par la diversité des sérotypes et le manque d'antigènes du groupe EVs, augmentant le risque de réactivité croisée. La méthode utilisée est le test de neutralisation. Il est basé sur le blocage de

l'infectivité du virus avec des antisérums. Il existe d'autres techniques telles que la fixation du complément et les tests d'agglutination qui ne sont plus recommandées. Deux sérums sont nécessaires, un au début de l'infection et un à 3-4 semaines d'intervalle. Les sérums sont testés simultanément pour la séroconversion ou des changements significatifs dans les titres d'anticorps entre les deux. Une limitation de cette méthode est la présence d'anticorps lors de l'échantillonnage précoce, ce qui peut interférer avec l'interprétation des résultats. La séroconversion est basée sur la détection des IgM par la technologie ELISA. Bien qu'elle soit principalement utilisée dans les études épidémiologiques, la réactivité croisée entre les sérotypes complique l'interprétation des résultats.

### **3- Diagnostic moléculaire**

Des sondes ADN complémentaires fabriquées par transcription inverse de l'ARN génomique purifié du virus Coxsackie B ont été utilisées pour détecter l'ARN de l'EVs dans des cultures cellulaires infectées, des souris infectées et des biopsies de tissus humains. Bien que préparées contre un seul sérotype du virus Coxsackie B, les sondes comprenaient des séquences d'ARN qui sont hautement conservées parmi les EVs et sont donc spécifiques d'un groupe. Elles ont été utilisées pour détecter l'ARN des EVs, à la fois dans des extraits d'ARN de tissus et par hybridation in situ, bien que le virus infectieux ou l'antigène viral soit rarement détecté dans ces tissus. LA PCR est techniquement plus simple et plus rapide que les méthodes d'hybridation de l'acide nucléique. Cette méthode est donc mieux adaptée au diagnostic viral. L'identification de séquences extrêmement conservées dans la région non codante 5'UTR du génome des EVs a permis la conception d'amorces PCR qui permettent de détecter la plupart des EVs(85) et de nombreuses études ont montré que la PCR des EVs est plus sensible que la culture virale pour la détection des EVs dans divers échantillons cliniques. Dans de nombreux laboratoires de diagnostic, l'examen du LCR par PCR des EVs a remplacé l'isolement du virus pour le diagnostic de la méningite à EVs, ce qui laisse entrevoir la possibilité d'un diagnostic plus rapide, susceptible d'avoir un impact plus important sur le traitement du patient. La PCR des EVs est également utile pour le diagnostic des infections néonatales et de la myocardite à EVs(61,85) si l'on dispose de tissus de biopsie ou d'autopsie.

Ces protocoles PCR sur les EVs ne permettent pas l'identification sérotypique. Il est toutefois nécessaire de différencier les EVs polio des EVs non polio pour l'investigation des cas suspects de poliomyélite et surveiller la circulation des poliovirus sauvages dans les régions endémiques.

Des tests pour la différenciation intratypique des poliovirus sauvages et des poliovirus de souche vaccinale sont disponibles dans les laboratoires de référence de l'OMS pour les poliovirus. Ces dernières années, plusieurs groupes ont décrit des systèmes de "sérotypage moléculaire" dans lesquels les régions codantes de la capsidie des isolats d'EVs sont amplifiées et séquencées. La comparaison de la séquence avec des séquences publiées de sérotype connu permet de déduire le sérotype de l'isolat recherché (12,87).

**Chapitre 2 :**  
**Fondements Éthiques et Méthodologiques**

## I. Considération éthique

Cette étude constitue une composante de l'Initiative mondiale pour l'éradication de la poliomyélite. Elle n'a pas impliqué de cas humains, mais a utilisé les échantillons de selles récoltés chez des patients atteints de paralysie flasque aiguë dans le cadre des activités de surveillance routinière de la poliomyélite. Toutes les caractéristiques éthiques et techniques ont été approuvées par l'OMS et le Ministère de la santé et de la protection sociale de notre pays. Le protocole et le consentement oral faisaient partie des activités de surveillance routinière recommandées par le Comité directeur de l'OMS et sont conformes à toutes les réglementations nationales pertinentes protégeant les sujets humains.

Toutes les informations collectées dans le présent travail de thèse sont anonymes et non identifiants pour l'utilisateur.

## II. Type d'étude:

Il s'agit d'une étude transversale descriptive utilisant les données épidémiologiques des patients reçus au niveau du laboratoire national de référence de la poliomyélite de l'Institut National d'hygiène.

En effet, la surveillance des PFA repose sur deux systèmes complémentaires :

**la surveillance épidémiologique:** Animée par la Direction de l'Épidémiologie et de la Lutte contre les Maladies (DELM), tout cas notifié est déclaré au SSE qui récolte les données relatives à l'âge, la date de début de la maladie, la date de la dernière dose de VPO, les symptômes accompagnant la paralysie,

**la surveillance virologique:** concerne le recueil des prélèvements de selles au niveau du laboratoire et la réalisation des analyses selon l'algorithme de l'OMS pour l'identification du Poliovirus.

## III. Population de l'étude

Cette étude a été réalisée sur des prélèvements de selles d'enfants de moins de 15 ans présentant le syndrome de la paralysie flasque aiguë appartenant à différentes provinces du Maroc dont les prélèvements étaient réalisés dans les 14 jours qui suivent la survenue de la maladie et reçus au laboratoire dans les 72 heures.

## **IV- Conception de l'étude**

Dans le cadre de cette étude, la conception méthodologique repose sur une approche visant à explorer et à documenter les caractéristiques des cas de PFA. La collecte de données s'effectue de manière exhaustive à partir du registre du laboratoire, qui constitue une source fiable des renseignements cliniques. Le résultat principal de cette étude vise à quantifier le nombre de cas enregistrés, fournissant ainsi une base solide pour l'analyse épidémiologique de la pathologie. De plus, l'étude vise à répertorier les virus isolés par culture cellulaire chez ces patients.

Le constat d'un faible taux d'entérovirus isolés chez les enfants présentant une PFA motive une exploration approfondie. Afin de combler cette lacune, une recherche des entérovirus est entreprise dans les échantillons de selles qui se révèlent négatifs en culture cellulaire (n=225), en utilisant des méthodes moléculaires. Ces échantillons ont également été soumis à des recherches spécifiques visant à détecter la présence d'Adénovirus. Cette démarche a été entreprise dans le but de déterminer une éventuelle association entre les Adénovirus et le syndrome de la paralysie flasque aiguë (PFA). Cette investigation complémentaire vise à élargir la portée de l'étude en examinant la possible implication des Adénovirus dans la pathogenèse de la PFA, fournissant ainsi une vision plus complète et nuancée des agents viraux potentiels associés à cette condition neurologique.

Dans un second lieu, Les échantillons positifs en entérovirus, qu'ils aient été isolés par culture cellulaire (n=36) ou détectés par rRT-PCR dans les selles initialement négatives en isolement viral (n=51), sont ensuite soumis au typage moléculaire. Cette démarche vise à approfondir la compréhension des entérovirus associés à la PFA, permettant ainsi une caractérisation plus précise des souches virales impliquées dans cette pathologie.

## **VI. Approche méthodologique:**

### **1. Culture Cellulaire**

767 échantillons de selles de cas de PFA ont été reçus au laboratoire durant la période 2017-2021. Les prélèvements de selles sont pré-traités par PBS-Chloroforme, puis inoculés sur les deux lignées cellulaires RD et L20B pour l'isolement viral.

## 2. Extraction de l'ARN et de l'ADN viraux

L'extraction automatisée de l'ADN et de l'ARN viraux a été réalisée en utilisant le système Qiagen Qiacube avec le kit AllPrep DNA/RNA Mini Handbook (Qiagen).

La concentration des acides nucléiques extraits a été quantifiée à l'aide d'un spectrophotomètre UV (Nanodrop, Thermofisher, États-Unis).

## 3. Détection Moléculaire des Entérovirus et Adénovirus

La rRT-PCR (rétrotranscriptase suivie par PCR en temps réel) pour la détection des Entérovirus, dans les selles négatifs en culture cellulaire, a été réalisée par deux techniques :

- a- Kit O-DiaENT™ de Diagenode pour la détection des Entérovirus (Article 3) sur le système QuantStudio 5.
- b- rRT-PCR sur le système ABI7500 en utilisant les amorces EV2 (5'-CCCCTGAATGCGGCTAATC-3'), EV1 (5'-GATTGTCACCATAAGCAGC-3') et la sonde (FAM-CGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGT-TAMRA) (Article 4)

La PCR en temps réel pour la détection des Adénovirus sur ces mêmes échantillons a été réalisée par le kit R-DiaADV de Diagenode sur le système QuantStudio 5 (Article 3).

## 4. Séquençage Sanger des Entérovirus

Le typage des Entérovirus utilise deux gènes : la 5UTR (région non codante) et une partie du gène de l'enveloppe VP1 (Article 4).

Une RT-PCR en deux étapes a été utilisée pour la formation de l'ADN complémentaire à partir de l'ARN des Entérovirus (isolés sur cellules RD ou détectés par rRT-PCR pour les cultures négatives). La transcriptase inverse utilise une amorce HeptaN (NNNNNNN) et la PCR utilise un couple d'amorce UG52/UC53 pour la 5UTR (CAAGCACTTCTGTTTCCCCGG / TTGTCACCATAAGCAGCCA) et AMDH/GDCL pour la première PCR de la VP1 (GCIATGYTIGSIACICAYVT / ARIABICCICRCARTCICC) et 222/224 pour la deuxième PCR (GCIATGYTIGSIACICAYVT / CICCIGGIGGIAYRWACAT).

Les produits de la PCR sont visualisés sur un gel d'électrophorèse à 2% avec 0.5 µg/ml de bromure d'éthidium.

La purification des produits de la PCR a été réalisée par l'ExoSAP-IT® (Applied Biosystems™) puis dirigés pour le séquençage par le kit BigDye terminator v3.1 (Applied Biosystems) sur le séquenceur capillaire ABI Prism 3130 (Applied Biosystems).

Les amorces utilisées pour la réaction de séquence sont UG52/UC53 pour la 5UTR et 222/224 pour la VP1.

### **5. Séquençage Haut Débit (NGS)**

Le séquençage du génome entier des Entérovirus a été réalisé dans le centre collaborateur OMS de l'Institut Pasteur de Paris sur la plateforme PIBNET (Pasteur International Bioresources Network, Institute Pasteur Paris). Les séquences sont obtenues sur le système Illumina NextSeq HiSeq (Article 4).

### **6. Analyse des séquences**

L'analyse des séquences obtenues a été réalisée à l'aide du logiciel SeqScape v2.7 d'Applied Biosystems. Le type des EVs a été déterminé, en comparant les séquences de la région non-codante 5'UTR et de l'enveloppe VP1 obtenues aux séquences de la même région publiées dans la base de données GenBank. Les types d'EVs sont définis sur la base d'une similarité de séquence nucléotidique supérieure à 75% et d'une similarité de séquence en acides aminés supérieure à 85% par rapport à une souche prototype.

## **Chapitre 3:**

# **Etude épidémiologique des paralysies flasques aiguës**

## **I- Etat des lieux de la poliomyélite et impact de la Covid19 sur l'éradication du poliovirus**

Dans le cadre de ce travail de recherche ; nous avons réalisé une revue sur le programme de l'éradication de la poliomyélite lancé en 1988 durant l'assemblée générale de la santé et qui a joué un rôle important dans la limitation de la transmission du poliovirus sauvage (PVS) à travers le monde. En effet, et depuis le lancement de ce programme, les cas de poliomyélite a baissé de 350000 cas en 1988 à seulement deux cas de PVS de type 1 en début de l'année 2021 dans les deux pays de la région EMRO (le Pakistan et l'Afghanistan) où la circulation du virus n'est toujours pas interrompue.

Le poliovirus, qui est un EVs appartenant à la famille des Picornaviridae, existait sous forme de 3 types (1, 2 et 3) de caractères génétiques et immunologiques différents ce qui implique que l'éradication doit concerner chaque virus indépendamment de l'autre. Le dernier cas de poliomyélite causée par un poliovirus de type 2 a été détecté dans le nord de l'Inde en 1999, et la déclaration de l'éradication du virus poliomyélitique sauvage de type 2 a eu lieu en septembre 2015. Le dernier cas de poliomyélite causée par un poliovirus de type 3 a été notifié au Nigéria en 2012 et son éradication a été déclarée en octobre 2019.

En 2020, l'épidémie due au coronavirus (Covid-19) a eu un impact considérable sur les systèmes de santé du monde entier qui étaient à la fois confrontés au défi de répondre aux besoins des patients atteints de Covid-19 et de gérer les autres programmes de santé, y compris le programme d'éradication de la poliomyélite afin de prévenir le risque de réintroduction de la poliomyélite dans les pays où la circulation du poliovirus a été interrompue.

L'impact de la pandémie de Covid-19 sur la surveillance de la poliomyélite a été évalué par la Commission européenne en comparant les données de surveillance entre janvier et septembre 2019 à la même période durant l'année 2020. Une diminution du nombre de cas de paralysie flasque aiguë (PFA) déclarés et le délai de collecte des deux selles pour la recherche du poliovirus a augmenté. Les vaccinations infantiles, y compris le vaccin antipoliomyélitique, ont

été interrompues en Afghanistan et au Pakistan, pays où la transmission virale est toujours active.

En revanche, la pandémie de Covid-19 a créé des opportunités pour accroître conjointement l'efficacité des activités d'éradication de la poliomyélite et promouvoir l'intégration des services de santé. Par exemple, le déploiement mondial des vaccins Covid-19 offre l'occasion de renforcer la demande pour les deux types de vaccins. La Région de l'Afrique a été déclarée polio-free en août 2020, en plein milieu de la pandémie. Toutefois, les réseaux de lutte contre la poliomyélite se sont rapidement adaptés à la situation mondiale du Covid-19. Une nouvelle stratégie d'éradication de la poliomyélite (2022-2026) a été élaborée pour répondre à l'objectif d'éradication de la poliomyélite et adaptée à la situation mondiale de la Covid-19.

Dans notre nation, le fonctionnement du laboratoire de surveillance des paralysies flasques a dépendu de la notification des cas, une activité qui a connu une diminution significative pendant la pandémie. Le personnel du laboratoire a continué à remplir ses missions, tout en s'intégrant aux activités de dépistage de la Covid-19 au sein du département de virologie, et ce jusqu'à la levée de l'état d'urgence dans le pays. De même, et malgré les conditions de confinement lors de la Covid-19, les services de vaccination ont persévéré dans leur mission de servir la population infantile afin de maintenir une couverture vaccinale adéquate, dont le vaccin antipoliomyélitique. Cette culture vaccinale préexistante a joué un rôle essentiel dans le développement de la vaccination contre la COVID-19, désormais accessible à l'ensemble de la population.

La revue rapportant ces données intitulée « Eradication Polio : progress affected by Covid 19 pandemic » a été publiée le 1<sup>er</sup> Juillet 2023 dans le journal International Journal of Biology Pharmacy and Allied Sciences. L'article tel qu'il a été publié est reporté sur la page qui suit.

**ERADICATING POLIO: PROGRESS AFFECTED BY COVID 19 PANDEMIC****LEMRAKET S<sup>1,2\*</sup>, FILALI-MALTOUF A<sup>2</sup>, MEDRAOUI L<sup>2</sup> AND OUMZIL H<sup>1,3</sup>****1:** Virology Department, National Institute of Hygiene, Ministry of Health, Rabat, Morocco**2:** Microbiology and Molecular Biology Team, Research Center for Plant and Microbial Biotechnology, Biodiversity and Environment, Faculty of Sciences, Mohammed V University in Rabat, Morocco**3:** Pedagogy and Research Unit of Microbiology and Genomic Center of Human Pathologies, School of Medicine and Pharmacy, Mohammed V University in Rabat, Morocco**\*Corresponding Author: Dr. Sanae Lemrabet: E Mail: [sanae.lem@gmail.com](mailto:sanae.lem@gmail.com)**Received 14<sup>th</sup> July 2022; Revised 20<sup>th</sup> Sept 2022; Accepted 2<sup>nd</sup> Nov. 2022; Available online 1<sup>st</sup> July 2023<https://doi.org/10.31032/IJBPAS/2023/12.7.7319>**ABSTRACT**

Since the 1988 World Health Assembly (WHA) resolution to eradicate polio, considerable progress has been made in ending the transmission of wild poliovirus throughout the world. The number of polio endemic countries in the world fell from over 125 in 1988 to just two countries in the Eastern Mediterranean Region EMRO after the Polio-free declaration of the remaining five WHO regions. Cases of paralytic polio have declined enormously, from some 350000 cases in 1988 to only 2 cases in 2021. Wild poliovirus type 2 (WPV2) was last detected in 1999, WPV type 3 (WPV3) in 2012, and WPV type 1 is still endemic in Pakistan and Afghanistan.

The recent coronavirus disease (COVID-19) pandemic has had an immense impact on health systems around the world, which must face the challenge of simultaneously meeting the needs of COVID-19 patients and managing other programs including the polio eradication program. This review presents the epidemiology of the poliovirus, progress for the polio eradication and the impact of the COVID-19 pandemic on the objectives of the GPEI.

**Keywords: Global Eradication Poliomyelitis Initiative; Acute Flaccid Paralysis;  
Poliovirus; COVID-19**

## INTRODUCTION

Prior to the launch of the Global Polio Eradication Initiative (GPEI) in 1988, polio left more than 350,000 children paralyzed in 125 countries. Today, only WPV1 continues to circulate in two countries: Afghanistan and Pakistan [1].

GPEI defines four pillars of polio eradication: a/ **Routine immunization:** In worldwide immunization programs, oral polio vaccine (OPV) and at least one dose of injectable inactivated poliovirus vaccine (IPV) are routinely used. b/ **Supplementary immunization:** “National Immunization Days” are organized to provide supplementary doses of oral polio vaccine to all children under five years old. c/ **Surveillance:** Active surveillance for wild poliovirus by reporting all cases of acute flaccid paralysis in children under 15 years old and laboratory confirmation of infection. d/ **Targeted “mop-up” campaigns:** Targeted “mop-up” campaigns once wild poliovirus transmission is restricted to a specific focal area [2].

Childhood vaccinations, including the polio vaccine, have been halted in Afghanistan and Pakistan since the COVID-19 pandemic struck in March 2020 to avoid the risk of disease transmission within the community and left 50 million children without their polio vaccine [3].

In the middle of the global COVID-19 pandemic, African region was certified polio free on August 25, 2020 [4]. And in 2021, only two WPV1 cases were reported in Afghanistan (one case) and Pakistan (one case).

The occurrence of the COVID-19 pandemic and the measures put in place for its elimination provide an opportunity to recognize the value existing infrastructure to eradicate polio and ensure its long-term sustainability. This is how the extensive polio networks were rapidly adapted to the COVID-19 context [5].

### Poliovirus:

Poliovirus is a representative member within the Picornaviridae, a family that contains many human and animal pathogens. All three serotypes of poliovirus cause paralytic disease. The viral genome, a single-stranded RNA with positive polarity and 7.1–7.2 kb long is enclosed in a nonenveloped capsid comprising 60 copies of four different polypeptides arranged with icosahedral symmetry [6].

Poliovirus replication is rapid, as up to 10,000 infectious virus particles are released upon cell lysis and death at 6 h post-infection. This rapid rate of cellular destruction accounts for the sudden onset of acute flaccid paralysis (AFP) when poliovirus infects motor neurons [7].

**Poliomyelitis:**

Poliomyelitis, commonly shortened to polio is an acute viral infection that influences the motor neurons within the spinal cord and brain leading to the classic manifestations of paralysis [8]. Polio is transmitted by the fecal-oral route. Shedding the virus in the stool makes polio a highly transmissible disease. Maximum virus shedding is observed 2-3 days before and 1 week after symptom onset. The spread is rapid in areas with poor sanitation, especially among the non-immune population. The spread of the virus is mainly observed during the summer months in temperate regions [9].

In the prevaccine era, polio had a virtually worldwide distribution, and nearly all young children in endemic areas were infected early in life. WPV1 is associated with widespread outbreaks and WPV2 and WPV3 with more localized circulation [10].

**AFP surveillance:**

In order to achieve polio eradication, WHO has recommended that countries carry out surveillance of AFP cases, which allows new cases to be identified and wild poliovirus imports to be detected. Performance indicators established for AFP surveillance require that all AFP cases be reported and investigated as prospective polio cases, including collection of 2 stool samples 24 hours apart and within 14 days following the onset of paralysis [11].

**Poliovirus vaccines:**

Poliovirus infections have been effectively controlled in many parts of the world since the late 1950s by the use of two vaccines, one inactivated (IPV) developed by Jonas Salk [12], the other attenuated (OPV) developed by Albert Sabin [13].

In a number of countries, OPV is used instead of IPV for several reasons included reduced cost for OPV, ease of administration, relative availability of IPV, and perceived increased efficacy of OPV in protecting the vaccinees from intestinal infection and in immunizing the unvaccinated by contact spread [14].

However, the attenuated virus in the OPV vaccine can undergo genetic changes during replication, leading to vaccine-derived poliovirus (VDPV) infection in populations with low vaccination coverage, and which can cause polio-like paralysis [15].

The use of monovalent OPV of sabin strain type 2 (mOPV2) is reserved for responses to VDPV2 outbreaks. The updated GPEI Polio Eradication Strategy 2022–2026 includes expanded use of the type 2 novel oral poliovirus vaccine (nOPV2) - genetically stabilized -to avoid new emergences of VDPV2 during outbreak responses [16].

**Global Polio eradication initiative:**

Global eradication is defined as "the worldwide absence of a specific pathogen in nature as a result of deliberate control efforts which may be discontinued when

the agent is deemed to no longer present a significant risk from extrinsic sources. eg smallpox” [17]. WHO launched the GPEI at the 1988 during the World Health Assembly, a year when 125 countries around the world were still reporting endemic polio. Polio eradication can be completed for a number of reasons including: (a) the existence of an effective, inexpensive and easy to administer polio vaccine (b) the absence of an animal reservoir since humans are the only host of the virus and (c) polio gives immunity to long term and there are no long-term carriers of the disease [8].

#### **Global certification:**

WHO has established a formal process for the certification of polio eradication, modeled on the International Smallpox Certification Commission. Until the beginning of 2020, four regions were certified polio-free: the Americas in 1994, the Western Pacific in 2000, Europe in 2002, and South-East Asia in 2014. No indigenous WPV has been detected in these regions postcertification. On August 25, 2020 African region was certified polio free; right in the middle of a global COVID-19 pandemic [17].

Following the certification of the African Region as free of wild poliovirus, the Eastern Mediterranean Region is the only region in the world still harbouring wild poliovirus.

#### **Impact of COVID-19 pandemic on Polio surveillance**

Health programs including polio eradication have been impacted by the onset of the COVID-19 pandemic. As a result, the risk of re-introduction of polio has probably increased.

The impact of the COVID-19 pandemic on polio surveillance was assessed by comparing surveillance data between January and September 2019 to the same period in 2020. The number of cases of acute flaccid paralysis (AFP) reported worldwide decreased by 33% and the average number of days between the second stool collected and reception by the laboratory increased by 70%. Continued analysis of AFP case reporting and stool collection is critical to ensure timely detection and response to interruptions of polio surveillance [18].

Childhood vaccinations, including the polio vaccine, have been halted in Afghanistan and Pakistan since the COVID-19 pandemic struck in March 2020 to avoid the risk of disease transmission within the community [19].

In contrast, the COVID-19 pandemic has created opportunities to jointly increase the effectiveness of polio eradication activities and promote the integration of health services. For example, the global rollout of COVID-19 vaccines provides an opportunity to build demand for both

COVID-19 and polio vaccines. Thousands of polio eradication officers around the world continue to play a critical role in implementing COVID-19 responses in countries. Maintaining these partnerships will be important to eradicate WPV1 and end transmission of VDPV while addressing other health priorities [5, 16].

Despite the COVID-19 pandemic, efforts continue to be made to end polio. Africa was certified polio free in August 2020 [4]. As of August 3, 2021, one WPV1 case was reported in Afghanistan in 2021, a 97% decrease compared with the first 6 months of 2020. And one WPV1 case has been reported during January–June 2021 in Pakistan, a 98% decrease from the 60 WPV1 cases from during the same 2020 period [16].

As health systems around the world focused on addressing the pandemic of COVID-19, the GPEI launched an intensive review to identify barriers to eradication and develop a new strategy to achieve the goal of: a polio-free world. The program then had to list the challenges faced in the years leading up to COVID-19 and define solutions that will work in a world perhaps forever altered in the wake of COVID-19 [20].

**Polio eradication strategy 2022-2026:**

GPEI is focusing efforts on two goals: a) interrupting persistent WPV1 transmission in Pakistan and Afghanistan, and b) stopping all current outbreaks of VDPV2.

To reach the first goal, the GPEI plans to limit poliovirus circulation to core reservoirs and shared corridors of transmission and then interrupt all poliovirus within the reservoirs by 2023, with the global eradication of all wild poliovirus certified by 2026. The program continues to progress to stop transmission of VDPV2 [20].

By 2026, the GPEI plans to end VDPV2 and the validation of the absence of VDPV2 in all foci of the current epidemic by moving to an emergency management structure with clearly defined roles and responsibilities, and strengthening regional and national capacities for sensitive surveillance and rapid, high-quality response. Innovative tools and methods, as well as new partnerships, will be sought to strengthen outbreak response operations [16].

The Post-Certification Strategy (PCS) describes the roadmap for maintaining a polio-free world, including containment, vaccination with appropriate polio vaccines, poliovirus surveillance and outbreak response. A Global Plan of Action (GAPIII), has been developed by WHO outlining the containment requirements for poliovirus to minimize the risk associated with poliovirus installations after wild poliovirus eradication and cessation of administration of poliovirus. oral polio vaccine [20, 21].

## CONCLUSION

In the first half of the 20th century, as smallpox began to disappear, polio (infantile paralysis) was the disease most feared in resource-rich countries.

Actually, only Pakistan and Afghanistan have endemic transmission of wild poliovirus type1 (WPV1). The WPV2 was eradicated in September 2015, and the WPV3 was eradicated in 2019.

Since the outbreak of the COVID-19 pandemic in March 2020, routine vaccination campaigns have been interrupted, leaving 23 million children worldwide without basic immunization and causing new epidemics of VDPV. However, the extensive polio networks were rapidly adapted to the COVID-19 worldwide. New polio eradication strategy has been developed to respond to the polio eradication goal and adapted to the global COVID-19 situation.

## Acknowledgments

The authors would like to thank all the WHO partners in the Eastern Mediterranean Region for their efforts related to end the polio disease.

## Conflict of Interest

There is no conflict of interest to declare

## REFERENCES

- [1] Global Poliomyelitis eradication Initiative. Available at: <https://polioeradication.org/wp-content/uploads/2020/04/GPEI-fact-sheet-20191113.pdf>. Accessed September 2nd, 2021.
- [2] Centers for Disease Control and Prevention. CDC and the Global Polio Eradication Initiative. Available at: <https://www.cdc.gov/polio/gpei/index.htm>. Accessed October 8th, 2021.
- [3] Haqqi A, Zahoor S, Aftab MN, Tipu I, Rehman Y, Ahmed H, Afzal MS. COVID-19 in Pakistan: Impact on global polio eradication initiative. *J Med Virol* 2021; 93(1):141-143
- [4] Mohammed A, Tomori O, Nkengasong JN. Lessons from the elimination of poliomyelitis in Africa. *Nat Rev Immunol* 2021; 21(12):823-828.
- [5] World Health Organization. Contributions of the polio network to the COVID-19 response: turning the challenge into an opportunity for polio transition 2020; World Health Organization. Available at: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/336261>. Accessed September 2nd, 2021.
- [6] Racaniello VR. One hundred years of poliovirus pathogenesis. *Virology* 2006; 344(1):9–16.
- [7] Bodian D. Histopathologic basis of clinical findings in poliomyelitis. *Am J Med* 1949. 6:563–78
- [8] Ahmad T, Arif S, Chaudry N,

- Anjum S. Epidemiological Characteristics of Poliomyelitis during the 21st century (2000-2013). *Int J Public Heal Sci* 2014; 3(3).
- [9] Mehndiratta MM, Mehndiratta P, Pande R. Poliomyelitis: Historical Facts, Epidemiology, and Current Challenges in Eradication. *The Neurohospitalist* 2014; 4(4):223-9.
- [10] Kew O, Pallansch M. Breaking the last chains of poliovirus transmission: Progress and challenges in global polio eradication. *Annu Rev Virol* 2018; 5:427–51.
- [11] World Health Organization. Manual for the virological investigation of poliomyelitis. Geneva, Switzerland: World Health Organization 2004.
- [12] Tan SY, Ponstein N. Jonas salk (1914–1995): A vaccine against polio. *Singapore Med J* 2019; 60(1):9–10.
- [13] Horaud F, Albert B. Sabin and the development of oral poliovaccine. *Biologicals* 1993; 21, 311–6.
- [14] Wassilak S, Orenstein W. Editorial: Challenges faced by the global polio eradication initiative. *Expert Rev Vaccines* 2010; 9(5):447–9.
- [15] Famulare M, Chang S, Iber J, Zhao K, Adeniji JA, Bukbuk D Baba M, Behrend M, Burns C, Oberste S. Sabin Vaccine Reversion in the Field: a Comprehensive Analysis of Sabin-Like Poliovirus Isolates in Nigeria. *J Virol* 2016; 90(1):317–31.
- [16] Bigouette JP, Wilkinson AL, Tallis G, Burns CC, Wassilak SGF, Vertefeuille JF. Progress Toward Polio Eradication — Worldwide, January 2019–June 2021. *MMWR Recomm Reports* 2021; 70(34):1129–35.
- [17] Cochi SL, Dowdle WR. Disease eradication in the 21st century: implications for global health. Cambridge (MA): MIT Press Books; 2011. Available at: <http://mitpress.mit.edu/books/disease-eradication-21st-century>. Accessed October 20, 2021.
- [18] Smith J, Leke R, Adams A, Tangermann RH. Certification of polio eradication: Process and lessons learned. *Bull World Health Organ* 2004. 82(1):24–30.
- [19] Abba Ahmed B. Impact of COVID-19 Pandemic on Global Economy. *SSRN Electron J* 2020; 69(51).
- [20] UNICEF. Polio vaccination campaigns resume in Afghanistan and Pakistan after COVID-19

disruptions leave 50 million children unimmunized.

<https://www.unicef.org/press-releases/polio-vaccination-campaigns-resume-afghanistan-and-pakistan-after-Covid-19>.

Accessed October 20, 2021.

- [21] Global Polio Eradication Initiative (GPEI). Polio Eradication Strategy 2022-2026 Delivering on a promise. Geneva: World Health Organization 2021. Available at: <https://polioeradication.org/wp-content/uploads/2021/10/9789240031937-eng.pdf>. Accessed November 15, 2021.
- [22] World Health Organization: Polio eradication and endgame strategic plan 2013-2018. Poliovirus detection and interruption. WHO; 2013:20–23.

## **II- Evaluation de la surveillance virologique des paralysies flasques aiguës au Maroc**

Ce travail porte sur l'analyse des données de la surveillance virologique des PFA dans notre pays pendant une période de neuf ans (2010-2018). L'objectif de la surveillance de la PFA est d'enquêter de manière exhaustive et de signaler tous les cas de PFA chez les enfants de moins de 15 ans dans le cadre du programme d'éradication de la poliomyélite. Au Maroc, le dernier cas de poliomyélite due au poliovirus sauvage a été notifié en 1989 et aucun cas de poliomyélite n'a été signalé depuis. C'est ainsi que notre pays a eu la certification « polio-free ou exempt de poliomyélite » par l'OMS en 2015.

Une évaluation descriptive et rétrospective des cas de PFA enregistrés systématiquement au Laboratoire national de référence pour la poliomyélite entre 2010 et 2018 a permis d'évaluer l'efficacité du système de surveillance..

La définition de cas utilisée pour une atteinte de PFA était la suivante : tout enfant de moins de 15 ans présentant une faiblesse d'un ou de plusieurs membres. Pour ces cas, l'investigation est réalisée sur un prélèvement de selles adéquat. Un échantillon de selles adéquat consiste en deux échantillons de selles prélevés à 24-48 heures d'intervalle, obtenus dans les 14 jours suivant l'apparition de la paralysie et transportés en respectant la chaîne du froid (à 4 °C) dans les 72 heures après la première selle.

Pendant la période de l'étude (2010-2018), le nombre de cas de PFA notifiés et dont les échantillons de selles ont été envoyés au LNRP et analysés était de 978 cas. Les prélèvements sont accompagnés de formulaires d'enquête standardisés recueillis dans le cadre de la surveillance de routine. 57,06 % de ces cas avaient moins de cinq ans et 56,65 % étaient de sexe masculin. Le statut vaccinal était connu pour 62% de ces enfants.

L'OMS a établi des indicateurs de performance minimaux qui devraient être utilisés pour garantir la qualité de la surveillance de la PFA.

Le taux de cas de PFA non polios pour 100 000 enfants de moins de 15 ans doit être supérieur à 1 pour 100 000 enfants pour les pays à faible risque d'importation du poliovirus. Dans notre étude ce taux variait de 0,84 en 2011-2015 à 2,29 en 2018. Une amélioration considérable dans la notification des cas de PFA a été enregistrée et ce grâce à des formations de sensibilisation des

animateurs de la surveillance sur l'importance des enquêtes actives afin de notifier tous les cas de PFA indépendamment du diagnostic pré-établi par le clinicien.

Les indicateurs d'adéquation des prélèvements de selles restent faibles et doivent être améliorés par le respect du délai d'acheminement des prélèvements et le maintien de la chaîne de froid lors du transport des échantillons. En effet, la chaîne de froid est évaluée par le taux des EVs non polio isolés par culture cellulaire et qui doit être supérieur à 10% alors que la moyenne annuelle de ce taux dans notre laboratoire ne dépassait pas 6,35 %.

Des cas de poliomyélite paralytique associée au vaccin oral sont détectés par culture cellulaire et confirmés par deux tests fournis par le CDC : différenciation intratypique pour le poliovirus (ITD Poliovirus rRT-PCR) qui établit un diagnostic sur le type de poliovirus isolé et VDPV rRT-PCR pour déterminer s'il s'agit d'une souche vaccinale ou d'un poliovirus dérivé du vaccin. En effet, et malgré leurs différentes propriétés, le vaccin antipoliomyélitique inactivé (VPI) et le vaccin antipoliomyélitique oral trivalent (VPO à poliovirus type 1 ; 2 et 3) ont tous deux contribué à accélérer le déclin de la poliomyélite paralytique dans les pays. Le VPO est le plus utilisé dans les pays à faible revenu en raison de son prix abordable, de sa facilité d'utilisation et d'autres qualités, mais l'absorption variable des vaccins et l'affaiblissement des réponses immunitaires dû aux mauvaises conditions d'hygiène ont limité l'impact. Le VPO type 2 a engendré des épidémies de paralysie poliomyélitique associée à ce vaccin raison pour laquelle il a été coordonné au niveau mondial d'introduire le VPI dans le calendrier vaccinal à l'âge de 4 mois en 2015 et de passer du VPO trivalent au VPO bivalent (type 1 et 3) en 2016.

La couverture vaccinale étant très bien maintenue dans notre pays a contribué en l'absence de circulation de poliovirus dérivés du vaccin (VDPV) dans notre population.

Bien que les taux de PFA non polio aient augmenté pour atteindre les critères de l'OMS, l'adéquation globale des selles et le taux d'EVs non polio doivent être améliorés. Indépendamment de la culture cellulaire, les laboratoires peuvent utiliser des techniques alternatives pour s'assurer qu'ils ne passent pas à côté de cas importés de poliovirus surtout en cette ère d'éradication.

Les résultats de cette étude ont été publiés dans la revue *Advances in public health* et l'article tel qu'il a été publié est présenté dans la page qui suit.

## Research Article

# Evaluation of the Acute Flaccid Paralysis Virological Surveillance System in Polio-Free Morocco, 2010–2018

Sanae Lemrabet <sup>1,2</sup>, Maria El Qazoui,<sup>1</sup> Lalla Meryem Idrissi Azzouzi,<sup>1</sup> Ahmed Rguig,<sup>3</sup> Malika Elhamdaoui,<sup>3</sup> Abdelkarim Filali-Maltouf <sup>2</sup>, Leila Medraoui,<sup>2</sup> and Hicham Oumzil<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Virology Department, National Institute of Hygiene, Ministry of Health and Social Protection, Rabat, Morocco

<sup>2</sup>Microbiology and Molecular Biology Team, Research Center for Plant and Microbial Biotechnology, Biodiversity and Environment, Faculty of Sciences, Mohammed V University in Rabat, Rabat, Morocco

<sup>3</sup>Directorate of Epidemiology and Disease Control, Ministry of Health, Rabat, Morocco

<sup>4</sup>Pedagogy and Research Unit of Microbiology and Genomic Center of Human Pathologies, School of Medicine and Pharmacy, Mohammed V University in Rabat, Rabat, Morocco

Correspondence should be addressed to Sanae Lemrabet; [sanae.lem@gmail.com](mailto:sanae.lem@gmail.com)

Received 18 January 2022; Revised 24 July 2022; Accepted 5 September 2022; Published 23 September 2022

Academic Editor: Sylvester C. Chima

Copyright © 2022 Sanae Lemrabet et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**Background.** The goal of Acute flaccid paralysis (AFP) surveillance is to comprehensively investigate and report any case of a child below 15 years with a floppy weakness. This is essential for the poliovirus eradication initiative. **Objective.** In this study, we analyzed the results of nine-year surveillance (2010–2018) of AFP in Morocco. **Method.** This was a descriptive, retrospective study of cases with AFP routinely documented at the National Referral Laboratory of Polio (NRLP) from 2010 to 2018. **Results.** Among the 884 AFP cases identified and analyzed, we identified 11 polioviruses as Sabin-like vaccine strains (PSL). PSL were isolated in 11 samples of AFP cases received at the laboratory, including one PSL1, three PSL2 + PSL3, one PSL1 + PSL2, and one PSL1 + 2 + 3. The annualized nonpolio AFP rate per 100,000 children under 15 years ranged from 0.84 during 2011–2015 to 2.29 in 2018. The stool adequacy indicator was poor and may be improved with better delivery times and maintaining the cold chain. The incidence of isolated nonpolio enteroviruses (NPEV) varied between 2.27% and 12.6%, with the average not exceeding 6.35%; the incidence remained low compared to the indicator set by the World Health Organization (WHO). **Conclusion.** Morocco was certified polio-free by WHO in 2015, and since then no cases of wild poliovirus have been reported. Overall, although the nonpolio AFP rate has risen to the WHO standard, stool adequacy and the proportion of nonpolio enteroviruses need to be improved. The laboratory can adopt alternative techniques, independent of cell culture, to ensure that imported cases of poliovirus are not missed, especially in this era of eradication.

## 1. Introduction

Poliomyelitis is an infectious viral disease that mainly affects children below five years. Less than 1% of children infected with polio develop paralysis, and for every child with paralysis, there are approximately 200 children who are infected but asymptomatic [1]. There is no cure for polio; however, it can be prevented through immunization. The widespread use

of oral polio vaccine (OPV), containing live attenuated poliovirus types 1, 2, and 3, has been the primary method to prevent polio since the early 1960s. However, the attenuated polioviruses contained in OPV can undergo genetic changes during replication and, in communities with low immunization coverage, can give rise to vaccine-derived polioviruses (VDPVs) that can cause paralytic polio similar to the disease caused by wild polioviruses (WPV) [2].

The Global Polio Eradication Initiative (GPEI) was launched by the World Health Organization (WHO) in 1988. Since then, cases of WPV have decreased by approximately 99.99%, and WPV2 and WPV3 types were declared eradicated. Transmission of WPV type 1 (WPV1) is still uninterrupted only in Afghanistan and Pakistan [3]. The key strategies in the GPEI include (1) strengthening childhood immunization through oral polio vaccines, (2) conducting surveillance through investigation of AFP cases among children below 15 years, and (3) conducting house-to-house "mop-up" campaigns in areas where cases of polio have been detected [4]. To achieve a "certification standard," the AFP surveillance systems need to detect at least one case of nonpolio AFP per 100,000 children below 15 years every year and collect two adequate stool specimens from at least 80% of cases with AFP, with the stool specimens tested for poliovirus at a WHO-accredited laboratory [5]. Morocco implemented this GPEI based on the following strategies recommended by the WHO: routine immunization of infants with at least three doses of the oral polio vaccine (OPV), annual national immunization days, during which two additional doses of OPV are administered to all children under five years regardless of their previous immune status, and surveillance of all cases of AFP in a virological laboratory. Since 1990, no case of poliomyelitis has been reported in Morocco. The average vaccination coverage of the population is about 95% with the use of the oral polio vaccine (OPV) and the introduction of the inactive polio vaccine in 2015 [6].

The National Referral Laboratory of Polio (NRLP) has strongly promoted the polio control program and achieved its objectives by ensuring the isolation and identification of the strains of polioviruses causing paralysis. The laboratory was accredited by the WHO in 2001. The accreditation is annually granted after the validation of a performance test or "proficiency testing" through sample analysis and a site visit by a WHO consultant, who evaluates the compliance standards of the laboratory premises and platforms, as well as, the technical procedures followed [7].

The NRLP receives stool samples of all cases of AFP reported in Morocco. Two stool samples of adequate quantity (~8 g) are collected at least 24 h apart from each child with AFP and below 15 years within 14 days of the onset of paralysis. If the sample is collected after 14 days of the onset of paralysis, a stool sample is also collected from five children below 15 years who have been in contact with the child with AFP. The NRLP ensures the isolation and identification of poliovirus in samples collected locally and sent by the surveillance officers. Owing to the efforts of all the stakeholders in the Ministry of Health, Morocco was declared a "Polio Free" zone by the WHO in 2015.

In this study, we analyzed the results of nine-year surveillance (2010–2018) of AFP in Morocco and identified the weak areas that need to be improved to meet the WHO requirements under the GPEI.

**1.1. Ethics Statement.** This study was a part of the GPEI. Fecal samples from children with AFP were sent to the

laboratory for isolation of poliovirus by cell culture. The technical and ethical protocols were validated by the WHO and the Ministry of Health of Morocco.

**1.2. Study Area.** The kingdom of Morocco is a country in North Africa bordering the Atlantic Ocean and the Mediterranean Sea. Morocco has 12 administrative regions [8]. The population of Morocco was 36,670,141 on 14 December 2019, based on the Worldometers report of the latest data from the United Nations [9].

## 2. Methodology

**2.1. Study Design.** This was a descriptive, retrospective analysis of the stool samples of AFP cases routinely collected at the NRLP of the National Institute of Hygiene between 2010 and 2018.

**2.2. Patients and Samples.** During the study, 2529 stool samples were received at the NRLP between 2010 and 2018. Of these, 1799 stool samples were received from 884 AFP cases, and 730 were samples of the contacts of children with AFP (Table 1).

**2.3. Specimen Preparation, Virus Isolation, and Characterization.** The specimens were pretreated before inoculation in the culture medium, and all fecal samples were treated with chloroform. Besides removing the bacteria and fungi, this method also removed potentially cytotoxic lipids and dissociated the virus aggregates [10]. The WHO specified that fecal suspension from all AFP cases should be inoculated in cell cultures of RD (human rhabdomyosarcoma) and L20B (mouse L cells transfected with human cellular receptor gene for poliovirus) and incubated in a stationary inclined position at 36°C. The isolates that showed a cytopathic effect (CPE) only in the RD cell line were assumed to be nonpolio enteroviruses (NPEV), and those that showed CPE on both cell lines, i.e., RD and L20B, were considered to be polioviruses and subsequently subjected to intratypic differentiation (ITD) with a real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (Poliovirus rRT-PCR ITD 5.0 and Poliovirus rRT-PCR VDPV 5.0 kits, Centers for Disease Control, Atlanta, GA, USA). The ITD/VDPV assay was performed to classify polioviruses as nonenterovirus (NE), nonpolio enterovirus (NPEV), vaccine-like (Sabin-like PSL) poliovirus type 1, 2, or 3, or vaccine-derived poliovirus (VDPV) [7].

## 3. Results

**3.1. Demographic and Geographic Characteristics of AFP Cases.** Of the 978 AFP patients identified and analyzed, 57.06% were below five years, and 56.65% were male (Table 2). The vaccination status of 62% of these children was known.

An analysis of the notification of AFP cases per region showed high notification in the Fes-Meknes region, followed by the Casablanca region; these are the northern and eastern

TABLE 1: Distribution of AFP cases per region and per year.

Region	year												Total
	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	
1. Tanger-Tetouan-Al Hoceima	21	14	5	11	14	9	9	22	25	116			
2. Oriental	8	8	16	15	12	13	14	9	29	113			
3. Fes-Meknes	18	14	25	14	18	21	21	39	30	186			
4. Rabat-Sale-Kenitra	7	8	2	14	15	8	8	14	31	94			
5. BeniMellal-Khenifra	7	2	4	6	0	7	4	7	15	49			
6. Casablanca-Settat	11	4	10	18	14	8	14	15	27	121			
7. Marrakech-Safi	14	7	9	13	8	8	3	17	25	106			
8. Draa-Tafilalet	5	8	5	7	4	0	1	9	9	47			
9. Souss-Massa	6	8	4	7	15	4	5	7	16	67			
10. Guelmim-Oued Noun	1	1	1	0	2	1	2	0	0	8			
11. Laayoune-Sakia El Hamra	1	1	0	1	1	0	2	1	3	8			
12. Dakhla-Oued Ed Dabhab	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1			
<b>Total of AFP cases (n = number of stool specimens)</b>	<b>99</b>	<b>76</b>	<b>81</b>	<b>106</b>	<b>103</b>	<b>79</b>	<b>83</b>	<b>140</b>	<b>211</b>	<b>978</b>			
<b>Number of AFP contacts</b>	<b>62</b>	<b>50</b>	<b>52</b>	<b>67</b>	<b>71</b>	<b>68</b>	<b>85</b>	<b>92</b>	<b>183</b>	<b>730</b>			

TABLE 2: Characteristics of AFP cases reported in Morocco between 2010 and 2018.

Characteristic	Value, n (%)
Sex	
Male	554/978 (56.65%)
Female	424/978 (43.35%)
Age (years)	
Unknown	40/978 (4.09%)
<1	53/978 (5.42%)
1–5	505/978 (51.64%)
6–10	228/978 (23.31%)
11–15	152/978 (15.54%)

TABLE 3: Nonpolio AFP rate, percentage of AFP cases with two adequate stool specimens and NPEV rate (WHO).

Target		Year								
		2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018
Nonpolio AFP rate per 100,000 children under 15 years	≥1	1.1	0.84	0.89	1.16	1.12	0.84	0.9	1.52	2.29
% Adequate stool collection	≥80	78	80	81	70	71	57	61	67	78
NPEV rate	>10%	6.80% (11/161)	12.60% (16/126)	2.27% (3/132)	6.35% (11/173)	6.28% (11/175)	5.51% (8/145)	8.82% (15/170)	5.98% (14/234)	2.54% (10/393)

regions of Morocco, respectively (Table 1). Very few cases were reported from Guelmim-Oued Noun and Laayoune-Sakia El Hamra, while no cases were notified in the Dakhla-Oued Ed Dahab region.

**3.2. Nonpolio AFP Rate.** At least one case of nonpolio AFP should be reported each year for every 100,000 children below 15 years. The average nonpolio AFP rate during the nine-year surveillance was 1.18. It ranged from 0.84 in 2011–2015 to 2.29 in 2018 (Table 3).

**3.3. Stool Adequacy.** The WHO stipulates that two stool samples must be collected at least 24h apart, both within 14 days of the onset of paralysis, transported under cold storage with ice, and received in good condition at the WHO-accredited laboratory. At least 80% of the cases must have two adequate stool samples. The adequate stool collection rate ranged from 81% (in 2012) to 57% (in 2015). Three periods were described regarding stool adequacy. The first period corresponded to acceptable stool conditions (2011–2012). During the second period, the rate decreased to 70% in 2013 and further decreased to 61% in 2016. In the third period, the stool adequacy rate steadily increased to 67% in 2017 and 78% in 2018 but was lower than the recommended rate of at least 80% (Table 3).

**3.4. Polioviruses Isolated from Stool Specimens.** In total, 11 polioviruses were identified by ITD as Sabin-like vaccine strains (PSL). PSL were isolated from 11 samples of AFP cases received at the laboratory. One case was of PSL1, three cases each of PSL2 and PSL3, one case was of combined PSL1 and PSL2, and one case was of combined three vaccine strains 1,2, and 3 (PSL1 + 2 + 3).

**3.5. NPEV Isolated from Stool Specimens.** NPEV should be isolated in at least 10% of stool specimens submitted to the laboratory. It is an indicator of the quality of the reverse cold chain and also the efficiency of the laboratory in performing routine isolation of the enterovirus. In total, 99 NPEV were isolated by cell culture from the stool samples of AFP cases. The incidence of isolated NPEV was calculated based on the number of samples of AFP cases and their contacts. This incidence varied from 2.27% to 12.6% (Table 3), and the average did not exceed 6.35%; the incidence remained low compared to the indicator set by the WHO.

The group that was most affected by the NPEV infection included children under five years, corresponding to 87% of the AFP cases (86/99 patients).

**3.6. Turnaround Times for Reports of AFP Cases to the WHO.** The three standard indicators of laboratory timeliness for processing the stool specimen included reporting ≥80% isolation results within 14 days of sample receipt, reporting >80% ITD results within seven days of receiving the sample, and shipping ≥80% of WPV and suspected VDPV isolates to the sequencing lab within three days of obtaining the ITD results. The proportion of the annual results reported by the NRLP during the study period (2010–2018) is shown in Figure 1. All results of AFP cases were communicated by the NRLP within the deadlines set by the WHO. All three standard indicators of laboratory timeliness were met.

## 4. Discussion

Morocco was certified as polio-free by the WHO in 2015, and no new cases of WPV have been reported. However, the importation of poliovirus is a potential threat as outbreaks of the wild virus occur in the Middle East [11]; therefore, continued surveillance for AFP is essential.

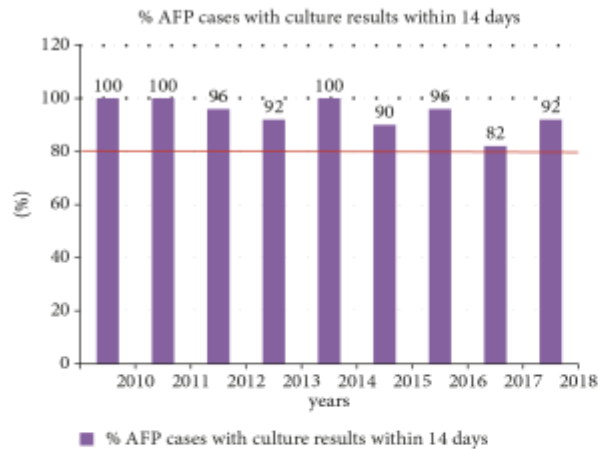


FIGURE 1: Percentage of results of AFP cases reported to the WHO within 14 days of receipt of the sample from 2010 to 2018.

In this study, we reported 11 Sabin-like polioviruses (vaccine strains) after nine years of surveillance of AFP cases and their close contacts as part of the GPEI. The surveillance system revealed no case of WPV or cVDPV in the Moroccan territory. Additionally, 0.6% of cases of residual paralysis were due to attenuated PSL. The data showed that most cases of AFP occurred in children below five years; this was similar to the reports of other studies [12, 13] and confirmed that the risk of developing AFP is greater at a younger age.

The incidence of AFP during the study period was consistently higher among males than females, with an average incidence rate of 56.8% and 43.2% in boys and girls, respectively. Morbidity and mortality rates are higher in men than in women throughout life, and women have stronger humoral and cellular immune responses to infection or antigen stimulation [14]. Our results were similar to those reported in other countries such as Egypt, Jordan, and Spain [12, 15, 16], indicating that boys are more affected by paralysis than girls.

Based on the laboratory data, the reporting of cases of paralysis has improved since 2017 in various regions of the country, especially the Fes-Meknes, Grand Casablanca, Marrakech Safi, and Oriental regions. This improvement is the result of training and awareness workshops conducted by the epidemiologic surveillance service in collaboration with the NRLP. These programs were conducted to ensure that no case of paralysis is missed, regardless of the established diagnosis. Due to these efforts, the AFP detection rate increased, and finally, in 2017 and 2018, met the WHO requirement of  $\geq 1$  per 100,000 children. However, some southern regions failed to report AFP; hence, more efforts are needed, particularly for polio eradication.

The rate of NPEV isolated in the laboratory is a performance indicator linked to the quality of the specimen and transport conditions. The performance of the quality of viral isolation by cell culture is checked every year through the "proficiency test" for isolation and is always found to be 100%. The NPEV rate was very low and was 2.24% in 2018.

Although the number of cases reported has doubled, the transport conditions have not improved. Similarly, the mean NPEV isolation rate reported was 6% in Jordan [15] and 5% in Kurdistan [17]. A high NPEV isolation rate of 20% was reported in Ghana [18], 15% in Egypt [12], and 14.6% in Nigeria [19]. The NPEV rate is a strict criterion for accreditation of the reference laboratories. Hence, it is important to improve the virological culture technique or use more sensitive detection techniques, such as RT-PCR, which do not require the virus to be viable for detection.

**4.1. Limitations of the Study.** This study had some limitations. We performed a retrospective programmatic evaluation, and therefore, our study lacked the strength of data fullness. While designing the study, we took measures to limit sources of bias by gathering uniform and full information, mainly for the data in the first year, where the information system was paper-based. The data completeness was checked thoroughly. Consecutively, enrolling AFP cases and data collection depended on the responsiveness of the field epidemiology teams. Catch-up was often performed in the third trimester. Data management improved after implementing the information system, and patient records were generally complete.

## 5. Conclusion

In this study, we found that the AFP virological surveillance system has improved and has not detected WPV, indicating that the "polio-free" status in our country for the last nine years between 2010 and 2018 is valid. However, the indicators of epidemiological surveillance, including the adequacy of stool samples and the notification of AFP cases, are weak at a regional level and require further efforts for more effective surveillance. The cold chain from sample collection to laboratory testing needs to be maintained to ensure the reliability of the stool specimens required for the isolation of NPEVs.

## Data Availability

All data reported in the tables were included in the main manuscript.

## Disclosure

This study is a report of AFP surveillance in Morocco and was conducted as part of the routine poliovirus surveillance program in the National Referral Polio Laboratory of the National Institute of Hygiene.

## Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

## Acknowledgments

This study did not receive any funding in any form.

## References

- [1] M. M. Mehndiratta, P. Mehndiratta, and R. Pande, "Polio-myelitis: historical facts, epidemiology, and current challenges in eradication," *The Neurohospitalist*, vol. 4, no. 4, pp. 223–229, 2014.
- [2] World Health Organization, "World Health organization: immunization," 2019, <https://www.who.int/immunization/diseases/poliomyelitis/en/>.
- [3] A. Rachlin, J. C. Patel, C. C. Burns et al., "Progress toward polio eradication-worldwide, january 2020–april 2022," *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, vol. 71, no. 19, pp. 650–655, 2022.
- [4] S. Wassilak and W. Orenstein, "Challenges faced by the global polio eradication initiative," *Expert Review of Vaccines*, vol. 9, no. 5, pp. 447–449, 2010.
- [5] J. Smith, R. Leke, A. Adams, and R. H. Tangermann, "Certification of polio eradication: process and lessons learned," *Bulletin of the World Health Organization*, vol. 82, no. 1, pp. 24–30, 2004.
- [6] K. Fahmy, L. M. Hampton, H. Langar et al., "Introduction of inactivated polio vaccine, withdrawal of type 2 oral polio vaccine, and routine immunization strengthening in the eastern mediterranean region," *Journal of Infectious Diseases*, vol. 216, pp. S86–S93, 2017.
- [7] S. S. Z. Zaidi, H. Asghar, S. Sharif, and M. M. Alam, "Poliovirus laboratory based surveillance: an overview," *Methods in Molecular Biology*, vol. 1387, pp. 11–18, 2016.
- [8] Moroccan Government Website Concerning the Regionalization: *Regionalisationavancee*, 2018.
- [9] 2019, <https://www.worldometers.info/world-population/morocco-population>.
- [10] World Health Organisation, *Polio Laboratory Manual*, World Health Organisation, Geneva, Switzerland, 4th edition, 2004.
- [11] A. Wilder-Smith, W. Y. Leong, L. F. Lopez et al., "Potential for international spread of wild poliovirus via travelers," *BMC Medicine*, vol. 13, no. 1, p. 133, 2015.
- [12] A. Abdel-Fattah, A. H. El-Gilany, R. El-Masry, and A. Kanddeel, "Acute flaccid paralysis in North East Delta, Egypt: a retrospective analysis of prospectively collected surveillance data," *Journal of Infection and Public Health*, vol. 12, no. 5, pp. 714–719, 2019.
- [13] H. K. Membo, A. Mweene, S. A. Sadeuh-Mba et al., "Acute flaccid paralysis surveillance indicators in the Democratic Republic of Congo during 2008–2014," *The Pan African Medical Journal*, vol. 24, p. 154, 2016.
- [14] M. Muenchhoff and P. J. R. Goulder, "Sex differences in pediatric infectious diseases," *Journal of Infectious Diseases*, vol. 209, pp. S120–S126, 2014.
- [15] F. Zerriouh, Y. Khader, N. Qasem et al., "Evaluation of the acute flaccid paralysis surveillance system in polio-free Jordan, 2012–2016: retrospective secondary analysis," *JMIR Public Health and Surveillance*, vol. 5, no. 3, Article ID e14217, 2019.
- [16] J. Masa-Calles, N. Torner, N. López-Perea et al., "Acute flaccid paralysis (AFP) surveillance: challenges and opportunities from 18 years' experience, Spain, 1998 to 2015," *Euro Surveillance*, vol. 23, no. 47, Article ID 1700423, 2018.
- [17] J. Soltani, N. Esmailnasab, D. Roshani, M. Karimi, and M. J. Amjadi, "Acute flaccid paralysis and its differential diagnosis in in Kurdistan province, Western Iran; an 11-year surveillance," *Iranian Journal of Pediatrics (Persian edition)*, vol. 24, no. 2, pp. 131–139, 2014.
- [18] J. K. Odoom, N. A. A. Ntim, B. Sarkodie et al., "Evaluation of AFP surveillance indicators in polio-free Ghana, 2009–2013," *BMC Public Health*, vol. 14, no. 1, p. 687, 2014.
- [19] O. B. Soji, O. A. Olayinka, H. O. Tekena, M. M. Baba, D. N. Bukbuk, and O. O. Olayinka, "Non-polio enteroviruses implicated in acute flaccid paralysis in northern Nigeria," *Research Journal of Medicine and Medical Sciences*, vol. 2, no. 1, pp. 25–28, 2007.

**Chapitre 4:**  
**Profil virologique des paralysies flasques aiguës chez  
les enfants au Maroc**

## **I- Détection des EVs et Adénovirus dans les selles négatifs en culture cellulaire par PCR en temps réel**

À l'ère de l'éradication de la polio, la paralysie flasque aiguë (PFA), une présentation clinique majeure de l'infection par le poliovirus, continue de poser un problème de santé publique. Plusieurs agents infectieux appartenant à différentes familles de virus ont été isolés dans des cas de PFA. Les EVs non poliomyélitiques (ENPV) sont considérés comme les principaux agents infectieux dans les cas de PFA, des investigations complémentaires ont montré l'isolement d'Adénovirus dans les selles de certains patients présentant un syndrome poliomyélitique. Le diagnostic des EVs polio et non polio se fait par culture cellulaire dans les laboratoires de référence de la poliomyélite appartenant au réseau de l'organisation mondiale de la santé. Cependant, certains EVs ne se développent pas dans les lignées cellulaires conventionnelles ou les conditions défavorables d'acheminement empêchent que le virus soit isolé par culture cellulaire, d'où la nécessité d'adopter des méthodes plus sensibles et plus rapides pour détecter avec précision les EVs dans les échantillons de selles des patients atteints de PFA.

Dans cette étude rétrospective, des prélèvements de selles d'enfants de moins de 5 ans atteints de PFA et qui étaient négatifs en culture cellulaire ont fait l'objet de recherche par rRT-PCR d'EVs et d'Adénovirus directement à partir des suspensions de selles des patients. Il s'agit de 225 échantillons prétraités par le PBS/Chloroforme ayant subi une extraction d'acides nucléiques sur le système Qiacubeen utilisant le kitAllPrep DNA/RNA Mini kit (Qiagen). Les extraits ont été amplifiés et détectés par PCR en temps réel pour la recherche des EVs et des Adénovirus par le kit DiaENTetle kit R-DiaADV respectivement (Diagenode).

Les résultats ont montré que les EVs étaient présents chez 13% des cas de PFA investigués (n=30/225), et les Adénovirus ont été détectés dans 8% des cas (n=18/225). Il est à noter qu'un nombre de 5 cas parmi les patients étudiés ont montré une coinfection d'EVs et d'Adénovirus (2,2%). C'est ainsi qu'il a été démontré que les méthodes moléculaires sont plus sensibles et plus rapides que la culture cellulaire qui nécessite que le virus soit vivant pour pouvoir l'isoler et nécessite une longue durée (5 à 10 jours) pour rendre un résultat. Il est donc nécessaire de remplacer la culture cellulaire par des méthodes moléculaires afin d'améliorer la sensibilité de la détection des EVs chez les patients atteints de PFA et d'élargir la gamme des virus recherchés pour démontrer leur implication dans l'apparition de la paralysie.

Les entérovirus détectés par rRT-PCR dans le cadre de cette présente étude, en plus des EVs isolés par culture cellulaire, feront l'objet d'un typage moléculaire pour déterminer les différents types impliqués dans les atteintes neurologiques dont la PFA. Le taux des Adénovirus était faible pour pouvoir réaliser un typage moléculaire et nous recommandons que l'investigation soit réalisée sur un plus grand nombre d'échantillons.

Ce type d'études offre un cadre pour d'autres enquêtes approfondies afin de fournir aux autorités les informations nécessaires pour prévenir l'exposition aux facteurs de risque impliqués dans l'incidence et la prévalence de la PFA.

Malgré l'absence de corrélation entre l'AFP et l'infection virale dans la présente étude, nous suggérons de mener cette étude sur une population plus importante couvrant différents pays afin d'obtenir une meilleure vision de la relation entre les différentes infections virales et les PFA.

Les résultats de ce travail ont été publiés le 1<sup>er</sup> Avril 2023 dans la revue *International Journal of BiologyPharmacy and Allied Sciences*. L'article tel qu'il a été publié est reporté sur la page suivante.



---

**DETECTION OF ENTEROVIRUSES AND ADENOVIRUS BY REAL-  
TIME POLYMERASE CHAIN REACTION IN CELL CULTURE  
NEGATIVE STOOL SPECIMENS OF PATIENTS WITH ACUTE  
FLACCID PARALYSIS IN MOROCCO**

**LEMRAKET S<sup>1,2\*</sup>, ZAHER H<sup>3</sup>, RAISS N<sup>2</sup>, ANNAN A<sup>2</sup>, IDRISSE AZZOUZI LM<sup>1</sup>, FILALI  
MALTOUF A<sup>2</sup>, MEDRAOUI L<sup>2</sup> AND OUMZIL H<sup>1,4</sup>**

**1:** Virology Department, National Institute of Hygiene, Ministry of Health, Rabat, Morocco

**2:** Microbiology and Molecular Biology Team, Research Center for Plant and Microbial Biotechnology,  
Biodiversity and Environment, Faculty of Sciences, Mohammed V University in Rabat, Morocco

**3:** Agri-Food and Health Laboratory (AFHL), Faculty of Sciences and Techniques of Settat, Hassan  
First University, Settat, Morocco

**4:** Pedagogy and Research Unit of Microbiology and Genomic Center of Human Pathologies, School of  
Medicine and Pharmacy, Mohammed V University in Rabat, Morocco

**\*Corresponding Author: Dr. Sanae Lemrabet: E Mail: [sanae.lem@gmail.com](mailto:sanae.lem@gmail.com)**

Received 8<sup>th</sup> May 2022; Revised 16<sup>th</sup> June 2022; Accepted 27<sup>th</sup> Aug. 2022; Available online 1<sup>st</sup> April 2023

<https://doi.org/10.31032/IJBPAS/2023/12.4.7036>

**ABSTRACT**

In the era of polio eradication, acute flaccid paralysis (AFP), a major clinical presentation of poliovirus infection, continues to pose a public health problem. Several infectious agents comprising different families of viruses have been isolated from cases of AFP. Non-polio Enteroviruses (NPEVs) are considered to be the main infectious agents in AFP cases; further investigations have shown the isolation of *Adenovirus* from the stools of these patients. However, some Enteroviruses do not grow in the conventional cell lines used for the detection of Enteroviruses which is laborious and time consuming. Thus, more sensitive and faster methods are urgently needed for accurate detection of Enteroviruses in stool samples from AFP cases.

In this study, we aimed to detect Enteroviruses and Adenoviruses in 225 culture negative stool specimens collected from AFP cases by RT-PCR. The Enteroviruses were present in 30/225 samples of AFP patients (13%), and Adenovirus were detected in 18/225 samples (8%). Of note, a number of 5/225 samples (2.2%) showed coinfection of Enteroviruses and Adenoviruses. These results show that the RT-PCR is more rapid and sensitive than the culture. It is therefore necessary to replace cell culture with molecular methods to improve the sensitivity of detecting Enteroviruses in patients with AFP and to expand the range of viruses sought to demonstrate their involvement in the onset of paralysis.

## INTRODUCTION

Acute flaccid paralysis (AFP) is known as a weakness in one or more limbs or the respiratory or bulbar muscles, resulting from damaged lower motor neurons in children under 15 years old [1].

The most common viral causes are polio and non-polio Enteroviruses. In the era of polio eradication, the emergence of other neurotropic viruses, which may cause infections mimicking acute paralytic polio, is of major concern [2].

The poliomyelitis eradication program has progressed through AFP successful surveillance. The main aim of AFP surveillance is the detection of poliovirus, however neurological diseases can be also induced by either non-infectious or infectious pathogens other than poliovirus. Indeed, a number of known viral families have been frequently detected in stool specimens of AFP cases [3].

Among infectious agents, viruses from different families such as Enteroviruses, Flaviviruses, Herpes viruses, Rabies virus and some Arboviruses have been isolated frequently from stool samples of AFP [3]. However, their etiology needs to be further elucidated.

Human Enteroviruses (EVs) are a genus of the Picornaviridae family and responsible for a number of neurological pathologies including acute flaccid paralysis (AFP), encephalitis, and meningitis [4].

Adenoviruses are non-enveloped icosahedral dsDNA viruses. The genus MastAdenovirus comprises mammalian Adenoviruses including 85 genotypes of Human Adenoviruses (HAdV), which are classified into seven species, HAdV-A to HAdV-G. *Adenovirus* infection in immunocompetent subjects is usually asymptomatic or manifests as a mild respiratory syndrome [5]. Adenoviruses have also been shown to infect

the Central Nervous System (CNS) and have been isolated from patients with acute myelopathies [6] and AFP [7].

The method used to isolate poliovirus and non-polio Enterovirus (NPEV) from fecal samples of cases of acute flaccid paralysis is based on tissue culture of viruses on at least two different cell lines (Rd and L20B). Unlikely, failure to isolate virus in cell lines may underestimate the rate of positive specimens for Enterovirus isolation.

Hence, we aimed to detect Adenoviruses and Enteroviruses in stool specimens of AFP cases by RT-PCR sent to the laboratory for investigation of poliomyelitis as part of the global eradication of polioprogram and to compare the performance of molecular results with those of culture.

## Methods

### Specimens

In this retrospective study, we analyzed 225 patients with clinical features of AFP referred to the National Polio Laboratory of Morocco (NPLM) in 2018-2019, all subjects were under 15 years old. Stool specimens were subjected to chloroform pre-treatment. Briefly, about 2 gr of each sample was mixed with 5 ml of Phosphate Buffer Saline (PBS) and 0.5 ml of chloroform. The solution was shaken vigorously for 20 minutes and centrifuged (20 min, 2100 ×g, 4°C) [8]. The

supernatant or stool suspension was used for cell culture [1].

The analyzed specimens were negative for poliovirus and non-polio Enterovirus detection by cell culture, their stool suspensions were used for nucleic acid suspension.

### RNA and DNA extraction

Automated extraction of the viral DNA and RNA has been processed by using the Qiagen Qiacube System with the AllPrep DNA/RNA Mini Handbook kit (Qiagen).

The Real-Time PCR and Retrotranscriptase Real Time PCR were performed using the Enterovirus PCR kits - O-DiaENT™ and Diagenode Adenovirus (R-DiaADV) for Enterovirus and Adenovirus detection in stool specimens respectively; according to the manufactures instructions.

## RESULTS

Among the stool samples from AFP cases sent to the national polio reference laboratory during the period 2018-2019, 225 negative cell culture samples were randomly selected for the detection of Enteroviruses and Adenoviruses.

All patients were less than 14 years old.

The Enteroviruses were present in 30/225 samples of AFP patients (13%), whereas Adenovirus were detected in 18/225 samples (8%).

Of note, 5/225 samples (2.2%) showed coinfection with both Enteroviruses and Adenoviruses.

## DISCUSSION

The aim of AFP surveillance and laboratory diagnosis is to detect PV and remedy its reimportation into polio-free areas. Virological surveillance is based on detection of poliomyelitis and non-poliomyelitis enteroviruses by cell culture in WHO program certified laboratories [9].

Among the performance indicators of virological surveillance, the annual percentage of non-polio Enteroviruses isolated by cell culture, which must be greater than 10%. However, in our laboratory level, this percentage remains low (2% in 2018-2019). Indeed, cell culture for the detection of Enteroviruses has several limitations: 1- low sensitivity of only 65 to 75%; 2- long turnaround time of 3 to 10 days; 3- high degree of technical expertise required [8]. Also, the viability of viruses may be affected by inappropriate transport or storage of samples [10]. Thus, it is crucial to use a less laborious more rapid and sensitive technique such as RT-PCR for rapid and efficient diagnosis of Enteroviruses.

In the present study, we firstly performed the rRT-PCR for Enteroviruses in the stool of patients with acute flaccid paralysis

diagnosed negative in cell culture for the detection of polio and non-polio Enteroviruses. Enteroviruses were detected in 13% (30/225) of these cases. These results are similar to other studies carried out confirming that RT-PCR is more sensitive than cell culture for Enterovirus detection [10, 11].

Although detection of Adenoviruses is a common practice in the stools of patients with diarrhea, testing for Adenoviruses in AFP, to determine its probable involvement in the pathogenesis, has not been reported previously. Our results showed that Adenovirus were present in 8% of the cases studied. The presence of Adenoviruses cannot be considered as etiological factor in the occurrence of paralysis. Likewise, its presence in healthy subjects does not exclude its ability to cause disease. Therefore, their presence in AFP patients remains inconclusive [3; 5].

Coinfection with both Enteroviruses and Adenoviruses was detected in 2.2% of the samples (5/225). This finding deserves more investigations on a larger number of samples. Based on these results, we suggest to prospectively detect Adenoviruses both in patients' stools and in cerebrospinal fluid to confirm or infirm their implication in the occurrence of AFP [12].

## CONCLUSION

As part of the global polio eradication program, virological surveillance of AFP cases is now carried out worldwide.

Surveillance is based on the detection of cases associated with the polio virus or non-polio enteroviruses. However, in a large number of cases, and apart from the non-infectious etiology, the viral agent responsible for the paralysis remains undetermined.

For rapid and efficient diagnosis, RT-PCR must replace cell culture for detection of Enteroviruses. Also it is noted in this study, it is necessary to widen the range of the neurotropic viruses sought in the case of AFP in order to detect the possible causal agents of the disease.

### What is already known on this topic:

- Despite the elimination of poliovirus in all five regions of the world, acute flaccid paralysis continues to present a major public health problem
- In one hand, some enterovirus serotypes with the potential to cause neurological disorders are not easily isolated in cell culture systems used for the diagnosis of AFP. In the other hand, long transit time and failure to follow the cold chain can lead to false negative cell culture results.

### What this study adds

- We tested for the presence of enterovirus genomes in fecal suspensions previously considered negative by cell culture procedures, using Real Time PCR.
- Several studies have reported the presence of Adenovirus in the stools of AFP patients without a causal link to the disease having been proven.

### Competing interests

The authors declare no competing interest.

### Authors' contributions

Conception and study design: Sanae Lemrabet and Hicham Oumzil.

Data collection: Sanae Lemrabet, Houda Zaher, Lalla Meryem Azzouzi Idrissi.

Data analysis and interpretation: Sanae Lemrabet, Houda Zaher, Nouredine Raiss, Azzeddine Annan.

Manuscript drafting: Sanae Lemrabet, Houda Zaher and Hicham Oumzil

Revising the manuscript: AbelKarim Filali-Maltouf, Leila Medraoui and Hicham Oumzil

All the authors have read and agreed to the final manuscript.

### Acknowledgements

The authors would like to thank the National Polio Laboratory team of National Institute of Hygiene for their cooperation

### REFERENCES

- [1] WHO. Polio laboratory manual. 4th ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2004. 2004.
- [2] Suresh S, Rawlinson WD, Andrews PI, Stelzer-Braid S. Global epidemiology of nonpolio enteroviruses causing severe neurological complications: A systematic review and meta-analysis. *Rev Med Virol.* 2020;30(1):e2082.
- [3] Yousefi M, Nejati A, Zahraei SM, Mahmoudi S, Parhizgari N, Farsani SMJ, et al. Enteroviruses and adenoviruses in stool specimens of paralytic children-can they be the cause of paralysis? *Iran J Microbiol.* 2018;10(3):194–201.
- [4] Shaukat S, Angez M, Alam MM, Jebbink MF, Deijs M, Canuti M, et al. Identification and characterization of unrecognized viruses in stool samples of non-polio acute flaccid paralysis children by simplified VIDISCA. *Virol J.* 2014;11(1):1–8.
- [5] Haddad-Boubaker S, Joffret ML, Pérot P, et al. Metagenomic analysis identifies human adenovirus 31 in children with acute flaccid paralysis in Tunisia. *Arch Virol.* 2019;164(3):747-755
- [6] Ohtsuki N, Kimura S, Nezu A. *No To Hattatsu.* 2000;32(1):68-72.
- [7] Ooi MH, Wong SC, Clear D, et al. Adenovirus type 21-associated acute flaccid paralysis during an outbreak of hand-foot-and-mouth disease in Sarawak, Malaysia. *Clin Infect Dis.* 2003;36(5):550-559
- [8] Tangermann RH, Lamoureux C, Tallis G, Goel A. The critical role of acute flaccid paralysis surveillance in the Global Polio Eradication Initiative. *Int Health.* 2017;9(3):156-163.
- [9] Rotbart HA, Ahmed A, Hickey S, et al. Diagnosis of enterovirus infection by polymerase chain reaction of multiple specimen types. *Pediatr Infect Dis J.* 1997;16(4):409-411.
- [10] Shoja ZO, Tabatabai H, Sarijloo M, Shahmahmoodi S, Azad TM, Nategh R. Detection of enteroviruses by reverse-transcriptase polymerase chain reaction in cell culture negative stool specimens of patients with acute flaccid paralysis. *J Virol Methods.* 2007;142(1-2):95-97.
- [11] Santos AP, Costa E V., Oliveira SS, Souza MC, Da Silva EE. RT-PCR based analysis of cell culture negative stools samples from poliomyelitis suspected cases. *J Clin Virol.* 2002;23(3):149–52.
- [12] Ivanova OE, Yurashko OV, Eremeeva TP, Baikova OY, Morozova NS, Lukashev AN. Adenovirus isolation rates in acute flaccid paralysis patients. *J Med Virol.* 2012;84(1):75-80. Diagnosis

of enteroviruses infection by polymerase chain reaction of multiple specimen types.

- [13] Tangermann RH, Lamoureux C, Tallis G, Goel A. The critical role of acute flaccid paralysis surveillance in the Global Polio Eradication Initiative. 2018;(January):156–63.
- [14] Shoja ZO, Tabatabai H, Sarijloo M, Shahmahmoodi S, Azad TM, Nategh R. Detection of enteroviruses by reverse-transcriptase polymerase chain reaction in cell culture negative stool specimens of patients with acute flaccid paralysis. *J Virol Methods*. 2007;142(1–2):95–7.
- [15] Santos AP, Costa E V., Oliveira SS, Souza MC, Da Silva EE. RT-PCR based analysis of cell culture negative stools samples from poliomyelitis suspected cases. *J Clin Virol*. 2002;23(3):149–52.
- [16] Olga E. Ivanova, 1 Olga V. Yurashko, 1 Tatiana P. Eremeeva, 1 Olga Yu. Baikova, 1 Nadezhda S. Morozova 2 and Alexander N. Lukashev1. Adenovirus Isolation Rates in Acute Flaccid Paralysis Patients. *Antivir Ther*. 2006;55(November 2005):52–5.

## II- Typage moléculaire des EVs isolés chez les enfants atteints de PFA

Les systèmes de santé sont constamment vulnérables aux épidémies de virus. L'Organisation mondiale de la santé (OMS) a établi un objectif ambitieux pour éliminer la poliomyélite et a considéré la lutte contre les maladies virales comme une priorité absolue dans le domaine de la santé. Un programme de surveillance capable de détecter efficacement la circulation de la poliomyélite (PV) et des EVs non poliomyélitiques (ENPV) est essentiel pour l'initiative mondiale de l'éradication de la poliomyélite.

Les EVs appartiennent à la famille des Picornaviridae qui infectent les humains et sont classés en quatre espèces (A à D) sur la base de leur divergence génétique (10). Ils sont désormais reconnus comme la cause la plus fréquente de méningite et peuvent provoquer d'autres maladies graves, notamment la myocardite, le syndrome sepsis-like, les maladies respiratoires et l'hépatite aiguë (3).

La détection accrue d'EVs D68 (EV-D68) dans des échantillons respiratoires, ainsi que l'association temporelle et géographique de ces foyers avec une augmentation des cas de myélite flasque aiguë (MFA) observés aux États-Unis et en Europe(11) ; ainsi que les foyers périodiques d'EV-A71 en Asie, démontrent la morbidité et la mortalité importantes qui peuvent être causées par les EVs.

La détection et le sérotypage des EVs sont traditionnellement effectués par l'isolement du virus à partir d'une culture cellulaire suivi par la séroneutralisation. C'est une méthode laborieuse et nécessite une longue durée, et l'isolement des EVs nécessite une combinaison de lignées cellulaires. C'est ainsi que cette méthode rend de nombreux virus "non typables".

Le séquençage Sanger conventionnel de la région non-codante 5'UTR et d'une partie du gène codant pour la protéine de capsid VP1 constitue le « gold standard » de l'analyse génomique et du géotypage des EVs dans les laboratoires de santé publique. Cependant, le développement de la technologie de séquençage de nouvelle génération (NGS) a augmenté de manière exponentielle les informations génomiques pouvant être recueillies sur les agents pathogènes. Ces nouvelles approches NGS ont amélioré la résolution de l'épidémiologie moléculaire, l'étude des événements de recombinaison génomique et l'association avec des syndromes dont l'étiologie reste souvent inconnue, comme l'encéphalite, l'hépatite fulminante, la septicémie, etc.

Dans la présente étude ; nous avons réalisé le typage des EVs isolés par culture cellulaire à partir des prélèvements de selles des cas de PFA reçus au laboratoire national de la poliomyélite dans le cadre de la surveillance des PFA. Il s'agit de 29 isolats viraux sur les lignées cellulaires RD. Le typage a été mené par séquençage Sanger de la région 5' non codante et une partie du gène codant pour l'enveloppe VP1.

Cette étude a révélé que les entérovirus de l'espèce B étaient détectés plus fréquemment que ceux appartenant aux autres espèces d'entérovirus. Les NPEV, responsables de paralysies résiduelles confirmées, incluaient l'Échovirus (types 1, 3, 6, 7, 11, 19 et 21) ainsi que le virus Coxsackie B (types B3 et B4). Au cours de cette recherche, un échantillon a été identifié comme appartenant au sérotype EV-A76, pour lequel seulement douze séquences génomiques complètes sont disponibles dans la base de données GenBank (en date de mars 2023). Seuls quelques pays ont signalé des cas ou des flambées de ce virus.

La paralysie poliomyélitique associée au vaccin est une réaction indésirable à l'exposition au vaccin oral contre la poliomyélite (VAPP). De rares cas de polio paralytique peuvent survenir à cause des poliovirus atténués (affaiblis) utilisés dans la fabrication du vaccin oral (OPV). Cependant, le vaccin poliovirus inactivé (IPV) ne provoque pas de VAPP et offre une protection contre la paralysie causée par tous les types de poliovirus, y compris les souches Sabin de l'OPV susceptibles de provoquer la VAPP. Dans cette étude, un cas de VAPP a été identifié, causé par la souche Sabin3. Pour prévenir l'apparition de VAPP chez les enfants, le Maroc a adopté le programme de vaccination IPV-OPV en 2015.

Le séquençage de la région génomique VP1 est considéré comme la méthode moléculaire la plus fiable pour le typage des entérovirus, étant donné qu'il existe une corrélation absolue entre le sérotype et le génotype dans cette région. Le génotypage par séquençage du génome entier (WGS) et par la région VP1 est plus précis que par la région 5'UTR. Bien que très sensible, le génotypage par la méthode 5'UTR est moins spécifique.

Le whole genome sequencing a été utilisée pour les EVs ayant été isolés par culture cellulaire, mais seulement 11 échantillons ont pu être séquencés par cette méthode. Cette méthode a été réalisée en sélectionnant deux couples d'amorces par espèce d'EVs qui ont généré deux fragments se chevauchant, ce qui a permis de réduire le travail, le temps et le coût par échantillon testé. Le premier couple d'amorces génériques (C004-F et CRE- R) correspond à deux régions conservées pour tous les EVs (-A à -D) et a permis d'amplifier avec succès la première moitié du génome (~4500 nt). La seconde moitié du génome a été amplifiée à l'aide d'amorces génériques conçues pour cibler spécifiquement tous les virus de l'espèce concernée (EV- A, -B, -C et -D). Nous avons pu amplifier la quasi-totalité du génome de tous les EVs en utilisant seulement cinq Mix de PCR. Elle a permis non seulement de fournir une information sur le type d'EVs présent dans l'échantillon mais elle a aussi déterminé la présence de mélange d'EVs de différents sous-types dans la même suspension des selles du cas de PFA.

Les conclusions de cette recherche ont été formulées dans une ébauche d'article en vue de sa soumission.

Le séquençage sera réalisé sur les Evs détectés par rRT-PCR sur les échantillons négatifs en culture en vue de déterminer les autres sous-types existant chez les cas de PFA et qui n'ont pas pu être cultivés sur les lignées cellulaires utilisées au laboratoire.

## Draft d'article

### **Molecular detection and identification of enteroviruses from children with acute flaccid paralysis in Morocco 2017-2021**

Sanae Lemrabet, Marie-Line Joffret, Houda Zaher, Noureddine Raiss, Azzeddine Annan, Abdelkarim Filali Maltouf, Leila Medraoui, Hicham Oumzil and Mael Bessaud.

#### **1. Background**

Enteroviruses (EVs) constitute the largest genus within the family Picornaviridae. These are small naked single-stranded positive RNA viruses of approximately 7,400 nucleotides grouped into four species HEV-A, HEV-B, HEV-C, and HEV-D and have 120 different serotypes(1)(2). Most viruses in this genus cause infections in humans, ranging from mild respiratory illnesses to severe neurological diseases such as meningitis, encephalitis and poliomyelitis(3).

The Enteroviruses genome includes a long single open reading frame (ORF) flanked by 5'UTR and 3'UTR. The ORF encodes a single polyprotein that can be cleaved into mature viral capsid proteins P1 (VP4, VP2, VP3 and VP1) and non-structural proteins P2 (2A–C) and P3 (3A–D). VP1, VP2 and VP3 are on the surface of the viral capsid and are under immune pressure, whereas VP4 is inside the capsid (4)(5).

The conventional method for detection and serotyping of enteroviruses is the seroneutralization after virus isolation by cell culture(6). This is a time consuming and relatively insensitive method, relying on the presence of viable viruses. It also requires a combination of cell lines to isolate all the HEVs. Many viruses are found to be “untypeable” using this method(7)

Several methods based on reverse transcriptase PCR (RT-PCR) and sequencing techniques have been developed for the diagnosis and identification of enteroviruses using oligonucleotide primers complementary to conserved sequences located in the 5' untranslated region (UTR) of the enterovirus genome(8). The capsid protein VP1, located primarily on the virion surface, contains most of the neutralizing epitopes, and the genomic region encoding VP1 has been used in studies

of poliovirus evolution, poliovirus genotyping, and serotype-specific oligonucleotides(9)(10). Comparing isolates previously identified by neutralization with the full-length VP1 cDNA prototype enterovirus strain revealed that the clustering of VP1-derived sequences correlated with serotypes, paving the way for the creation of molecular typing methods compatible with current immunological methods. (9)(11).

The present study reported on the detection and identification of enteroviruses infections associated with acute flaccid paralysis (AFP) cases obtained through routine poliomyelitis surveillance activities at the World Health Organization's (WHO) National Polio Laboratory in Morocco. Both enteroviruses strains isolated by cell culture and enteroviruses detected by qRT-PCR in negative cell culture stools were examined in this investigation.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Ethics statement**

This study was a part of the Global Polio Eradication Initiative. Stool samples from children with AFP were sent to the laboratory for isolation of poliovirus by cell culture. The technical and ethical protocols were validated by the WHO and the Ministry of Health of Morocco.

### **2.2. Clinical samples**

During the period 2017- 2021, stool specimens of AFP cases were received in the National Polio Laboratory of Morocco and were processed according to the WHO protocol (6). The AFP cases were under 15 years of age.

Stool suspensions were prepared by adding approximately 2g of each stool sample to polypropylene test tubes, containing 10 ml of PBS, 5 g of glass beads and 1 ml of Chloroform. The samples were then shaken for at least 20 min, and centrifuged at 1500xg for 20 min at 4°C. The supernatant was carefully collected and used for both inoculation of the cell cultures and RNA extraction procedure for cell-negative stool samples.

### **2.2. Virus Isolation**

According to WHO polio laboratories requirements, two cell lines, RD (Rhabdomyosarcoma) and L20B (mouse L cells expressing the human poliovirus receptor) are used for polio and non-polio enteroviruses detection in the diagnosis of AFP cases (6).

A volume of 0.2 ml of treated faecal sample was used for the inoculation of each cell line culture. The inoculated tubes were then incubated in a roller at 37°C for a period of 1–10 days, until a complete cytopathic effect was observed under ordinary light microscope. Uninfected cells were used as negative control.

36 enterovirus strains isolated in RD cell lines during the study period (2017-2021) were directed to molecular characterisation of the enteroviruses. Cells were frozen and thawed three times and then subjected to RNA extraction procedure.

### **2.3. RNA extraction**

A volume of 140µl of the cell culture supernatant (36 RD+) were used for RNA extraction with the QIAamp viral RNA mini kit (Qiagen, Santa Clarita, CA) as per the manufacturer's instructions and eluted with 40 µl elution buffer.

### **2.4. Real-Time reverse transcription PCR**

In order to check the RNA extraction step, a one-step real-time RT-PCR assay was performed on extraction products. Assays were run on Applied Biosystems 7500 PCR System. The primers and probes used for detection are already described [12]. Reverse primer EV1 [5'-GATTGTCACCATAAGCAGC-3'] (position 579–597), forward primer EV2 [5'-CCCCTGAA TGCGGCTAATC-3'] (position 451–469) and EV-probe [5'-FAM-CGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGT-TAMRA-Phosphor-3'] (position 532–557) were used.

Volume of 5 µL of the concentrate from nucleic acid extraction was added to Invitrogen SuperSriptTMIII Platinum Onestep Quantitative kit. Concentration of the primer was 500 nM; concentration of the fluorescent labeled probe was 250 nM.

The Reverse transcription was produced at 45 °C for 15 minutes. AmpliTaq DNA polymerase was then activated at 95 °C for 2 minutes and PCR performed for 45 cycles for denaturing at 95 °C for 15 seconds, and annealing-extension at 60 °C for 30 seconds. The fluorescent signal was collected during the step of annealing-extension.

## 2.5. RT-PCR and Sanger sequencing

A two-step RT-PCR was used. Synthesis of cDNA was done in a 20- $\mu$ L reaction volume containing 0.01 M dithiothreitol (DTT), 2 mmol/L deoxynucleotide triphosphates (dNTPs), 20 U of RNAsin (Promega, Madison, WI, USA), 10 pmol of the HeptaN primer, 200 U of RT superscript II reverse transcriptase (Invitrogen), 4  $\mu$ L of 5 $\times$  RT buffer, and 2  $\mu$ L of extracted RNA. The mixture was incubated at 25°C for 10 min, 42°C for 50 min and 70°C for 15 min.

2  $\mu$ L of cDNA was then used in the PCR (final volume, 50  $\mu$ L) (PCR1), consisting of 5  $\mu$ L of 10x PCR buffer (Invitrogen), 200  $\mu$ M each dNTP, 50 pmol each of primers UG52 (5'-CAAGCACTTCTGTTTCCCCGG-3'), UC53 (5'-TTGTCACCATAAGCAGCCA-3') for the 5'UTR fragment and AMTH (5'-GCIATGYTIGSIACICAYVT-3'), GDCL (5'-ARIABICCCRCARTCICC-3') for the VP1 genome [13], and 5 U of Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen), with 35 cycles of amplification (95°C for 20 s, 45°C for 30 s, 60°C for 2 min; and final extension at 72°C for 10 min).

The VP1 PCR products were subjected to a second round of PCR under the same experimental procedures using the primers 224 (5'-GCIATGYTIGSIACICAYVT-3'), 222 (5'-CICCIGGIGGIAYRWACAT-3') designed by Nix et al.[9].

The reaction products of the 5'UTR PCR and VP1 nested PCR were separated and visualized on 2% agarose gel containing 0.5  $\mu$ g ethidium bromide per ml.

PCR products were cleaned with ExoSAP-IT<sup>®</sup> (Applied Biosystems<sup>™</sup>) and the sequences of the obtained amplicons were verified by sequencing using a BigDye terminator v3.1 kit (Applied Biosystems) on an ABI Prism 3130 automated sequencer (Applied Biosystems). The primers used for the sequence reaction mixture were UG52/UC53 for the 5'UTR fragment and AMTH/GDCL or 222/224 for the VP1 genome.

## 2.6. Whole genome sequencing

Synthesis of cDNA was carried out in a 15  $\mu$ L reaction mixture containing 4  $\mu$ L of RNA, 100 $\mu$ M each deoxynucleoside triphosphate, 0.5  $\mu$ g/ $\mu$ L of Oligo (dT)<sub>18</sub>, and deionised water. The mix was then incubated in 65°C for 5 min, and put on ice for 2 min. 4  $\mu$ L of the 5x RT buffer and 1 $\mu$ L of the Maxima H minus enzyme Mix were added to the each RT reaction mixture and then incubated at 50°C for 30 min and 85°C for 5 min.

The cDNA obtained was amplified in two rounds of PCR: one mix for all species of enterovirus and a mix for each of the four species of enterovirus separately (A,B,C and D) using the primers shown in Table 1 [13, 14]. A volume of 2µl of the cDNA was added to a First round PCR reaction mixture containing 5µl of the 5x Phusion HF Buffer, 40pmol each of primers, 1 mmol/L deoxynucleotide triphosphates, 0.5 U of Phusion High-Fidelity DNA polymerase (Thermo scientific) and incubated at 98°C for 30 s prior to 35 cycles of amplification (98°C for 10 s, 55°C for 30 s, 72°C for 3 min) and a final extension at 72°C for 10 min.

**Table 1:** Primers for PCR 1 -NGS

MIX	Primer	Position	Sequence	length
A,B,C and D	5NC-6BF	165-185	CAAGCACTTCTGTTTCCCCGG	
	EV-CRE-R	4500	CGGBRRTTGSWCTTGAAGCTG	4000
A	EVA-4110-F	4110	AARAARTTYAAYGAYATGGC	
	EVA-7410-R	7410	TTTGCTATTCTGGTTATAAC	3300
B	EVB-4110-F	4110	GGCGNTGGCTYAARCRAARG	3300
	EVB-PolyT	end	TTTTTTTTTTTTTTTTCCGCACCG	
C	EVC-4220-F	4220	GARGCNTGYAAYGCNGCNAARG	
	C005-R	7415	CCGAATYAAARRAAAATTACCC	3200
D	EVD-4064-F	4065	GGCTNAAGAARTTCACAGARGC	
	EVD-7362-R	7362	CCAAKTRACCAAAAATTTACC	3298

The PCR products were subjected to a second round of PCR using the primers listed in Table 2.

**Table 2:** Primers used for the Nested PCR-NGS.

MIX	Name	Position	Sequence	Size
A,B,C and D	UG53	577-595	TGGCTGCTTATGGTGACAAT	
	EV-CRE-R	4500	CGGBRRTTGSWCTTGAAGCTG	3923
A	EVA-4250-F	4250	GARAAAYCARATHHTCHAAAYHTNG	
	EV-A-7380-R	7380	CYAGTCATDAACACGACCAG	3130
B	EV-B-4215-F	4215	GYAARGGNATGGARTGGATWG	
	EVB-7400-R	7400	GCACCGAATGCGGAGAATTTAC	3185
C	EVC-4390-F	4390	GYCCNAGYCARGAASAHCARG	
	EVC-7405-R	7405	GACTGAGGTAGGGTTACTAAA	3015
D	EVD-4112-F	4112	GGCTAKCMCAAAGATWGAC	
	EVD-7311-R	7311	AAKTAGAGTTATCTARAAYG	3199

For each sample, the five PCR products were pooled and purified using a nucleofast 96 PCR plate (Macherey-Nagel) and then sent to the sequencing platform PIBNET (Pasteur International Bioresources Network, Institute Pasteur Paris). The libraries were created using 1 ng of DNA with the Nextera XT DNA Library Preparation Kit in a SureCycler 8800 thermocycler (Agilent). Following purification on AMPure beads (Beckman), the libraries were controlled using the High

Sensitivity D1000 assay (Agilent) on a TapeStation 2200. The products were sequenced using Illumina NextSeqHiSeq. All kits were used following manufacturer's instructions.

### **3. Results**

#### **3.1. Cell culture isolation**

29 enterovirus clinical strains from respective clinical cases were isolated initially by the cell culture algorithm. Due to the reduced sensitivity that is frequently encountered with conventional cell culture systems, repeated passages were required in most cases till the observation of a cytopathic effect in only one, or two cell lines.

#### **3.2. Sanger Sequencing of the 5'UTR**

After gel electrophoresis of the 5'UTR PCR products, only samples with Ct values below 25 during rRT-PCR gave a positive signal. These were 15/29 RD cell culture positive (table 3).

Sequencing of the 5'UTR revealed that the majority of enteroviruses belong to group B. An enterovirus A76 was detected and a sabin3 strain was identified.

Sequencing of part of VP1 showed a high diversity of enteroviruses belonging to group B, including Echoviruses 1, 3, 6, 7, 11, 19 and 21, and Coxsackieviruses B3 and B4.

#### **4. Sanger Sequencing of the VP1 and NGS**

11 samples were amplified with the Nested PCR of VP1 and sequences obtained using the VP1 primers were the same as those of the sequence analysis on the corresponding 5'UTRs. Of these 11 samples, only 8 were typed using the whole genome sequencing: the same EV group was identified for all the samples and 5/8 had of the samples belonged to different EV types. Six samples were successfully sequenced by the NGS method while they were negative with sanger sequencing for 5UTR and VP1: 3/6 were identified as non-enterovirus, 1/6 sample contained three types of EV and 2/6 were corresponding to Echovirus 7.

**Table 3:** Results for the 29 virus isolated in RD cell lines subjected for 5'UTR and VP1 Sanger sequencing and NGS sequencing.

Isolate	qRT-PCR 5'UTR(Ct)	PCR UG52/UC53	Species/Serotype	Nested VP1	Serotype 5UTR/VP1 Sanger	Nested-NGS					Seq NGS, position
						P1	EV A	EV B	EV C	EV D	
1	32	-		-		-	-	-	-	-	
2	34	-		-		-	-	-	-	-	
3	17	-		-		-	-	-	-	-	
4	18	+	EV-B	+	E3	-	-	-	-	-	
5	24	+	EV-B	+	E6	-	-	-	-	-	
6	33	-		-		p1	-	-	-	-	no EV
7	15	+	EV-A76	+	EV-A76	-	-	-	-	-	
8	16	+	Sab3	+	Sab3	-	-	-	EV C	-	MAR-8-NODE_1-Sab3 nt 4106-7415
9	31	-		-		-	-	-	-	-	
10	16	+	EV-B	+	E21	-	-	EV B	-	-	MAR-10-NODE_2-CVB2-nt4085-7053
11	16	+	EV-B	-		-	-	EV B	-	-	MAR-11-NODE_1-EVB-E11-E30-nt4130-7428
12	14	+	EV-B	+/-		p1	-	EV B	-	-	MAR-12-NODE_1-E7-nt4025-7390
13	18	+	EV-B	+/-	CV-B3	-	-	EV B	-	-	MAR-13-NODE_1-E9-nt4022-7418
14	18	-		-		p1	-	-	-	-	no EV
15	18	+	EV-B	+/-		-	-	EV B	-	-	MAR-15-NODE_1-E7-nt4025-7390
16	36	-		-		-	-	-	-	-	
17	33	-		-		-	-	-	-	-	
18	18	+	EV-B	-	E7	-	-	EV B	-	-	MAR-18-NODE_1-EVB-nt4030-7430
19	17	+	EV-B	-	E1	-	-	EV B	-	-	MAR-19-NODE_1-CVB-nt4097-6890
20	15	-		-		-	-	-	-	-	
21	20	+/-	EV-B	-		-	-	-	-	-	
22	33	-		-		-	-	-	-	-	
23	35	-		-		-	-	-	-	-	
24	32	-		-		-	-	-	-	-	
25	35	+/-		-		p1	-	-	-	-	no EV
26	20	+	EV-B	+	CV-B4	p1	-	-	-	-	MAR-26-NODE_15-CVB-nt6737-7390
27	35	-		-		-	-	-	-	-	
28	18	+	EV-B	+	E19	-	-	EV B	-	-	MAR-28-NODE_1-EVB-nt4020-7400
29	18	+	EV-B	+	E11	-	-	EV B	-	-	MAR-29-NODE_1-E11-nt4040-7408

## Discussion

Polio and a number of non-polio enteroviruses are among the leading causes of central nervous system (CNS) diseases, including acute flaccid paralysis (AFP)(1). Because non-polio enteroviruses (NPEVs) can produce AFP that resembles the symptoms brought on by wild polioviruses, the only way to distinguish between these agents is by biological analysis of the virus at the laboratory level. Therefore, applying molecular techniques for fast detection can reduce the time needed to detect enteroviruses and polioviruses from 2-3 weeks to 1-2 days(15,16). Although not definitive, the isolation of a given enterovirus from stool samples is highly suggestive of that agent's involvement in the etiology. Some enterovirus serotypes, however, are difficult to isolate in cell culture. 29 viral isolates on RD cell lines were subjected to the 5'UTR typing, VP1 typing and whole genome sequencing.

The results of this study showed that species B enteroviruses were more commonly detected than members of the other enterovirus species. The NPEVs, implicated in confirmed residual paralysis were Echovirus (1, 3, 6, 7, 11, 19 and 21) and Coxsackie virus B (B3, and B4).

In this investigation, one sample were determined as EV-A76 as only twelve complete genome sequences for the EV-A76 known serotype are currently available in the GenBank database (as of March 2023), and only a few countries have reported cases or outbreaks of the virus (17).

Vaccine-associated paralytic poliomyelitis is a negative response to OPV exposure (VAPP). Rare cases of paralytic polio could arise from live attenuated (weakened) polioviruses used to produce OPV(21). However, the inactivated poliovirus vaccine (IPV), does not result in VAPP and is able to protect against paralysis from all poliovirus types, including the Sabin strains of OPV that can cause VAPP(22). In the present investigation, one case of VAPP was identified due to Sabin3 strain. To stop the emergence of VAPP in children, Morocco switched to the IPV-OPV immunization program in 2015.

Sequencing of the VP1 genomic region is considered to be the most reliable molecular method for enterovirus typing, as it is well established that in this region there is an absolute serotype-genotype correlation. Genotyping with WGS and VP1 is more accurate than 5'UTR. Genotyping by the 5'UTR method is very sensitive, but less specific (23).

The public health impact of enteroviruses has been highlighted by outbreaks of severe neurological disease that mimicked polio but was linked to non-polio enteroviruses. In light of this, we hypothesize that NPEVs may predominate in their ability to cause paralysis after polio

must have been completely eradicated. Thus, investigating non-polio enteroviruses linked to neurological effects becomes essential.

This study also highlights the probable role of non-polio viral etiologies associated with AFP and needs to plan new strategies especially during the post polio eradication era.

### **Ethical Approval**

This report does not contain any data that might be used to identify study participants.

### **References**

1. Tapparel C, Siegrist F, Petty TJ, Kaiser L. Picornavirus and enterovirus diversity with associated human diseases. *Infect Genet Evol.* 2013;14:282-293.
2. Renois F, Bouin A, Wehbe M, Leveque N, Andreoletti L. Persistent enterovirus infections and human diseases | Infections persistantes à entérovirus et pathologies humaines. *Virologie.* 2014;18(6):306–24.
3. Baggen J, Thibaut HJ, Strating JRPM, Van Kuppeveld FJM. The life cycle of non-polio enteroviruses and how to target it. *Nat Rev Microbiol [Internet].* 2018;16(6):368–81.
4. Racaniello, VR. Picornaviridae: The viruses and their replication. In: Knipe, DM.; Howley, PM.; Griffin, DE.; Lamb, RA.; Martin, MA.; Roizman, B.; Strauss, SE., editors. *Fields Virology.* 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins; USA: 2007. p. 795-838.
5. Zhou F, Kong F, Wang B, McPhie K, Gilbert GL, Dwyer DE. Molecular characterization of enterovirus 71 and coxsackievirus A16 using the 5' untranslated region and VP1 region. *J Med Microbiol.* 2011;60(3):349–58.
6. WHO. Polio laboratory manual. WHO Libr [Internet]. 2004;4(August):157. Available from: <http://apps.who.int/iris/handle/10665/68762>
7. Pulli, T., Koskimies, P., & Hyypiä T. Molecular comparison of coxsackie A virus serotypes. 1995;212(1), 30–38.
8. Kyriakopoulou Z, Tsolis K, Pliaka V, Tsakogiannis D, Ruether IGA, Gartzonika C, et al. Combined 5' UTR RFLP analysis and VP1 sequencing for epidemic investigation of enteroviruses. *Arch Virol.* 2013;158(1):103–11.

9. Oberste MS, Nix WA, Maher K, Pallansch MA. Improved molecular identification of enteroviruses by RT-PCR and amplicon sequencing. *J Clin Virol.* 2003;26(3):375–7.
10. Allan Nix W, Oberste MS, Pallansch MA. Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 2006;44(8):2698–704.
11. Caro V, Guillot S, Delpeyroux F, Crainic R. Molecular strategy for “serotyping” of human enteroviruses. *J Gen Virol.* 2001;82(1):79–91.
12. S. Monpoeho, A. Dehée, B. Mignotte, L. Schwartzbrod, V. Marechal, J.-C. Nicolas SB& VF. Quantification of Enterovirus RNA in Sludge Samples Using Single Tube Real-Time RT-PCR. *Biotechniques.* 2000;29(1):88–93.
13. Bessaud M, Jegouic S, Joffret ML, Barge C, Balanant J, Gouandjika-Vasilache I, et al. Characterization of the genome of human enteroviruses: Design of generic primers for amplification and sequencing of different regions of the viral genome. *J Virol Methods.* 2008;149(2):277–84.
14. Joffret ML, Polston PM, Razafindratsimandresy R, Bessaud M, Heraud JM, Delpeyroux F. Whole Genome Sequencing of Enteroviruses Species A to D by High-Throughput Sequencing: Application for Viral Mixtures. *Front Microbiol.* 2018;9:0–10.
15. Santos AP, Costa E V., Oliveira SS, Souza MC, Da Silva EE. RT-PCR based analysis of cell culture negative stools samples from poliomyelitis suspected cases. *J Clin Virol.* 2002;23(3):149–52.
16. Shoja ZO, Tabatabai H, Sarijloo M, Shahmahmoodi S, Azad TM, Nategh R. Detection of enteroviruses by reverse-transcriptase polymerase chain reaction in cell culture negative stool specimens of patients with acute flaccid paralysis. *J Virol Methods.* 2007;142(1–2):95–7.
17. Oberste MS, Maher K, Michele SM, Belliot G, Uddin M, Pallansch MA. Enteroviruses 76, 89, 90 and 91 represent a novel group within the species Human enterovirus A. *J Gen Virol.* 2005;86(2):445–51.
18. Li X, Lu H, Sun Q, Zheng P, Zhang B, Cui H, et al. Transmission of recombinant enterovirus A76 (EV-A76) in Xinjiang Uighur autonomous region of China. *Emerg*

- Microbes Infect. 2023;12(1):3–5.
19. Peacey M, Hall RJ, Wang J, Todd AK, Yen S, Chan-Hyams J, et al. Enterovirus 74 Infection in Children. PLoS One. 2013;8(10):1–9.
  20. Sun Q, Zhang Y, Cui H, Zhu S, Li X, Huang G, et al. Complete genome sequence analysis of two human enterovirus C99 strains isolated in Xinjiang Uighur Autonomous Region, China, in 2011. Arch Virol. 2014;159(2):359–64.
  21. Modlin JF, Bandyopadhyay AS, Sutter R. Immunization against Poliomyelitis and the Challenges to Worldwide Poliomyelitis Eradication. J Infect Dis. 2021;224(4):S398–404.
  22. Fahmy K, Hampton LM, Langar H, Patel M, Mir T, Soloman C, et al. Introduction of Inactivated Polio Vaccine, Withdrawal of Type 2 Oral Polio Vaccine, and Routine Immunization Strengthening in the Eastern Mediterranean Region. J Infect Dis. 2017;216(1):S86–93.
  23. Gulholm T, Yeang M, Nguyen I, Andrews PI, Balgahom R, Beresford R, et al. Molecular typing of enteroviruses: comparing 5'UTR, VP1 and whole genome sequencing methods. Pathology. 2022;54(6), 779–783.

## **Discussion Générale**

## **Poliomyélite : Pionnière de l'initiative mondiale de l'éradication**

S'inspirant de la remarquable réussite de l'éradication de la variole, l'Initiative mondiale pour l'éradication de la poliomyélite (IMEP) a été inaugurée en 1988 et prévoyait l'élimination de la polio en l'an 2000. Bien que cet objectif initial n'ait pas encore été concrétisé, les progrès réalisés dans la lutte contre la poliomyélite sont indéniables et la maladie est aujourd'hui confinée plus étroitement qu'auparavant. Après éradication des poliovirus de type 2 et 3, actuellement, le poliovirus de type 1 ne maintient sa circulation qu'au sein d'une seule région de l'Organisation mondiale de la santé (OMS), à savoir la Région EMRO (Région de la Méditerranée orientale), et son impact est circonscrit à seulement deux pays : le Pakistan et l'Afghanistan. Ceux-ci demeurent les deux derniers bastions où le virus persiste, mais les efforts soutenus de vaccination et de surveillance ont permis de réduire considérablement sa propagation. Les avancées dans la lutte contre la polio témoignent de l'engagement global en faveur de la santé publique et de la coopération internationale visant à éradiquer cette maladie dévastatrice une fois pour toutes.

Les vaccins poliomyélitiques ont joué un rôle crucial dans les efforts mondiaux d'éradication de cette maladie. En particulier, le vaccin antipolio oral (VPO) se distingue par sa facilité d'administration et sa capacité à susciter une réponse immunitaire locale au niveau intestinal. De plus, il joue un rôle majeur dans la construction d'une immunité collective, agissant pour réduire la propagation du virus au sein des communautés. Néanmoins, il convient de noter qu'une préoccupation exceptionnelle réside dans la possibilité, quoique très rare, que le virus atténué contenu dans le VPO subisse des mutations, entraînant ainsi des flambées de poliovirus dérivé du vaccin (VDPV), notamment dans les zones où la couverture vaccinale n'est pas optimale.

Depuis l'établissement du Programme National d'Immunisation en 1987, le Maroc a enregistré des progrès significatifs dans la gestion des maladies infectieuses en général, et spécifiquement dans le contrôle des maladies ciblées par la vaccination. À cet égard, aucun cas de poliomyélite n'a été signalé depuis 1989 grâce à une politique sanitaire préventive solide. Néanmoins, la persistance d'un risque d'introduction extérieure nous oblige à maintenir une vigilance soutenue, tout en assurant une couverture vaccinale adéquate contre la poliomyélite. Ces mesures demeurent les piliers essentiels pour garder le statut de « Polio Free » obtenu depuis 2015.

Après la déclaration de l'éradication du poliovirus type 2, il a été décidé de le retirer de la composante vaccinale du vaccin trivalent (contenant les poliovirus de type 1, 2 et 3) et switcher vers le vaccin bivalent contenant les poliovirus de type 1 et 3. Le Maroc, à l'instar des autres pays du monde, a commencé dès 2015 à se préparer au remplacement et au retrait du VPOt, et le

remplacement a été lancé de façon effective en avril 2016. Le vaccin antipolio inactivé a été introduit dans le calendrier vaccinal de notre pays en 2015. Il est administré à l'âge de 4 mois, en plus du VPO, et ne remplace aucune des doses du VPO. Le VPI est recommandé pour les programmes de vaccination systématique et non pour les campagnes de vaccination.

Grâce à une couverture vaccinale optimale dépassant 95%, la menace des souches de poliovirus dérivé du vaccin (VDPV) a été efficacement prévenue sur notre territoire. Les campagnes de vaccination bien planifiées, associées à une sensibilisation continue en matière d'hygiène et de prévention, ont abouti à l'absence totale de circulation des souches VDPV au Maroc. Cette réalisation démontre l'engagement résolu du pays à garantir la santé publique et à maintenir une protection durable contre la poliomyélite, contribuant ainsi aux efforts mondiaux visant à éradiquer cette maladie.

Le taux de couverture vaccinale dans notre pays dépasse les 95%, c'est ainsi qu'aucun cas de poliomyélite dérivé du vaccin (VDPV) n'a été notifié. Cependant, de rares cas de paralysie poliomyélitique associée au vaccin (VAPP). Il est tout à fait légitime d'affirmer que sans le vaccin antipolio inactivé (VPI), la réalisation de l'éradication mondiale de la poliomyélite serait tout aussi irréalisable. Dans un monde où le virus sauvage de la polio aurait été éradiqué, le VPI se révélerait être le seul moyen de se prémunir contre trois risques persistants. Tout d'abord, il permettra de contrer la circulation potentielle de virus dérivés du vaccin oral, excrétés par des individus immunodéprimés. De plus, le VPI servira de bouclier face à la libération accidentelle de virus provenant d'échantillons de laboratoire, ainsi que face à la menace de bioterrorisme. De manière cruciale, le VPI facilitera également la surveillance attentive de toute réapparition de poliovirus : une fois que la circulation de virus associés au vaccin oral aura cessé, la détection d'un unique poliovirus – qu'il provienne d'un patient ou de l'environnement – servira de signal d'alarme, déclenchant des enquêtes et des mesures d'intervention rapides. Enfin, et c'est un élément majeur, le VPI offrira en toute sécurité une protection individuelle continue aux personnes vaccinées, jusqu'à ce que toute crainte de résurgence du virus de la polio, que ce soit par accident ou intention malveillante, soit dissipée.

### **Eradication de la polio durant la COVID-19**

La récente pandémie de coronavirus (COVID-19) a profondément bouleversé les systèmes de santé à l'échelle mondiale, créant un défi sans précédent pour les professionnels de la santé. Les établissements médicaux se sont retrouvés confrontés à la tâche complexe de jongler entre la

prise en charge des patients atteints de COVID-19 et la gestion continue d'autres affections potentiellement mortelles.

Les perturbations causées par la pandémie de COVID-19 ont eu des conséquences d'une grande portée, allant au-delà de ses effets immédiats sur la santé. Dans de nombreux pays, dont le Pakistan, des services et des équipes de lutte contre la poliomyélite ont été contraints de fermer leurs portes à cause de la pandémie. Les ressources sanitaires locales et les organisations internationales telles que l'Organisation mondiale de la santé (OMS) ont fait état de ces fermetures. Les conséquences de ces fermetures se répercutent sur le système de santé, affectant non seulement les soins de routine de la poliomyélite qui sont essentiels pour prévenir la propagation de la maladie, mais aussi la fourniture de traitements urgents. En outre, la pandémie a mis à rude épreuve les relations des patients avec leur famille, car les restrictions et les mesures de sécurité ont limité les contacts et les interactions. Cette situation complexe met en évidence l'équilibre délicat que les systèmes de santé doivent trouver lors d'une crise mondiale, alors qu'ils s'efforcent de relever simultanément de multiples défis sanitaires tout en veillant à ce que les patients reçoivent les soins dont ils ont besoin et en maintenant des liens solides avec les familles et les communautés. Elle met en évidence la nécessité pour les pays et la communauté mondiale de la santé de collaborer pour atténuer les effets plus larges de la pandémie sur les services de santé essentiels.

L'impact des diverses crises sanitaires a également influencé la mise en œuvre de la vaccination contre la COVID-19. Les flambées de polio, de rougeole, de fièvre jaune et plus récemment d'Ebola ont engendré des changements de perspective au sein des nations touchées, altérant les échelles de priorités établies.

L'émergence de la pandémie de COVID-19 et les actions entreprises pour la contenir ont fourni une opportunité de reconnaître l'importance de l'infrastructure préexistante dans la lutte contre la poliomyélite, et de garantir sa durabilité à long terme. Cette période a mis en évidence la capacité d'adaptation des vastes réseaux dédiés à l'éradication de la polio, qui ont été rapidement ajustés pour répondre aux exigences du contexte de la pandémie de COVID-19.

Au plein milieu de la pandémie mondiale de COVID-19, la région africaine a été certifiée exempte de polio en Août 2020. Le succès de la certification de l'Afrique témoigne non seulement des efforts acharnés déployés pour éradiquer cette maladie débilitante, mais également de l'impact profond du programme de lutte contre la poliomyélite sur la santé des communautés locales. Ce programme, en plus de cibler spécifiquement la polio, a engendré des bénéfices

considérables et durables dans d'autres domaines de la santé publique spécialement la COVID-19. En effet, à travers le monde et dans le contexte de la pandémie de COVID-19, les compétences et l'infrastructure mises en place pour la surveillance, la vaccination et la mobilisation communautaire dans le cadre de la lutte contre la polio se sont révélées inestimables. Les mécanismes établis pour suivre et répondre aux flambées épidémiques ont permis une réaction rapide et coordonnée face à la propagation du virus. Les partenariats solides entre les gouvernements, les organismes de santé et les communautés ont facilité la communication d'informations vitales, le renforcement des systèmes de santé et la mise en œuvre de mesures de prévention efficaces.

De plus, le programme de lutte contre la poliomyélite a eu un impact profond sur la sensibilisation à la vaccination et l'importance de l'immunisation systématique. Les campagnes de vaccination ont contribué à renforcer la confiance des communautés envers les services de santé, encourager la participation active et sensibiliser à la valeur de la prévention. Par conséquent, non seulement les taux de polio ont été réduits, mais également ceux de diverses autres maladies évitables par la vaccination.

Le programme de lutte contre la poliomyélite a montré comment des efforts concertés peuvent non seulement éradiquer une maladie dévastatrice, mais aussi renforcer les systèmes de santé, promouvoir l'immunisation et améliorer la résilience des communautés face aux défis de santé publique, y compris les pandémies.

### **Foyers de Poliovirus dérivés du vaccin (cVDPV)**

Entre janvier 2021 et mars 2023, un total de 1 619 occurrences de cVDPV ont été rapportées dans 36 nations. Parmi ces pays, six ont notifié 225 incidents de cVDPV de type 1, tandis que 34 pays ont enregistré 1 393 incidents de cVDPV de type 2. La République démocratique du Congo (RDC), le Malawi, le Mozambique, la République du Congo et le Yémen ont rapporté la présence simultanée du cVDPV1 et du cVDPV2. Au cours de l'année 2022, on a identifié 673 occurrences de cVDPV2 réparties dans 20 pays ; parmi celles-ci, les 504 cas détectés en RDC représentaient 59 % de l'ensemble des cas mondiaux de cVDPV signalés. Pour ce qui est du cVDPV de type 1, le bilan mondial s'élevait à 185 incidents déclarés dans cinq pays pour l'année 2022(7).

En 2022, parmi les foyers accidentels, on a identifié le poliovirus de type 2 dérivé d'un vaccin (VDPV2) à partir d'échantillons environnementaux recueillis à Londres, au Royaume-Uni (UK), dans le cadre de la surveillance continue de la maladie. De plus, en juillet 2022, un cas de

paralysie poliomyélitique causée par le VDPV2 a été signalé chez un enfant non vacciné résidant dans le comté de Rockland, aux États-Unis d'Amérique.

Dans le but de mettre fin aux foyers de VDPVc, une nouvelle formule vaccinale a été élaborée, connue sous le nom de nOPV2. Cette approche novatrice vise à offrir une réponse plus ciblée et efficace pour éradiquer les souches de poliovirus de type 2 dérivées du vaccin (VDPVc) qui persistent dans certaines régions. Le nOPV2 est génétiquement plus stable que la souche Sabin et est utilisé dans les activités de vaccination supplémentaires depuis mars 2021. L'introduction de ce vaccin est probablement à l'origine d'une nette diminution des nouvelles émergences de cVDPV 2 et d'une baisse de 46 % du nombre de cas de poliomyélite paralytique dus à ce type de virus entre 2020 et 2022.

Le plan stratégique de l'IMEP pour la période 2022-2026 avait pour objectif de détecter les derniers cas de PVV1 et de VDPVc en 2023. Cependant, la situation actuelle de la transmission mondiale du poliovirus rend peu probable l'atteinte de cet objectif à cette date. La détection de poliovirus (PVV1 et VDPVc) dans des zones précédemment éliminées met en évidence le risque de persistance de ce virus. Cela souligne la menace d'une propagation continue du poliovirus dans les régions où la vaccination est insuffisante. Ainsi, il est crucial de renforcer la vaccination de masse et la surveillance dans les zones où la transmission est encore active afin de mettre un terme à la propagation du poliovirus et d'éliminer la menace de poliomyélite paralytique chez les enfants à l'échelle mondiale.

### **Programme de la Surveillance des PFA :**

Outre la vaccination, la stratégie de lutte contre la poliomyélite repose également sur la surveillance des cas de paralysie flasque aiguë (PFA). Cette surveillance vise à repérer la présence du poliovirus sauvage et du poliovirus de type 2 dérivé du vaccin en circulation, afin de recueillir des données essentielles pour la formulation de stratégies de prévention et de contrôle.

Le Maroc a mis en œuvre cette IMEP en se basant sur les stratégies de l'OMS. Et grâce aux efforts fournis par toutes les parties concernées du ministère de la santé, le Maroc a été déclaré polio-free en 2015 et aucun cas de poliovirus sauvage n'a été signalé depuis 1989. Cependant, l'importation de poliovirus est une menace potentielle, car le poliovirus sauvage continue à circuler au Moyen-Orient.

Le laboratoire de la poliomyélite de l'Institut National d'Hygiène a été désigné par le Ministère de la Santé comme étant le Laboratoire National de Référence de la polio (LNRP) depuis 1994.

Une étude visant l'évaluation de la surveillance virologique de la poliomyélite a été élaborée durant la période 2010 -2018 afin d'identifier les points forts de la surveillance et les points faibles pour établir les mesures à prendre pour répondre aux exigences de l'OMS dans le cadre de l'IMEP. La surveillance continue du poliovirus soutiendra l'objectif mondial d'éradication du poliovirus et fournira des enseignements pour renforcer la surveillance d'autres maladies infectieuses, Une attention particulière sera portée à la pertinence des indicateurs de surveillance afin de guider efficacement le suivi du programme.

L'évaluation du système de surveillance des PFA repose sur plusieurs indicateurs. Parmi ces indicateurs : le taux de notification des cas qui doit être supérieur à 1/100 000 enfants de la population. Ce taux était faible dans notre pays n'atteignant pas le minimum requis vu que des régions du pays ont un taux de déclaration faible alors que d'autres n'en notifient aucun. Des programmes de formation destinés aux praticiens sur le terrain ont été développés pour améliorer les enquêtes épidémiologiques liées à la poliomyélite. Ces initiatives de formation ont produit des résultats concluants, se traduisant par un taux de notification dépassant 2 pour 100 000 enfants au cours des années 2018 et 2019. Après cette période fructueuse, malheureusement, ces avancées n'ont pu être maintenues, car la pandémie de COVID-19 a une fois de plus perturbé ce progrès. Les années 2020 et 2021 ont enregistré une baisse significative du taux de PFA déclaré.

La capacité du programme à obtenir des échantillons de selles adéquats suscite des préoccupations. Les échantillons de selles sont la seule source permettant au laboratoire national de tester la présence du poliovirus chez les patients atteints de PFA. L'absence d'échantillons, la réception d'un seul échantillon, la collecte tardive d'échantillons en cours de maladie et les longs délais pour que l'échantillon parvienne au laboratoire national compromettent l'intégrité de l'échantillon et peuvent introduire une incertitude de mesure, tout en reflétant des problèmes logistiques. Ainsi, il faudrait mettre en œuvre des campagnes de sensibilisation ciblées à l'égard des professionnels de la santé et des patients concernant l'importance d'une collecte adéquate d'échantillons de selles pour la surveillance de la PFA. Cela pourrait impliquer des sessions de formation, des brochures informatives et des programmes éducatifs. Il est nécessaire aussi d'assurer des mesures pour réduire les délais de transport, notamment en établissant des protocoles de transport rapides et efficaces, en renforçant les infrastructures logistiques et en garantissant le respect strict de la chaîne de froid tout au long du processus.

En prenant des mesures pour aborder ces causes sous-jacentes et en mettant en œuvre des solutions adaptées, il est possible de surmonter les problèmes logistiques et de préserver l'intégrité des échantillons de selles pour une surveillance précise et fiable de la PFA.

La surveillance virologique a mis en évidence des cas de paralysie poliomyélitique associée aux vaccins (PPAV) dues aux souches vaccinales atténuées contenues dans le vaccin poliomyélitique oral. La PPAV est une complication rare mais grave de l'utilisation du VPO observée chez les enfants vaccinés par le VPO et leurs contacts, qui ne peut être distinguée cliniquement d'une poliomyélite due au poliovirus sauvage. Avant 2014, l'incidence mondiale de la PPAV était estimée à 250-500 cas par an dans les pays utilisant le VPO. Depuis le retrait du VPO type 2 et l'ajout du VPI au calendrier du programme d'immunisation, l'incidence estimée de la PPAV a considérablement diminué (OMS Polio, données non publiées). Le risque de PPAV a été un facteur dominant dans la politique mondiale de lutte contre la poliomyélite, ce qui a conduit à la décision d'arrêter l'utilisation du VPO type 2 en 2016 et au plan visant à arrêter l'administration du VPO afin d'éradiquer la poliomyélite dans le monde.

Un autre indicateur est le taux d'EVs non-poliomyélitiques isolés au laboratoire. Il s'agit d'un paramètre lié à la qualité de l'échantillon et aux conditions de transport. En effet la culture cellulaire implique que le virus soit vivant pour pouvoir l'isoler. Toutefois, les EVs sont très sensibles aux conditions de température et si la chaîne de froid n'est pas respectée, le résultat de la culture sera rendu faussement négatif. De même, certains sérotypes d'EVs peuvent ne pas pousser sur les lignées cellulaires utilisées dans le programme de la poliomyélite.

Un autre critère adopté pour évaluer la fiabilité et la capacité des échantillons de selles expédiés au laboratoire en vue de leur isolement viral est le taux des EVs non polio isolés par culture cellulaire. On prévoit qu'au minimum 10% des échantillons de selles envoyés au laboratoire devraient permettre d'isoler des EVs non polio. Durant la période de l'étude (2010-2018), ce taux demeurait modeste dans notre contexte national, ne dépassant pas 2,2% en 2018. Cette situation peut principalement s'expliquer par un certain nombre de facteurs, dont la stagnation des conditions de transport malgré une augmentation notable du nombre de cas déclarés. Durant les deux années marquées par la pandémie de COVID-19, ce taux est vraisemblablement tombé à zéro, ce qui pourrait être attribué aux mesures de confinement mises en place et à l'amélioration des conditions d'hygiène pendant cette période.

La surveillance des paralysies flasques aiguës et le diagnostic en laboratoire des EVs sont des éléments essentiels de l'initiative de l'Organisation mondiale de la santé pour l'éradication de la

poliomyélite. Par conséquent, il est nécessaire de disposer de techniques rapides et fiables pour un diagnostic différentiel efficace de ces virus. En effet, le diagnostic des infections à EVs par culture virale est limité par une sensibilité de 65 à 75 % seulement, un délai d'exécution de 3 à 10 jours et un haut degré d'expertise technique. Les techniques moléculaires offrent une alternative appropriée en vue d'améliorer la sensibilité et la spécificité pour le diagnostic des EVs.

### **Corrélation entre EVs, Adénovirus et les Paralysies Flasques Aiguës**

Afin de rechercher le taux réel des EVNP dans les prélèvements de selles de cas de PFA ; nous avons utilisé des méthodes moléculaires indépendantes de la culture cellulaire. Deux approches de RT-PCR en temps réel ont été utilisées afin de détecter directement les génomes d'EVs à partir d'échantillons de selles traités, précédemment considérés comme négatifs lors des tests en culture cellulaire : détection par kit DiaENT-rRT-PCR (Diagenode Diagnostics) et par amplification génique ciblant la région non codante 5'UTR.

Les deux méthodes ont réussi à détecter une prévalence de 13% d'EVs parmi les enfants atteints de PFA. Ces résultats démontrent que la rRT-PCR s'est révélée plus performante que la culture cellulaire en termes de rapidité et de sensibilité pour la détection des EVs. Diverses études ont été menées pour soutenir l'amélioration de l'algorithme de détection du Poliovirus établi par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) dans le contexte de la surveillance des Paralysies Flasques Aiguës (PFA) (89,90), stratégie clé du programme d'éradication de la poliomyélite. L'approche traditionnelle, qui repose sur l'isolement viral par culture cellulaire, est considérée comme le "gold standard" pour cette surveillance. Cependant, il existe un effort pour remplacer cette méthode par des techniques moléculaires plus rapides et sensibles, afin d'améliorer la précision et la rapidité de la détection.

Outre les défis logistiques liés à la nécessité de maintenir une chaîne du froid pendant le transport pour préserver la viabilité du virus en vue de son isolement, des problèmes spécifiques surgissent en lien avec la culture de certains sérotypes viraux qui ne peuvent pas être cultivés sur les lignées cellulaires recommandées par l'OMS, notamment les lignées RD et L20B. Ceci est particulièrement pertinent pour des EVs du groupe C, tels que les Coxsackievirus ne sont pas cytopathogènes aux cellules utilisées pour la culture cellulaire(91) et donc leur présence ne peut être mise en évidence qu'en ayant recours aux techniques moléculaires.

Par ailleurs, dans le cadre de cette étude rétrospective, l'utilisation de la rRT-PCR pourrait exercer un impact sur la gestion clinique des patients souffrant d'infections à EVs, ainsi qu'améliorer la réactivité et la réponse en cas de survenance d'épidémies liées à des affections entérovirales éventuelles. De même, à l'ère de l'éradication du poliovirus, il est essentiel que le test rRT-PCR soit utilisé de manière proactive en complément des méthodes conventionnelles, afin de garantir un diagnostic prompt et une réaction efficace des autorités sanitaires dans le cas où un poliovirus serait identifié.

En dehors des EVs, qui sont les agents les plus fréquemment associés à la survenue de Paralysies Flasques Aiguës (PFA), il convient de mentionner que d'autres virus ont également été détectés dans les selles et le LCR d'enfants atteints de ce syndrome. Parmi ces agents viraux, les Adénovirus ont également une importance notable.

Les Adénovirus (AdVs) sont des virus à ADN bicaténaire non enveloppés de structure icosaédrique. Plus de 85 génotypes d'AdV ont été identifiés et classés en sept espèces désignées A à G. Ils provoquent généralement des infections légères touchant les voies respiratoires supérieures ou inférieures, le tractus gastro-intestinal ou la conjonctive. Des manifestations rares des infections à AdV comprennent la cystite hémorragique, l'hépatite, la colite hémorragique, la pancréatite, la néphrite ou la méningo-encéphalite. Les Adénovirus ont également démontré leur capacité à infecter le système nerveux central (SNC) et ont été isolés chez des patients présentant des myélopathies aiguës et des paralysies flasques aiguës (PFA). Les infections à AdV sont plus fréquentes chez les jeunes enfants en raison d'une immunité humorale insuffisante. Dans le but d'étudier l'association des Adénovirus avec les manifestations neurologiques chez les patients atteints de PFA, nous avons mené une étude préliminaire pour estimer le taux de détection des Adénovirus dans les selles d'enfants atteints de PFA par RT-PCR en temps réel en utilisant le kit R-DiaADV (Diagenode Diagnostics). Les Adénovirus ont été identifiés dans 8% des cas analysés. Des études ont montré que le taux de prévalence des Adénovirus dans les groupes de patients atteints PFA et dans les groupes sans PFA ont montré une différence statistiquement significative(92). Les cas de PFA ont présenté un taux considérablement plus élevé par rapport aux groupes témoins. Cette observation appuie l'hypothèse de l'implication potentielle des Adénovirus dans les manifestations neurologiques, y compris la PFA. Il a été rapporté que parmi les cas de PFA, le type B d'Adénovirus humain (HAdV) était le plus fréquemment détecté, en particulier les sous-types B3, B7, B16 et B21. D'autres types tels que les types A (HAdV-A12 et A31), C (HAdV-C1 et C6), D (HAdV-D19 et D93) et F (HAdV-F41) ont également été identifiés.

Nos résultats ont révélé qu'une proportion de 2,2 % des échantillons présentait une co-infection à la fois par des EVs et des Adénovirus, une donnée qui suggère qu'une interaction entre les deux virus pourrait avoir eu lieu. En effet, lors d'une épidémie due à la maladie main-bouche-pieds survenue en Malaisie étant associée à l'EVs de type 71, huit enfants ont présenté une PFA associée à l'Adénovirus de type 21 dont 3 présentaient une paralysie résiduelle(93). Il n'est pas certain si l'épidémie de la maladie main-bouche-pieds associée à l'EV-A71 était une coïncidence ou si l'infection entérovirale a contribué à la sévérité des symptômes provoqués par l'Adénovirus. Pour cela, afin de mieux comprendre cette possible interaction entre les EVs et les Adénovirus, ainsi que les schémas de maladies qu'ils engendrent, il est essentiel de mener des études plus approfondies et détaillées, notamment sur le plan clinique, virologique et physiopathologique. Dans notre contexte, il s'agit d'une étude préliminaire qui requiert le typage des Adénovirus détectés afin d'identifier les types spécifiques d'Adénovirus associés à la paralysie flasque aiguë (PFA) et en circulation au Maroc.

### **Diversité des EVs associés aux PFA au Maroc**

Dans la dernière phase de ce travail, nous nous sommes intéressés au typage des EVs associés aux cas de PFA qui ont été examinés au sein du laboratoire national de la poliomyélite dans le cadre de la surveillance des PFA dans notre pays, et ce dans le but de déterminer les sous-types impliqués dans l'étiologie de la PFA. Le typage a été réalisé par la méthode de séquençage Sanger et le séquençage du génome entier par la méthode NGS. Le typage a concerné les EVs isolés par culture cellulaire sur les lignées RD (Séquençage Sanger et NGS).

Après la déclaration de l'éradication des poliovirus de type 2 et 3 et la limitation de circulation du poliovirus de type 1, il est essentiel d'accorder une surveillance renforcée aux EVs non poliomyélitiques, en particulier lorsque les sérotypes sont liés à des épidémies importantes ou à des affections graves (comme le EV-A71 et le EV-D68). La classification des EVs est en constante évolution depuis l'identification des premiers membres de cette population virale relativement hétérogène. La classification actuelle de ces virus est principalement basée sur l'homologie de la séquence des molécules d'ARN simple brin qui constituent leur génome. Les EVs sont ainsi divisés en 15 espèces : les EVs A à L et les rhinovirus A à C.

Pour les méthodes de typage des EVs, Les techniques moléculaires telles que la transcriptase inverse PCR (RT-PCR) et le séquençage des nucléotides ont gagné en importance par rapport aux techniques conventionnelles de culture virale et de test de séroneutralisation pour le diagnostic et la caractérisation des infections à EVs(32). La région 5' non codante (5'UTR) est

extrêmement conservée parmi tous les EVs et est donc largement utilisée dans les tests de diagnostic par RT-PCR. En raison de la conservation génétique de la 5'UTR, le séquençage de cette région ne permet pas d'identifier avec précision le type d'EVs. La méthode standard pour le génotypage des EVs consiste à séquencer la partie amino terminale de la protéine de la capsid VP1.

Le séquençage Sanger ciblant les gènes de la 5'UTR et de la VP1 a été réalisé pour étudier la diversité des EVs dans les échantillons de selles des enfants atteints de PFA reçus au laboratoire durant la période 2017-2021. Les échantillons choisis pour cette étude étaient ceux provenant de prélèvements ayant montré une cytopathologie caractéristique des EVs sur la lignée cellulaire RD et étaient au nombre de 30 échantillons

Les résultats de cette étude ont démontré une grande variété des EVs potentiellement impliqués dans l'étiologie de la PFA. Les Echovirus et les virus Coxsackie-B étaient les types les plus prévalents chez les cas analysés. Ces résultats sont en accord avec d'autres études menées au Nigeria, au Pakistan, en Chine orientale et en Inde (93,94), ce qui confirme leur endémicité marquée et leur distribution à l'échelle mondiale.

Les EVs appartenant à l'espèce B étaient détectés de manière plus fréquente que les membres des autres espèces A et C. En effet, l'EVs B est l'espèce la plus représentée dans le monde, c'est aussi l'espèce qui contient plus de la moitié des types d'EV connus. La prédominance de l'espèce B parmi les EVNP en circulation a été signalée dans de nombreux pays d'Afrique, d'Asie et d'Europe. Parmi le groupe B d'EV, l'échovirus 3 et 6 (E3, E6) étaient les plus fréquents chez les cas de PFA étudiés. Des études ont confirmé que l'E6 a été identifié comme un facteur prédominant des symptômes neurologiques observés chez les enfants, en particulier dans le contexte de la paralysie flasque aiguë (PFA). Ces associations ont été observées dans divers pays, incluant des régions d'Afrique de l'Ouest (96), l'Italie (97), l'Iran (98) et la Tunisie(99).

Le typage des EVs chez les cas de PFA analysés a pu mettre en évidence la présence d'un génotype rare: l'EV-A76. En effet, seules douze séquences génomiques complètes du sérotype EV-A76 connu sont actuellement disponibles dans la base de données GenBank (en date de mars 2023), et seuls quelques pays ont signalé des cas ou des épidémies de ce virus (106).

Le typage a aussi mis en évidence un cas de paralysie associée au vaccin antipoliomyélitique oral. Il s'agit de la souche de type sabin 3 (SL3). Le virus à isoler a échappé à la culture cellulaire sur les cellules L20B laissant l'étiologie virale de la maladie indéterminée, d'où la nécessité de mettre au point une stratégie adéquate pour la détection et le typage simultané des virus associés

à la PFA afin de fournir des réponses rapides et précises concernant le diagnostic virologique de la paralysie chez les enfants.

Lors de notre étude, une absence de circulation des EVs de groupe D a bien été confirmée. L'EVs D est l'une des plus petites espèces du genre EVs, ne comptant que cinq types, mais la gamme d'hôtes, le tropisme tissulaire et les maladies associées sont très diversifiés. EV-D68 et EV-D70, les premiers EV-D découverts, sont responsables d'infections respiratoires et oculaires respectivement. Les trois autres types d'EV-D, EV-D94, EV-D111 et EV-D120, ont été détectés en Afrique et restent mal caractérisés. L'EV-D94 a été découvert en 2007 dans des échantillons d'eaux usées en Égypte et dans des cas de paralysie flasque aiguë (PFA) en République démocratique du Congo. L'EV-D111 a été identifié à la fois dans des échantillons de selles humaines et de primates, tandis que l'EV-D120 n'a été détecté que dans des échantillons de selles de primates sauvages non humains. Le membre respiratoire de l'espèce EVs D, EV-D68, est probablement le plus connu, car il a été à l'origine d'épidémies bi-annuelles dans la population pédiatrique ces dernières années. Toutefois, il ne s'agit pas d'un virus récent, mais plutôt d'un virus ré-émergent. Lors d'une épidémie généralisée aux États-Unis d'Amérique en 2014, EV-D68 a suscité l'intérêt du public en raison de sa forte morbidité chez les enfants. Des complications graves sont apparues, allant d'une maladie respiratoire à une maladie ressemblant à la polio, décrite comme l'AFM.

### **Séquençage du génome entier par NGS appliqué aux EVs**

Pour obtenir des données de séquençage, la méthode traditionnelle Sanger est capable de séquencer le génome entier, mais dans un temps qui est long sans pouvoir séquencer simultanément un mélange de virus. Cette méthode ne peut être appliquée à des systèmes de surveillance à grande échelle puisqu'il est difficile de cibler spécifiquement chaque type d'EVs connu et sans s'intéresser aux virus inconnus. C'est ainsi que les méthodes de séquençage à haut débit NGS offrent un nouvel outil performant pour l'identification et la caractérisation des EVs et permettront probablement de classer les EVs prenant en compte l'ensemble du génome et non plus seulement la région codant la capsid.

La méthode de séquençage pour le génome entier adoptée pour notre étude utilise des amorces génériques et spécifiques aux espèces capable de typer et de séquencer le génome entier de tous les EVs des espèces A à D présents dans des échantillons contenant des mélanges viraux. Le séquençage a concerné les isolats viraux cultivés sur les lignées cellulaires RD. Ces isolats ont fait l'objet d'une extraction de l'ARN suivie par une RT-PCR réalisée avec des amorces

dégénérées ciblant des régions conservées du génome, afin d'amplifier les fragments d'ADN, puis nous avons procédé au séquençage par la méthode NGS. Cette méthode a été réalisée en sélectionnant deux couples d'amorces par espèce d'EVs qui ont généré deux fragments se chevauchant, ce qui a permis de réduire le travail, le temps et le coût par échantillon testé. Le premier couple d'amorces génériques (C004-F et CRE- R) correspond à deux régions conservées pour tous les EVs (-A à -D) et a permis d'amplifier avec succès la première moitié du génome (~4500 nt). La seconde moitié du génome a été amplifiée à l'aide d'amorces génériques conçues pour cibler spécifiquement tous les virus de l'espèce concernée (EV- A, -B, -C et -D). Nous avons pu amplifier la quasi-totalité du génome de tous les EVs en utilisant seulement cinq mélanges réactionnels de PCR. Elle a permis non seulement de fournir une information sur le type d'EVs présent dans l'échantillon mais elle a aussi déterminé la présence de mélange d'EVs de différents sous-types dans la même suspension des selles du cas de PFA.

Sur les 29 isolats viraux, seulement 11 échantillons ont pu être séquencés par cette méthode. Les séquences obtenues déterminent le type d'EVs isolé et amplifié. Pour un cas de PFA, le séquençage a révélé la présence de deux virus en co-infection.

Les données présentées dans cette étude soulignent également l'importance de l'analyse des caractéristiques épidémiologiques et génétiques des infections à EVs pour mieux comprendre la charge de morbidité de la PFA non poliomyélitique causée par les EV. Ainsi, l'intégration d'une surveillance moléculaire des EV dans les zones où le poliovirus n'existe plus et spécialement dans la phase d'élimination post-polio aurait une importance clinique dans l'évaluation à long terme de l'association des PFA aux EVs non polio.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les EVs sont des petits virus à ARN qui causent de nombreuses infections chez les humains, allant de formes asymptomatiques à des maladies sévères voire mortelles. Les techniques de culture cellulaire ont longtemps été utilisées pour détecter les EVs. Le typage des souches d'EVs est réalisé par séquençage des gènes de la région non codante 5'UTR et une partie du gène codant les protéines de capsid VP1. La principale difficulté avec la plupart de ces techniques est la nécessité de travailler à partir de souches isolées par culture cellulaire. Plusieurs études ont récemment proposé des méthodes combinées de détection et de typage qui utilisent une amplification directe d'échantillons cliniques ou environnementaux permettant un gain de temps et une meilleure sensibilité.

En effet, et à l'ère de l'éradication du poliovirus, il est important que les systèmes de santé et principalement l'OMS réévaluent la méthode de surveillance virologique du poliovirus en faveur de techniques moléculaires plus avancées. Ce changement vise à augmenter la sensibilité du système de surveillance, afin de mieux détecter les cas importés de poliovirus dans les pays déjà exempts de polio. L'adoption de méthodes moléculaires offre une approche plus sensible et spécifique qui pourra renforcer la capacité du système de surveillance à identifier rapidement et à répondre aux éventuelles réapparitions de la maladie.

Pour une meilleure prise en charge des atteintes neurologiques d'origine virale, en particulier les Paralysies Flasques Aiguës, il est essentiel de ne pas se limiter à la surveillance du seul poliovirus. Il convient également d'accorder une attention particulière aux Entérovirus non polio, en raison de leur capacité à causer des syndromes imitant la poliomyélite, pouvant entraîner des effets irréversibles. Afin de mieux comprendre et aborder les cas de PFA, il est impératif de déterminer les types spécifiques de virus responsables de ces atteintes neurologiques. Dans le cadre de la surveillance des paralysies flasques aiguës au Maroc, le typage a été réalisé sur des prélèvements de selles de cas de PFA, mettant en évidence une grande diversité des Enterovirus impliqués dans la survenue de ce syndrome. Il devient essentiel d'élargir la gamme des virus neurotropes recherchés dans le cas des PFA afin de détecter les possibles agents causaux de la maladie, renforçant ainsi la capacité à identifier et traiter rapidement ces troubles neurologiques.

Cette étude présente certaines limites qu'il est important de prendre en considération. Tout d'abord, les données sur les patients s'avèrent insuffisantes, en particulier en ce qui concerne le suivi de la paralysie, qu'elle soit réversible ou irréversible. Cette lacune pourrait restreindre la

compréhension complète des conséquences à long terme de la maladie. De plus, les conditions d'acheminement des prélèvements présentent des défis, compromettant potentiellement la viabilité des virus. Ces conditions logistiques peuvent influencer la qualité des échantillons collectés et, par conséquent, impacter les résultats de l'analyse virologique. Par ailleurs, la sous-déclaration des cas constitue une limitation majeure de cette étude. Une amélioration significative de la collecte et de la déclaration des cas est nécessaire pour garantir une représentation plus précise de la prévalence de la maladie. Des efforts supplémentaires doivent être déployés pour sensibiliser, former et renforcer les systèmes de déclaration afin de réduire cette sous-estimation des cas.

Les perspectives de cette étude sont importantes puisqu'elle permet de s'affranchir de la culture cellulaire pour la détection et le typage des EV. Des études phylogénétiques et phylogéographiques sont à prévoir sur un plus grand nombre d'échantillon de cas de PFA et éventuellement dans le cas d'autres pathologies où pourraient intervenir les EVs principalement les infections respiratoires aiguës sévères et les méningites.

Il est également essentiel d'établir une surveillance environnementale des enterovirus. Cette approche permettra de détecter la présence de ces virus dans l'environnement, ce qui peut jouer un rôle crucial dans la compréhension de leur circulation, de leur persistance et de leur potentiel de transmission. En intégrant la surveillance environnementale des EVs dans les protocoles de surveillance existants, on peut améliorer la sensibilité du système de détection et renforcer la capacité à anticiper et à répondre aux éventuelles émergences ou résurgences de maladies associées à ces virus. Cette approche complète, combinant surveillance clinique et environnementale, offre une vision plus exhaustive de la dynamique des EVs, facilitant ainsi la mise en œuvre de mesures préventives et d'interventions rapides.

## Références Bibliographiques

1. Mehndiratta MM, Mehndiratta P, Pande R. Poliomyelitis: Historical Facts, Epidemiology, and Current Challenges in Eradication. *The Neurohospitalist*. 2014;4(4):223–9.
2. Kew O, Pallansch M. Breaking the last chains of poliovirus transmission: Progress and challenges in global polio eradication. *Annu Rev Virol*. 2018;5:427–51.
3. Messacar K, Asturias EJ, Hixon AM, Van Leer-Buter C, Niesters HGM, Tyler KL, et al. Enterovirus D68 and acute flaccid myelitis—evaluating the evidence for causality. *Lancet Infect Dis*. 2018;18(8):e239–47.
4. World Health Organisation. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/poliomyelitis>
5. Tapparel C, Siegrist F, Petty TJ, Kaiser L. Picornavirus and enterovirus diversity with associated human diseases. *Infect Genet Evol*. 2013;14(1):282–93.
6. Garon JR, Cochi SL, Orenstein WA. The Challenge of Global Poliomyelitis Eradication. *Infect Dis Clin North Am*. 2015;29(4):651–65.
7. Lee SE, Greene SA, Burns CC, Tallis G, Wassilak SGF, Bolu O. Progress Toward Poliomyelitis Eradication — Worldwide, January 2021–March 2023. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2023;72(19):517–22.
8. Tan SY, Ponstein N. Jonas salk (1914–1995): A vaccine against polio. *Singapore Med J*. 2019;60(1):9–10.
9. Horaud F, Albert B. Sabin and the development of oral poliovaccine. Vol. 21, *Biologicals*. 1993. p. 311–6.
10. Suresh S, Forgie S, Robinson J. Non-polio Enterovirus detection with acute flaccid paralysis: A systematic review. *J Med Virol*. 2018;90(1):3–7.
11. Pallansch MA, Oberste MS, Lindsay Whitton J. Enteroviruses: Polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. *Fields Virol Sixth Ed*. 2013;1.
12. Oberste MS, Nix WA, Maher K, Pallansch MA. Improved molecular identification of enteroviruses by RT-PCR and amplicon sequencing. *J Clin Virol*. 2003;26(3):375–7.
13. Allan Nix W, Oberste MS, Pallansch MA. Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical

- specimens. *J Clin Microbiol.* 2006;44(8):2698–704.
14. Gulholm T, Yeang M, Nguyen I, Andrews PI, Balgahom R, Beresford R, et al. Molecular typing of enteroviruses: comparing 5'UTR, VP1 and whole genome sequencing methods. *Pathology.* 2022;54(6), 779–783.
  15. Kyriakopoulou Z, Tsolis K, Pliaka V, Tsakogiannis D, Ruether IGA, Gartzonika C, et al. Combined 5' UTR RFLP analysis and VP1 sequencing for epidemic investigation of enteroviruses. *Arch Virol.* 2013;158(1):103–11.
  16. Pliaka V, Dedepside E, Kyriakopoulou Z, Papadopoulou I, Levidiotou S, Markoulatos P. Use of mutational pattern in 5'-NCR and VP1 regions of polioviruses for molecular diagnosis. *Mol Cell Probes.* 2007;21(4):267–75.
  17. Ge S, Yan Q, He S, Zhuang S, Niu J, Xia N. Specific primer amplification of the VP1 region directed by 5' UTR sequence analysis: Enterovirus testing and identification in clinical samples from hand-foot-and-mouth disease patients. *J Virol Methods.* 2013;193(2):463–9.
  18. Zell R, Delwart E, Gorbalenya AE, et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Picornaviridae. *J Gen Virol.* 2017;98(10):2421-2422.
  19. Racaniello, VR. Picornaviridae: The viruses and their replication. In: Knipe, DM.; Howley, PM.; Griffin, DE.; Lamb, RA.; Martin, MA.; Roizman, B.; Strauss, SE., editors. *Fields Virology.* 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins; USA: 2007. p. 795-838.
  20. Mueller S, Wimmer E, Cello J. Poliovirus and poliomyelitis: A tale of guts, brains, and an accidental event. *Virus Res.* 2005;111(2 SPEC. ISS.):175–93.
  21. Xiao C, Bator-Kelly CM, Rieder E, Chipman PR, Craig A, Kuhn RJ, et al. The crystal structure of coxsackievirus A21 and its interaction with ICAM-1. *Structure.* 2005;13(7):1019–33.
  22. Plevka P, Perera R, Cardoso J, Kuhn RJ, Rossmann MG. Crystal structure of human enterovirus 71. *Science* (80- ). 2012;336(6086):1274.
  23. Belnap DM, Filman DJ, Trus BL, Cheng N, Booy FP, Conway JF, et al. Molecular Tectonic Model of Virus Structural Transitions: the Putative Cell Entry States of Poliovirus. Vol. 74, *Journal of Virology.* 2000.
  24. Kim H, Aponte-Diaz D, Sotoudegan MS, Shengjuler D, Arnold JJ, Cameron CE. The enterovirus genome can be translated in an IRES-independent manner that requires the

- initiation factors eIF2A/eIF2D. *PLoS Biol.* 2023;21(1):1–28.
25. Kitamura N, Semler BL, Rothberg PG, Larsen GR, Adler CJ, Dorner AJ, et al. Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. *Nature.* 1981;291(5816):547–53.
  26. Borman AM, Deliat FG, Kean KM. Sequences within the poliovirus internal ribosome entry segment control viral RNA synthesis. *EMBO J.* 1994;13(13):3149–57.
  27. Zoll J, Heus HA, van Kuppeveld FJ, Melchers WJ. The structure-function relationship of the enterovirus 3'-UTR. *Virus Res.* 2009;139(2):209-216.
  28. Svitkin Y V., Maslova S V., Agol VI. The Genomes of attenuated and virulent poliovirus strains differ in their in vitro translation efficiencies. *Virology.* 1985;147(2):243–52.
  29. Jacobson SJ, Konings DA, Sarnow P. Biochemical and genetic evidence for a pseudoknot structure at the 3' terminus of the poliovirus RNA genome and its role in viral RNA amplification. *J Virol.* 1993;67(6):2961–71.
  30. Aniko V. Paul, Eckard Wimmer. Initiation of protein-primed picornavirus RNA synthesis. *Virus Res.* 2015;2015(206):12–26.
  31. Molla A, Paul A V., Schmid M, Jang SK, Wimmer E. Studies on Diccistronic Polioviruses Implicate Viral Proteinase 2Apro in RNA Replication. Vol. 196, *Virology.* 1993. p. 739–47.
  32. Sandoval I V, Carrasco L. Poliovirus infection and expression of the poliovirus protein 2B provoke the disassembly of the Golgi complex, the organelle target for the antipoliovirus drug Ro-090179. *J Virol.* 1997;71(6):4679–93.
  33. Neufeld KL, Galarza JM, Richards OC, Summers DF, Ehrenfeld E. Identification of terminal adenylyl transferase activity of the poliovirus polymerase 3Dpol. *J Virol.* 1994;68(9):5811–8.
  34. Paul, A. V., van Boom, J. H., Filippov, D., & Wimmer, E. (1998). Protein-primed RNA synthesis by purified poliovirus RNA polymerase. *Nature*, 393(6682), 280–284.
  35. Nilsson EC, Jamshidi F, Johansson SMC, Oberste MS, Arnberg N. Sialic Acid Is a Cellular Receptor for Coxsackievirus A24 Variant, an Emerging Virus with Pandemic Potential. *J Virol.* 2008;82(6):3061–8.
  36. Pelletier, J., & Sonenberg, N. (1988). Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature*, 334(6180), 320–325.

37. Rossmann MG, He Y, Kuhn RJ. Picornavirus-receptor interactions. *Trends Microbiol.* 2002;10(7):324–31.
38. Dang S, Gao N, Li Y, Li M, Wang X, Jia X, et al. Dominant CD4-dependent RNA-dependent RNA polymerase-specific T-cell responses in children acutely infected with human enterovirus 71 and healthy adult controls. *Immunology.* 2014;142(1):89–100.
39. Yamayoshi S, Ohka S, Fujii K, Koike S. Functional Comparison of SCARB2 and PSGL1 as Receptors for Enterovirus 71. *J Virol.* 2013;87(6):3335–47.
40. Goodfellow IG, Sioofy AB, Powell RM, Evans DJ. Echoviruses Bind Heparan Sulfate at the Cell Surface. *J Virol.* 2001;75(10):4918–21.
41. Alexander DA, Dimock K. Sialic Acid Functions in Enterovirus 70 Binding and Infection. *J Virol.* 2002;76(22):11265–72.
42. Newman JF, Brown F. Foot-and-mouth disease virus and poliovirus particles contain proteins of the replication complex. *J Virol.* 1997;71(10):7657–62.
43. Bailly J. Génotypage et épidémiologie moléculaire des entérovirus non poliomyélitiques. 2008;12(1):53–65.
44. Steil BP, Barton DJ. Cis-active RNA elements (CREs) and picornavirus RNA replication. *Virus Res.* 2009;139(2):240–52..
45. Vogt DA, Andino R. An RNA element at the 5'-end of the poliovirus genome functions as a general promoter for RNA synthesis. *PLoS Pathog.* 2010;6(6).
46. Oh HS, Pathak HB, Goodfellow IG, Arnold JJ, Cameron CE. Insight into Poliovirus Genome Replication and Encapsidation Obtained from Studies of 3B-3C Cleavage Site Mutants. *J Virol.* 2009;83(18):9370–87.
47. Klein KA, Jackson WT. Picornavirus subversion of the autophagy pathway. *Viruses.* 2011;3(9):1549–61.
48. Walsh, D., Mohr, I. Viral subversion of the host protein synthesis machinery. *Nat Rev Microbiol* 2011; 9(12): 860–875
49. Lin JY, Chen TC, Weng KF, Chang SC, Chen LL, Shih SR. Viral and host proteins involved in picornavirus life cycle. *J Biomed Sci.* 2009;16(1):1–14.
50. Doedens JR, Kirkegaard K. Inhibition of cellular protein secretion by poliovirus proteins 2B and 3A. *EMBO J.* 1995;14(5):894–907.

51. Barco A, Feduchi E, Carrasco L. Poliovirus protease 3C(pro) kills cells by apoptosis. *Virology*. 2000;266(2):352–60.
52. Campanella M, De Jong AS, Lanke KWH, Melchers WJG, Willems PHGM, Pinton P, et al. The Coxsackievirus 2B Protein Suppresses Apoptotic Host Cell Responses by Manipulating Intracellular Ca<sup>2+</sup> Homeostasis. *J Biol Chem* [Internet]. 2004;279(18):18440–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M309494200>
53. Ammendolia MG, Tinari A, Calcabrini A, Superti F. Poliovirus infection induces apoptosis in CaCo-2 cells. *J Med Virol*. 1999;59(1):122–9.
54. Girard S, Couderc T, Destombes J, Thiesson D, Delpeyroux F, Blondel B. Poliovirus Induces Apoptosis in the Mouse Central Nervous System. *J Virol*. 1999;73(7):6066–72.
55. Lauring AS, Frydman J, Andino R. The role of mutational robustness in RNA virus evolution. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2013;11(5):327–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3003>
56. Muslin C, Kain A Mac, Bessaud M, Blondel B, Delpeyroux F. Recombination in enteroviruses, a multi-step modular evolutionary process. *Viruses*. 2019;11(9):1–30.
57. Delpeyroux F, Colbère-garapin F, Razafindratsimandresy R, Sadeuh- S, Joffret M, Rousset D, et al. Série : le réseau international des Instituts Pasteur ( 3 ) de la poliomyélite et émergence de poliovirus pathogènes dérivés du vaccin au Cameroun. 2013;29(3).
58. Andréoletti L, Renois F, Jacques J, Lévêque N. Human enteroviruses and respiratory infections. *Medecine/Sciences*. 2009;25(11):921–9.
59. Chang YK, Chen KH, Chen KT. Hand, foot and mouth disease and herpangina caused by enterovirus a71 infections: A review of enterovirus a71 molecular epidemiology, pathogenesis, and current vaccine development. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2018;60(October):1–8.
60. Yin-Murphy M, Kee Tai Goh, Meng Chee Phoon, Yao J, Baharuddin-Ishak. A recent epidemic of acute hemorrhagic conjunctivitis. *Am J Ophthalmol*, 1993;116(2):212–7.
61. Lévêque N, Huguet P, Norder H, Chomel JJ. Les Enterovirus responsables de conjonctivite aiguë hémorragique. *Med Mal Infect*. 2010;40(4):212–8.
62. Andréoletti L, Lévêque N, Boulagnon C, Brasselet C, Fornes P. Viral causes of human myocarditis. *Arch Cardiovasc Dis*. 2009;102(6–7):559–68.

63. Huang WT, Lee PI, Chang LY, Kao CL, Huang LM, Lu CY, et al. Epidemic Pleurodynia Caused by Coxsackievirus B3 at a Medical Center in Northern Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect* [Internet]. 2010;43(6):515–8. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1684-1182\(10\)60079-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1684-1182(10)60079-5)
64. Lafolie J, Labbé A, L'Honneur AS, Madhi F, Pereira B, Decobert M, et al. Assessment of blood enterovirus PCR testing in paediatric populations with fever without source, sepsis-like disease, or suspected meningitis: a prospective, multicentre, observational cohort study. *Lancet Infect Dis*. 2018;18(12):1385–96.
65. de Ory, F., Avellón, A., Echevarría, J. E., Sánchez-Seco, M. P., Trallero, G., Cabrerizo, M., Casas, I., Pozo, F., Fedele, G., Vicente, D., Pena, M. J., Moreno, A., Niubo, J., Rabella, N., Rubio, G., Pérez-Ruiz, M., Rodríguez-Iglesias, M., Gimeno, C., Eir S. Viral infections of the central nervous system in Spain: a prospective study. *J Med Virol*. 2013;85(3):554–62.
66. Archimbaud C, Bailly JL, Chambon M, Tournilhac O, Travade P, Peigue-Lafeuille H. Molecular evidence of persistent echovirus 13 meningoencephalitis in a patient with relapsed lymphoma after an outbreak of meningitis in 2000. *J Clin Microbiol*. 2003;41(10):4605–10.
67. Racaniello VR. One hundred years of poliovirus pathogenesis. *Virology*. 2006;344(1):9–16.
68. Nix, W. A., Khetsuriani, N., Peñaranda, S., Maher, K., Venczel, L., Cselkó, Z., Freire, M. C., Cisterna, D., Lema, C. L., Rosales, P., Rodriguez, J. R., Rodriguez, W., Halkyer, P., Ronveaux, O., Pallansch, M. A., & Oberste MS. Diversity of picornaviruses in rural Bolivia. *J Gen Virol*. 2013;94(09):2017–28.
69. Wollants E, Beller L, Beuselinck K, Bloemen M, Lagrou K, Reynders M, et al. A decade of enterovirus genetic diversity in Belgium. *J Clin Virol* [Internet]. 2019;121:104205. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2019.104205>
70. Tangermann RH, Lamoureux C, Tallis G, Goel A. The critical role of acute fl accid paralysis surveillance in the Global Polio Eradication Initiative. 2018;(January):156–63.
71. Crainic R, Delpyroux F, Georgescu MM, Otelea D, Colbère-Garapin F, Guillot S, et al. La poliomyélite: une maladie neurologique provoquée par un virus entérotrope. *Ann l'Institut Pasteur/Actualites*. 1995;6(2):75–85.
72. Chastel C. When the Egyptian mummies are speaking about the infections that have made them ill. *Hist Sci Med*. 2004;38(2):147–55.
73. Ibrahim Karagoz GS. Duchenne Muscular Dystrophy and Sugammadex. *J Anesth Clin Res*.

- 2015;06(01):225–35.
74. Guillaume Duchenne de Boulogne. De l'électrisation localisée: et de son application a la physiologie, a la pathologie et a la thérapeutique.
  75. Pearce JMS. Poliomyelitis (Heine-Medin disease). *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2005;76(1):128.
  76. N. RT. The Nobel Chronicles. 1954: John Franklin Enders (1897-1985); Thomas Huckle Weller (b 1915); and Frederick Chapman Robbins (b 1916). *Lancet* (London, England). 1999;353(9165):1716.
  77. Global Polio Eradication Initiative. Polio Eradication and Endgame Strategic Plan 2013 – 2018. Polio Erad Endgame Strateg Plan 2013 – 2018 [Internet]. 2013;(April 2013):1–8. Available from: [www.polioeradication.org](http://www.polioeradication.org)
  78. World of health organisation. <https://www.who.int/news-room/feature-stories/detail/two-out-ofthree-wild-pour-eradiquer-souches-de-poliovirus>
  79. Centres pour le contrôle et la prévention des maladies. <https://www.cdc.gov/globalhealth/immunization/stories/global-certification-of-eradiation-dupoliavirus-sauvage-autochtone-de-type-3.html>.
  80. Modlin JF, Bandyopadhyay AS, Sutter R. Immunization against Poliomyelitis and the Challenges to Worldwide Poliomyelitis Eradication. *J Infect Dis*. 2021;224(Suppl 4):S398–404.
  81. Systems I, Group M. Introduction of inactivated polio vaccine and switch from trivalent to bivalent oral poliovirus vaccine Introduction du vaccin antipoliomyélitique inactivé et passage du vaccin antipoliomyélitique oral trivalent au vaccin antipoliomyélitique oral bivalent. 2016;2016(Cdc):2013–6.
  82. Oberste MS. Progress of polio eradication and containment requirements after eradication. *Transfusion*. 2018;58(December):3078–83.
  83. Ministère de la santé. Manuel Pratique sur la vaccination à l'intention des Professionnels de Santé. 2015
  84. OMS. <https://www.emro.who.int/fr/mor/moroccoinfocus/realisation-du-remplacement-du-vaccin-anti-poliomyelite-oral-trivalent-par-le-bivalentau-maroc.html>.
  85. Rotbart, H.A., Ahmed, A., Hickey, S., Dagan, R., McCracken, G.H., Whit- ley, R.J., Modlin,

- J.F., Cascino, M.R.N., Oconnell, J.F., Menegus, M.A., Blum, D., 1997. Diagnosis of 110 enteroviruses infection by polymerase chain reaction of multiple specimen types. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 16 (4), 409–411.
86. Nicholson F, Ajetunmobi JF, Li M, Shackleton EA, Starkey WG, Illavia SJ, et al. Molecular detection and serotypic analysis of enterovirus RNA in archival specimens from patients with acute myocarditis. *Heart.* 1995;74(5):522–7.
87. Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Flemister MR, Brown BA, Pallansch MA. Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. *J Clin Microbiol.* 1999;37(5):1288–93.
88. Zell R, Delwart E, Gorbalenya AE, Hovi T, King AMQ, Knowles NJ, et al. ICTV virus taxonomy profile: Picornaviridae. *J Gen Virol.* 2017;98(10):2421–2.
89. Santos AP, Costa E V., Oliveira SS, Souza MC, Da Silva EE. RT-PCR based analysis of cell culture negative stools samples from poliomyelitis suspected cases. *J Clin Virol.* 2002;23(3):149–52.
90. Shoja ZO, Tabatabai H, Sarijloo M, Shahmahmoodi S, Azad TM, Nategh R. Detection of enteroviruses by reverse-transcriptase polymerase chain reaction in cell culture negative stool specimens of patients with acute flaccid paralysis. *J Virol Methods.* 2007;142(1–2):95–7.
91. Lukashev AN, Drexler JF, Kotova VO, Amjaga EN, Reznik VI, Gmyl AP, et al. Novel serotypes 105 and 116 are members of distinct subgroups of human enterovirus C. *J Gen Virol.* 2012;93(PART 11):2357–62.
92. Olga E. Ivanova, 1 Olga V. Yurashko, 1 Tatiana P. Eremeeva, 1 Olga Yu. Baikova, 1 Nadezhda S. Morozova 2 and Alexander N. Lukashev1. Adenovirus Isolation Rates in Acute Flaccid Paralysis Patients. *Antivir Ther.* 2006;55(November 2005):52–5.
93. Ooi MH, Wong SC, Clear D, Perera D, Krishnan S, Preston T, et al. Adenovirus type 21-associated acute flaccid paralysis during an outbreak of hand-foot-and-mouth disease in Sarawak, Malaysia. *Clin Infect Dis.* 2003;36(5):550–9.
94. Maan HS, Dhole TN, Chowdhary R. Identification and characterization of nonpolio enterovirus associated with nonpolio-acute flaccid paralysis in polio endemic state of Uttar Pradesh, Northern India. *PLoS One.* 2019;14(1):1–18.
95. Bessaud M, Pillet S, Ibrahim W, Joffret ML, Pozzetto B, Delpeyroux F, et al. Molecular characterization of human enteroviruses in the central african republic: Uncovering wide diversity and identification of a new human enterovirus A71 genogroup. *J Clin Microbiol.*

- 2012;50(5):1650–8.
96. Fernandez-garcia MD, Kebe O, Fall AD, Ndiaye K. Identification and molecular characterization of non-polio enteroviruses from children with acute flaccid paralysis in West Africa , 2013 – 2014. 2017;(May):1–11.
  97. Pellegrinelli L, Bubba L, Primache V, Pariani E, Battistone A, Delogu R. Surveillance of poliomyelitis in Northern Italy: Results of acute fl accid paralysis surveillance and environmental surveillance , 2012 – 2015. *Hum Vaccin Immunother* [Internet]. 2017;13(2):332–8.
  98. Nejati A, Zahraei SM, Mahmoudi S, Yousefi M, Mollaei-Kandelous Y, Tabatabaie H, et al. Molecular characterization of non-polio enteroviruses isolated from children with acute flaccid paralysis in IRAN, 2015–2018. *Virus Genes*. 2020;56(5):531–6.
  99. Chouikha A, Rezig D, Driss N, Abdelkhalek I, Ben Yahia A, Touzi H, et al. Circulation and molecular epidemiology of enteroviruses in paralyzed, immunodeficient and healthy individuals in tunisia, a country with a polio-free status for decades. *Viruses*. 2021;13(3).
  100. Smuts H, Cronje S, Thomas J, Brink D, Korsman S, Hardie D. Molecular characterization of an outbreak of enterovirus-associated meningitis in Mossel Bay, South Africa, December 2015-January 2016. *BMC Infect Dis*. 2018;18(1):1–11.
  101. Broberg EK, Simone B, Jansa J, Member EEA. Upsurge in echovirus 30 detections in five EU / EEA countries , April to September , 2018. *Euro Surveill*. 2018;23(44):1800537.
  102. Österback R, Kalliokoski T, Lähdesmäki T, Peltola V, Ruuskanen O, Waris M. Echovirus 30 meningitis epidemic followed by an outbreak-specific RT-qPCR. *J Clin Virol*. 2015;69:7–11.
  103. Razafindratsimandresy R, Joffret ML, Andriamandimby SF, Andriamamonjy S, Rabemanantsoa S, Richard V, et al. Enterovirus detection in different regions of Madagascar reveals a higher abundance of enteroviruses of species C in areas where several outbreaks of vaccine-derived polioviruses occurred. *BMC Infect Dis* 2022;22(1):1–12.
  104. Taravilla, C. N., Pérez-Sebastián, I., Salido, A. G., Serrano, C. V., Extremera, V. C., Rodríguez, A. D., Marín, L. L., Sanz, M. A., Traba, O. M. S., & González AS. Enterovirus A71 Infection and Neurologic Disease, Madrid, Spain, 2016. *Emerg Infect Dis*. 2019;25(1):25–32.
  105. Messacar K, Spence-Davison E, Osborne C, Press C, Schreiner TL, Martin J, et al.

- Clinical characteristics of enterovirus A71 neurological disease during an outbreak in children in Colorado, USA, in 2018: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis.* 2020;20(2):230–9.
106. Li X, Lu H, Sun Q, Zheng P, Zhang B, Cui H, et al. Transmission of recombinant enterovirus A76 (EV-A76) in Xinjiang Uighur autonomous region of China. *Emerg Microbes Infect.* 2023;12(1):3–5.
107. Peacey M, Hall RJ, Wang J, Todd AK, Yen S, Chan-Hyams J, et al. Enterovirus 74 Infection in Children. *PLoS One.* 2013;8(10):1–9.
108. Luchs A, Leal E, Tardy K, Milagres FA de P, Komninakis SV, Brustulin R, et al. The rare enterovirus c99 and echovirus 29 strains in Brazil: Potential risks associated to silent circulation. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2019;114(7):4–7.
109. Sun Q, Zhang Y, Cui H, Zhu S, Li X, Huang G, et al. Complete genome sequence analysis of two human enterovirus C99 strains isolated in Xinjiang Uighur Autonomous Region, China, in 2011. *Arch Virol.* 2014;159(2):359–64.

## **Annexes**

## Annexe I

### Pré-traitement des selles des cas de PFA pour la recherche du Poliovirus et des EVs non-poliomyélitiques

Les échantillons requièrent un prétraitement avant d'être inoculés, et tous les prélèvements de selles doivent subir un traitement au chloroforme auquel les EVs sont résistants. Cette méthode élimine les bactéries et les champignons contenus dans les selles, détruit les lipides potentiellement cytotoxiques et dissocie les agrégats viraux.

1. Marquer les tubes à centrifuger avec l'identifiant de l'échantillon
2. Ajouter 10ml de solution Phosphate buffered saline (PBS), 1g de billes de verre et 1ml de chloroforme dans chacun des tubes.
3. Sous une enceinte de sécurité biologique (ESB), ajouter 2g de chaque selle collectée à chacun des tubes marqués.
4. Les tubes, correctement fermés, sont vortexés pendant 20 min.
5. Centrifuger les tubes dans une centrifugeuse réfrigérée à 1500 xg pendant 20 min.
6. Sous l'ESB, transférer le surnageant de chaque suspension vers un tube de collecte de 2 ml et conserver à -20°C jusqu'à inoculation.

**Tableau 3: Composition du Phosphate Buffer Saline pour la préparation des suspensions de selles**

Solution	Produit chimique	Masse (g)	Préparation
<b>Solution A (PBS incomplet)</b>	NaCl	8g	Dissoudre les sels dans 1000 ml puis autoclaver à 70 kPa pendant 15 min.
	KCl	0,2 g	
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (anhydre)	0,91 g	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,12g	
<b>Solution B</b>	MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,10 g	Dissoudre dans 100 ml d'eau distillée puis autoclaver à 70 kPa pendant 15 min.
<b>Solution C</b>	CaCl <sub>2</sub>	0,10 g	Dissoudre dans 100 ml d'eau distillée puis autoclaver à 70 kPa pendant 15 min.
<b>Pour préparer la solution de travail du PBS complet ajouter 1 volume de solution B et 1 volume de solution C à 8 volumes de solution A</b>			

## Annexe II

### Composition du milieu utilisé pour la culture cellulaire

Deux milieux sont préparés pour la culture cellulaire des lignées RD et L20B utilisés pour l'isolement du Poliovirus et des EVs non-poliomyélitiques : le milieu de croissance et le milieu de maintien à la base du milieu Eagle's minimum essential medium.

**Le milieu de croissance**, riche en sérum (généralement 10 %), favorise une croissance cellulaire rapide. Après la formation d'une monocouche et avant l'inoculation du virus, le milieu de croissance est retiré et remplacé par un milieu de maintien.

Le milieu de maintien (MM), à faible teneur en sérum (généralement 2 %), est destiné à maintenir les cultures cellulaires dans un état stable de réplication cellulaire lente tout en maintenant le métabolisme cellulaire pendant la période de réplication virale.

**Tableau 4: Composition du milieu de croissance et du milieu de maintien pour la culture cellulaire.**

	<b>Milieu de croissance</b>	<b>Milieu de maintien</b>
Eagle's minimum essential medium	83,3 ml	90,3
Sérum de veaufœtal	10 ml	2 ml
L-glutamine 200 mM	1 ml	1 ml
Solution Bicarbonate de Sodium NaHCO <sub>3</sub> 7.5%	3,5 ml	4,5 ml
HEPES 1M	1 ml	1 ml
Solution de Penicillin/streptomycin	1 ml	1 ml
Rouge de phénol 0,4%	0,2 ml	0,2 ml

## Annexe III

### Entretien des lignées cellulaires RD et L20B

La qualité des cultures cellulaires utilisées dans l'étude virologique de la poliomyélite est importante pour la normalisation de l'isolement du poliovirus et sa caractérisation. Les étapes de l'entretien des lignées cellulaires utilisées doivent être menées dans des conditions d'asepsie totale pour éviter la contamination des cellules lors des passages. De même, les lignées cellulaires RD et L20B doivent être manipulées séparément pour éviter les contaminations croisées.

1. Examiner les cellules pour en vérifier la qualité (c'est-à-dire une monocouche entière de cellules saines) et l'absence de contamination, selon un examen visuel.
2. Décanter le milieu de croissance de la fiole de culture cellulaire et laver délicatement la couche de cellules confluentes deux fois avec du PBS sans Ca ni Mg.
3. Ajouter une solution de trypsine à la monocouche cellulaire, en la dispersant uniformément (un volume de 1ml pour un flasque de 75 cm<sup>2</sup> et 0,5 ml pour un flasque de 25 cm<sup>2</sup>).
4. Placer le flasque dans un incubateur à 36°C jusqu'à ce que les cellules se détachent de la surface. Vérifier le détachement complet des cellules en les examinant au microscope inversé.
5. Remettre les cellules en suspension dans du milieu de croissance (9,5 ml ou 4,5 ml dans un flasque de 75 cm<sup>2</sup> ou 25 cm<sup>2</sup>), afin d'arrêter l'action de la trypsine. Aspirer doucement la suspension à plusieurs reprises à l'aide d'une pipette Pasteur fine pour briser les amas de cellules.
6. Diluer avec le milieu de croissance jusqu'à la concentration souhaitée, (généralement 1:3).
7. Boucher les flasques hermétiquement et les placer dans un incubateur à 36°C.
8. Les flacons sont généralement sub-cultivés tous les 5 à 7 jours.

## **Annexe IV**

### **Isolement des EVs polio et non polio par culture cellulaire**

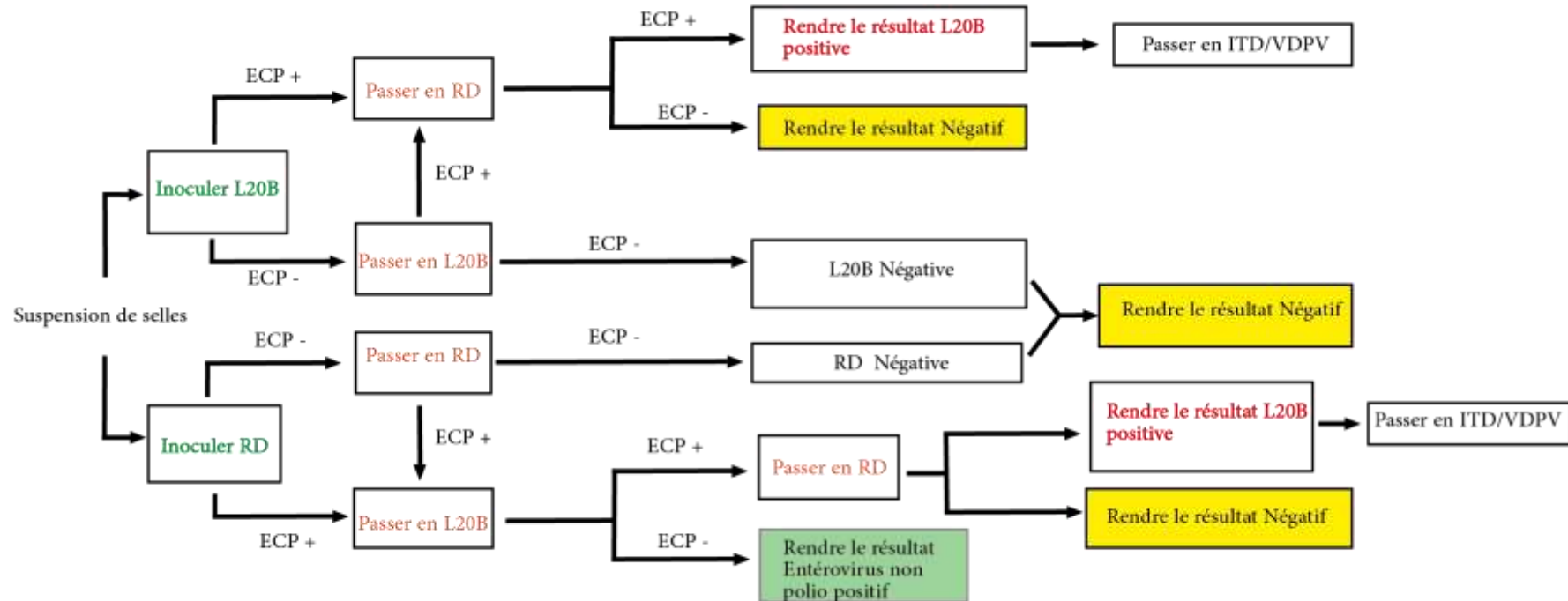
Examiner au microscope les cultures monocouches récentes pour s'assurer que les cellules sont saines. Une monocouche appropriée est une monocouche formée dans les 2 à 3 jours suivant l'ensemencement.

L'ensemencement se fait sur une monocouche cellulaire cultivée sur des tubes de culture plats. La procédure technique pour l'isolement est comme suit :

- Retirer le milieu de croissance et le remplacer par 1 ml de milieu de maintien.
- Étiqueter deux tubes de RD et deux tubes de L20B pour chaque spécimen à inoculer (numéro du spécimen, date, numéro de passage).
- Étiqueter un tube de chaque type de cellule comme contrôle négatif.
- Inoculer chaque tube avec 0,2 ml de suspension de selles prétraitée et incubé en position stationnaire inclinée (5°) à 36°C.
- Examiner quotidiennement les cultures à l'aide d'un microscope inversé pour détecter l'apparition de l'ECP.
- Noter toutes les observations des cultures inoculées et des cultures témoins pendant au moins une semaine, en notant l'ECP (1+ à 4+) pour indiquer le pourcentage de cellules affectées (1+ jusqu'à 25 % ; 2+ de 25 à 50 % ; 3+ de 50 à 75 % et 4+ de 75 à 100%), les cellules montrant un ECP seront traitées selon l'algorithme de l'OMS pour l'isolement du poliovirus (Annexe V).
- Les cultures négatives doivent être examinées pendant au moins 14 jours au total avant d'être éliminées.

## Annexe V

### Algorithme de l'OMS pour l'isolement du poliovirus et des EVs non polio



L'ITD rRT-PCR correspond au test de différenciation intratypique des poliovirus réalisé sur les L20B afin de déterminer le type de poliovirus isolé (SL1, SL2, SL3, WPV1, PV2, WPV3).

Si un SL1 et/ou SL3 (souches vaccinales) est détecté ; ils seront passés en VDPV rRT-PCR pour déterminer s'il s'agit d'un poliovirus dérivé du vaccin. Ces deux tests sont fournis sous forme de kits délivrés par les « Centres pour le contrôle et la prévention des maladies (CDC) ».

## Annexe VI

### **Extraction de l'ARN viral par le minikitQiagen (250 réactions)**

L'extraction de l'ARN viral a été réalisé aussi bien à partir de suspensions de selles des patients atteints de PFA qu'à partir des cultures cellulaires ayant été positives pour les EVs.

1- Pour la préparation des réactifs suivre les conditions présentées sur le tableau qui suit :

**Tableau 5: Préparation des réactifs pour extraction de l'ARN viral**

<b>Réactif</b>	<b>Procédure de reconstitution</b>
Solution AVE-RNA carrier	Ajouter 310µl d'AVE au contenu du tube RNA carrier (310µg), vortexer pour dissoudre le complexe AVE-RNA carrier puis distribuer 5,6µl dans des tubes de 2ml qui serviront pour l'extraction et conserver à -20°C.
AW1	Ajouter 130 ml de l'éthanol absolu au flacon contenant la solution AW1
AW2	Ajouter 160 ml de l'éthanol absolu au flacon contenant la solution AW2

2- Procédure technique de l'Extraction de l'ARN viral

- a- Etiqueter les tubes contenant la solution AVE-RNA carrier avec l'identifiant de l'échantillon
- b- Ajouter 560 µl de réactif de lyse AVL aux tubes d'extraction.
- c- Ajouter 140µl de la suspension des selles ou de la culture cellulaire. Vortexer pendant 15 sec.
- d- Incuber à température ambiante pendant 10 min. Centrifuger brièvement
- e- Ajouter 560 µl d'éthanol absolu aux tubes d'extraction puis vortexer pendant 15 sec. Centrifuger brièvement
- f- Transférer 630µl du contenu du tube d'extraction dans la colonne de filtration fournie avec le kit puis fermer le tube. Centrifuger à 6000xg pendant 1 min. Placer la colonne dans un nouveau tube de collection et jeter le tube contenant le filtrat.
- g- Répéter l'étape « e » afin de filtrer la totalité du mélange.
- h- Ajouter 500µl de la solution de lavage AW1 sur la colonne avec précaution. Fermer la colonne et centrifuger à 6000xg pendant 1min. Placer chaque colonne sur un nouveau tube de collection de 2ml et jeter le tube contenant le filtrat.
- i- Ajouter 500µl de la solution de lavage AW2 sur la colonne avec précaution. Fermer la colonne et centrifuger à 20.000xg pendant 3min.
- j- Placer la colonne sur un tube à centrifuger de 1,5ml. Ajouter 60µl du tampon AVE puis incuber à température ambiante pendant 1 min.
- k- Centrifuger à 6000 x g pendant 1 min.

L'ARN ainsi purifié peut être conservé à -20°C jusqu'à utilisation. L'ARN est stable pendant une année à -80°C.

## Annexe VII

### Détection des EVs par rRT-PCR ciblant la région non codante 5'UTR

#### rRT-PCR-5UTR

Selon Monpoeho S. et al. BioTechniques 2000, 29, 88-93

InvitrogenSuperSript<sup>TM</sup>III Platinum Onestep Quantitative kits (Cat# 11732-020)

**Tableau 6: Séquences des primers et de la sonde utilisés pour la rRT-PCR détection des EVs par amplification de la région 5'UTR**

primer		Seq
EV2	451-469	Ccctgaatgctggctaac
EV1	579-597	Gattgtcaccataagcagc
EV-probe	532-557	FAM-CGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGT-TAMRA

Le mélange réactionnel est préparé comme suit :

Reactif	concentration	volume (µl)	concentration finale	Mix pour X échantillons
RT-PCR mix	2X	10	1X	
F primer	10 µM	1	500 nM	
R primer	10 µM	1	500 nM	
Probe	10 µM	0.5	250 nM	
Enzyme mix	-	0.4	-	
Water qsp 20 µl	-	2.1	-	
Sample	RNA	5	-	-

- Travailler dans la glace
- Distribuer 15 µl de mix par puits (plaque 0,2ml pour QuantStudio 5)
- Ajouter 5µl d'ARN
- Recouvrir la plaque d'un film optique
- Centrifuger

Programme : pour QuantStudio 5 (82min)

Reverse transcription 45°C ; 15 minutes

Taq inhibitor activation 95°C ; 2 minutes

PCR amplification { 95°C ; 15 seconds  
(45 cycles) { 60°C ; 30 seconds

## Annexe VIII

### Procédure du typage des EVs par séquençage Sanger des gènes de la 5'UTR et VP1

#### 1- Synthèse du cDNA

La rétrotranscription de l'ARN pour formation de l'ADN complémentaire est réalisée par le kit de transcription inverse RT SuperscriptII d'Invitrogen.

Réactifs	1 réaction	N réactions
ARN	(2 µl)	
RNAsin (40u/µl)	0,5 µl	
AmorceHepta N (100 µM)	1 µl	
Tampon RT (5X)	4 µl	
DTT (0,1 M)	2 µl	
dNTP (10mM)	1 µl	
RT superscript II reverse transcriptase (200u/µl) Invitrogen	1 µl	
H <sub>2</sub> O qsp 20 µl ou 90 µl	8,5 µl	

#### 2- Amplification du cDNA pour la région non codante 5'UTR (UG52/UC53) et le gène de la protéine VP1 (AMTH/GDCL)

**Tableau 7: Séquences des primers et de la sonde utilisés pour la rRT-PCR de la région 5'UTR et la VP1**

Mix	nom	sequence	position	taille
M1	AMTH	2200	GCIATGYTIGSIACICAYVT	
	GDCL	3700	ARIABICCCRCARTCICC	1500
M2	UG52	165-185	CAAGCACTTCTGTTCCTCCCGG	
	UC53	595-577	TTGTCACCATAAGCAGCCA	430

Le mélange réactionnel est préparé comme suit :

Réactifs	1 Réaction	N Réactions
Tampon Taq sans MgCl <sub>2</sub> (10X) Y02028	5 µl	
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	1,5µl	
Amorcegénomique (20 µM)	1µl	
Amorcecomplémentaire (20 µM)	1µl	
dNTP (10 mM)	1µl	
H <sub>2</sub> O	40µl	
Platinum Taq DNA pol invitrogen (5u/µl)	0,5µl	

Distribuer 50 µl mix/puits

Ajouter 2 µl de cDNA,

Le programme d'amplification est comme suit :

94°C 2 min	}	30 cycles
94°C 30 sec		
45°C 30 sec		
60°C 2 min		

### 3- Nested PCR pour le gène de la VP1

Pour amplifier le gène de la VP1, nous avons procédé à une Nested PCR utilisant un couple d'amorces internes et dont les séquences sont présentées sur la tableau qui suit.

**Tableau 8: Séquences des primers utilisés pour la Nested PCR de la VP1**

<i>Mix</i>	<i>nom</i>	<i>sequence</i>	<i>position</i>	<i>taille</i>
<i>Sur le M1</i>	224	2200	<i>GCIATGYTIGSIACICAYVT</i>	
	222	2969-2951	<i>CICCIGGIGGIAYRWACAT</i>	769

Le mélange réactionnel est préparé comme suit :

<b>Réactifs</b>	<b>1 Réaction</b>	<b>N réactions</b>
Tampon Taq sans MgCl <sub>2</sub> (10X) Y02028	5 µl	
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	1,5µl	
Amorcegénomique (20 µM)	1µl	
Amorcecomplémentaire (20 µM)	1µl	
dNTP (10 mM)	1µl	
H <sub>2</sub> O	40µl	
Platinum Taq DNA pol invitrogen (5u/µl)	0,5µl	

Distribuer 50 µl mix/puits

Ajouter 2 µl de produit PCR

Le programme d'amplification sur le thermocycleur est le suivant :

94°C 2 min	} 30 cycles
94°C 30 sec	
45°C 30 sec	
60°C 1 min	

Les produits d'amplification de la 5'UTR et de la VP1 sont visualisés sur un gel d'électrophorèse à 2%.

Les produits amplifiés sont purifiés par l'ExoSap et transférés pour la réaction de séquence utilisant le BigDye Terminator v3.1.

Les réactions de séquence sont passées sur le ABI 3130 (AppliedBiosystems) à l'Institut National d'Hygiène.

## Annexe IX

### Séquençage du génome entier des EVs par NGS des EVs isolés par culture cellulaire

La procédure de séquençage NGS des EVs isolés à partir d'échantillons de selles des enfants atteints de PFA est comme suit:

#### **I. Synthèse cDNA**

Nous avons utilisé le kit Maxima H Minus First Strand cDNASynthesis Kit (Thermo Scientific, ref K1652). Le mélange réactionnel est préparé comme suit:

<i>Composants</i>	<i>1 réaction(μl)</i>	<i>N réactions</i>
<i>dNTP du kit (10 mM)</i>	<i>1</i>	
<i>Oligo (dT)18 du kit (0.5μg/μl)</i>	<i>1</i>	
<i>Water (QSP 20μl)</i>	<i>13</i>	

Distribuer **15 μl du mix** dans chaque puit

Ajouter **4 μl** d'ARN

Incuber à 65°C pendant 5 min

Incuber dans la glace pendant 2 min

<i>Composants</i>	<i>1 réaction(μl)</i>	<i>N réactions</i>
<i>RT buffer (5X)</i>	<i>4</i>	
<i>Maxima H minus enzyme Mix</i>	<i>1</i>	

Ajouter 5μl par puit

Incuber à 50°C pendant 30 min

Incuber 85°C pendant 5 min

#### **2. PCR EV-PI, EV-A, -B, -C et -D (5 Mix)**

L'amplification de l'ADN complémentaire des EVs est réalisée selon la procédure suivante :

**Tableau 9: Séquences des primers utilisés pour la PCR1 des EVs pour NGS**

<i>MIX</i>	<i>Name</i>	<i>Position</i>	<i>Sequence</i>	<i>Taille</i>
<i>1</i>	<i>5NC-6BF</i>	<i>165-185</i>	<i>CAAGCACTTCTGTTCCCGG</i>	
	<i>EV-CRE-R</i>	<i>4500</i>	<i>CGGBRTTGSWCTTGAAGT</i>	<i>4000</i>
<i>2</i>	<i>EVA-4110-F</i>	<i>4110</i>	<i>AARAARTTYAAYGAYATGGC</i>	
	<i>EVA-7410-R</i>	<i>7410</i>	<i>TTTGCTATTCTGGTTATAAC</i>	<i>3300</i>
<i>3</i>	<i>EVB-4110-F</i>	<i>4110</i>	<i>GGCGNTGGCTYAARCRAARG</i>	<i>3300</i>
	<i>EVB-PolyT</i>		<i>TTTTTTTTTTTTTTTTCCGCACCG</i>	
<i>4</i>	<i>EVC-4220-F</i>	<i>4220</i>	<i>GARGCNTGYAAYGCNGCNAARG</i>	
	<i>C005-R</i>	<i>7415</i>	<i>CCGAATYAAARRAAAATTTACCC</i>	<i>3200</i>
<i>5</i>	<i>EVD-4064-F</i>	<i>4065</i>	<i>GGCTNAAGAARTTCACAGARGC</i>	
	<i>EVD-7362-R</i>	<i>7362</i>	<i>CCAARKTRACCAAATTTACC</i>	<i>3298</i>

Components	1 réactions (µl)	N réactions
Phusion HF Buffer (5X) F-518	5	
Forward primer 20 µM	0,5	
Reverse primer 20 µM	0,5	
dNTP (10mM) kit RT	1	
H <sub>2</sub> O (QSP 25 µl)	15,75	
Phusion High-Fidelity DNA pol Thermo scientific (F-530S)	0,25	

Distribuer **23 µl** du mix par puit

Ajouter **2 µl** du cDNA

Le programme du thermocycleur est comme suit:

98°C 30 sec  
 98°C 10 sec } x 35 cycles  
 55°C 30 sec } (temps extension : 15-30 sec /1 kb)  
 72°C 3 min  
 72°C 10 min

On dépose les produits d'amplification sur gel d'agarose à 2%. Après visualisation du gel, on procède à la purification des produits de la PCR et on réalise la Nested PCR.

### 3. PCR Nested PCR (P2+P3) -EV-A, -B, -C et -D

Les primers utilisés pour la nested PCR sont présents dans le tableau suivant:

**Tableau 10: Séquences des primers utilisés pour la nested PCR du génome entier des EVs**

MIX	Name	Position	Sequence	Size
1	UG53	577-595	TGGCTGCTTATGGTGACAAT	
	EV-CRE-R	4500	CGGBRITTTGSWCTTGAAGCTG	3923
2	EVA-4250-F	4250	GARAAAYCARATHHTCHAAAYHTNG	
	EV-A-7380-R	7380	CYAGTCATDAACACGACCAG	3130
3	EV-B-4215-F	4215	GYAARGGNATGGARTGGATWG	
	EVB-7400-R	7400	GCACCGAATGCGGAGAAATTTAC	3185
4	EVC-4390-F	4390	GYCCNAGYCARGAASAHCARG	
	EVC-7405-R	7405	GACTGAGGTAGGGTTACTAAA	3015
5	EVD-4112-F	4112	GGCTAKCMCAAAAAGATWGAC	
	EVD-7311-R	7311	AAKTAGAGTTATCTARAAYG	3199

Les produits sont ensuite visualisés sur gel d'agarose 1%

Purifier sur plaque les produits PCR présentant une bande : pooler les produits PCR d'un même échantillon (par exemple : produit PCR mix1+produit PCR mix2).

Les produits de PCR étaient ensuite envoyés pour séquençage NGS à la plateforme de séquençage PIBNET (Pasteur International Bioresources Network) de l'Institut Pasteur de Paris.