

Variabilité génétique des *Poliovirus* : étude du polymorphisme de la longueur des fragments de restriction enzymatique de souches isolées à Madagascar

Razafindratsimandresy R¹, Rakoto Andrianarivelo M¹, Rousset D¹

RESUME : La différenciation de l'origine vaccinale ou sauvage des *Poliovirus* au laboratoire est une étape importante vers le processus d'éradication de la poliomyélite. Dans cet article, nous rapportons les résultats obtenus sur des souches de *Poliovirus* type 3 et 2, isolés à Madagascar en 1997 et 2002 à partir d'enfants asymptomatiques et de cas de paralysie flasque aiguë, respectivement. La technique utilisée est basée sur l'amplification du génome (RT-PCR), suivie de l'analyse du Polymorphisme de la Longueur des Fragments de Restriction enzymatique (RFLP), dans 3 régions différentes du génome. Dans la région capsidale (VP3-VP1 et VP1-2A), l'analyse RFLP a permis de différencier sans ambiguïté l'origine sauvage ou vaccinale des souches de *Poliovirus* type 3, et d'identifier des Virus Dérivés de Souches Vaccinales (VDSV) de type 2. Dans la région non capsidale incluant l'ARN polymérase et la région 3' non codante (3D^{pol}-3'NC), les VDSV se sont avérés être en plus des virus recombinants avec d'autres Entérovirus. Ces résultats confirment que la technique RFLP est un outil fiable de différenciation intratypique et d'étude de la dérive génétique et des phénomènes de recombinaison des *Poliovirus*.

Mots-clés : RT-PCR-RFLP - *Poliovirus* - Virus Dérivés de Souches Vaccinales - Différenciation intratypique - Recombinaison - Madagascar.

ABSTRACT : "Genetic variability of *Poliovirus* : typing of strains isolated in Madagascar by Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) assay". The differentiation of the vaccine or wild origin of *Poliovirus* at the laboratory is an important step towards the process of the poliomyelitis eradication. We report herein the results obtained from *Poliovirus* types 3 and 2, isolated in Madagascar in 1997 and 2002 from healthy children and cases of acute flaccid paralysis, respectively. The technique used is based on the amplification of genome (RT-PCR), followed by Restriction Fragment Length Polymorphism assay (RFLP), performed in 3 different regions of the genome. In the capsid region (VP3-VP1 and VP1-2A), RFLP analysis allowed us to differentiate without ambiguity the wild or vaccine origin of the *Poliovirus* type 3, and to identify Vaccine-Derived *Poliovirus* (VDPV) type 2. In the noncapsid region, including the RNA polymerase and 3' non coding region (3D^{pol}-3' NTR), the VDPV were found to be recombinant with other Enteroviruses. These results confirm that RFLP assay is a reliable tool for intratypic differentiation and to study the genetic drift and recombination of *Poliovirus*.

Key-words : RT-PCR-RFLP - *Poliovirus* - Vaccine-Derived *Poliovirus* - Intratypic differentiation - Recombination - Madagascar.

INTRODUCTION

L'espèce *Poliovirus* (PV), genre *Entérovirus*, famille des *Picornaviridae*, est l'agent étiologique de la poliomyélite. Il se transmet essentiellement par voie féco-orale et peut être excrété dans les selles pendant 4 à 6 semaines. C'est un virus non enveloppé dont le génome est une molécule d'ARN simple brin, de polarité positive d'environ 7440 nucléotides (nt), protégé par une capsidie icosaédrique formée des protéines VP1 à VP4. La protéine VP1, siège de déterminants antigéniques de neutralisation, permet la distinction des 3 sérotypes de *Poliovirus* (PV1, 2 et 3), mais également la diffé-

renciation de son origine vaccinale ou sauvage [1,2].

Pour lutter contre la poliomyélite et atteindre l'objectif mondial de l'éradication, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) préconise l'utilisation du vaccin polio oral (VPO) atténué par passages successifs de souches sauvages sur cellules. Le VPO induit une immunité intestinale empêchant la multiplication des virus sauvages dans l'organisme, et une immunité sérique durable par synthèse d'anticorps neutralisants [3].

L'utilisation de VPO lors des Journées Nationales de Vaccination (JNV) et l'augmentation et le maintien de la couverture vaccinale de routine avec ce vaccin à des taux élevés ont permis d'éradiquer la poliomyélite dans 3 régions du monde jusqu'en 2002 : Amérique, Pacifique occidentale y compris

¹Institut Pasteur de Madagascar, BP 1274 - 101 Antananarivo - Madagascar.

la Chine et l'Europe. Le PV sauvage continue encore à circuler en Inde, au Nigeria, au Pakistan et en Afghanistan [4]. Bien qu'aucun PV sauvage n'ait été isolé à Madagascar depuis 1997 [5], le pays a été récemment classé zone d'éradication prioritaire en raison d'une couverture vaccinale de routine faible, d'une surveillance des paralysies flasques aiguës (PFA) très faible et de l'apparition en 2001-2002 d'une épidémie de "Virus Dérivés de Souches Vaccinales" (VDSV) [6].

Dans le cadre de l'éradication de la poliomyélite et afin d'être en mesure de certifier à terme l'absence de circulation du PV sauvage, l'OMS a mis en place un réseau mondial de laboratoires chargé du diagnostic et de la différenciation de l'origine sauvage ou vaccinale des PV. Les principales techniques de différenciation intratypique du PV recommandées par l'OMS doivent associer une méthode antigénique (ELISA), et une méthode génétique (amplification du génome par RT-PCR à l'aide d'amorces spécifiques de souches vaccinales et sauvages ou hybridation du génome avec des sondes spécifiques) [7]. La confirmation de ces différentes techniques est réalisée par le séquençage partiel du génome dans la région codant la protéine VP1 entière. Des laboratoires de recherche ont développé une technique de différenciation intratypique basée sur l'amplification par RT-PCR de la région codant les protéines de capsidie suivie de l'analyse RFLP (Polymorphisme de la Longueur des Fragments de Restriction enzymatique) du produit amplifié [8]. Par ailleurs, l'analyse RT-PCR-RFLP de la région non capsidale permet de détecter les phénomènes de recombinaison génétique entre les souches de PV ou entre PV et *Entérovirus* [8,9].

Cet article présente les résultats de la technique RT-PCR-RFLP dans 3 régions différentes du génome du PV (protéines de capsidie VP3-VP1, VP1-2A et région à cheval entre l'ARN polymérase et la région 3' non codante) isolés à Madagascar entre 1997 et 2002. Les critères permettant d'identifier les sites de restrictions enzymatiques informatifs pour différencier les souches sauvages des souches vaccinales seront discutés, ainsi que l'intérêt d'étudier les régions des protéines non structurales du génome.

MATERIEL ET METHODES

Virus étudiés

Au total, 37 souches de PV isolées sur cellules L20B et identifiées par séroneutralisation avec des antisérums spécifiques ont été étudiées. Vingt-huit

souches sont de type 3 et proviennent d'enfants sains recrutés lors d'une étude de la circulation des *Entérovirus* en 1997 sur les hauts-plateaux de Madagascar. Neuf souches sont de type 2 et sont issues de cas de PFA déclarés en 2001-2002 sur les côtes Sud de Madagascar.

Amplification du génome par RT-PCR

Après extraction de l'ARN viral au Trizol LS® (Gibco BRL), les virus de type 3 ont été amplifiés dans deux régions codant les protéines de capsidie (VP3-VP1 et VP1-2A) selon une technique dérivée de Guillot *et al.* [8]. Les virus de type 2 ont été amplifiés dans trois régions différentes du génome: les régions VP3-VP1 et VP1-2A et une région non capsidale incluant l'ARN polymérase et la région 3' non codante (3D^{pol}-3'NC). Le tableau I montre les caractéristiques des amorces utilisées. Un mélange réactionnel de 14 µl renfermant 2 µl d'ARN viral, 10 pmoles d'amorce antisens UC1 ou UC13, ou 40 pmoles UC10, et 20U de RNasin (Promega), a été chauffé à 80°C-5 min et 50°C-5 min à l'aide d'un thermocycleur GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer Applied Biosystems). La synthèse des ADNc a été effectuée dans un volume de 20 µl avec 1,25U de RT-AMV (Reverse Transcriptase Avian Myeloblastosis Virus, Promega), et 10 mM de dNTPs (Gibco BRL); le mélange réactionnel a été incubé à 50°C-30 min et 95°C-5 min puis placé immédiatement dans la glace. L'amplification a été réalisée dans un volume total de 100 µl renfermant 10 pmoles d'amorce sens UG24 ou UG19, ou 40 pmoles UG17, et 1,25U de Taq DNA polymerase (Amersham), selon le programme suivant : 29 cycles à 94°C-10 sec, 45°C-60 sec, 70°C-60 sec et un dernier cycle à 94°C-10 sec, 45°C-60 sec, 70°C-10 min. Les produits d'amplification ont été visualisés par transillumination UV après électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% imprégné de bromure d'éthidium.

Tableau I : Caractéristiques des amorces utilisées

Amorces	Séquences	Localisation	Région amplifiée	Taille (pb)
UC1 (antisens)	5'-GAATTCATGTCAAATCTAGA-3'	2862-2881	VP3-VP1	972
UG24 (sens)	5'-GCAGAAATAGACACCATGAT-3'	1913-1932		
UC13 (antisens)	5'-TAGTCATTAGCTTCCATGTA-3'	3629-3648	VP1-2A	779
UG19 (sens)	5'-GACATGGAATTCACCTTTGTGG-3'	2870-2891		
UC10 (antisens)	5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTC-3'	7441-7464	3Dpol-3NC	929
UG17 (sens)	5'-TCAGTGCCATGAGAATGGC-3'	6536-6555		

Analyse du Polymorphisme de la Longueur des Fragments de Restriction enzymatique (RFLP)

Chaque région amplifiée a été digérée avec les enzymes de restriction *HinfI* (Gibco BRL), *DpnII* (Biolabs), *DdeI* (Promega) et *RsaI* (Gibco BRL). Le mélange réactionnel constitué de 20 µl de produits d'amplification, 10U d'enzyme de restriction et 2 µl de tampon 10X a été incubé à 37°C-2 h en bain-marie. Les fragments de restriction enzymatique ont été révélés par transillumination UV après électrophorèse sur gel d'agarose à 3% imprégné de bromure d'éthidium. La taille des fragments de restriction enzymatique des virus de référence Sabin 1, 2 et 3 a été calculée avec un programme d'analyse de la carte de restriction présent sur le site <http://www.infobiogen.fr/> à partir des séquences tirées de la banque de données GenBank. Les profils obtenus ont été comparés à ceux des virus étudiés. Pour les virus de type 3, les profils ont été également comparés aux profils obtenus à partir de la séquence d'une souche sauvage isolée en Finlande en 1984 (PV3/23127). La taille des différents fragments de restriction ainsi que la position des sites de restriction des virus de type 3 étudiés ont été déduits de la carte de restriction enzymatique du virus de référence vaccinal Sabin 3.

RESULTATS

Profils RFLP des poliovirus de type 3

Au total, 16 souches vaccinales et 12 souches sauvages de type 3 ont été identifiées par l'analyse RFLP.

Dans la région génomique VP3-VP1, l'analyse RFLP a permis d'identifier 3 groupes de profils en fonction des enzymes de restriction : **(i)** profils spécifiques pour les souches sauvages, **(ii)** profils spécifiques pour les souches vaccinales et, **(iii)** profils "mixtes" qui se rencontrent à la fois chez les souches sauvages et vaccinales, plus particulièrement avec les digestions enzymatiques *DdeI* et *DpnII* (tableau II). Après élimination des sites de restriction communs aux souches sauvages et vaccinales, seule l'enzyme *DdeI* n'a pas permis d'identifier l'origine des souches. En revanche, avec les enzymes *DpnII*, *RsaI* et *HinfI*, l'analyse des sites de restriction a permis de dégager des sites dont la présence dans le génome peut être utilisée comme critère pour déterminer l'origine vaccinale ou sauvage des souches PV3 isolées en 1997 (tableau III).

Dans la région génomique VP1-2A, l'analyse RFLP a permis d'observer 2 groupes de profils : **(i)** profils spécifiques pour les souches sauvages et **(ii)** profils spécifiques pour les souches vaccinales

(tableau IV). Avec les enzymes *DpnII*, *RsaI*, *HinfI* et *DdeI*, l'analyse des sites de restriction a permis d'identifier des sites dont la présence dans le fragment amplifié peut être utilisée pour déterminer l'origine sauvage ou vaccinale des souches de PV3 isolées en 1997 (tableau V).

Profils RFLP des poliovirus de type 2

Dans la région VP3-VP1, les profils RFLP des souches de type 2 se sont avérés différents du profil de la souche vaccinale Sabin 2, avec acquisition d'un site de restriction supplémentaire. Les profils observés permettent de distinguer 2 groupes de virus distincts, G1 et G2, provenant de 2 localités différentes, et de 2 sous groupes, G2a et G2b, au sein du groupe G2 (figure 1). Les résultats obtenus font suspecter le caractère dérivé de souches vaccinales des virus étudiés.

Dans la région VP1-2A, les profils RFLP des souches de type 2 étaient identiques au profil de la souche vaccinale Sabin 2.

Dans la région 3D^{pol}-3'NC, les profils observés ont révélé 2 groupes de virus séparés correspondant aux groupes G1 et G2, et complètement différents des 3 souches vaccinales Sabin 1, 2, et 3, suggérant l'existence de phénomènes de recombinaison avec d'autres *Entérovirus* (figure 2).

Tableau II : Carte de restriction enzymatique des souches de type 3 dans la région VP3-VP1

Virus	RFLP VP3-VP1				Profils RFLP
	<i>HinfI</i>	<i>DpnII</i>	<i>DdeI</i>	<i>RsaI</i>	
Sabin 3	772, 169, 18, 12	642, 195, 90, 45	340, 313, 183, 76, 60	338, 280, 184, 106, 64	vaccinal
PV3/Finlande	763, 94, 76, 18, 12, 9	387, 214, 196, 175	694, 184, 94	445, 290, 162, 64, 11	sauvage
R, S, T, U, Z, α, V, Y, γ, β	420, 227, 116, 94, 76, 18, 12, 9	490, 347, 135	340, 313, 183, 76, 60	390, 290, 162, 64, 55, 11	sauvage
X	420, 227, 116, 94, 76, 18, 12, 9	585, 387	340, 313, 183, 76, 60	390, 290, 162, 64, 55, 11	sauvage
G	434, 338, 170, 18, 12	642, 195, 90, 45	340, 313, 183, 76, 60	338, 280, 184, 106, 64	vaccinal
H, I	772, 169, 18, 12	642, 195, 135	340, 313, 183, 76, 60	338, 280, 184, 106, 64	vaccinal
J	772, 169, 18, 12	642, 240, 90	340, 313, 183, 76, 60	280, 250, 184, 106, 88, 64	vaccinal
K, L	772, 169, 18, 12	642, 195, 90, 45	340, 313, 183, 76, 60	280, 250, 184, 106, 88, 64	vaccinal
M, N, O	772, 169, 18, 12	642, 195, 90, 45	340, 313, 183, 76, 60	338, 235, 184, 106, 64, 45	vaccinal
A, C, D, E, F, B	772, 169, 18, 12	642, 195, 90, 45	340, 313, 183, 76, 60	338, 280, 184, 106, 64	vaccinal
Q	420, 227, 116, 94, 76, 18, 12, 9	837, 135	340, 313, 183, 76, 60	390, 290, 162, 64, 55, 11	mixte*
P	772, 169, 18, 12	837, 135	340, 313, 183, 76, 60	338, 280, 184, 106, 64	mixte†

Les chiffres indiqués dans le tableau représentent les tailles, en pb, des fragments générés après digestion.

* : profil RFLP commun aux virus Q et P par les digestions enzymatiques *DpnII* et *DdeI*. Dans la région VP1-2A (tableau IV) et après séquençage, le virus Q est d'origine sauvage.

† : profil RFLP commun aux virus P et Q par les digestions enzymatiques *DpnII* et *DdeI*. Dans la région VP1-2A (tableau IV) et après séquençage, le virus P est d'origine vaccinale.

Figure 1 : Profils RFLP des virus de type 2 dans la région VP3-VP1

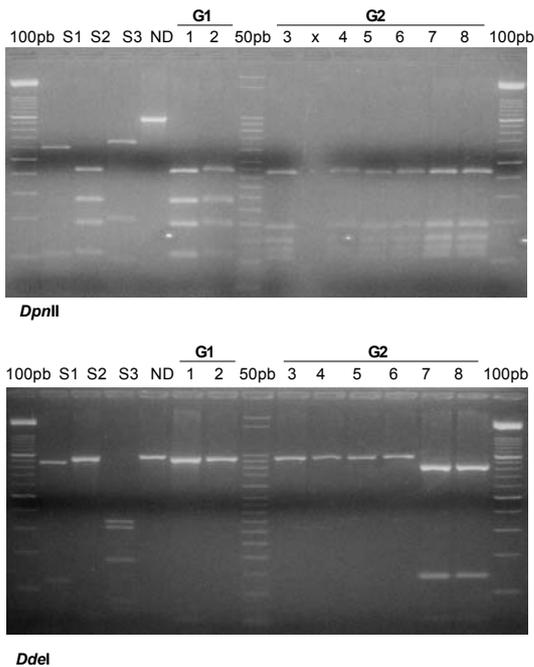


Figure 2 : Profils RFLP des virus de type 2 dans la région 3D^{pol}-3'NC

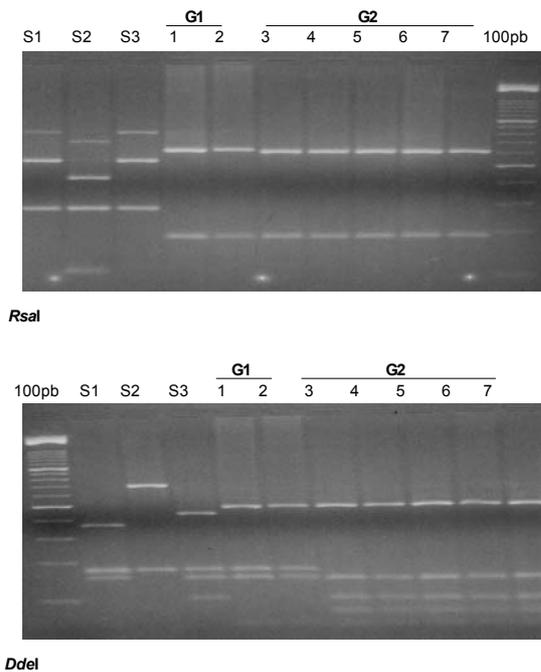


Tableau III : Sites spécifiques différenciant les souches sauvages des souches vaccinales de type 3 dans la région VP3-VP1

Différenciation intra-typique	Position des sites de restriction dans la région VP3-VP1 (972 pb)			
	<i>HinfI</i>	<i>DpnII</i>	<i>DdeI</i>	<i>RsaI</i>
Profil sauvage	27 ou 254 ou 376	482 ou 585	pas de sites spécifiques	365 ou 527
Profil vaccinal	452	90 ou 330	pas de sites spécifiques	170 ou 442 ou 692 ou 737

Les chiffres indiqués dans le tableau représentent les positions des sites de coupure dans le fragment de 972 pb.

Tableau IV : Carte de restriction enzymatique des souches de type 3 dans la région VP1-2A

Virus	RFLP VP1-2A				Profil RFLP
	<i>HinfI</i>	<i>DpnII</i>	<i>DdeI</i>	<i>RsaI</i>	
Sabin 3	354, 188, 101, 70, 45, 21	351, 219, 209	302, 195, 192, 90	213, 116, 112, 101, 79, 73, 40, 33, 21	vaccinal
PV3/Finlande	289, 214, 140, 70, 45, 21	209, 188, 152, 88, 75, 36, 31	653, 126	331, 137, 112, 85, 57, 52, 5	sauvage
Q, R, S, T, U, V, X	354, 289, 70, 45, 21	276, 219, 171, 75, 38	779	586, 85, 67, 59	sauvage
Y	354, 289, 70, 45, 21	276, 219, 171, 75, 38	779	653, 85, 59	sauvage
Z, α	354, 289, 70, 45, 21	276, 219, 171, 75, 38	653, 126	653, 85, 59	sauvage
β	354, 289, 70, 45, 21	276, 188, 171, 75, 38, 31	653, 126	653, 85, 59	sauvage
γ	354, 289, 70, 45, 21	276, 188, 171, 75, 38, 31	779	586, 85, 67, 59	sauvage
A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P	354, 188, 101, 70, 45, 21	351, 219, 209	302, 195, 192, 90	213, 116, 112, 101, 79, 73, 40, 33, 21	vaccinal

Les chiffres indiqués dans le tableau représentent les tailles, en pb, des fragments générés après digestion.

Tableau V : Sites spécifiques différenciant les souches sauvages des souches vaccinales de type 3 dans la région VP1-2A

Différenciation intra-typique	Position des sites de restriction dans la région VP3-1-2A (779pb)			
	<i>HinfI</i>	<i>DpnII</i>	<i>DdeI</i>	<i>RsaI</i>
Profil sauvage	pas de sites spécifiques	276 ou 522 ou 591	653 ou absence de site (fragment entier)	720 ou 653
Profil vaccinal	188	pas de sites spécifiques	192 ou 494 ou 584	73 ou 298 ou 410 ou 443 ou 544 ou 660 ou 700

Les chiffres indiqués dans le tableau représentent les positions des sites de coupure dans le fragment de 779 pb.

DISCUSSION

L'analyse RFLP des souches de PV3 isolées à Madagascar en 1997 dans les régions des capsides VP3-VP1 et VP1-2A a permis de différencier sans ambiguïté l'origine soit sauvage soit vaccinale des souches. Dans la région VP3-VP1, la comparaison des profils de restriction pour chaque enzyme a montré que seule l'enzyme *DdeI* ne donne aucune information sur l'origine vaccinale ou sauvage des souches. En revanche, les enzymes *DpnII*, *RsaI* et *HinfI* sont discriminatives et peuvent être utilisées comme critère de choix pour la différenciation intratypique. Dans la région VP1-2A, toutes les enzymes permettent indifféremment de faire la différenciation intratypique. Le groupage RFLP avec les 4 enzymes a montré que tous les virus d'origine vaccinale de type 3 identifiés ont des profils RFLP similaires ou identiques au profil du virus de référence Sabin 3 dans la région VP3-VP1, et un profil identique à Sabin 3 dans la région VP1-2A, suggérant que les sites de restriction spécifiques vaccinaux ont été très peu modifiés par des mutations. Les souches sauvages montrent des profils RFLP très proches les uns des autres. La

différence s'explique par la disparition ou l'apparition d'un ou plusieurs sites de restriction dans le génome. Les résultats RFLP ont été confirmés par le séquençage de la région VP1 entière (903 pb) de toutes les souches sauvages et de 13 souches vaccinales. Aucune dérive génétique n'a été observée parmi les souches vaccinales avec > 99% d'identité nucléotidique avec Sabin 3, suggérant que les virus excrétés par ces enfants majoritairement vaccinés s'étaient multipliés récemment dans le tractus intestinal de l'hôte. Les souches sauvages ont présenté 77% d'identité nucléotidique avec Sabin 3, et un seul génotype a été identifié avec une identité nucléotidique > 99% entre les souches. L'existence d'une seule lignée génétique suggère qu'une seule chaîne de transmission a entretenu la circulation de souches sauvages de type 3 pouvant être à l'origine du dernier cas de poliomyélite à Madagascar en 1997 [5]. Cependant, en l'absence d'autres échantillons ou isolats cliniques représentatifs d'autres régions, on ne peut exclure l'existence d'autres lignées génétiques.

La technique RT-PCR-RFLP a permis également de mettre en évidence dans les régions de la capsid, des virus dérivés de souches vaccinales (VDSV) de type 2 parmi des cas de PFA [6], que les techniques standards de différenciation intratypique ELISA et PCR n'ont pu détecter. Dans la région non capsidale 3D^{pol}-3'NC, cette technique s'est avérée également fiable pour l'identification des phénomènes de recombinaison génétique avec d'autres *Entérovirus*. Les résultats RFLP ont été confirmés par le séquençage partiel du génome codant les protéines VP1 et ARN polymérase. Une divergence nucléotidique de 1 à 2,5% dans la capsid VP1 comparée au virus vaccinal Sabin 2 indique qu'il s'agit de VDSV ayant probablement circulé pendant 1 à 2,5 ans d'après l'horloge moléculaire définie par Kew *et al.* [10]. Par ailleurs, la comparaison des séquences entre les groupes G1 et G2 a montré une divergence nucléotidique de 2,9%, suggérant l'existence de 2 lignées génétiques différentes. Le séquençage d'une partie de la région codant l'ARN polymérase a montré que la partie recombinante semble dérivée d'*Entérovirus* du groupe C incluant les *Poliovirus* et quelques sérotypes de *Coxsackievirus A*, comme cela a été rapporté pour d'autres virus [11-13]. La découverte de cas de VDSV a une implication majeure sur la décision d'arrêter le VPO après l'éradication de la poliomyélite, car elle doit tenir compte de la durée de circulation de ces virus. En effet, certains VDSV peuvent circuler sur une période allant jusqu'à plusieurs années [14,15] et les personnes infectées risquent d'entretenir un réservoir de poliovirus pathogènes, compromettant ainsi le processus d'éradication. Ainsi, afin de contrôler la circulation des

PV sauvages et des VDSV et atteindre l'objectif d'éradication en 2005, les stratégies suivantes sont primordiales : (i) améliorer la surveillance des cas de PFA et la maintenir pendant au moins 3 années successives aux niveaux requis pour la certification de l'éradication (≥ 1 cas de PFA non polio déclaré pour 100 000 enfants de ≤ 15 ans et $\geq 80\%$ des 2 échantillons de selles par cas récoltés dans ≤ 14 après le début de la paralysie) ; (ii) développer un outil moléculaire rapide et fiable pour le dépistage des VDSV ; et (iii) augmenter et maintenir un taux de couverture vaccinale de routine élevé par le VPO, car l'existence de populations non immunisées est le principal facteur favorisant la circulation des poliovirus et des VDSV. Par ailleurs, les caractéristiques de ces VDSV suggèrent que les remaniements génétiques entre PV et autres *Entérovirus* pourraient jouer un rôle primordial dans l'évolution des *Entérovirus* d'un même groupe et dans l'acquisition d'un phénotype viral nouveau.

Cette étude a permis d'évaluer la capacité de la technique RT-PCR-RFLP à différencier l'origine sauvage ou vaccinale des poliovirus type 3 isolés à Madagascar. Elle est disponible dans la pratique courante et peut être appliquée à d'autres souches isolées dans le cadre de la surveillance. C'est ainsi que le laboratoire a pu diagnostiquer rapidement des cas de VDSV recombinants en 2002, conduisant le Ministère de la Santé à organiser en urgence des Journées Nationales de Vaccination contre les PV.

REFERENCES

- 1- **Blondel B, Couderc T, Pavio N, Colbère-Garapin F.** Biologie moléculaire du poliovirus. *Ann Inst Pasteur* 1995; **6** : 86-99.
- 2- **Melnick JL.** Enteroviruses : Polioviruses Coxsackieviruses Echoviruses and Newer Enteroviruses. In : Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Channock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B, Straus SE. *Fields Virology*, 3rd ed. Philadelphia : Lippincott-Raven Publishers, 1996 : 655-712.
- 3- **Delpeyroux F, Crainic R.** L'éradication de la poliomyélite : un défi à l'aube du XXI^e siècle. *Virologie* 1998; **2** : 30-41.
- 4- **Centers for Disease Control and Prevention.** Progress toward global eradication of poliomyelitis, 2002. *MMWR* 2003; **52** : 366-369.
- 5- **World Health Organization.** Vaccines, immunization, and biologicals. <http://www.who.int/vaccines/cascount/afpextractnew.cfm>. September 13, 2003.
- 6- **Rousset D, Rakoto-Andrianarivelo M, Razafindratsimandresy R, Randriamanalina B, Guillot S, Balanant J, Maclère P, Delpeyroux F.** Recombinant vaccine-derived Poliovirus in Madagascar. *Emerg Infect Dis* 2003; **9** : 885-887.
- 7- **van der Avoort HGA, Hull BP, Hovi T, Pallansch MA, Kew OM, Crainic R, Wood DJ, Mulders MN, van Loon AM.** Comparative study of five methods for intratypic

- differentiation of poliovirus. *J Clin Microbiol* 1995; **33** : 2562-2566.
- 8- Guillot S, Caro V, Cuervo N, Korotkova E, Combiescu M, Persu A, Aubert-Combiescu A, Delpeyroux F, Crainic R. Natural genetic exchange between vaccine and wild poliovirus strains in humans. *J Virol* 2000; **74** : 8434-8443.
 - 9- Cuervo NS, Guillot S, Romanenkova N, Combiescu M, Aubert-Combiescu A, Seghier M, Caro V, Crainic R, Delpeyroux F. Genomic features of intertypic recombinant sabin poliovirus strains excreted by primary vaccines. *J Virol* 2001; **75** : 5740-5751.
 - 10- Kew OM, Mulders MN, Lipskaya GY, da Silva EE, Pallansch MA. Molecular epidemiology of polioviruses. *Semin Virol* 1995; **6** : 401-414.
 - 11- Yang, CF, Naguib T, Yang SJ, Nasr E, Jorba J, Ahmed N, Campagnoli R, Van der Avoort H, Shimizu H, Yoneyama T, Miyamura T, Pallansch M, Kew O. Circulation of endemic type 2 vaccine-derived poliovirus in Egypt from 1983 to 1993. *J Virol* 2003; **77** : 8366-8377.
 - 12- Kew O, Morris-Glasgow V, Landaverde M, Burns C, Shaw J, Garib Z, Andre J, Blackman E, Freeman CJ, Jorba J, Sutter R, Tambini G, Venczel L, Pedreira C, Laender F, Shimizu H, Yoneyama T, Miyamura T, Van der Avoort H, Oberste MS, Kilpatrick D, Cochi S, Pallansch M, de Quadros C. Outbreak of poliomyelitis in Hispaniola associated with circulating type 1 vaccine-derived poliovirus. *Science* 2002; **296** : 356-359.
 - 13- Centers for Disease Control and Prevention. Acute Flaccid Paralysis Associated with Circulating Vaccine-Derived Poliovirus - Philippines, 2001. *MMWR* 2001; **50** : 874-5.
 - 14- Bellmunt A, May G, Zell R, Pring-Akerblom P, Verhagen W, Heim A. Evolution of poliovirus during 5,5 years of prolonged enteral replication in an immunodeficient patient. *Virology* 1999; **265** : 178-184.
 - 15- Shulman LM, Manor Y, Handscher R, Delpeyroux F, McDonough M J, Halmut T, Silberstein I, Alfandari J, Quay J, Fisher T, Robinov J, Kew OM, Crainic R, Mendelson E. Molecular and antigenic characterization of a highly evolved derivative of the type 2 poliovaccine strain isolated from sewage in Israël. *J Clin Microbiol* 2000; **38** : 3729-3734.
-