



**HAL**  
open science

# Mise au point d'un système de PCR en temps réel "pan-poxvirus"

Léa Luciani

► **To cite this version:**

Léa Luciani. Mise au point d'un système de PCR en temps réel "pan-poxvirus". Sciences pharmaceutiques. 2019. dumas-02154795

**HAL Id: dumas-02154795**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02154795>**

Submitted on 13 Jun 2019

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

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

MEMOIRE DU DIPLÔME D'ETUDES SPECIALISEES  
DE BIOLOGIE MEDICALE

Soutenu le 29 Mai 2019

Par **Léa LUCIANI**  
Née le 14 Avril 1991

Conformément aux dispositions du décret n°2003-76 du 23 janvier 2003, tenant lieu de

THESE

POUR LE DIPLÔME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

----oOo----

**TITRE :**

**Mise au point d'un système de PCR en temps réel "pan-poxvirus"**

----oOo----

**JURY :**

Président : Pr. Philippe COLSON - PU-PH (AP-HM)

Membres : Pr. Xavier DE LAMBALLERIE (directeur de thèse) – PU-PH (AP-HM)  
Dr. Stéphane PRIET (UMR 190)  
Dr. Antoine NOUGAIREDE (AP-HM)



MEMOIRE DU DIPLÔME D'ETUDES SPECIALISEES  
DE BIOLOGIE MEDICALE

Soutenu le 29 Mai 2019

Par **Léa LUCIANI**  
Née le 14 Avril 1991

Conformément aux dispositions du décret n°2003-76 du 23 janvier 2003, tenant lieu de

THESE

POUR LE DIPLÔME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

----oOo----

**TITRE :**

**Mise au point d'un système de PCR en temps réel "pan-poxvirus"**

----oOo----

**JURY :**

Président : Pr. Philippe COLSON - PU-PH (AP-HM)

Membres : Pr. Xavier DE LAMBALLERIE (directeur de thèse) – PU-PH (AP-HM)  
Dr. Stéphane PRIET (UMR 190)  
Dr. Antoine NOUGAIREDE (AP-HM)

27 Boulevard Jean Moulin – 13385 MARSEILLE Cedex 05  
Tel. : 04 91 83 55 00 – Fax : 04 91 80 26 12

#### **ADMINISTRATION :**

<i>Doyen :</i>	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
<i>Vice-Doyens :</i>	M. Jean-Paul BORG, M. François DEVRED, M. Pascal RATHELOT
<i>Chargés de Mission :</i>	Mme Pascale BARBIER, M. David BERGE-LEFRANC, Mme Manon CARRE, Mme Caroline DUCROS, Mme Frédérique GRIMALDI
<i>Conseiller du Doyen :</i>	M. Patrice VANELLE
<i>Doyens honoraires :</i>	M. Jacques REYNAUD, M. Pierre TIMON-DAVID, M. Patrice VANELLE
<i>Professeurs émérites :</i>	M. José SAMPOL, M. Athanassios ILIADIS, M. Jean-Pierre REYNIER, M. Henri PORTUGAL
<i>Professeurs honoraires :</i>	M. Guy BALANSARD, M. Yves BARRA, Mme Claudette BRIAND, M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Aimé CREVAT, M. Bernard CRISTAU, M. Gérard DUMENIL, M. Alain DURAND, Mme Danielle GARÇON, M. Maurice JALFRE, M. Joseph JOACHIM, M. Maurice LANZA, M. José MALDONADO, M. Patrick REGLI, M. Jean-Claude SARI
<i>Chef des Services Administratifs :</i>	Mme Florence GAUREL
<i>Chef de Cabinet :</i>	Mme Aurélie BELENGUER
<i>Responsable de la Scolarité :</i>	Mme Nathalie BESNARD

#### **DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE**

Responsable : Professeur Philippe PICCERELLE

#### **PROFESSEURS**

BIOPHYSIQUE

M. Vincent PEYROT  
M. Hervé KOVACIC

GENIE GENETIQUE ET BIOINGENIERIE

M. Christophe DUBOIS

PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE,  
BIOPHARMACIE ET COSMETIQUE

M. Philippe PICCERELLE

## MAITRES DE CONFERENCES

BIOPHYSIQUE

M. Robert GILLI  
Mme Odile RIMET-GASPARINI  
Mme Pascale BARBIER  
M. François DEVRED  
Mme Manon CARRE  
M. Gilles BREUZARD  
Mme Alessandra PAGANO

GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE

M. Eric SEREE-PACHA  
Mme Véronique REY-BOURGAREL

PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE,  
BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE

M. Pascal PRINDERRE  
M. Emmanuel CAUTURE  
Mme Véronique ANDRIEU  
Mme Marie-Pierre SAVELLI

NUTRITION ET DIETETIQUE

M. Léopold TCHIAKPE

## A.H.U.

THERAPIE CELLULAIRE

M. Jérémy MAGALON

## ENSEIGNANTS CONTRACTUELS

ANGLAIS

Mme Angélique GOODWIN

## DEPARTEMENT BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe CHARPIOT

## PROFESSEURS

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE

M. Philippe CHARPIOT

BIOLOGIE CELLULAIRE

M. Jean-Paul BORG

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Françoise DIGNAT-GEORGE  
Mme Laurence CAMOIN-JAU  
Mme Florence SABATIER-MALATERRE  
Mme Nathalie BARDIN

MICROBIOLOGIE

M. Jean-Marc ROLAIN  
M. Philippe COLSON

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET  
ZOOLOGIE

Mme Nadine AZAS-KREDER

## MAITRES DE CONFERENCES

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	Mme Dominique JOURDHEUIL-RAHMANI M. Thierry AUGIER M. Edouard LAMY Mme Alexandrine BERTAUD Mme Claire CERINI Mme Edwige TELLIER M. Stéphane POITEVIN
HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Aurélie LEROYER M. Romaric LACROIX Mme Sylvie COINTE
MICROBIOLOGIE	Mme Michèle LAGET M. Michel DE MEO Mme Anne DAVIN-REGLI Mme Véronique ROUX M. Fadi BITTAR Mme Isabelle PAGNIER Mme Sophie EDOUARD M. Seydina Mouhamadou DIENE
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE	Mme Carole DI GIORGIO M. Aurélien DUMETRE Mme Magali CASANOVA Mme Anita COHEN
BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne-Catherine LOUHMEAU

## A.H.U.

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	M. Maxime LOYENS
----------------------------	------------------

## DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Patrice VANELLE

## PROFESSEURS

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine BADENS
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Philippe GALLICE
CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE – CHIMIE THERAPEUTIQUE	M. Pascal RATHELOT M. Maxime CROZET
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE	M. Patrice VANELLE M. Thierry TERME
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE	Mme Evelyne OLLIVIER

**MAITRES DE CONFERENCES**

BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE, BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne FAVEL Mme Joëlle MOULIN-TRAFFORT
CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine DEFOORT M. Alain NICOLAY Mme Estelle WOLFF Mme Elise LOMBARD Mme Camille DESGROUAS
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. David BERGE-LEFRANC M. Pierre REBOUILLON
CHIMIE THERAPEUTIQUE	Mme Sandrine FRANCO-ALIBERT Mme Caroline DUCROS M. Marc MONTANA Mme Manon ROCHE
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE HYDROLOGIE	M. Armand GELLIS M. Christophe CURTI Mme Julie BROGGI M. Nicolas PRIMAS M. Cédric SPITZ M. Sébastien REDON
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE	M. Riad ELIAS Mme Valérie MAHIOU-LEDDET Mme Sok Siya BUN Mme Béatrice BAGHDIKIAN

**MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)**

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Anne-Marie PENET-LOREC
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Cyril PUJOL
DROIT ET ECONOMIE DE LA PHARMACIE	M. Marc LAMBERT
GESTION PHARMACEUTIQUE, PHARMACOECONOMIE ET ETHIQUE PHARMACEUTIQUE OFFICINALE, DROIT ET COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE ET GESTION DE LA PHARMAFAC	Mme Félicia FERRERA

**A.H.U.**

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	M. Mathieu CERINO
--	-------------------

**ATER**

CHIMIE ANALYTIQUE	M. Charles DESMARCHELIER
CHIMIE THERAPEUTIQUE	Mme Fanny MATHIAS



**DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE**

Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

**PROFESSEURS**

PHARMACIE CLINIQUE	Mme Diane BRAGUER M. Stéphane HONORÉ
PHARMACODYNAMIE	M. Benjamin GUILLET
TOXICOLOGIE GENERALE	M. Bruno LACARELLE
TOXICOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT	Mme Frédérique GRIMALDI

**MAITRES DE CONFERENCES**

PHARMACODYNAMIE	M. Guillaume HACHE Mme Ahlem BOUHLEL M. Philippe GARRIGUE
PHYSIOLOGIE	Mme Sylviane LORTET Mme Emmanuelle MANOS-SAMPOL
TOXICOCINETIQUE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Joseph CICCOLINI Mme Raphaëlle FANCIULLINO Mme Florence GATTACECCA
TOXICOLOGIE GENERALE ET PHARMACIE CLINIQUE	M. Pierre-Henri VILLARD Mme Caroline SOLAS-CHESNEAU Mme Marie-Anne ESTEVE

**A.H.U.**

PHARMACIE CLINIQUE	M. Florian CORREARD
PHARMACOCINETIQUE	Mme Nadège NEANT

## CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE

Mme Valérie AMIRAT-COMBRALIER, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Marie-Hélène BERTOCCHIO, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Nicolas COSTE, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Sylvain GONNET, Pharmacien titulaire

Mme Florence LEANDRO, Pharmacien adjoint

M. Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire

M. Patrick REGGIO, Pharmacien conseil, DRSM de l'Assurance Maladie

Mme Clémence TABELLE, Pharmacien-Praticien attaché

Mme TONNEAU-PFUG, Pharmacien adjoint

M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien – Praticien hospitalier

M. Joël VELLOZZI, Expert-Comptable

Mise à jour le 22 février 2018

# REMERCIEMENTS

**A Monsieur le Professeur Philippe COLSON,**

Merci de me faire l'honneur de présider le jury de cette thèse. Merci pour votre capacité d'enseignement à tout instant. Soyez assuré de mon profond respect.

**A Monsieur le Professeur Xavier DE LAMBALLERIE,**

Merci de me faire l'honneur de diriger cette thèse. Merci pour votre humanité et votre implication dans ce travail. Soyez certain de toute mon admiration.

**A Monsieur le Docteur Stéphane PRIET,**

Merci de me faire l'honneur de participer au jury de cette thèse. Homme de terrain et divinité de la biologie moléculaire merci mille fois pour ta patience, ta bienveillance, ton esprit d'aventures scientifiques et le partage de tes connaissances.

**A Monsieur le Docteur Antoine NOUGAIREDE,**

Merci de me faire l'honneur de participer au jury de cette thèse, il manquait de flegme. Merci pour ta disponibilité, pour tes conseils théorico-pratiques dans la vie scientifique et dans celle de tous les jours. Merci pour ta sérénité et ton pouvoir de dédramatisation.

### **A ma maman**

Je te remercie pour ton soutien sans faille durant toutes ses années, pour avoir toujours cru en moi et m'avoir poussée jusque-là. Je t'aime.

### **A ma sœur**

Merci pour être ce que tu es, quelque part entre ce monde et un autre. J'espère que tu continueras à cultiver ma tolérance et mon éducation cinématographique encore longtemps. Je t'aime aussi.

### **A mon père**

Merci pour l'enfance heureuse que tu m'as donnée.

### **A Papi et Mamie de Crottet :**

Merci pour vous êtes toujours intéressés à moi et mes projets. Merci pour toutes ces noëls au coin du feu et ces longues discussions en bordure de Saône.

### **A Papi et Mamie de Fanny :**

Merci pour les souvenirs d'enfance que vous m'avez fabriqués grâce à votre dévouement et votre grande ingéniosité.

### **A Tatie :**

Merci pour m'avoir mis le pied à l'étrier dans bien des domaines.

### **A Denis et Chloé :**

Même si chacun poursuit sa route de plus en plus loin, les souvenirs restent.

### **A la Fonkyfamily**

Joyeuse bande du lycée, petit miracle de bonne entente, merci d'être un repère pour chaque grande étape.

### **Aux filles de la fac**

Merci à toutes et à vos pièces rapportées pour cette superbe collection de fous rires. Beaucoup d'obligations et de sacrifices durant ces études mais ce n'est pas grave car c'était avec vous.

### **A Caroline GERVAISE**

Toi-même tu sais pourquoi. J'espère qu'on galopera encore vers de belles aventures.

### **A Maude, Clémence et Estelle**

Merci les filles pour la petite famille de substitution qu'on s'est créée en arrivant dans le grand bain.

### **A Estelle**

Merci d'être mon binôme depuis le labo 101 jusqu'à Malmousque (peut-être un jour en Bretagne qui sait...), d'être mon aide sociable/sociale et de toujours voir le verre plein. J'espère qu'on continuera à se faire avancer encore longtemps.

### **Au groupe Internat\***

Merci au petit groupe d'internes qui s'est échoué à l'internat il y a plus de 4 ans. Merci à tous et à ceux qui sont venus agrandir le groupe petit à petit pour ces années hautes en couleurs, en piscine, en calanques, en découvertes et soirées mémorables ! J'espère qu'on gardera contact autrement que par signatures de bilans interposées.

### **Aux meilleurs qui sont restés sur Marseille\***

Grace à vous, j'ai appris qu'on pouvait dépenser sa première paye en Pastis, qu'on pouvait réanimer des gens et continuer à s'émerveiller de tout, qu'on peut être persuadé d'avoir la peste et y survivre, qu'on peut louper un bateau et rester amis... Parce que tomette s'accorde avec raclette, parce qu'on peut parler de tout et de tout (sauf du nénuphar) merci à vous tous !

### **A l'AIPM\***

Merci à toutes les générations d'internes engagés qui m'ont transmis leur passion pour cette belle aventure associative.

### **A la team M2**

Véritable kit de survie, merci pour nos interminables soirées décompensation. Comme quoi on peut cultiver autre chose que des bactéries anaérobies dans cet IHU !

### **A la pétillante équipe de virologie routine\***

Merci pour votre enseignement, votre humanité et votre solidarité. Merci pour votre patience et votre générosité dans ma formation. Il faudrait définitivement plus d'équipes comme celle-ci dans le monde hospitalier !

### **Aux personnes de l'UMR 190\***

Véritable bulle d'air ! Merci à tous ceux qui font de cette unité un environnement de travail sain et bienveillant. Merci à tous les membres de l'unité pour leur accueil, leur aide au quotidien et leur humour inébranlable. PS : Francky il n'y a plus rien entre cette méduse bière et moi maintenant !

### **A Alexandra Asanovna Elbakyan**

Merci d'avoir fondé Sci-Hub.

### **A Freddie Mercury, Brian May, Roger Taylor et John Deacon**

Merci pour votre talent et votre génie.

**Je remercie toutes les personnes que je côtoie quotidiennement à l'hôpital : les parasitologues et bactériologues, les co-internes, les techniciens, les chefs et professeurs... Toutes ces personnes qui aiment leur profession et concourent à une ambiance de travail en bonne intelligence. Toutes ces personnes qui transmettent leur bonne humeur et aident sans concession\*. Merci d'avoir croisé ma route.**

\*Jean-Sélim merci pour ton omniprésence bénéfique dans mon quotidien

## **A Jérémy**

Merci de m'aimer en plus de me supporter tous les jours. Merci de nous avoir donné les moyens d'arriver à ce que nous sommes aujourd'hui. Je t'aime.

*" L'Université n'entend donner aucune approbation, ni improbation aux opinions émises dans les thèses. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs. "*



## Liste et signification des sigles et abréviations usuelles utilisées dans ce travail

OMS : organisation mondiale de la santé

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

PCR : polymerase chain reaction

RT-PCR : reverse transcriptase polymerase chain reaction

qPCR : PCR en temps réel

APHM : assistance publique - hôpitaux de Marseille

IHU : institut hospitalo-universitaire (méditerranée infection)

UVE : Unité des virus émergents (UMR 190)

ICTV: International Committee on Taxonomy of Viruses

(k)bp : (kilo) base paired : (kilo) paires de bases

ITRs : inverted terminal repeats : séquences inverses terminales répétées

SIDA : syndrome de l'immunodéficience acquis

CDC : Centre pour le contrôle et la prévention des maladies (agence Américaine)

Ct: Cycle threshold – Cycle seuil

Tm: Melting temperature – température de fusion

LOD : limit of detection - limite de détection

NGS : next generation sequencing – Séquençage de nouvelle génération

ACEV : Anomala cuprea entomopoxvirus

AMEV : Amsca moorei entomopoxvirus

CBEV : Choristoneura bienis entomopoxvirus

CREV : Choristoneura rosaceana entomopoxvirus

AHEV : Adoxophyes honmai entomopoxvirus

MSEV : Melanopus sanguinipes entomopoxvirus

BPSV : Bovin papular stomatitis

YMTV : Yaba monkey tumor virus

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION ET HISTORIQUE .....</b>	<b>3</b>
La variole : un poxvirus fléau de l'humanité .....	3
Les poxvirus à la base d'une avancée majeure : la vaccination .....	4
Comment la vaccine remporta la partie .....	6
<b>MISE EN CONTEXTE ET BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>8</b>
<b>L'état actuel des connaissances sur les poxvirus .....</b>	<b>8</b>
Généralités .....	8
Espèces recensées et "réservoirs" .....	10
Les <i>Chordopoxvirinae</i> .....	10
Les <i>Entomopoxvirinae</i> .....	11
Les nouvelles espèces .....	14
La notion de réservoir .....	14
<b>Risques et enjeux depuis l'arrêt de la vaccination antivariolique .....</b>	<b>16</b>
La question du bioterrorisme .....	16
Les cas et épidémies .....	18
Chez l'animal .....	18
Chez l'homme .....	18
Cas du <i>Buffalopox virus</i> et du <i>Camelpox virus</i> .....	19
Le cas du <i>Monkeypox virus</i> .....	20
<b>Méthodes diagnostiques des Poxvirus .....</b>	<b>22</b>
Diagnostic clinique .....	22
Diagnostic biologique .....	22
<b>Rappels généraux sur la technique de PCR .....</b>	<b>24</b>
<b>Intérêts et challenge de développer un système de PCR "panpox" .....</b>	<b>26</b>

<b>MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>29</b>
Amorces et sondes .....	29
Echantillons d'ADN utilisés.....	29
Extraction d'ADN.....	30
Protocoles de PCR .....	30
Séquençage nouvelle génération .....	31
Clonage et séquençage Sanger .....	31
 <b>RESULTATS .....</b>	 <b>33</b>
Choix du gène cible .....	33
.....	35
Spécificité <i>in silico</i> .....	37
<b>Système SybrGreen® .....</b>	<b>37</b>
Sensibilité et performance du système.....	37
Répétabilité et reproductibilité (SybrGreen®) .....	41
Comparaison aux systèmes utilisés en routine (SybrGreen®).....	41
Spécificité et règles de positivité (SybrGreen®) .....	41
<b>Analyse Génétique .....</b>	<b>44</b>
<b>Système TaqMan® .....</b>	<b>48</b>
Sensibilité, reproductibilité, performances et comparaison à la routine .....	48
Spécificité .....	49
 <b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....</b>	 <b>51</b>
 <b>CONCLUSION .....</b>	 <b>54</b>
 <b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	 <b>56</b>
 <i>SERMENT DE GALIEN</i> .....	 <b>66</b>

# INTRODUCTION ET HISTORIQUE

## La variole : un poxvirus fléau de l'humanité

"Pox" est le pluriel de "pock" en anglais qui signifie "pustule". Les *poxviridae* sont une importante famille de virus à ADN capables d'infecter des hôtes très divers parmi les vertébrés (*chordopoxvirinae*) ou les insectes (*entomopoxvirinae*). Les poxvirus ont une importante valeur historique, en effet la variole est un poxvirus spécifique de l'Homme. Sa haute contagiosité interhumaine par voie respiratoire et par contact, son taux de létalité de l'ordre de 30% ainsi que les importants handicaps séquellaires en font un des principaux fléaux de l'humanité. La date de l'apparition de la variole dans l'humanité fait encore débat. Selon la méthode bayésienne et l'horloge moléculaire de virus, la variole est "assez jeune", différenciée il y a 4 000 ans environ.<sup>1</sup> Cependant les historiens rapportent des premiers indices d'apparition de cette pathologie entre 10 000 et 5 000 avant JC au Nord-Est de l'Afrique.<sup>2</sup> La variole, "le plus terrible de tous les ministres de la mort"<sup>3</sup> est retrouvée dans toutes les grandes étapes de l'humanité. Des traces de variole furent retrouvées sur la momie de Ramsès V (1157 avant JC)<sup>4</sup> et la "peste antonine" épidémie qui supprima 30% de la population du monde Gréco-romain était probablement due à la variole.<sup>5,6</sup> Hugues Capet compte parmi ses nombreuses victimes. En l'an mille, grâce aux guerres ou au commerce, la variole est établie sur le pourtour méditerranéen ainsi que dans les régions peuplées d'Asie. Les croisades termineront de disséminer le virus dans les régions encore épargnées.<sup>7</sup> L'introduction de la variole dans les populations isolées fût hautement meurtrière et explosive. L'Islande en 1241 perdit plus d'un tiers de sa population. Enfin, même si la part véritable et l'identification formelle des pathogènes en causes restent difficiles, il est indéniable que la variole joua un rôle clef dans la tragédie de la colonisation des Amériques. La population mexicaine passa de 18 millions avant l'arrivée des conquistadors à 1 million en 1600.<sup>8-10</sup> Au XVIII<sup>ème</sup> siècle, la variole était responsable de 400 000 décès annuels en Europe (dont Louis XV en 1774) et un tiers des survivants était aveugle.<sup>7</sup> La variole est actuellement le seul agent pathogène humain totalement éradiqué par l'homme d'où son étiquette "historique" mais le virus a sévi jusqu'au XX<sup>ème</sup> siècle : Joseph Staline survécut à la variole enfant et fit retoucher ses portraits politiques pour atténuer les séquelles. Le dernier cas eut lieu en 1977 mais plus de 100 millions de cas de variole ont été dénombrés pour le seul XX<sup>ème</sup> siècle.

## Les poxvirus à la base d'une avancée majeure : la vaccination

Au début des années 1700, les balbutiements du principe d'immunisation se généralisent à partir de la variolisation. Ce procédé issu de la médecine ayurvédique consistait à inoculer volontairement le contenu de la substance suppurant des vésicules d'un sujet faiblement malade à la personne qu'on voulait immuniser.<sup>11,12</sup> Les résultats de cette technique étant hautement aléatoires, la variolisation a été totalement supplantée par la découverte de la vaccination.

Le *Cowpox virus* est un poxvirus capable d'infecter les bovins, les équins, les chats, les rongeurs et l'homme. Son pouvoir pathogène est faible comparé à celui de la variole tant pour les hommes que pour les animaux. La transmission à l'homme donne des pustules varioliformes généralement localisées sur les mains ou les bras. La notion d'immunisation contre la variole par les pustules de vaches atteintes du cowpox est une notion très ancienne rapportée dans des écrits sanskrits. Au XVIIIème siècle, le naturaliste Alexander von Humboldt prouve que les habitants de la Cordillère des Andes connaissaient ce procédé depuis de nombreuses années. En parallèle, dans les années 1770, dans le comté de Gloucester en Angleterre, régnait une croyance populaire selon laquelle "les personnes qui, en trayant les vaches, avaient gagné les pustules du cowpox, étaient à l'abri de la petite vérole".<sup>13</sup> Plusieurs personnes en Europe commencent indépendamment à montrer que le cowpox a un effet immunisant contre la variole (via la consommation de lait issu de vaches contaminées notamment). L'agriculteur Benjamin Jetsy en 1774 a réussi, grâce au cowpox, à introduire une immunité chez sa femme et ses enfants au cours d'une épidémie de variole.<sup>14,15</sup> L'histoire retiendra cependant le médecin anglais Edward Jenner comme père de la vaccination.<sup>11</sup> A partir de 1788, Jenner mènera avec la rigueur scientifique requise ses premiers travaux<sup>16</sup> sur la vaccination et publia ses rapports sur 40 sujets. Le cas le plus connu est celui de James Phipps, un enfant de 8 ans à qui il inocula le pus des vésicules de la trayeuse Sarah Nelmes à l'aide d'un bout de bois. Cette inoculation chez le garçon provoqua fièvre et malaise général mais pas de pathologie grave. Jenner soumit Phipps à la variolisation par deux fois et le garçon ne manifesta aucun signe d'infection.<sup>17</sup>



**Photo 1:** Edward Jenner et ses premiers essais de vaccination fin du XVIIIème siècle

Le terme vaccination sera officialisé au début du XIXème siècle. Étymologiquement "vaccination" provient de "vacca", la "vache" en latin médiévale. La "vaccine" n'est pas un virus naturel, les souches vaccinales "modernes" comme Vaccinia Ankara dérivent de souches sauvages cultivées et atténuées dans les laboratoires producteurs de vaccins.<sup>18,19</sup> L'origine exacte de la vaccine pourrait à elle seule faire l'objet d'un sujet de thèse. L'hypothèse la plus probable est que la vaccine découle de multiples cultures de cowpox qui auraient pu être contaminées par la variole. Cependant, en 2017 une étude a retrouvé 99.7% d'identité génétique entre la vaccine contenue dans une dose de vaccin commercialisée en 1905 et l'*Horsepox virus*<sup>20</sup>. L'horsepox était un poxvirus proche du cowpox, capable d'infecter les bovins et équidés. Sa présentation clinique est similaire si bien que durant le XIXème siècle la vaccination antivariolique se faisait probablement en utilisant des souches dérivées soit du cowpox soit de l'horsepox.<sup>13,20</sup> Faudrait-il rendre sa place d'honneur à l'horsepox et renommer le procédé "équination" ?

## Comment la vaccine remporta la partie

A partir des premiers travaux de Jenner, il faudra environ un siècle pour que le procédé de vaccination se généralise et soit rendu obligatoire en Europe. Le gouvernement britannique interdira la variolisation en 1840 (17 ans après la mort de Jenner). La vaccination rencontre quelques problèmes techniques lors de sa transposition à la population générale. La vache contaminée reste la source principale de vaccine et doit donc être "emportée" dans les campagnes de vaccination. Loin de toute notion d'asepsie à l'époque, des essais sont fait par vaccination interhumaine " bras à bras" avec les sujets nouvellement infectés (facilité de déplacement par rapport à la vache).<sup>21</sup> Cette technique "d'échange de sang" n'est pas du goût de toutes les classes sociales et malheureusement favorise la transmission d'autres maladies comme la "terrifiante" syphilis. En 1899 la découverte du maintien de l'activité du virus conservé dans la glycérine permettant la vaccination en série à distance de l'animal marqua définitivement le début de l'éradication de la variole. Le 15 Février 1902 la France rend obligatoire la vaccination antivariolique chez tous les nourrissons.<sup>22</sup>



**Photo 2:** Deux garçons exposés à la même source de variole, l'un a été vacciné, l'autre non...

1904 Dr. Allan Warner, Resident Medical Officer to the Isolation Hospital in Leicester

Encore considérée comme endémique en France jusqu'à la fin de la première guerre mondiale, les campagnes de vaccinations systématiques réussirent en quelques décennies à éradiquer le fléau en Europe. La dernière épidémie en France date de 1955 ; elle fit 16 morts dans la commune de Vannes (Morbihan) due à des soies contaminées rapportées de Saïgon par un militaire.<sup>21</sup> Cependant les campagnes de vaccination massives ne sont pas adaptées aux pays du tiers monde si bien qu'en 1958, la variole fait encore 2 millions de victimes par an dans le monde.<sup>23</sup> En 1966, l'OMS annonce un programme d'éradication globale de la variole basé sur la stratégie d'endiguement : isoler les cas et vacciner toutes les personnes à proximité de foyers d'épidémie. Malgré des difficultés culturelles (il existe une divinité de la variole en Inde) et politiques (guerre civile au Soudan, conflits armés, migrations dans la corne de l'Afrique etc...) le projet fut un franc succès. Le dernier cas naturel de variole eut lieu en Somalie en 1977. En 1978, une micro épidémie se déclara à Birmingham au sein d'un bâtiment où un laboratoire de recherche travaillait avec des animaux infectés. La dernière victime connue de la variole est donc une anglaise, Janet Parker, photographe de l'École de Médecine de Birmingham, contaminée par une souche de laboratoire. Le 8 Mai 1980, l'OMS annonce officiellement l'éradication de la variole. Depuis 1984 la vaccination et les rappels antivarioliques ne sont plus obligatoires en France et dans le monde. Actuellement les dernières souches officielles de variole sont détenues dans deux laboratoires de confinement renforcé agréés par l'OMS (Atlanta – Etats Unis et Koltsovo – Russie).



# MISE EN CONTEXTE ET BIBLIOGRAPHIE

## L'état actuel des connaissances sur les poxvirus

### GENERALITES

Selon les espèces, les particules virales de poxvirus ont une forme soit ovoïde, soit dite "de brique". Elles mesurent de 220 à 450 nm de long et ont une largeur de 140 à 260 nm.<sup>24</sup> La microscopie électronique montre une membrane entourant une structure centrale, le "core" cylindrique ou biconcave. Ce core contient le matériel génétique : le génome et les protéines organisés en "complexe nucléoprotéique". Les acides nucléiques ne représentent que 3% du poids total du virus. Le génome se présente sous la forme d'une unique molécule d'ADN double brin linéaire allant de 130 à 375 kpb et contenant plus de 200 gènes. Les parties terminales du génome sont constituées par des séquences en configuration d'épingle à cheveux. Elles sont imparfaitement appariées et contiennent dans la majorité des cas des séquences répétées. Ce sont les ITRs (inverted terminal repeats) qui peuvent représenter de 0.1 à 12.4 kpb selon les espèces.

Les poxvirus sont très résistants dans le milieu extérieur. Ils peuvent rester infectieux après plus de 160 jours dans une eau à 4.5°C.<sup>25</sup> Le processus d'infection et de réplication a été préférentiellement étudié pour les cellules de mammifères. Les virions infectent les cellules hôtes après attachement à la surface cellulaire (interactions électrostatiques). La fusion des membranes virales et des membranes cellulaires est orchestrée par un complexe de sous unités virales contenant au moins 12 protéines conservées. Le core viral est alors injecté dans la cellule hôte. Les poxvirus se répliquent dans le cytoplasme de leur cellule hôte. Les ARN messagers sont synthétisés dans le core viral à partir de l'ADN double brin par une ARN polymérase virale. Ils sont ensuite extrudés du core pour la traduction par les ribosomes de l'hôte.<sup>26</sup> Au cours de la synthèse des protéines précoces, la synthèse macromoléculaire de l'hôte est inhibée. La reproduction du virus s'ensuit dans le cytoplasme de la cellule hôte, produisant des inclusions basophiles appelées "viroplasmes" ou "usines à virus". Ces inclusions sont visibles en anatomo-pathologie et participent au diagnostic des poxviroses.<sup>27</sup>

Les gènes précoces codent pour des enzymes impliquées dans la réplication du génome et dans la neutralisation de la réponse immunitaire de l'hôte.<sup>28</sup> Certaines protéines agissent comme des antagonistes des cytokines. Leur mode d'action précis (antagonistes direct, antagoniste par homologie...) dépend de l'espèce de pox et de son historique de coévolution avec son hôte.<sup>29</sup> Les gènes intermédiaires codant pour des facteurs de transcription tardifs sont exprimés pendant la période de réplication de l'ADN et sont nécessaires pour la transcription ultérieure des gènes. Enfin, les gènes tardifs sont exprimés au cours de la phase post-réplivative (ceux-ci codent principalement pour des protéines structurales de virion mais également des facteurs de transcription précoce).<sup>30</sup>



**Photo 3:** Virus de la variole en  
microscopie électronique

## ESPECES RECENSEES ET "RESERVOIRS"

Selon le 9<sup>ème</sup> rapport de l'ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) sortie initialement en 2009 et mis à jour en 2018, la famille des *Poxviridae* compte deux sous-familles : les *Chordopoxvirinae* et les *Entomopoxvirinae*. Ainsi, la totalité du règne animal semble concerné. Pour faciliter la lecture et la visualisation des différentes espèces, un tableau exhaustif de toutes les espèces actuellement répertoriées par l'ICTV est proposé en page 11 (Tableau 1).

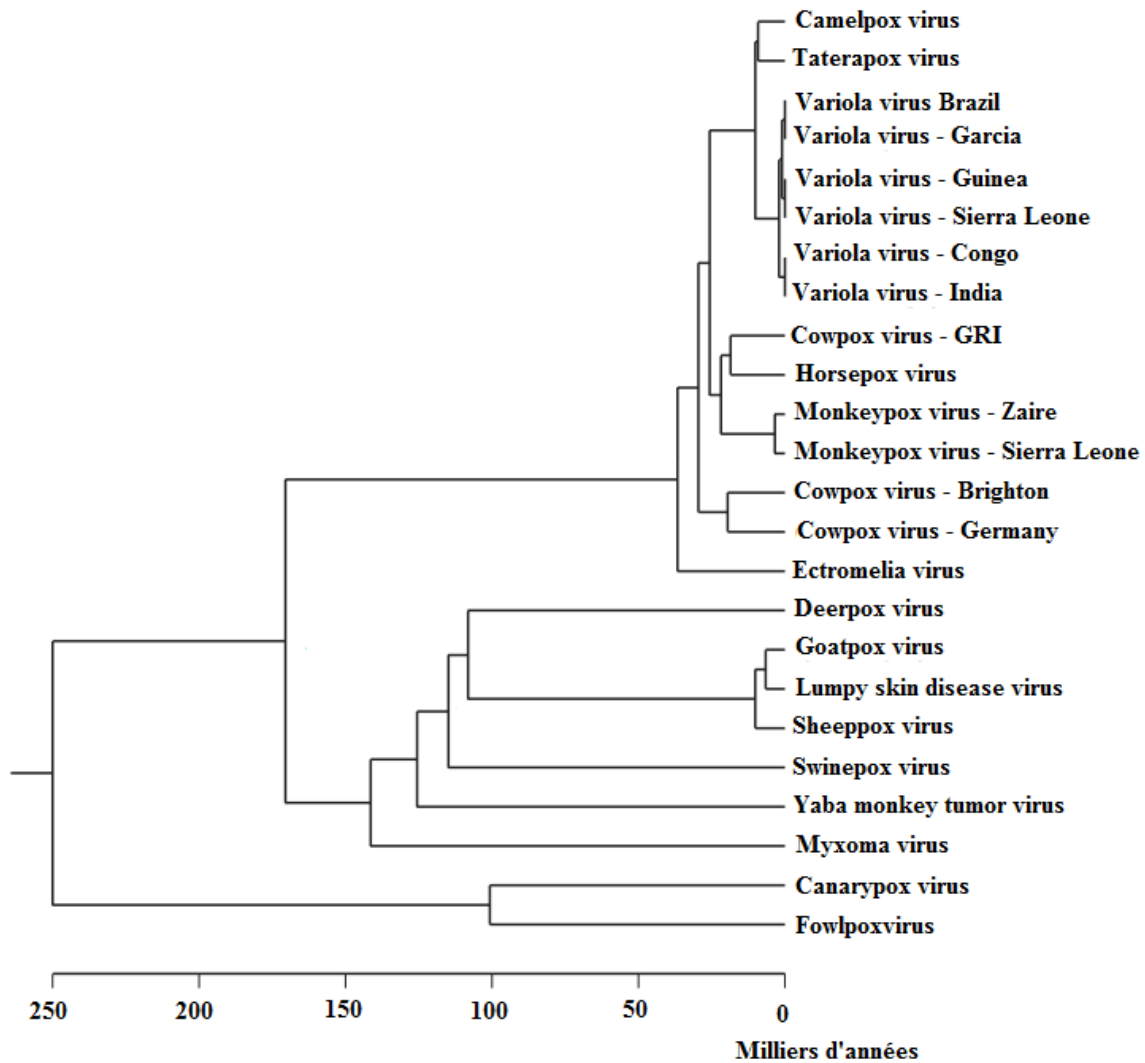
### Les *Chordopoxvirinae*

Les *Chordopoxvirinae* infectent les vertébrés. Cette sous famille comprend 11 genres identifiés ainsi que des espèces non encore affiliées :

- *Avipoxvirus* (poxvirus aviaires)
- *Capripoxvirus* (concernent les caprins et les ovins)
- *Centapoxvirus* (infectant les mammifères; un seul représentant nouvellement classé : *Yokapox virus*<sup>31</sup>)
- *Cervidopoxvirus* (infecte les cervidés, décrit chez le daim principalement)
- *Crocodylidpoxvirus* (une espèce référencée infectant les crocodiles du Nile)
- *Leporipoxvirus* (concerne les lapins, les lièvres et les écureuils)
- *Molluscipoxvirus* (une seule espèce : *Molluscum contagiosum*, seul autre poxvirus strictement humain)
- *Orthopoxvirus* (genre contenant la variole ainsi que la majorité des poxvirus de mammifères et potentiellement transmissibles à l'homme)
- *Parapoxvirus* (genre se différenciant des autres par sa composition nucléotidique particulière à haut GC% et non par sa spécificité d'hôte ; peuvent infecter le bétail ou les animaux sauvages, certaines espèces sont transmissibles à l'homme)
- *Suipoxvirus* (une seule espèce *Swinepox virus* infectant les porcs)
- *Yatapoxvirus* (deux espèces rares infectant les singes)
- Autres espèces non affiliées à un genre : *Pteropox virus*, *Salmonpox virus*...

Selon la méthode Bayésienne de datation par horloge moléculaire, on estime que le genre *Avipoxvirus* (un des plus diversifié) est le premier à s'être différencié il y a 250 000 ans. Les genres *Leporipoxvirus* et *Orthopoxvirus* sont suivis il y a environ 150 000 ans et les genres *Capripoxvirus* et *Suipoxvirus* sont un peu plus récents (différenciation estimée il y a 100 000

ans). Enfin, l'ancêtre commun des *Orthopoxvirus* serait apparu il y a moins de 50 000 ans<sup>1</sup>. Le tout premier pox remonterait quant à lui à avant la séparation des vertébrés comme l'atteste la présence de poxvirus chez les invertébrés : les Entomopoxviridae.



**Figure 1:** Evolution des *Chordopoxvirinae* selon l'approche de l'horloge moléculaire Bayésienne. D'après Babkin, I. V. & Babkina, I. N. Molecular Dating in the Evolution of Vertebrate Poxviruses. Intervirology 54, 253–260 (2011).

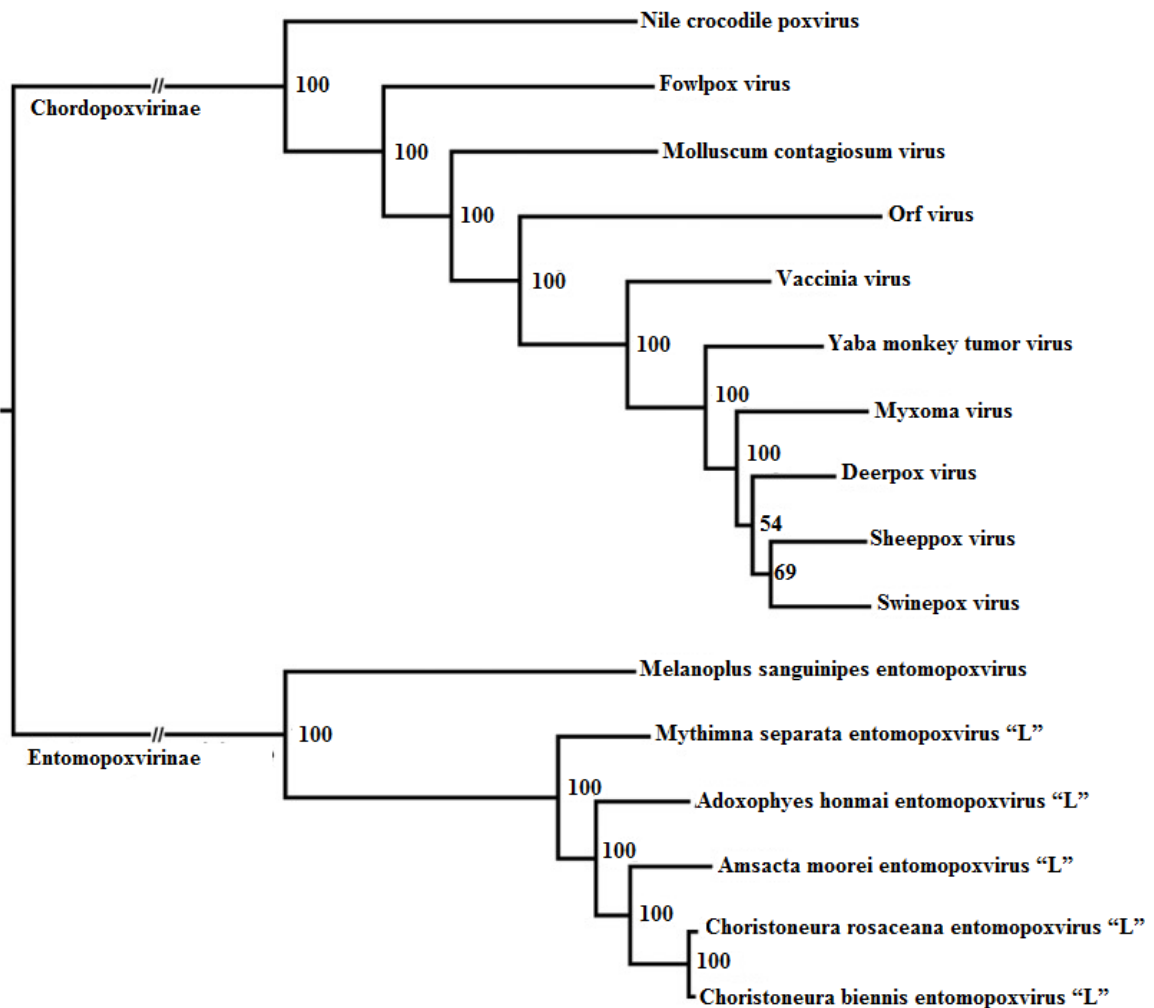
### Les *Entomopoxvirinae*

Les *Entomopoxvirinae* de découverte plus récente, infectent les insectes. Cette sous-famille comprend 3 genres identifiés ainsi que quelques espèces non encore affiliées :

- *Alphaentomopoxvirus* (infectent les coléoptères)

- *Betaentomopoxvirus* (concernent les lépidoptères et les orthoptères)
- *Gammaentomopoxvirus* (concernent lépidoptères et orthoptères également)
- Autres espèces non affiliées : *Diachasmimorpha entomopoxvirus*, *Melanoplus sanguinipes entomopoxvirus*

Les études sur les entomopoxvirus ont commencé à la fin des années 1990. Il y a actuellement environ 14 génomes complets déposés sur GenBank. On suppose que la séparation des *Chordopoxvirinae* et des *Entomopoxvirinae* remonte à la séparation des premiers vertébrés il y a 573 à 656 millions d'années.<sup>32</sup>



**Figure 2:** Arbre phylogénétique des poxvirus intégrant les *Entomopoxvirinae*. Cet arbre est construit selon un alignement de 49 gènes conservés des poxvirus. D'après Theze, J. et al. New Insights into the Evolution of Entomopoxvirinae from the Complete Genome Sequences of Four Entomopoxviruses Infecting *Adoxophyes honmai*, *Choristoneura biennis*, *Choristoneura rosaceana*, and *Mythimna separata*. J. Virol. 87, 7992–8003

CHORDOPOXVIRIDAE		
C H O R D O P O X V I R I D A E	<b>AVIPOX</b>	Canarypox Crowpox Fowlpox Juncopox Mynahpox Peacockpox Penguinpox Pigeonpox Psittacinepox Quailpox Sparrowpox Starlingpox Turkeypox
	<b>CAPRIPOX</b>	Goatpox Lumpy skin disease Sheeppox
	<b>CENTAPOX</b>	Yokapox
	<b>CERVIDPOX</b>	Deerpox
	<b>CROCODYLIDPOX</b>	Nile crocodile poxvirus
	<b>LEPORIPOX</b>	Hare fibroma Myxoma Rabbit fibroma Squirrel fibroma
	<b>MOLLUSCIPOX</b>	Molluscum contagiosum
	<b>ORTHOPOX</b>	Buffalopox Camelpox Cantagalo virus Cowpox Ectromelia virus Monkeypox Rabbitpox Raccoonpox Taterapox Vaccinia virus Variola virus Volepox
	<b>PARAPOX</b>	Auzduk disease virus Bovine papular stomatitis Camel contagious exthyma Chamois contagious ecthyma Orf virus Parapox of red deer Pseudocowpox Sealpox
	<b>SUIPOX</b>	Swinepox
	<b>YATAPOX</b>	Tanapox Yaba monkey tumor virus
	<b>Autres</b>	California harbor seal poxvirus Cotia virus Dolphin poxvirus Embu virus Grey kangaroo poxvirus Marmosetpox Molluscum-like poxvirus Quokka poxvirus Red kangaroo poxvirus Salanga poxvirus Spectacled caiman poxvirus Squirrelpox

ENTOMOPOXVIRIDAE		
E N T O M O P O X V I R I D A E	<b>ALPHAEPV</b>	Anomala cuprea (ACEV) Anphodisu tasmaniae (ATEV) Demodema boranensis (DBEV) Dermolepida albohirtum (DAEV) Figulus subleavis (FSEV) Geotrupes sylvaticus (GSEV) Melolontha melolontha (MMEV)
	<b>BETAEPV</b>	Acrobasis zelleri "L" (AZEV) Amsancta moorei "L" (AMEV) Arphia conspersa "O" (ACOEV) Choristoneura bienis "L" (CBEV) Choristoneura conflicta "L" (CCEV) Choristoneura diversuma "L"(CDEV) Choristoneura fumiferana "L"(CFEV) Chorizagrotis auxiliars "L" (CXEV) Heliothis armigera "L" (HAEV) Locusta migratoria "O" (LMEV) Oedalus senigalensis "O" (OSEV) Operophtera brumata "L" (OBEV) Schistocera gregari "O" (SGEV)
	<b>GAMMAEPV</b>	Aedes aegypti (AAEV) Camptochironomus tentans (CTEV) Chironomus attenuatus (CAEV) Chironomus luridus (CLEV) Chironomus plumosus (CPEV) Geldichironomus haloprasimus (GHEV)
	<b>Autres</b>	Diachasmimorpha (DIEV) Melanoplus sanguinipes (MSEV)

**Tableau 1:** vision globale des *Poxviridae* actuellement recensés

## Les nouvelles espèces

Les espèces de poxvirus actuellement recensées ne sont probablement que la partie émergée de l'iceberg. Régulièrement la découverte de nouvelles espèces complique la classification et pose la question de création de nouveaux genres tant leur diversité génétique est importante.<sup>33</sup> On peut citer par exemple le *Cotia virus* et l'*Embu virus* qui présentent un génome semblable et qui étaient initialement considérés comme proches de la vaccine. Les analyses phylogénétiques posent finalement la question d'un nouveau genre.<sup>34,35</sup> Les études vétérinaires et les autopsies animalières permettent également la découverte régulière de nouveaux poxvirus. La littérature récente fleurit de nouvelles descriptions de cas et d'espèces chez la chauve-souris<sup>33,36</sup>, les oiseaux<sup>37,38</sup>, les otaries<sup>39</sup>, les reptiles<sup>40,41</sup>, les poissons<sup>42-44</sup> ...

## La notion de réservoir

Dès 1977, D. Baxby<sup>45</sup> se penche sur la diversité des pox et la complexité de leur réservoir. Deux poxvirus présentent un réservoir strictement humain. La variole dont l'éradication est à la fois la conséquence et la preuve de cette exclusivité d'hôte. Le *Molluscum contagiosum*<sup>46-48</sup> est également strictement humain, cependant, sa pathogénicité se limite habituellement aux enfants et est bénigne (hormis quelques cas extensifs décrits chez les immunodéprimés sévères).<sup>46</sup> Il existe également des poxvirus qui ont la capacité d'infecter des hôtes de différentes espèces. Au sein d'un même genre, les espèces peuvent être très proches et, même si elles sont nommées d'après leur animal de découverte, les contaminations croisées sont fréquentes avec des animaux proches. Parmi les *capripoxvirus*, le *Sheeppox virus* et le *Goatpox virus* peuvent infecter indifféremment les ovins ou les caprins.<sup>49</sup> Certaines espèces de poxvirus sont capables d'infecter des espèces animales plus éloignées. Le *Cowpox virus* par exemple est capable d'infecter les ovins, les équins et l'homme (comme nous l'avons vu dans l'introduction historique) mais il est également pathogène pour les chats et les rongeurs.<sup>50-53</sup> A noter cependant que le cas du cowpox est particulier car il existe plusieurs sous-groupes cowpox. La génomique de cette espèce nécessiterait un important travail de reclassement car certaines espèces de "cowpox" ont probablement été classées un peu vite.<sup>54</sup> Les retombées cliniques des changements d'hôtes sont difficiles à prédire. Par exemple, le *Myxoma virus* et le *Rabbit fibroma virus* sont deux *lepripoxvirus*. Leur hôte naturel est le lapin américain chez qui l'infection est modérément grave. Cependant le *Myxoma virus* chez le lapin européen est hautement létal alors que le *Rabbit fibroma virus* ne provoque pas plus de complications que chez le lapin américain. Ces deux espèces font pourtant partie du même

genre et descendent du même ancêtre commun. A moins qu'une immunité générale ait déjà été acquise pour le *Rabbit fibroma virus* chez les lapins européens contrairement au *Myxoma virus* ?

Grace à un matériel enzymatique important et des mécanismes d'entrée cellulaire peu spécifiques, les poxvirus sont capables d'infecter des cellules appartenant à des hôtes multiples. Cette capacité d'infection ne confère pas forcément un pouvoir pathogène mais peut expliquer *in fine* la capacité d'émergence de certains d'entre eux. Par exemple, le *Camelpox virus* est endémique dans les régions où les camélidés sont exploités pour leur lait. Contrairement aux autres poxvirus, il pose un véritable problème vétérinaire car les épidémies sont graves et déciment les troupeaux. Son inoculation à d'autres mammifères : lapin, rat, chèvre, mouton, hamster, cochon d'Inde ne donne pas d'effet pathogène. Cependant, il est capable d'infecter l'homme et le virus peut se cultiver sur œufs embryonnés.<sup>55</sup>

En ce qui concerne les *Orthopoxvirus*, une théorie résultant des études sérologiques et phylogénétiques place les rongeurs comme potentiel réservoir commun.<sup>56</sup>



## Risques et enjeux depuis l'arrêt de la vaccination antivariolique

Depuis l'éradication de la variole, la vaccination a été abandonnée. Les personnes nées après 1985 n'ont plus été vaccinées. La population mondiale est donc en train de perdre progressivement son immunité globale contre la variole. Le premier risque qu'on peut identifier serait une réémergence naturelle ou intentionnelle du virus de la variole. Nous développerons cette idée dans le paragraphe dédié au bioterrorisme. L'autre risque serait lié à la perte d'immunité croisée avec les autres *orthopoxvirus*. En effet, puisque la vaccine a permis d'éradiquer la variole par immunité croisée, on peut imaginer un risque d'émergence d'un nouvel *orthopoxvirus* chez l'Homme lorsque la population mondiale aura définitivement perdu son immunité. Certains auteurs se sont penchés sur la question. Sur 1407 pathogènes humains connus, la majorité (58%) sont zoonotiques.<sup>57</sup> On sait que trois genres de poxvirus zoonotiques sont capables d'infecter l'homme : *Orthopoxvirus*, *Parapoxvirus* et *Yatapoxvirus*. Parmi les orthopox, le *Monkeypox virus* est le plus alarmant. De nombreuses épidémies ont été décrites en Afrique. Un paragraphe plus approfondi sur le monkeypox sera développé dans la partie sur les épidémies recensées. Les poxvirus potentiellement émergents n'auront plus à faire face à la concurrence de la variole. Durant des siècles d'évolution de l'humanité, la variole était si répandue que les survivants étaient immunisés contre les orthopoxvirus. Ces derniers n'ont probablement jamais eu l'occasion de s'établir dans la population humaine.

Le risque de changement d'hôte a été étudié via des modèles mais les avis restent divergents. La capacité des poxvirus à se répliquer dans le cytoplasme est fortement corrélée à un risque d'émergence.<sup>58</sup> Pour certains auteurs l'un des risques principaux serait l'émergence d'un orthopox zoonotique mieux adapté à l'homme (monkeypox, camelpox... qui verrait une augmentation de virulence et transmission inter-humaine). Le contrôle d'un tel virus amènerait un défi majeur. D'autres théories, comme celle d'Haller *et al*<sup>59</sup> mettent les poxvirus à large capacité d'hôte au centre du problème. Le cowpox par exemple serait une menace car c'est une des espèces contenant le plus grand ensemble de gènes immuno-régulateurs et il possède une importante capacité d'adaptation.<sup>28</sup>

### LA QUESTION DU BIOTERRORISME

Malgré toutes les théories et scénarios existant sur l'émergence d'un nouveau poxvirus pathogène pour l'homme, le risque d'une réémergence de la variole reste la crainte principale. Nous avons vu qu'il n'existe pas de réservoirs naturels autre que l'homme. La question d'une

réémergence naturelle est peu probable mais reste envisageable surtout avec la décongélation de corps conservés dans le permafrost. Le risque principal à l'heure actuelle viendrait d'une réintroduction intentionnelle. En 1979 l'OMS a demandé que tous les stocks de souches varioliques soient détruits ou transférés dans les deux seuls laboratoires agréés de haut confinement. On estime que le CDC d'Atlanta possède environ 450 souches de variole et que les Russes dans l'Institut d'État de virologie et de biotechnologie (oblast de Novossibirsk) en possèdent environ 150.<sup>60</sup> En pratique, il est difficile de savoir si absolument tous les laboratoires et les équipes ont obtempéré. Des souches ont pu être stockées secrètement (dans les années 1970, en pleine guerre froide, de grandes quantités de variole ont été produites à but d'armement microbiologique<sup>61,62</sup>), ou "accidentellement" comme l'ont prouvé plusieurs événements d'identification fortuite de souches non sécurisées dans des établissements de recherche ou de soins.

L'autre menace potentielle vient de la disponibilité du génome du virus de la variole – accessible dans les bases de données publiques. En 2002, une équipe réussit l'expérience de recréer du virus de la poliomyélite à partir de la séquence nucléotidique. À l'époque la création d'un poxvirus était inenvisageable en raison de la taille importante du génome (30 fois plus grand que celui de la poliomyélite). Pourtant, en 2017 une équipe canadienne a pu recréer l'*Horsepox virus*<sup>63,64</sup>, proche du cowpox et de la variole.

De nombreux auteurs ont posé la question de l'utilisation de la variole comme arme de bioterrorisme, principalement dans les années 2000 à la suite des enveloppes piégées à l'anthrax. En France, il existe un "plan national de réponse à une menace de variole" du ministère de la santé dont la dernière actualisation date de 2006. Il existe des panels commerciaux de détections des agents de bioterrorisme comme le Threat-E FilmArray system qui inclut la recherche d'*Orthopoxvirus* parmi les 17 pathogènes recherchés.<sup>65-67</sup> Aux États-Unis, on estime que 15 millions de doses de vaccin seraient disponibles<sup>68</sup> et diluables jusqu'à 40 millions (minimum requis pour faire face à une réelle menace).<sup>69</sup> Il existe également des stocks et des recherches sur les antiviraux ayant un effet sur les *Orthopoxvirus*, le cidofovir principalement.<sup>70-73</sup>

Citation de Christopher Shayà propos du risqué de réémergence de la variole ou de l'émergence d'un nouveau poxvirus: "*Better to be scared by the improbable possibility than to be unprepared for the catastrophic reality*"<sup>74</sup>

## LES CAS ET EPIDEMIES

### Chez l'animal

Les poxvirus dans le monde animalier ont un niveau de gravité différent en fonction de la spécificité d'hôte du poxvirus comme expliqué précédemment<sup>59</sup>, mais également en fonction de l'exposition chronique au virus. Par exemple le *Squirelpox virus* est relativement bien toléré dans les populations d'écureuils gris (aux États-Unis) alors qu'il fait des ravages dans les populations d'écureuils roux européens (Angleterre et Pays de Galles).<sup>75</sup> Il pourrait s'agir d'une acquisition de virulence due à un changement d'hôte ou à l'introduction plus récente de ce virus dans les populations européennes. L'immunité des populations d'écureuils roux serait alors naïve du squirelpox et expliquerait la différence de virulence.

Les oiseaux sont un des règnes les plus touchés par les poxvirus. Les programmes de surveillance des oiseaux marins en Afrique de Sud (mis en place en 1980) rapportent des épidémies d'*Avipoxvirus* de plus en plus fréquentes ces 5 dernières années. Cela permet la découverte régulière de nouvelles espèces de pox aviaires<sup>37,76</sup>. Sous nos latitudes, les Anglais observent une décimation des populations de mésanges.<sup>38</sup>

Une épidémie vétérinaires grave de *Cowpox virus* a été rapportée chez des singes en captivités<sup>77</sup>. Enfin les épidémies chez les animaux d'élevage comme le camelpox ou le buffalopox (détaillées ci-après) sont les plus problématiques car elles ont des retombées agroalimentaires avec un risque de passage à l'homme.

### Chez l'homme

Le *Molluscum contagiosum* reste le seul poxvirus strictement humain. Contrairement à la variole, il est bénin. Il est responsable d'une éruption limitée pustuleuse chez les enfants, spontanément résolutive. Il est contagieux et se transmet par contact ou échange de linge de bain (les enfants se contaminent facilement dans les piscines). Le molluscum peut poser problème chez les sujets fortement immunodéprimés. Chez des patients atteints de SIDA par exemple (la transmission peut alors être sexuelle<sup>78</sup>) les lésions peuvent être extensives et nécessitent un traitement par cidofovir.<sup>46-48</sup>

Parmi les autres genres, 3 sont capables d'infecter l'homme : les *Parapoxvirus*, les *Orthopoxvirus* et le *Yokapox virus* (seul représentant de son genre). Le *Yokapox virus* a causé quelques cas anecdotiques chez les personnes immunodéprimées<sup>79</sup>. Les *Parapoxvirus* en revanche comme l'*Orf virus* et le *Pseudocowpox virus* sont régulièrement impliqués dans des

cas humains. Les cas sont sporadiques et concernent les personnes en contact avec le bétail (bovins et ovins). Ils sont responsables de pustules au niveau des mains, généralement unique ou "nodule du trayeur".<sup>80</sup> Plusieurs cas ont été rapportés chez les éleveurs de chèvres<sup>27</sup> ou chez les chasseurs de daims.<sup>81</sup> Dans notre étude, l'une des souche d'Orf testée provenait d'une personne infectée suite à la préparation d'une tête de mouton contaminée pour l'abattage traditionnel de l'Aïd<sup>82</sup>.

Pour les orthopoxviroses, nous allons nous focaliser sur 3 espèces particulières responsables d'épidémies : les buffalopox, le camelpox et le monkeypox. Notons tout de même que plusieurs cas de *Cowpox virus* sont décrits dans la littérature récente.<sup>83</sup> Des cas par contamination à partir de rats domestiques<sup>84,85</sup> ou de chats ont été rapportés. Bien qu'impressionnantes, ces infections sont globalement résolutive chez les sujets immunocompétents sauf en cas d'atteintes de zones sensibles (visage, yeux etc...). En revanche chez les sujets immunodéprimés, les lésions peuvent être extensives, surinfectées et létales sans traitement.<sup>86,87</sup> En 2000, une équipe brésilienne a rapporté une épidémie d'un nouvel orthopoxvirus : le *Cantagalo virus*. Il touche principalement le bétail mais parmi les personnes exposées, 54 (18%) ont développé des symptômes et une virémie. Le *Cantagalo virus* est génétiquement plus proche de la vaccine que du cowpox, pourtant la moitié des sujets atteints étaient vaccinés.<sup>88</sup>

Enfin, notons que des cas d'orthopoxviroses provoquées par l'administration de la vaccine lors de campagne de vaccination chez les sujets immunodéprimés ont également été décrits (vaccin vivant atténué).<sup>89</sup> Cela a conduit dans les années 1990 au développement de souches modernes de vaccine (comme la souche Vaccinia Ankara modifiée) qui sont extrêmement atténuées, utilisables comme vecteur de vaccin recombinant même chez l'immunodéprimé.<sup>90</sup>

### **Cas du *Buffalopox virus* et du *Camelpox virus***

Le *Camelpox virus*, touche les camélidés. Il se transmet comme la variole par contact cutané ou inhalation.<sup>55,91,92</sup> Certaines régions en Inde sont particulièrement touchées durant la saison des pluies. Les insectes (tiques et moustiques) et les petits rongeurs qui pullulent à cette saison pourraient également être impliqués dans la dissémination du camelpox.<sup>93</sup> La transmission par les insectes serait alors "mécanique" plutôt que réellement vectorielle.<sup>94</sup> Le camelpox est grave voire mortel chez les camélidés. Dans certaines communautés nomades, les épidémies ont des conséquences économiques désastreuses car les troupeaux et la

production de lait sont sérieusement altérés. Le passage à l'homme est décrit mais mal évalué.<sup>95,96</sup> Les retombées cliniques chez l'homme seraient limitées mais le camelpox inquiète car son génome est un des plus proche de la variole.<sup>97</sup>

Le *Buffalopox virus* est en augmentation en Asie centrale (plus de 150 cas rapportés en Inde).<sup>55</sup> Il se transmet aux vaches domestiques et sévit sous forme d'épidémies dans les villages.<sup>98,99</sup> En plus des symptômes classiques d'une orthopoxvirose, des cas d'infections pharyngées par consommation de lait non pasteurisé ont été rapportés. Le buffalopox a aussi été impliqué dans une épidémie nosocomiale au Pakistan en 2005.<sup>100</sup> Durant plusieurs mois, une vingtaine de patients dans différentes unités de soins des grands brûlés ont développé des pustules multiples avec fièvre et malaise général. La contamination provenait de la "graisse animale" utilisée pour enduire les brûlures, l'élevage source était contaminé par du buffalopox.

### **Le cas du *Monkeypox virus***

De tous les cousins de la variole, le monkeypox est le plus préoccupant. Dès 1988, des cas sont rapportés en Afrique (plus de 400 cas recensés au Zaïre).<sup>53</sup> A noter cependant que des études a posteriori ont montré qu'il y avait probablement une surestimation des cas par confusion avec la varicelle.<sup>101,102</sup> Le taux de mortalité de monkeypox en Afrique varie de 1.5% à 11% selon les études.<sup>59,78,101,102</sup> En 2010, une équipe attire l'attention sur le monkeypox en république démocratique du Congo (zone d'endémie). Entre 2005-2007, 760 cas de monkeypox ont été rapportés et l'incidence des cas de monkeypox humain a été multiplié par 20 entre 1980 (fin de la vaccination obligatoire) et 2007. Parmi les facteurs de risques on trouve l'habitat (aux abords des forêts) et l'âge. Les sujets jeunes, donc non vaccinés, sont davantage touchés. Des cas en Afrique sous forme d'épidémies localisées sont régulièrement rapportés.<sup>56,102</sup> Au Nigéria, on assiste ces dernières années à une réémergence du *Monkeypox virus* (épidémie de 2017-2018 avec plus de 140 cas suspects dont 42 confirmés) alors que le dernier cas avait été décrit en 1978.<sup>103,104</sup> A noter que suite à cette épidémie, deux cas ont été rapportés au Royaume Unis à quelques jours d'écart. Les deux hommes revenaient du Nigéria (un militaire en déplacement et un touriste) et ont déclarés les symptômes sur le sol anglais après avoir voyagé par bateau, train et avion.<sup>105</sup> Une transmission interhumaine d'un des deux patient à une infirmière a été rapportée. Les trois patients ont été traité par Brincidofovir, une prodrogue du cidofovir.

En 2003, les Etats-Unis ont connu une épidémie de monkeypox humain transmis par des rongeurs importés d'Afrique. Des "rats de Gambie" contaminés ont été importés du Ghana comme animal de compagnie exotique. Lors de leur transport ils ont été "stockés" quelques jours au Texas où ils étaient en contact avec d'autres rongeurs destinés à la vente comme les chiens de prairies.<sup>106</sup> Au total, 79 cas de monkeypox humain seront diagnostiqués en quelques semaines dans plusieurs États (Illinois, Indiana, Wisconsin, Missouri, Kansas et Ohio). 25% des cas nécessiteront une hospitalisation dont deux enfants graves pour encéphalite, adénopathies importantes et lésions extensives. Dans une stratégie d'endiguement, 26 sujets exposés (travaillant en animalerie et vétérinaires) bénéficieront d'une vaccination anti-variolique préventive durant cette épidémie. Aucun mort n'est à déplorer et aucune transmission interhumaine n'a été objectivée durant cette épidémie.<sup>107,108</sup>



**Photo 4:** Présentation clinique typique du monkeypox chez une petite fille de 7 ans. District de Sankuru en République Démocratique du Congo.

Rimoin, Anne W., et al. "Major increase in human monkeypox incidence 30 years after smallpox vaccination campaigns cease in the Democratic Republic of Congo." *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2010): 201005769.

# Méthodes diagnostiques des Poxvirus

## DIAGNOSTIC CLINIQUE

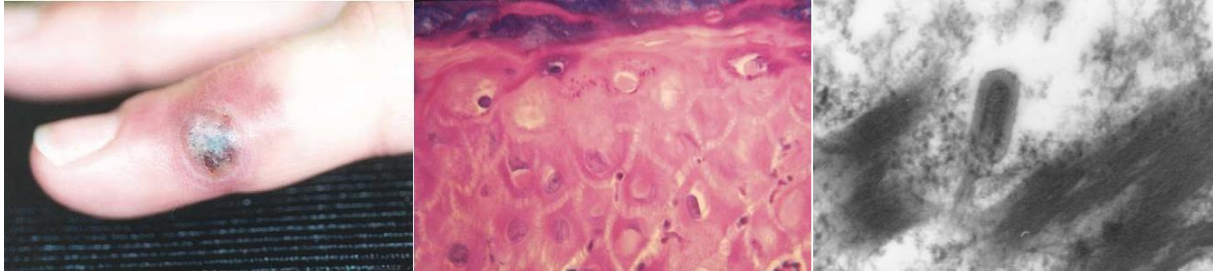
Chez les animaux, les pustules s'observent le plus souvent au niveau de la tête (autour des yeux, autour du bec ou sur le museau). Chez les oiseaux, il existe une forme "humide" où une membrane nécrotique tapisse les muqueuses aériennes. La pathogénicité est dépendante du tandem virus-hôte comme nous l'avons vu précédemment.

Chez l'homme, les parapoxviroses provoquent des "nodules" sur les parties en contacts avec l'animal infecté. Il s'agit donc le plus souvent de nodules uniques ou en faible quantité sur les mains voire les avant-bras. Devant ces symptômes et au vu des animaux porteurs, un interrogatoire bien conduit peut alors suffire à poser le diagnostic. Les orthopoxviroses provoquent des lésions cutanées varioliformes plus ou moins étendues en fonction du virus impliqué. L'animal de contamination peut être moins évident (animaux domestiques possibles, rongeurs, chats). Le diagnostic différentiel doit alors être fait entre les autres maladies éruptives.

## DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE

Les lésions cutanées, prélevées par raclage ou biopsie, peuvent être observées en anatomopathologie. L'examen anatomopathologique montre au stade papuleux une dilatation des capillaires et un œdème du derme. Il existe un infiltrat périvasculaire avec des lymphocytes et des histiocytes. Puis apparaît une vésicule profonde avec un épaissement et une vacuolisation de l'épiderme puis formation d'une pustule avec une infiltration de polynucléaires. Des inclusions éosinophiliques intracytoplasmiques caractéristiques des infections à poxvirus sont visibles. En microscopie optique, l'examen direct d'un frottis fixé et coloré permet de voir ces mêmes inclusions caractéristiques. Les autres techniques de diagnostic rapide font appel à l'examen en microscopie électronique par technique de coloration négative qui visualise des particules ayant la morphologie des poxvirus mais ne permet pas le diagnostic de famille. Cette technique a constitué longtemps la méthode de référence et reste utilisée pour sa capacité d'application à tous les poxvirus sans *a priori*. Les autres techniques comme l'immunofluorescence, l'immunoprécipitation ou l'immunoélectrosynérèse permettent le diagnostic du genre orthopoxvirus mais sont plus délicates. Le diagnostic de certitude est apporté soit par l'isolement du virus dans le liquide

des vésicules ou dans les croûtes par culture cellulaire, soit par polymérase chain reaction (PCR). La PCR est maintenant la méthode de diagnostic rapide retenue dans les centres hospitaliers de référence. Puisqu'il s'agit ici de la technique développée dans notre travail, nous allons consacrer un paragraphe sur le principe de méthodologie de la PCR.



**Photo 5:** Trois étapes de diagnostic d'une parapoxvirose. Stade clinique (nodule du trayeur unique). L'analyse anatomopathologique de la biopsie (coloration à l'hématoxyline-éosine x400) révèle une spongiose avec inclusions cytoplasmiques et intranucléaires caractéristique d'une infection à poxvirus. Enfin la microscopie électronique permet de visualiser directement le virus (250 à 300 nm de longueur) avec les critères vus dans le chapitre "généralités". Werchniak, Andrew E., et al. "Milker's nodule in a healthy young woman." *Journal of the American Academy of Dermatology* 49.5 (2003): 910-911.



## Rappels généraux sur la technique de PCR

La PCR (polymerase chain reaction) ou "amplification en chaîne par polymérase" est une technologie qui a révolutionné le monde de la biologie moléculaire. Inventé vers 1985, ce procédé permet d'amplifier un fragment d'ADN choisi. Globalement, une technique de PCR suit classiquement 3 étapes : dénaturation, hybridation et amplification.

Lors de la dénaturation, une température de 94 à 98°C permet de dissocier les fragments d'ADN extraits de la source initiale. Il passe donc d'un état naturel de double hélice à une forme monobrin.

Lors de l'hybridation, deux amorces ou courts fragments d'ADN simple brin (oligonucléotides) vont pouvoir s'hybrider au brin d'ADN dénaturé. Les séquences des amorces sont définies en fonction du fragment d'ADN qu'on cherche à amplifier (la séquence doit être connue). Grâce à la complémentarité des bases azotées, les nucléotides des amorces (sens et anti-sens) vont pouvoir s'hybrider spécifiquement avec leur brin complémentaire. La température de cette phase est calculée en fonction de la  $T_m$  des amorces (température de demi-dénaturation des amorces). Les systèmes de PCR actuels sont généralement optimisés pour une phase d'hybridation autour de 60°C.

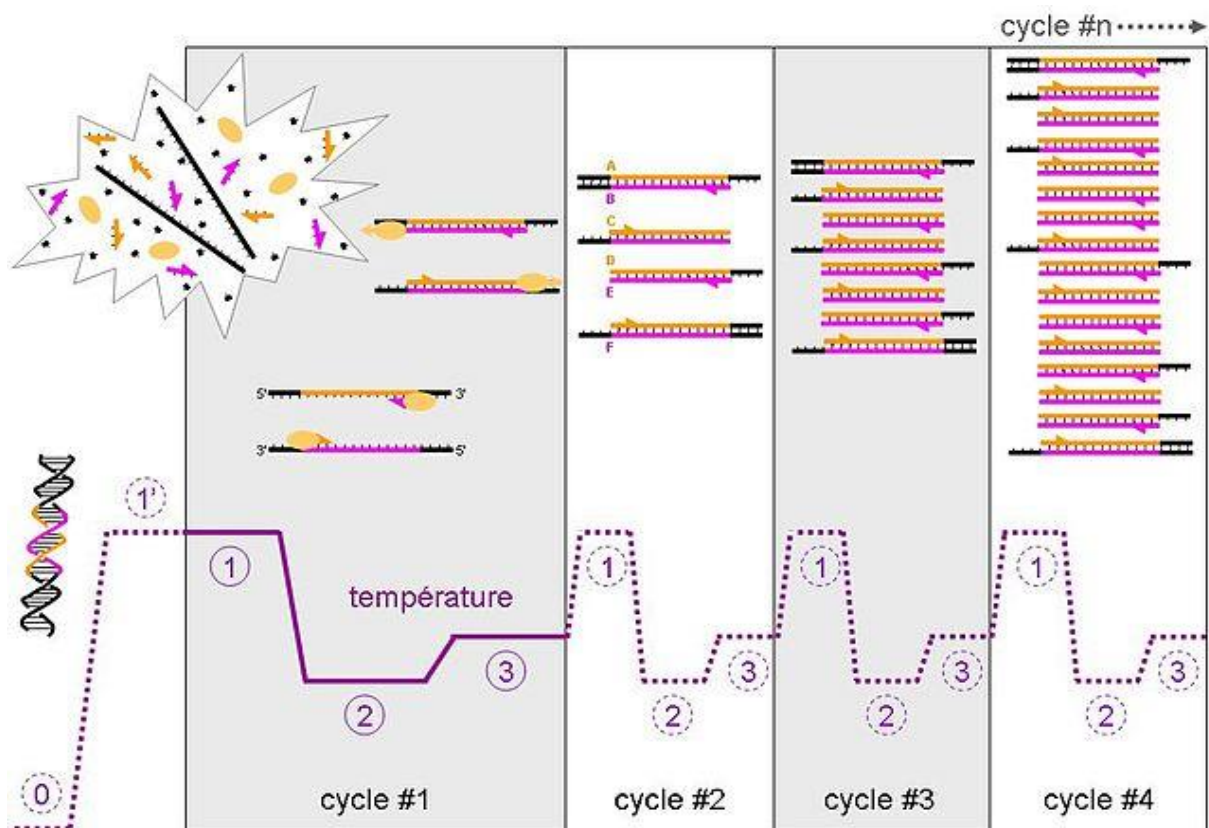


Figure 3: Schéma récapitulatif du principe de PCR

Enfin, la phase d'élongation permet de synthétiser le brin d'ADN matrice (donc le fragment recherché) à partir des amorces par les polymérases en utilisant des désoxyribonucléotides libres présents dans le milieu réactionnel. Cette phase clef a longtemps été une limite technique car aucune polymérase connue ne pouvait fonctionner à des températures aussi élevées (nécessaires pour garder l'ADN sous forme monocaténaire). Il faudra attendre la découverte dans une source du parc Yellowstone d'une des premières bactéries extrêmophiles : *Thermus aquaticus*. Cette bactérie, vivant usuellement entre 50 et 80°C, permis de fournir la "Taq polymérase" dont le fonctionnement optimal est à 72°C. Ces étapes sont ainsi répétées plus d'une trentaine de fois grâce aux automates thermocycleurs qui permettent une variation précise et rapide des températures. Le fragment d'ADN ciblé s'en retrouve donc synthétisé de manière exponentielle.

Pour détecter l'ADN amplifié plusieurs moyens existent. La plus ancienne technique consiste à faire migrer les produits de PCR en gel d'agarose contenant un intercalant d'ADN. La "taille" des amplicons pouvait alors être contrôlée avec la migration en parallèle d'un marqueur de poids moléculaire. Ce processus a été supplanté par la PCR en temps réel. Le fragment amplifié est alors détecté grâce à une émission de fluorescence au fur et à mesure de la synthèse *de novo*. Il peut s'agir d'un intercalant d'ADN (SybrGreen®) ou d'un système de sonde qui s'hybride sur une séquence entre les deux amorces et libère une fluorescence lors de son hydrolyse par le passage de la polymérase.

La PCR a complètement révolutionné le diagnostic des maladies infectieuses et la routine hospitalière. Cette technique permet de détecter l'ADN (ou l'ARN grâce à la RT-PCR comprenant une étape initiale de rétro-transcription) en faible quantité dans les échantillons biologiques. Dès lors, tous les microorganismes dont le diagnostic direct était difficile ou fastidieux (culture cellulaire ou exigeante, microscopie) peuvent à présent être recherchés via la PCR. On amplifie un fragment spécifique du génome de l'espèce recherchée. A l'APHM, chaque semaine le secteur biologie moléculaire diagnostic de routine de l'IHU réalise plus d'un millier de PCR en temps réel qualitatives ou quantitatives (virologie, bactériologie et parasitologie).

## Intérêts et challenge de développer un système de PCR "panpox"

Les *Poxviridae* possèdent un des génomes les plus complexes du règne viral. La structure est globalement similaire entre les différents genres malgré une fluctuation importante du contenu des gènes et fonction de l'hôte.<sup>109</sup> Parfois le même genre peut présenter des différences et des mutations importantes résultat de milliers d'années de coévolution incluant des mutations, délétions, insertions et transferts horizontaux.<sup>109-111</sup> Les *Orthopoxvirus*<sup>110,112</sup> et les *Avipoxvirus*<sup>113</sup> font partis des clades les plus diversifiés. Par exemple, les avipox infectant les populations aviaires d'Afrique du Sud sont similaires à 94,4% entre eux, descendant probablement d'un ancêtre commun local. En revanche, ils ne partagent que 60% de similarité génétique avec leur cousin le *Canarypox virus*.<sup>113,114</sup> Chez les *Entomopoxvirinae*, certains gènes codant pour des protéines élémentaires comme les uracile ADN glycosylases s'apparentent davantage aux bactéries ou à des virus du groupe herpes plutôt qu'à ceux des *Chordopoxvirinae*. Cela suggère que leur acquisition s'est faite indépendamment.<sup>110,111</sup> Dans ce contexte on comprend que la réalisation d'un système de PCR "pan-poxviridae" comprenant les chordopox et les entomopox paraît difficile.

Les systèmes de PCR existants répondent à un besoin diagnostique. Il existe évidemment des systèmes très spécifiques et sensibles pour le diagnostic rapide de la variole.<sup>115</sup> Il existe quasiment un système de PCR spécifique pour chaque espèce d'intérêt humain ou vétérinaire.<sup>116,117</sup> Cependant l'intérêt de ces systèmes spécifiques d'espèce est limité face au diagnostic d'une poxvirose inconnue. On a vu que les espèces connues peuvent facilement changer d'hôte et qu'il reste probablement un nombre important d'espèces à découvrir. Nous nous sommes donc intéressés plus spécifiquement aux systèmes qui autorisent un spectre de détection élargi. Malgré une forte variabilité génétique, l'existence de gènes conservés codant pour des protéines indispensables au cycle de vie du virus<sup>118</sup> parmi les *Chordopoxvirinae* a permis la mise au point de systèmes "pan-orthopox".<sup>36,39,65</sup> Les gènes conservés E9L<sup>119</sup> ou rpo147<sup>120</sup> entre autres sont souvent utilisés. Chez l'homme, des systèmes regroupant parapox et orthopox ont été développés. Il s'agit effectivement des genres responsables de zoonoses humaines et leur présentation clinique peut être similaire. Cependant de par leur composition nucléotidique très différente, les systèmes utilisés combinent plusieurs jeux d'amorces dans des systèmes multiplex.<sup>121</sup> Des systèmes pour les genres impliqués en santé vétérinaire ont également été développés. Pour les *avipoxvirus* (clade extrêmement hétérogène) le gène 4b<sup>122</sup> codant pour une protéine du core est autant utilisé pour la détection que pour la classification.<sup>38,114,123</sup> Les *capripoxvirus* ont également

fait l'objet de nombreux systèmes centrés sur les gènes A32L et B2L.<sup>124</sup> Enfin, pour pouvoir garder une différenciation d'espèces au sein du genre, certains systèmes utilisent la température de fusion des amplicons qui diffère selon l'espèce amplifiée.<sup>49,115,125</sup>

En 2010, Li and al (collaboration Américaine et Allemande) publient un système de PCR "pan-poxvirus". Il s'agit d'un des articles les plus cités sur le sujet. Leur approche est intéressante : elle divise les poxvirus en deux groupes selon le GC% de leur génome. Parmi les hauts GC% (>60%) on trouve les *Parapoxvirus* et le *Molluscum contagiosum*. Le *Nile crocodilepox virus* présente un génome à 61% de GC. A l'époque de l'étude, il n'a pas été considéré. Les 6 autres genres de chordopox testés dans cet article ont un GC% bas (entre 30 et 40%). Les raisons de cette évolution génétiques différentes pour certains genres sont encore inconnues. Cependant, dans le développement de notre système, on verra que cette différence de GC% nous permettra grâce aux courbes de fusion des amplicons de savoir dans quelle catégorie se trouve le poxvirus. L'approche de Li est donc intéressante. Le système haut GC est évidemment très robuste puisqu'il s'agit du même genre de poxvirus (hormis le *Molluscum contagiosum* qui n'est pas un *Parapoxvirus* mais dont certaines parties du génome en sont très proches). Le système bas GC est donc censé englober tout le reste des poxvirus mais l'équipe n'a testé que 4 familles. Les *Avipoxvirus* ont été exclus d'emblée de l'étude en raison de leur haut taux de recombinaison génétique et aucun *Entomopoxvirinae* (qui font partie des bas GC) n'a été testé. Enfin, les essais ont été menés avec une PCR standard et non en temps réel. Bien que non exhaustif, ce système "pan-pox" a fait ses preuves en permettant la découverte du *Yokapox virus*.<sup>31,87</sup>

En ce qui concerne les *Entomopoxvirinae*, la littérature scientifique ne rapporte actuellement pas de système de PCR pour la détection de ces espèces. Le séquençage des *Entomopoxvirinae* a permis de trouver des gènes homologues avec les *Chordopoxvirinae* mais avec des taux de GC identiques et bas (de 20 à 50%).<sup>127</sup>

Pour résumer la situation actuelle, il existe des systèmes de PCR spécifiques d'espèces, spécifiques pour certains genres (avec différenciation d'espèces possible) et adaptés au diagnostic des poxviroses humaines (système multiplex). Une équipe a créé un système potentiellement "pan-pox" mais utilise différents jeux d'amorces en fonction du GC%. Le système créé pour les bas GC est le plus large et le plus prometteur mais il n'a pas été testé sur tous les genres (il exclut le genre avipox qui est le plus diversifié) et ne devrait pas fonctionner pas sur la sous-famille des *Entomopoxvirinae*. De fait, la création d'un jeu d'amorces et sonde "pan-pox absolu" permettrait une détection de tous les *Poxviridae* y

compris ceux qui ne sont pas encore découverts avec une technologie de routine rapide et peu cher (qPCR). L'application en diagnostic humain dépendra des performances par rapport aux systèmes déjà existant. Mais, son utilisation en screening systématiques en revanche permettrait la découverte de nouvelles espèces, de nouveaux genres ou des chainons évolutifs manquants et nous permettrait de nous préparer à une éventuelle émergence de souches inattendues. Cependant, malgré une très forte hétérogénéité génétique des poxvirus, à l'image de la diversité du monde du vivant, l'existence de gènes ultra conservés impliqués dans les fonctions basiques du cycle de vie des poxvirus rend le challenge possible.

# MATERIELS ET METHODES

## Amorces et sondes

Notre système contient deux amorces dégénérées dans l'extrémité 5' du gène E6R qui est hautement conservée entre tous les poxvirus. La stratégie que nous avons utilisée pour identifier cette séquence ultra-conservée est détaillée dans la partie "résultats". Nos amorces sont tout de même dégénérées et contiennent des inosines lorsque les 4 nucléotides devaient être représentés.

Amorce sens : CCDCAYCARYTVGCIACIBTIGAYT

et amorce anti-sens: GMDATIAYIGTYTTICCTGAICCCAT.

Les températures de fusion théoriques sont respectivement de 52,6°C et de 48,1°C. Les amorces sont séparées de 53 nucléotides et le fragment amplifié totalise 104 nucléotides. Après une mise au point approfondie, nous utilisons un mélange de sondes d'hydrolyse : la sonde pan-pox (très dégénérée) : FAM-TRTGRAABARNARNACRCT-MGB ainsi qu'une sonde un peu plus spécifique de certains poxvirus à haut GC% car notre sonde pan-pox seule ne donnait pas un signal satisfaisant sur ces espèces. Cette amorce FAM-TRTGRAABARGARGACRCT-MGB s'utilise à 1/5<sup>ème</sup> de la concentration de la sonde "pan-pox".

## Echantillons d'ADN utilisés

Nous avons utilisé une souche provenant de notre laboratoire (collection EVAg), une souche provenant d'une culture de l'IHU<sup>82</sup>, 7 extraits d'ADN qui nous ont été envoyés par le Centre National de Référence français des *Orthopoxvirus*, 5 ADN et souches importés du Royaume Uni (Animal and Plant Health Agency et Pirbright Institute) et un échantillon d'ADN provenant directement d'un prélèvement clinique de *Molluscum contagiosum* (AP-HM). Pour tester notre système sur des poxvirus plus rares (dont les souches ou les ADN n'étaient pas facilement disponibles) nous avons fait synthétiser des plasmides de 165 nucléotides contenant la séquence d'intérêt (GenScript®). Ces plasmides nous ont également permis d'établir nos gammes de quantification. Le détail des ADN utilisées et de leur provenance est disponible dans les Tableaux 2 et 3.

## **Extraction d'ADN**

Différents protocoles d'extraction ont été utilisés en fonction de la provenance des souches ou des ADN. Dans notre laboratoire nous avons utilisé EZ1 Advanced XL avec les kits Virus mini kit v2.0 ou EZ1 DNA Tissue Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) selon les recommandations du fabricant. Les échantillons humains et d'insectes pour les essais de spécificité ont été extraits avec le Qiacube - QIAamp cadaver Pathogen Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) selon les recommandations du fabricant. Le CNR des Orthopoxvirus a utilisé le QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) selon les recommandations du fabricant. APHA a utilisé le QIAamp Viral RNA mini kit (Qiagen, Manchester, UK) selon les recommandations du fabricant.

## **Protocoles de PCR**

En raison du haut degré de dégénérescence de nos oligonucléotides, les concentrations utilisées sont élevées en comparaison avec un système de PCR en temps réel classique.

Protocole SybrGreen®: volume de réaction final de 10µL contenant 3.5µL d'ADN, 5µL de 2x GoTaq® Green Master Mix (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) et 1250nM de chaque amorce.

Protocole TaqMan®: volume de réaction finale de 10µL contenant 3.5µL d'ADN, 5µL de EXPRESS One-Step SuperScript® qRT-PCR SuperMix (ThermoFisher scientific Waltham USA), 1250nM de chaque amorce, 1250nM de sonde "pan-pox" et 250nM de sonde spécifique haut GC%.

Nous avons utilisé plusieurs types de thermocycleurs : QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Villebon-sur-Yvette, France) ou Biorad CFX96 (Biorad Marnes-la-Coquette, France). Les conditions suivantes doivent être appliquées: 95°C durant 5 minutes puis 40 cycles [95°C durant 5 secondes, 45°C durant 20 secondes et 60°C durant 40 secondes]. Une étape de courbe de fusion doit être ajoutée pour la détection en système SybrGreen®: 95°C durant 15 secondes, 60°C durant 1 minute et une augmentation progressive de 0,05°C par seconde jusqu'à 95°C pendant 15 secondes.

## Séquençage nouvelle génération

Après une quantification d'ADN en utilisant le Qubit® dsDNA HS Assay Kit et Qubit 2.0 fluorometer (ThermoFisher Scientific), les amplicons ont été fragmentés par sonication en fragments d'environ 200 paires de bases. Les bibliothèques ont été construites en ajoutant les "barcodes" pour l'identification des échantillons (AB Library Builder System (ThermoFisher Scientific)). Afin de pooler équimolairement les échantillons barcodés, une étape de quantification avec le 2100 Bioanalyzer instrument (Agilent Technologies) a été réalisée. L'automate Ion Chef instrument (ThermoFisher) réalise une PCR en émulsion des pools et les charge sur la puce. Le séquençage a été effectué en utilisant le S5 Ion torrent technology (Thermo Fisher Scientific) selon les recommandations du fabricant. Les séquences consensus ont été obtenues après un "mappage" des reads sur une référence en utilisant le logiciel CLC (Qiagen). Des contigs *de novo* ont également été produites et blastées sur GenBank afin de s'assurer que la séquence consensus n'était pas affectée par la référence.

## Clonage et séquençage Sanger

Les amplicons (4µL) ont été clonés grâce au kit TOPO TA cloning (ThermoFisher Scientific) dans le plasmide pCR2.1 selon les recommandations du fabricant. Nous avons ensuite transformé les bactéries *Escherichia coli* One Shot™ TOP10 Chemically Competent (ThermoFisher Scientific) par choc thermique. Passage de 0°C à 42°C durant 30 secondes puis de nouveau 0°C. Les bactéries ont ensuite étéensemencées sur une gélose de LB agar contenant 25µg/mL de Kanamycine et 0,5 mM d'IPTG préalablement recouverte 60ul de Xgal (20mg/mL) permettant la coloration des bactéries n'ayant pas intégré l'amplicon. Trois colonies ont ensuite été multipliées par culture en milieu LB et l'ADN plasmidiques a été extrait grâce au kit Monarch Plasmid Miniprep Kit (NEB).

Pour le séquençage un puit de réaction contenait 4µL de plasmide purifié, 1µL de tampon (BigDye® Terminator v1.1 5X buffer – Applied Biosystem ThermoFisher Scientific), 2µL de BigDye ((BigDye® Terminator v1.1 5X buffer – Applied Biosystem ThermoFisher Scientific), l'amorce à 0.5µM et de l'eau stérile pour un volume total de 10µL par puit. Les amorces M13 sens et M13 reverse ont été utilisées comme préconisé dans le kit TOPO TA clonin. Le programme de températures appliqué est le suivant : dénaturation 95°C durant 5min puis 25 cycles composés de 5 secondes à 95°C, 5 secondes à 50°C et 3 minutes à 60°C



pour l'élongation. Une dernière étape de purification est réalisée par filtration sur résine Sephadex™. Nous avons ensuite utilisé le 3500XL genetic analyzer (Applied Biosystem ThermoFisher Scientific) pour le séquençage des amplicons obtenus. Les séquences ont été analysées par le logiciel ChromasPro® (Technelysium Pty Ltd)

# RESULTATS

## Choix du gène cible

Pour parvenir à isoler une séquence d'ADN ultra-conservée entre tous les poxvirus pouvant servir de cible à notre système de PCR en temps réel, nous avons utilisé la stratégie suivante :

La littérature scientifique recense une cinquantaine de gènes connus pour être conservés et communs aux différents genres de *Chordopoxvirinae*. Nous avons supposé qu'une séquence conservée chez tous les *Poxviridae* devait se trouver dans un gène commun entre les *Chordopoxvirinae* et les *Entomopoxvirinae*. Pour déterminer les gènes candidats, nous avons dans un premier temps constitué une base de données de toutes les séquences protéiques d'*Entomopoxvirinae* disponibles sur GenBank. Pour chacun des 50 gènes conservés décrits dans la littérature, nous avons récupéré la séquence protéique du *Monkeypox virus* qui est un des pox les plus éloigné des *Entomopoxvirinae*. Grâce à un logiciel de Blast interne au laboratoire, nous avons ensuite blasté chacune des 50 séquences protéiques du *Monkeypox virus* potentiellement conservées sur notre base de données contenant exclusivement des séquences d'*Entomopoxvirinae*. Le résultat de ce blast est donné en table 2.

Ensuite, nous avons constitué un panel de poxvirus représentatif de l'ensemble et de la diversité des poxvirus selon l'état actuel des connaissances. Nous avons pris soin de prendre au moins un représentant de chaque genre. Nous avons ensuite procédé à un alignement des séquences protéiques pour chacun des gènes potentiels en utilisant Clustal (MEGA 7)<sup>128</sup>. Nous avons soigneusement étudié chacun des alignements pour repérer une séquence protéique conservée. Pour les séquences protéiques conservées nous avons aligné la séquence correspondante en nucléotides. Nous avons appliqué, toujours en utilisant MEGA 7, un filtre de similarité des nucléotides à 80% sur notre panel pour visualiser les séquences conservées. Au final, nous n'avons trouvé qu'une seule région qui permettait le design d'amorces pour un système de qPCR. C'est une région proche de l'extrémité 5' du gène E6R (impliqué dans la morphogénèse des virions). Nous avons choisi cette séquence car c'était la seule qui présentait un minimum de 5 nucléotides d'affilés totalement conservés dans notre panel à proximité d'une autre séquence bien conservée pour le design de la seconde amorce. Mais même s'il s'agissait du meilleur résultat, nous avons dû fortement dégénérer les amorces.

Gènes potentiels	Bit score	Hsp score	Query cover %	Identity %	Evalue
E6R	963	375	98	36	3,82E-122
F9L	810	316	98	26	1,97E-92
I8R	742	290	96	30	9,44E-89
D1	517	203	101	26	2,51E-55
H6R	473	186	99	34	1,70E-57
J6R	468	184	99	34	9,98E-57
H2R	353	140	94	39	6,29E-43
A18R	346	137	71	30	3,57E-36
H4L	342	136	100	23	1,77E-33
J5L	334	133	93	36	4,67E-40
I7L	218	88	99	25	1,38E-19
E9L	200	81	74	33	1,68E-19
A2L	180	73	85	26	9,71E-17
E10R	137	57	31	35	2,23E-10
A23R	134	56	97	27	6,22E-11
G5R	132	55	54	26	8,25E-09
A11R	119	50	55	25	1,15E-07
A1L	116	49	47	27	2,52E-08
A24R	93	40	21	30	2,65E-04
D5R	79	35	38	31	4,66E-03
D6R	77	34	38	32	9,06E-03
H3L	No result	No result	No result	No result	No result
A5R	No result	No result	No result	No result	No result
D10R	No result	No result	No result	No result	No result
A21L	No result	No result	No result	No result	No result
D1R	No result	No result	No result	No result	No result
D13L	No result	No result	No result	No result	No result
D4R	No result	No result	No result	No result	No result
A7R	No result	No result	No result	No result	No result
A22R	No result	No result	No result	No result	No result
L5R	No result	No result	No result	No result	No result
E1L	No result	No result	No result	No result	No result
A28L	No result	No result	No result	No result	No result
D11L	No result	No result	No result	No result	No result
D12L	No result	No result	No result	No result	No result
F10L	No result	No result	No result	No result	No result
G6R	No result	No result	No result	No result	No result
L4R	No result	No result	No result	No result	No result
A3L	No result	No result	No result	No result	No result
G9R	No result	No result	No result	No result	No result
A29L	No result	No result	No result	No result	No result
L1R	No result	No result	No result	No result	No result
A9L	No result	No result	No result	No result	No result
A10L	No result	No result	No result	No result	No result
A16L	No result	No result	No result	No result	No result
A32L	No result	No result	No result	No result	No result
D7R	No result	No result	No result	No result	No result
G1L	No result	No result	No result	No result	No result
J3R	No result	No result	No result	No result	No result
L3L	No result	No result	No result	No result	No result

**Tableau 2:** Résultat du blast protéique des 49 gènes potentiellement conservés (séquences du *Monkeypox virus*) sur une base de données ne contenant que des séquences d'Entomopoxvirinae

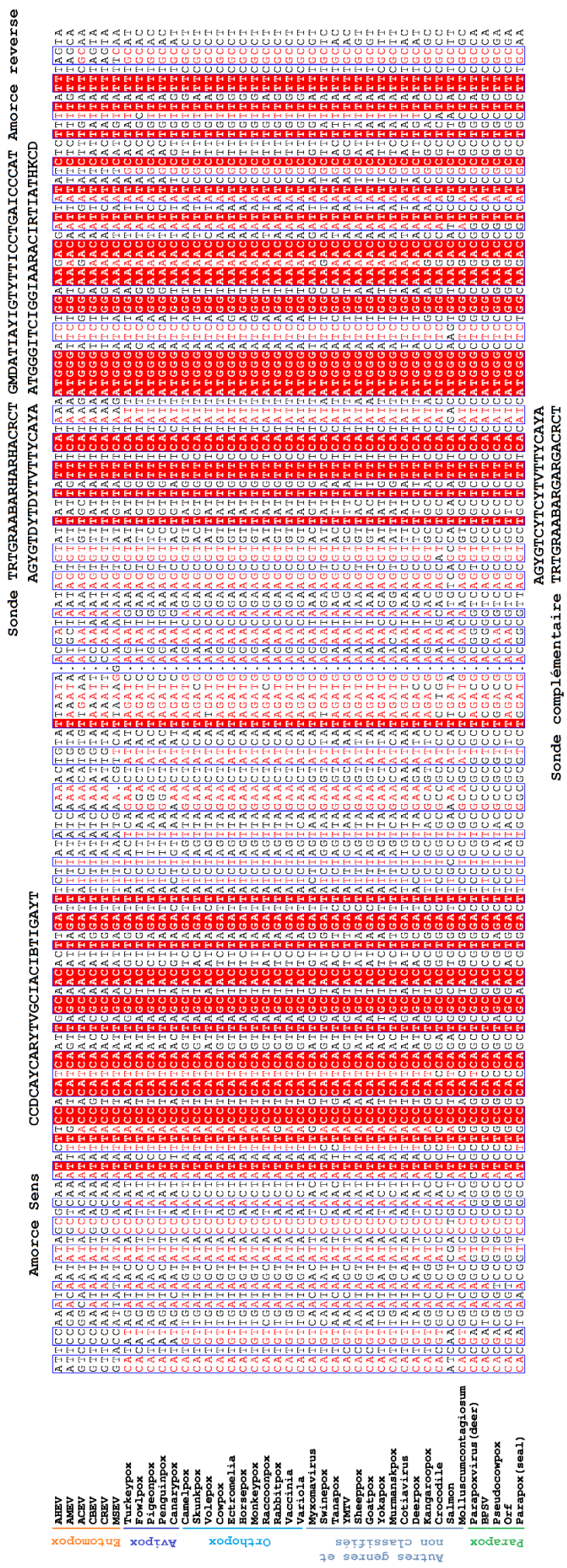
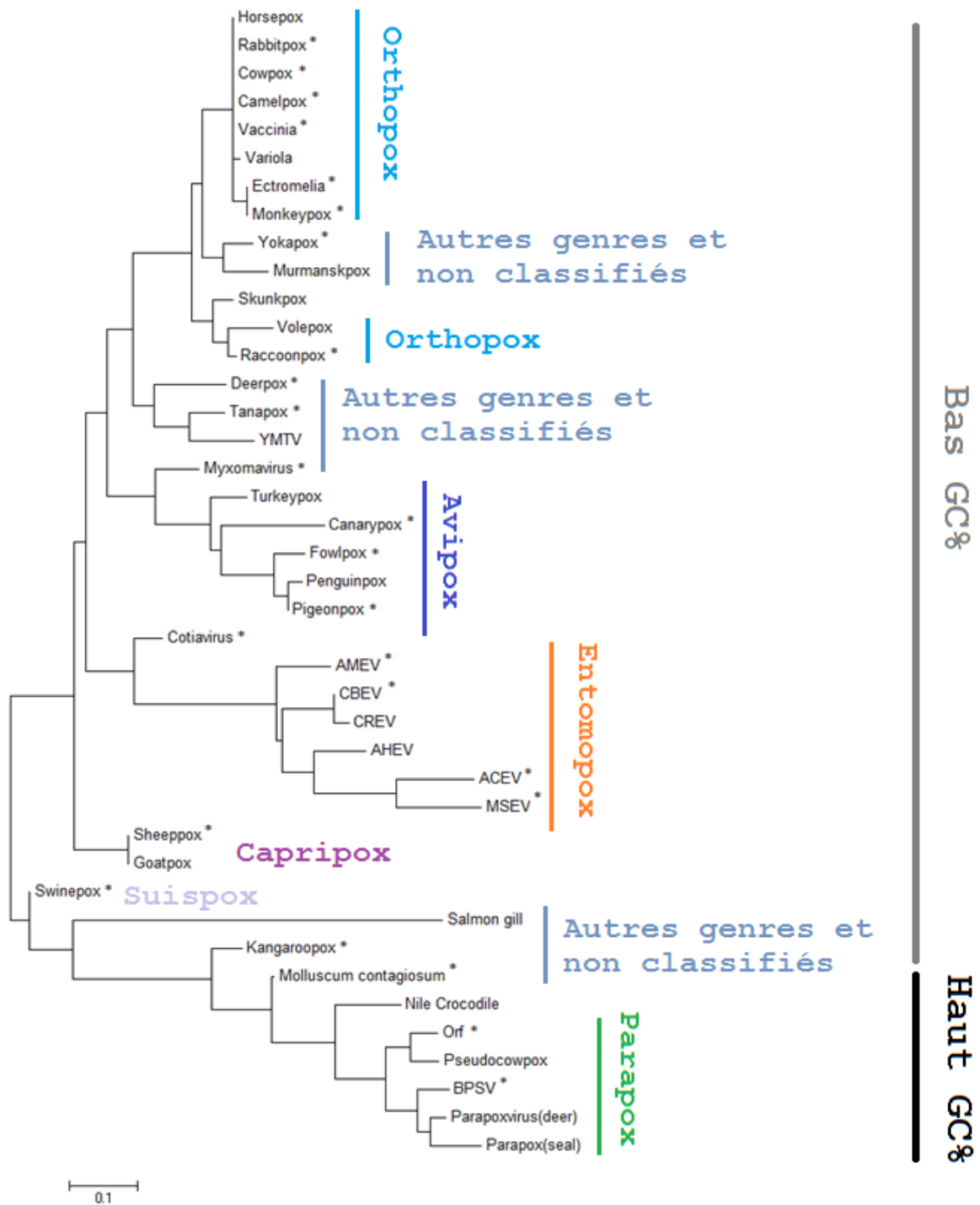


Figure 4: Alignement de la séquence conservée permettant la mise au point du système de qPCR "pan-pox". C'est une séquence à l'extrémité 5' du gène "E6R".



**Figure 5:** Arbre phylogénétique (MEGA 7) de la séquence amplifiée par notre système ciblant une courte séquence du gène E6R. Cette séquence de 104 nucléotides nous permettra de différencier les différents genres mais n'est pas discriminante au niveau de l'espèce. Les espèces qui ont été testées (souches ou plasmides sont marquées d'un astérisque).

## Spécificité *in silico*

Nous avons utilisé notre outils informatique de Blast local pour blaster toutes les possibilités d'amorces (sens 5'- 3' et sens 3'-5') sur une base de données complète des génomes disponibles sur NCBI. Les deux amorces peuvent s'hybrider sur une multitude de génomes de poxvirus (y compris des génomes très récemment rapportés). Cependant chacune des amorces en raison de leur haut degré de dégénérescence étaient également capable de blaster avec un score significatif sur d'autres organismes.

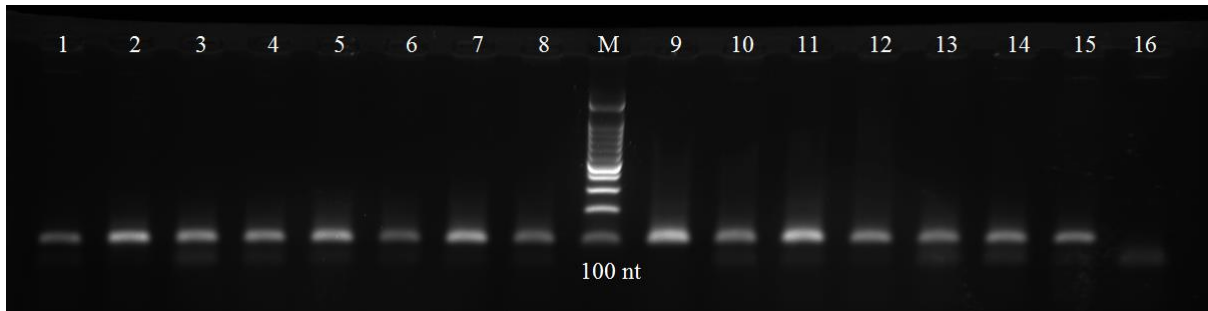
L'amorce sens est capable de blaster à 100% sur 3 espèces de *Streptomyces*, une plante (*Sesamum indicum*), une espèce animale (*Oryzias melastigma*) et une amibe (*Acytostelium subglobosum*). L'amorce reverse blaste sur des génome bactériens comme *Clostridium saccharoperbutylaceticum*, *Thalassotalea crassostreae*, *Enterobacter cloacae*, *Moorea producens*, *Pelosinus fermentans* ou fongiques (*Puccinia striiformis*). Elle est également capable de blaster sur un génome de plante (*Spirodela polyrhiza*) et sur un génome de macaque. Hormis les poxvirus, il n'y a aucun organisme en commun aux deux amorces. Nous avons également blasté les amorces sur une bases de données uniquement humaine. Nous avons obtenu un résultat pour l'amorce sens: "chromosome 20, whole genome shotgun sequence CM003702". Pour l'amorce anti-sens un seul résultat est ressorti: "chromosome 7, whole genome shotgun sequence CM003689". Malgré le haut taux de dégénérescence de nos amorces l'analyse *in silico* est rassurante et les amorces ne semble pas blaster sur un organisme commun en dehors des poxvirus.

## Système SybrGreen®

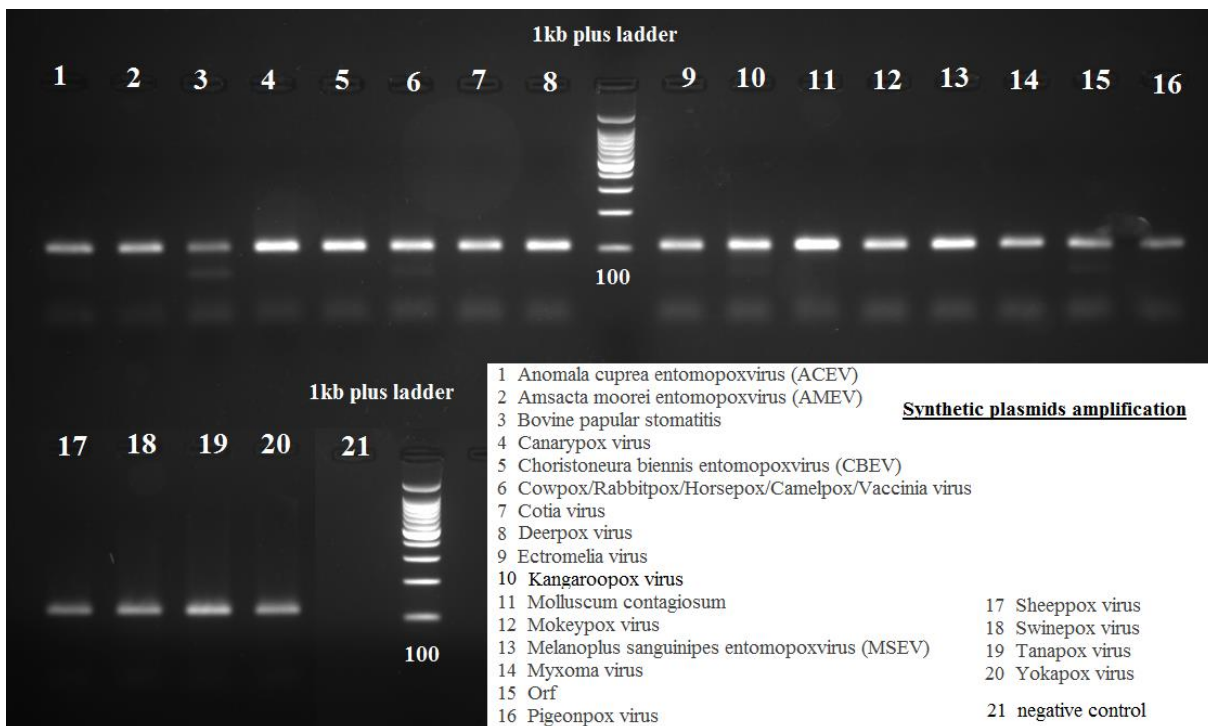
### SENSIBILITE ET PERFORMANCE DU SYSTEME

Initialement, nous avons développé le système pour une détection par SybrGreen® car nous pensions que la séquence n'était pas assez conservée pour la mise au point d'une sonde d'hydrolyse. Au total nous avons testé notre système avec succès sur 30 espèces différentes de poxvirus représentant 12 genres différents (incluant les *Entomopoxvirinae*, les *Avipoxvirus* et des espèces non encore classifiées). Nous avons confirmé que le signal de fluorescence correspondait bien à l'amplicon attendu par migration sur gel (photos 6 et 7). Nous observons une bande unique à environ 100 paires de bases. On observe également un dépôt moins net de petit poids moléculaire. Il s'agit très probablement de dimères d'amorces

en raison des quantités importantes d'amorces dégénérées dans le mélange. Le système en SybrGreen® nous permet de classer les poxvirus en deux catégories grâce aux courbes de fusion: génome à haut ou bas GC%. Pour les hauts GC%, la température de fusion se situe entre 79,5 et 83° selon les espèces et entre 72,5 et 76°C pour les bas GC% (figure 6).

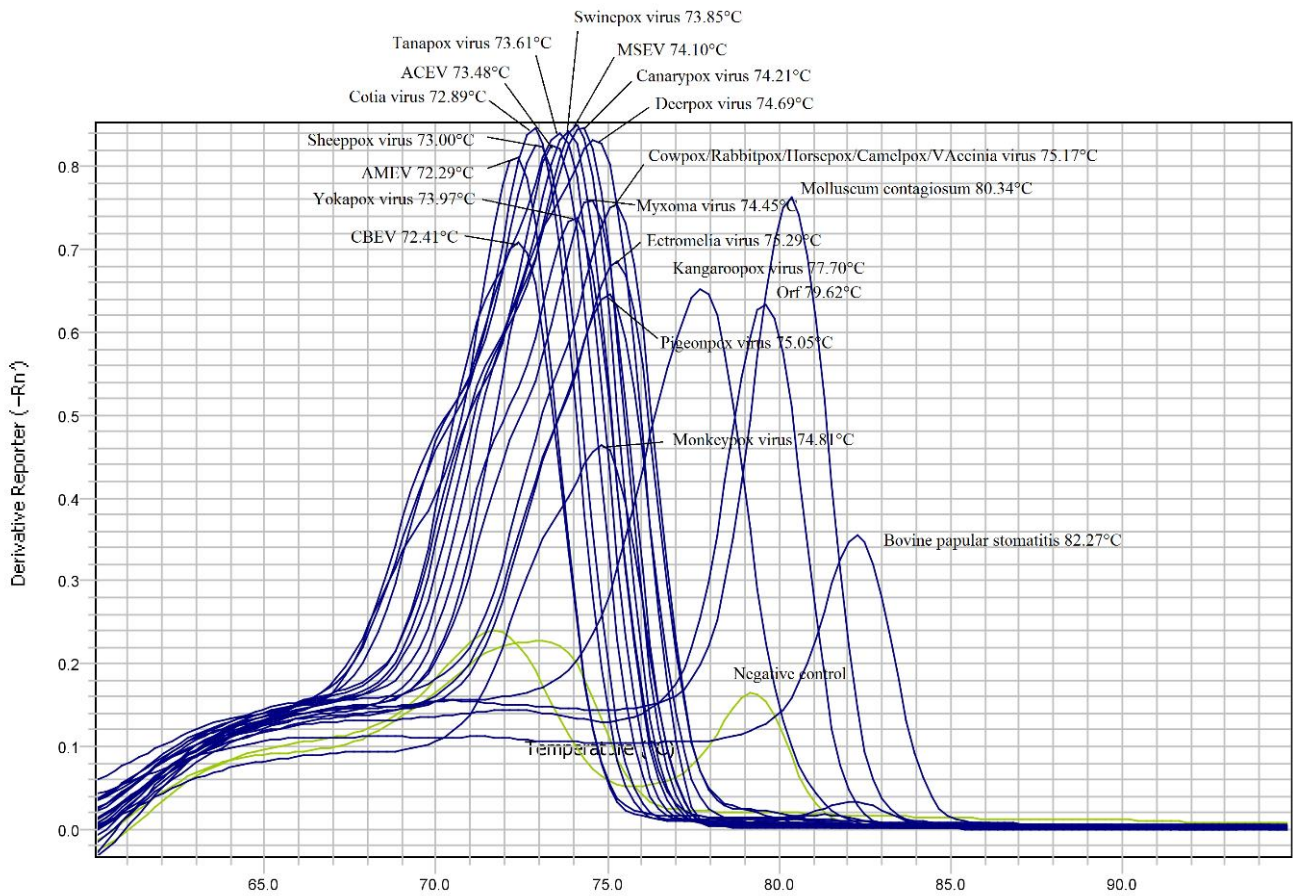


**Photo 6:** migration sur gel d'agarose des amplicons obtenus à partir de souches d'ADN de poxvirus. 1 *Fowlpox virus*, 2 *Lumpy skin disease*, 3 *Taterapox virus*, 4 *Camelpox virus*, 5 *Cowpox virus*, 6 *Racoonpox virus*, 7 *Buffalopox virus*, 8 *Catpox virus*, 9 *Vaccinia virus*, 10 *Rabbitpox virus*, 11 *Orf*, 12 *Orf bis*, 13 *Pseudocowpox virus*, 14 *Molluscum contagiosum*, 15 *Cetaceanpox virus*, 16 Témoin négatif



**Photo 7:** Migration sur gel d'agarose des amplicons obtenus à partir des 20 plasmides

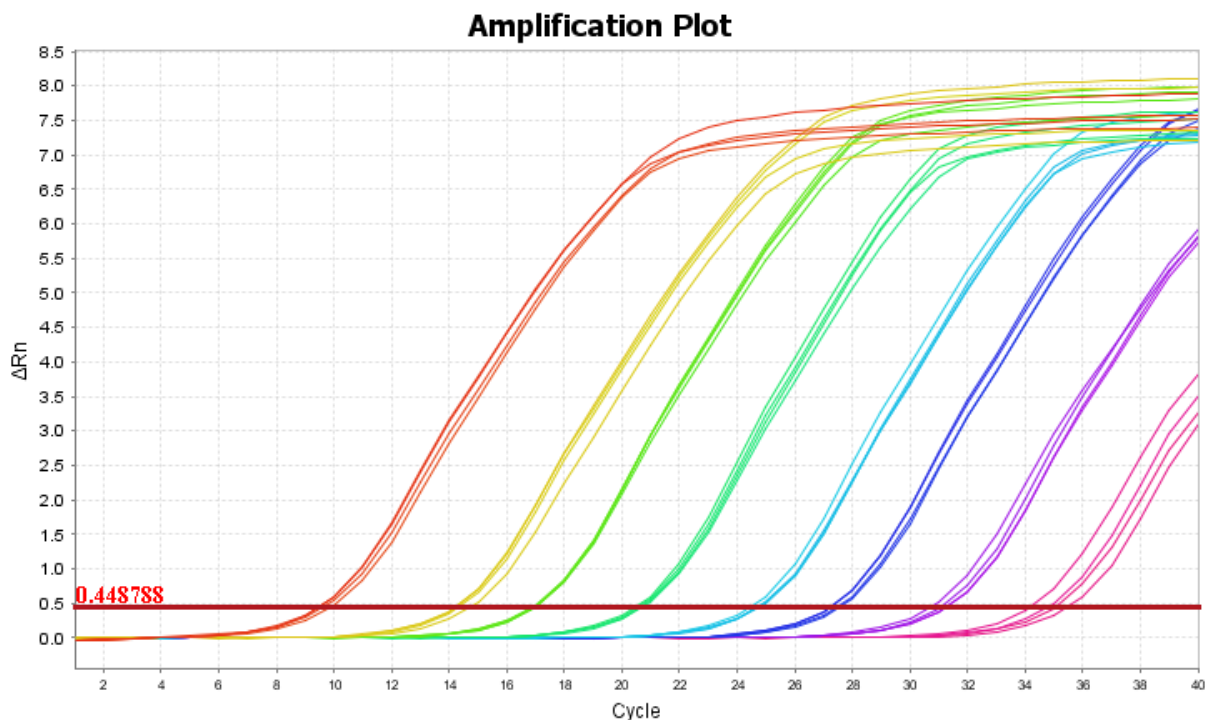
## Synthetic genes Melting curve Plot



**Figure 6 :** Visualisation des courbes de fusion des différentes espèces de poxvirus en système SybrGreen®. Comme prévu ce système de détection nous permet de différencier les poxvirus en deux catégories : les bas ou les hauts GC%. A noter que le *Kangaroopox virus* possède une température intermédiaire.



Pour évaluer les performances de notre système nous avons suivi les recommandations de Vaerman et al.<sup>129</sup> Nous avons dosé la concentration en ADN des 20 solutions de plasmides initiales en utilisant le spectrophotomètre Nanodrop®. Nous avons ensuite effectué des dilutions en cascade pour obtenir une gamme de  $10^9$  à  $10^2$  copies d'ADN dans le milieu de réaction. Chaque dilution a été testée en quadruplicat. Les valeurs du  $R^2$  sont comprises entre 0.950 et 0.998. Les valeurs de la pente entre -3.02 et -3.66. L'efficacité est entre 87.62% et 114.08%. Nous avons défini la limite de détection (LOD) comme la dernière dilution pour laquelle les 4 puits donnaient un signal de PCR positif. Neuf plasmides (incluant des *Entomopoxvirinae*) sont détectés avec une limite de détection très basse (100 copies d'ADN dans le milieu de réaction). Deux plasmides de parapoxvirus (Orf et BPSV) ont une limite de détection médiocre (10 000 copies d'ADN). Les autres plasmides sont détectés avec une LOD de 1000 copies d'ADN. Nous avons donc considéré que notre système présentait des performances satisfaisantes (détails dans la table 3).



**Figure 7:** Gamme de dilution en SybrGreen® de  $10^9$  à  $10^2$  copies d'ADN dans le milieu (dépôts en quadruplicats) pour le plasmide mimant le *Deerpox virus*

### **REPETABILITE ET REPRODUCTIBILITE (SYBRGREEN®)**

Pour les tests de répétabilité (variabilité intra essais), chaque échantillons d'ADN a été testé en 10 dépôts (pour les plasmides) et 5 dépôts (pour les ADN issus de souches) au sein de la même expérience (même opérateur, même matériel, même réactif, même moment). Concernant le système en SybrGreen®, nous nous sommes focalisé sur les température de fusion ( $T_m$ ) des amplicons par analyse des courbes de fusion. Pour chaque poxvirus nous avons calculé la  $T_m$  médiane et l'écart type associé en °C. Pour la reproductibilité (variabilité inter essais), les ADN étaient déposés en un seul exemplaire par expérience. Nous avons réparti les essais sur plusieurs semaines, plusieurs opérateurs et utilisé différents lots de réactifs et différents thermocycleurs. Les écart-types de température des  $T_m$  sont inférieurs ou égaux à 0,8°C pour tous les plasmides pour les variabilités intra et inter-essais. Nous avons donc considéré que notre système était reproductible et robuste. Détails en table 3.

### **COMPARAISON AUX SYSTEMES UTILISES EN ROUTINE (SYBRGREEN®)**

Nous avons comparé notre système "panpox" aux systèmes utilisés dans notre routine hospitalière. Nous utilisons deux systèmes de qPCR avec sonde: un pan-orthopox<sup>65</sup> et un pan-parapox<sup>130</sup> (genres impliqués en pathologie humaine). Nous avons testé tous nos ADN issus de souches en parallèle sur les deux systèmes. Nous avons mis les deux système en conditions optimales d'utilisation. Nous avons effectué deux runs sur le même thermocycleur à une heure d'écart (les programmes de température sont différents). Nous avons confirmé que les systèmes de routine sont incapables de détecter les genres avipox, capripox, ou molluscipox. Concernant les souches testées issues des genre orthopox et parapox, la détection par le système de routine est en moyenne plus précoce de 2 Ct (cycles d'amplification). A noter le cas inverse du Raccoonpox virus qui n'est détecté que tardivement par le système de routine pan-orthopox comparativement à notre système. Au total, ces résultats sont encourageant car les performances de notre système sont comparables à celles d'un système pan-genre utilisé en diagnostic, avec un spectre de détection considérablement élargi (détails en table 3).

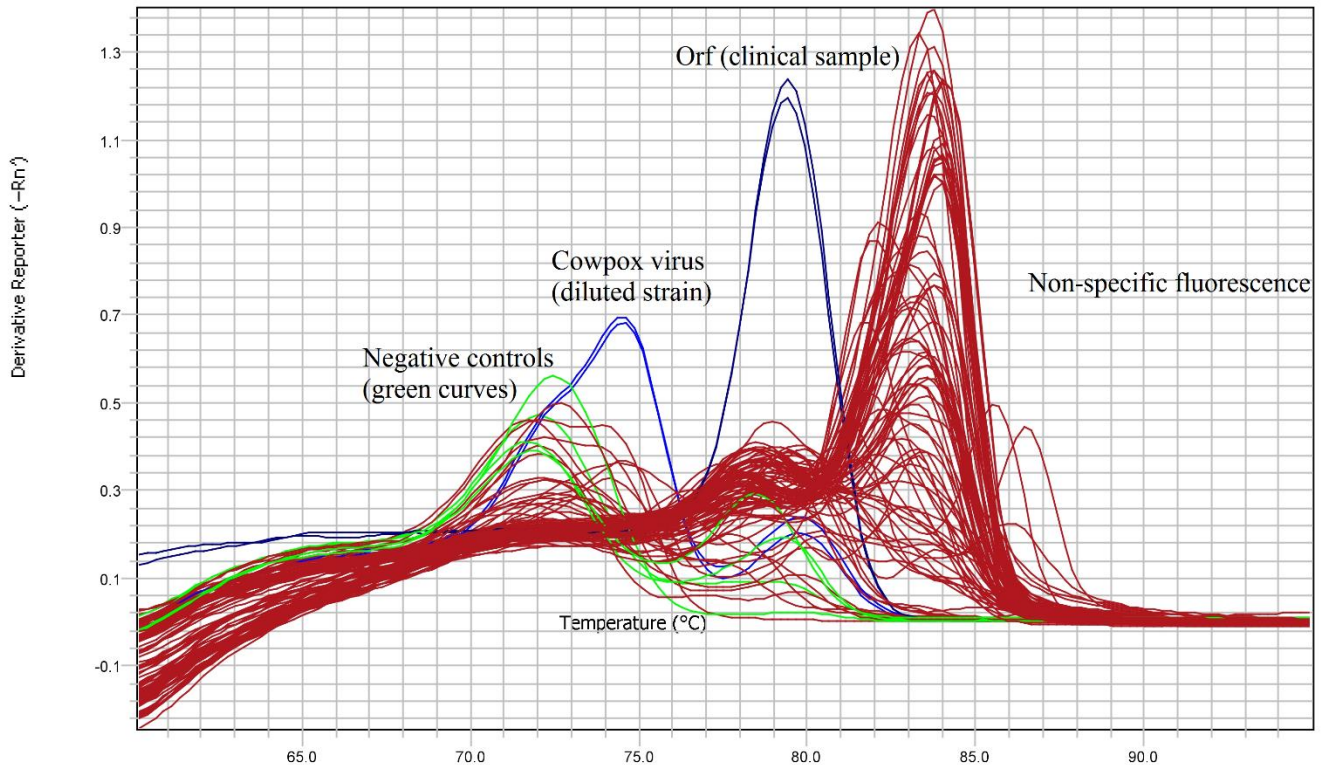
### **SPECIFICITE ET REGLES DE POSITIVITE (SYBRGREEN®)**

Nous avons testé 270 ADN extraits d'échantillons humains. Nous avons aussi testé notre système sur des ADN issus d'arthropodes (80 tiques et 93 phlébotomes). Nous avons alors réalisé que nous avons une émission de fluorescence non spécifique pour un grand

nombre d'échantillon. Cette fluorescence non spécifique apparait principalement sur des prélèvements humains à des Ct compris entre 20 et 30Ct (figure 8). Les Tm en revanche sont alors différentes des Tm attendues pour les Poxvirus.

Nous avons alors établi des règles de positivité basées sur les températures de fusion. Un échantillon est considéré comme potentiellement positif pour un poxvirus lorsque (i) la fluorescence émise est plus précoce que le témoin négatif (faible fluorescence intrinsèque du système due aux dimère d'amorces autour de 35 Ct); (ii) la courbe de fusion se présente bien définie en un pic unique et étroit. Cela est fastidieux car il est nécessaire de regarder en détail toutes les courbes de fusion; (iii) la température de fusion est comprise dans les plages de températures correspondant aux pox de bas GC% (72,5 et 76°C) ou aux pox de haut GC% (79,5 et 83°C).

## Melt Curve Plot



**Figure 8:** Courbes de fusion montrant la fluorescence non spécifique en SybrGreen® sur des prélèvements humains. Les températures sont différentes des températures attendues pour les poxvirus, ce qui nous a amené à mettre au point des règles de positivité.

Nous conseillons l'utilisation systématique de deux témoins positifs de bas et haut GC% pour avoir une référence intrinsèque à chaque expérience. Après application de ces règles de positivité il nous restait tout de même 27% des échantillons humains *a priori* négatifs qui remplissaient les critères de positivité. Il s'agit principalement des ADN extraits d'échantillons très cellulaires. Non n'avons pas eu de fluorescence non spécifique sur les échantillons de phlébotomes. Pour les tiques cette fluorescence non spécifique concerne environ 20% des échantillons (table 4). Une migration des produits de PCR sur gel d'agarose révèle des bandes, le plus souvent doubles, situées entre 250 et 500 paires de bases. La différenciation avec les amplicons issus des souches de poxvirus est alors bien visible (une bande unique de 100 paires de bases). Afin de réduire cette fluorescence non spécifique nous avons testé plus de 63 combinaisons d'amorces possible, testé différentes températures et temps d'élongation. Il

nous a été impossible de réduire cette fluorescence sans perdre en capacité de détection des poxvirus.

Nous avons également testé deux souches de virus à ADN (ADV and HSV), deux souches bactériennes, (*Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*), et deux témoins d'extraction utilisés dans la routine hospitalière (un bactériophage et le Tiss) ainsi que 4 ADN extraits de lignées cellulaires (Vero (singe), C6/36 (moustique), A549 (humain) and MDCK (chien)) qui ont donné des résultats comparables aux contrôles négatifs.

## Analyse Génétique

Afin de nous assurer que nous amplifions bien du poxvirus, nous avons séquencé les amplicons obtenus à partir des ADN de souches par NGS. En utilisant le logiciel CLC nous avons pu confirmer que nous amplifions bien de l'ADN de poxvirus par deux analyses. Premièrement, les reads obtenus ont été mappés sur une base de référence contenant les séquences de gènes E6R utilisées pour l'alignement de départ. Dans tous les cas nous avons obtenus un nombre important de reads (> 2 000) d'intérêt (104 nucléotides) qui mappaient avec 100% de similarité sur les séquences attendues. Secondairement un assemblage *de novo* des séquences a retrouvé des contigs d'une centaine de paires de bases qui, après vérification par un blast sur NCBI correspondent bien aux séquences de poxvirus amplifiées attendues. Comme expliqué dans la partie "choix du gène" avons été incapable de différencier les poxvirus génétiquement proches au sens du même genre (*Orthopoxvirus* principalement) sur ce seul amplicon.

Nous nous sommes également intéressé aux échantillons donnant des signaux de fluorescence non spécifiques chez l'homme. Une analyse par NGS retrouve plusieurs séquences assemblées *de novo* comprises entre 200 et 500 paires de bases qui blastent sur une ou deux séquences isolées du chromosome 19. Nous avons également essayé le séquençage par méthode Sanger de ces échantillons en utilisant directement nos amorces "pan-pox". Les séquences obtenues sont de faible qualité mais nous avons pu tout de même blaster certaines parties de ces séquences qui semblent indiquer qu'il s'agit également du chromosome 19 du génome humain. Enfin, nous avons également essayé de séquencer ces amplicons après un clonage en plasmide et culture bactérienne et là aussi nous retrouvons une séquence blastant sur le chromosome 19. Cependant, paradoxalement, nous n'arrivons pas à retrouver clairement la séquence de nos amorces dans les séquences amplifiées. Le motif ATGGG qui sont les 5 nucléotides conservés pour tous les poxvirus en 5' de l'amorce reverse est un motif assez

communément réparti dans le génome humain. Le motif GATT ou GACT qui est le motif terminal 3' de l'amorce sens est également un motif commun et dans le cadre de notre séquence amplifiée du chromosome 19, ce motif se retrouve plusieurs fois à moins de 500 nucléotides des motifs ATGGG. Cela pourrait expliquer les bandes doubles ou simples comprises entre 200 et 500 nucléotides observées sur gel.

En conclusion, nous n'avons pas réussi à déterminer avec précision quelles sont les séquences amplifiées donnant de la fluorescence non spécifique. Nous supposons, qu'en raison du très haut taux de dégénérescence de nos amorces et donc de leur forte concentration dans le milieu, il existe un risque d'hybridation non spécifique important médiée par des motifs de 4 à 6 nucléotides d'affilés conservés dans d'autres génomes. Pour les échantillons humains, trois méthodes de séquençage semblent indiquer que cette hybridation non spécifique se déroulerait principalement sur le chromosome 19. Malheureusement les diverses techniques de séquençage sur les amplicons issus d'insectes n'ont pas encore permis d'identifier la source du problème.

**Afin d'améliorer la spécificité de notre système et d'éviter un processus plutôt fastidieux d'analyse des courbes de fusion et de migration sur gel nous avons ré-envisagé la possibilité d'utiliser une sonde d'hydrolyse et sommes passé sur un système TaqMan®.**

**SYBRGREEN®**

**SYBRGREEN®**

Famille	Virus	Matériel génétique disponible	Origine	Limite de détection (copies d'ADN)	Coefficient de corrélation	Pente	Efficacité (%)	Ordonnée à l'origine	Réproductibilité (Tm médiane ± écart type standard °C)	Système de routine (Ct)	Système "Pan-pox" (Ct)
<b>CHORDOPOXVIRIDAE</b>											
<b>AVIPOX</b>	Canarypox virus	Synthetic plasmid	Genscript®	100	0.960	-3.38	97.6	40.9	73.8 ± 0.4	NA	NA
	Pigeonpox virus	Synthetic plasmid	Genscript®	100	0.998	-3.55	91.0	42.9	74.2 ± 0.2	NA	NA
	Fowlpox virus	Strain	APHA	NA	NA	NA	NA	NA	72.0 ± 0.8	Negative	18.3
<b>CAPRIPOX</b>	Lumpy skin disease	Strain	Pirbright Institute	NA	NA	NA	NA	NA	72.1 ± 0.1	Negative	21.0
	Sheeppox virus	Synthetic plasmid	Genscript®	100	0.997	-3.35	98.6	39.7	72.7 ± 0.4	NA	NA
<b>CERVIDPOX</b>	Deerpox virus	Synthetic plasmid	Genscript®	100	0.997	-3.44	94.9	41.6	74.3 ± 0.3	NA	NA
<b>LEPORIPOX</b>	Myxoma virus	Synthetic plasmid	Genscript®	1000	0.975	-3.51	95.4	51.5	74.0 ± 0.7	NA	NA
<b>MOLLUSCIPOX</b>	Molluscum contagiosum	Clinical sampling	APHM	NA	NA	NA	NA	NA	79.5 ± 0.2	Negative	26.1
	Monkeypox virus	Synthetic plasmid	Genscript®	1000	0.995	-3.15	107.3	43.9	79.6 ± 0.1	NA	NA
	Camelpox virus	Synthetic plasmid	Genscript®	100	0.978	-3.02	114.0	45.3	74.6 ± 0.3	NA	NA
<b>ORTHOPOX</b>	Camelpox virus	DNA	NRC orthopoxvirus	NA	NA	NA	NA	NA	73.5 ± 0.2	25.2	27.9
	Taterapox virus	Synthetic plasmid	Genscript®	1000	0.963	-3.03	113.9	44.0	74.4 ± 0.2	NA	NA
	Cowpox virus	Strain	UMR 190	NA	NA	NA	NA	NA	73.5 ± 0.1	25.4	27.8
	Ectromelia virus	DNA	NRC orthopoxvirus	NA	NA	NA	NA	NA	73.4 ± 0.2	22.5	25.3
	Buflpox virus	Synthetic plasmid	Genscript®	1000	0.963	-3.03	113.9	44.0	74.6 ± 0.3	NA	NA
	Raccoonpox virus	Synthetic plasmid	Genscript®	1000	0.994	-3.32	99.9	48.6	74.4 ± 0.2	NA	NA
	Çatpox virus	DNA	NRC orthopoxvirus	NA	NA	NA	NA	NA	73.6 ± 0.2	23.5	24.2
	Vaccinia virus	DNA	NRC orthopoxvirus	NA	NA	NA	NA	NA	73.4 ± 0.2	33.5	28.3
	Rabbitpox virus	DNA	NRC orthopoxvirus	NA	NA	NA	NA	NA	73.4 ± 0.3	24.6	27.0
	Bovine papular stomatitis (BPSV)	Synthetic plasmid	Genscript®	10,000	0.971	-3.66	87.6	47.9	81.9 ± 0.1	NA	NA
<b>PARAPOX</b>	Orf virus	Strain	APHM	NA	NA	NA	NA	NA	78.4 ± 0.3	22.7	25.7
	Pseudocowpox virus	DNA	APHA	NA	NA	NA	NA	NA	78.5 ± 0.3	21.2	23.9
	Swinepox virus	Synthetic plasmid	Genscript®	10,000	0.995	-3.63	88.2	47.7	79.3 ± 0.3	NA	NA
<b>SUIPOX</b>	Tanapox virus	DNA	APHA	NA	NA	NA	NA	NA	78.7 ± 0.3	23.9	28.9
	Cotia virus	Synthetic plasmid	Genscript®	1000	0.960	-3.57	90.2	46.1	73.0 ± 0.2	NA	NA
<b>YATAPOX</b>	Cetaeanpox virus	DNA	APHA	1000	0.958	-3.53	91.5	44.2	73.3 ± 0.1	NA	NA
	Kangarooepox virus	Synthetic plasmid	Genscript®	1000	0.956	-3.16	106.9	45.6	72.3 ± 0.1	NA	NA
<b>OTHERS</b>	Yokapox virus	Synthetic plasmid	Genscript®	1000	0.970	-3.33	99.5	45.2	76.7 ± 0.3	Negative	20.9
	Anomala cuprea entomopoxvirus (ACEV)	Synthetic plasmid	Genscript®	1000	0.950	-3.46	94.5	50.0	73.3 ± 0.3	NA	NA
<b>ENTOMOPOXVIRUS</b>											
<b>ALPHAEPV</b>	Choristoneura bienis entomopoxvirus (CBEV)	Synthetic plasmid	Genscript®	100	0.998	-3.40	96.2	39.7	72.9 ± 0.2	NA	NA
<b>BETAEPV</b>	Anisacta moorei entomopoxvirus (AMEV)	Synthetic plasmid	Genscript®	1000	0.999	-3.54	91.3	41.2	72.4 ± 0.4	NA	NA
	Melanoplus sanguinipes entomopoxvirus (MSEV)	Synthetic plasmid	Genscript®	100	0.984	-3.40	95.6	41.4	73.8 ± 0.3	NA	NA

**Tableau 3: performances du système en SybrGreen®**

TAQMAN®

Famille	Virus	Matériel génétique disponible	Origine
---------	-------	-------------------------------	---------

TAQMAN®

Limite de détection (copies d'ADN)	Coefficient de corrélation	Pente	Efficacité (%)	Ordonnée à l'origine	Réproductibilité (1m médiane ± écart type standard °C)	Système de routine (Ct)	Système "Pan-pox" (Ct)
------------------------------------	----------------------------	-------	----------------	----------------------	--	-------------------------	------------------------

CHORDOPOXVIRIDAE

AVIPOX	Canarypox virus	Synthetic plas mid	Genscript®
	Pigeonpox virus	Synthetic plas mid	Genscript®
	Fowlpox virus	Strain	APHA
CAPRIPOX	Lumpy skin disease	Strain	Pirbright Institute
	Sheeppox virus	Synthetic plas mid	Genscript®
CERVIDIPOX	Deerpoxx virus	Synthetic plas mid	Genscript®
	Myxoma virus	Synthetic plas mid	Genscript®
MOLLUSCIPPOX	Molluscum contagiosum	Clinical sampling	APHM
	Monkeypox virus	Synthetic plas mid	Genscript®
	Camelpox virus	Synthetic plas mid	Genscript®
ORTHOPOX	Camelpox virus	DNA	NRC orthopoxvirus
	Taterapox virus	Synthetic plas mid	Genscript®
	Cowpox virus	Strain	UMR 190
	Ectromélie virus	DNA	NRC orthopoxvirus
	Buffelpepox virus	DNA	NRC orthopoxvirus
	Racoonpox virus	DNA	NRC orthopoxvirus
	Caïpox virus	DNA	NRC orthopoxvirus
	Vaccinia virus	DNA	NRC orthopoxvirus
	Rabbitpox virus	Synthetic plas mid	Genscript®
	Bovine papular stomatitis (BPSV)	DNA	NRC orthopoxvirus
PARAPOX	Orf virus	Strain	APHM
	Pseudocowpox virus	DNA	APHA
	Swinepox virus	Synthetic plas mid	Genscript®
YATAPOX	Tanapox virus	Synthetic plas mid	Genscript®
	Cotia virus	Synthetic plas mid	Genscript®
OTHERS	Cetaceanpox virus	DNA	APHA
	Kangaroox virus	Synthetic plas mid	Genscript®
	Yokapox virus	Synthetic plas mid	Genscript®

CHORDOPOXVIRIDAE

100	0.975	-3.59	89.6	42.9	19.6 ± 1.8	NA	NA
1000	0.981	-3.83	82.2	50.3	27.4 ± 0.9	NA	NA
NA	NA	NA	NA	NA	25.1 ± 0.9	Negative	26.8
NA	NA	NA	NA	NA	23.8 ± 0.6	Negative	22.2
100	0.950	-3.39	97.2	38.9	17.3 ± 1.3	NA	NA
100	0.967	-3.45	94.9	39.6	19.1 ± 1.3	NA	NA
1000	0.948	-3.52	92.2	50.5	25.0 ± 1.3	NA	NA
NA	NA	NA	NA	NA	26.1 ± 1.6	Negative	28.4
100	0.966	-3.56	90.8	44.2	17.0 ± 1.4	NA	NA
100	0.956	-3.10	110.2	42.1	20.8 ± 0.9	NA	NA
NA	NA	NA	NA	NA	25.9 ± 1.2	27.1	25.2
1000	0.970	-3.18	106.2	41.1	18.7 ± 0.9	NA	NA
NA	NA	NA	NA	NA	24.9 ± 1.4	29.9	23.9
NA	NA	NA	NA	NA	23.4 ± 0.9	24.7	24.4
1000	0.970	-3.18	106.2	41.1	18.7 ± 0.9	NA	NA
100	0.969	-3.01	115.1	42.52	23.1 ± 1.7	NA	NA
NA	NA	NA	NA	NA	20.6 ± 1.7	26.4	20.0
NA	NA	NA	NA	NA	24.3 ± 1.1	35.1	26.0
NA	NA	NA	NA	NA	20.9 ± 0.9	27.0	26.7
NA	NA	NA	NA	NA	18.1 ± 0.6	17.8	18.6
1000	0.970	-3.18	106.2	41.1	18.7 ± 0.9	NA	NA
10,000	0.966	-3.46	94.5	47.4	23.7 ± 1.4	25.4	26.9
NA	NA	NA	NA	NA	25.8 ± 0.6	22.7	26.1
NA	NA	NA	NA	NA	25.9 ± 1.5	24.1	25.4
10,000	0.959	-3.13	108.4	43.5	26.8 ± 1.6	NA	NA
NA	NA	NA	NA	NA	29.3 ± 0.6	27.3	29.8
100	0.957	-3.49	93.4	48.2	25.4 ± 1.1	NA	NA
100	0.983	-3.57	90.3	45.7	18.2 ± 1.4	NA	NA
100	0.964	-3.37	97.6	44.8	22.9 ± 0.6	NA	NA
NA	NA	NA	NA	NA	19.7 ± 1.0	Negative	18.1
1000	0.990	-3.59	89.8	46.7	21.8 ± 1.1	NA	NA
100	0.966	-3.41	96.1	43.3	23.6 ± 1.4	NA	NA

ENTOMOPOXVIRUS

1000	0.972	-3.08	111.0	43.9	22.5 ± 0.6	NA	NA
100	0.966	-3.07	111.4	43.5	23.1 ± 1.4	NA	NA
1000	0.969	-3.70	86.2	50.8	24.2 ± 1.6	NA	NA
100	0.971	-3.58	90.0	40.3	17.9 ± 1.2	NA	NA

ENTOMOPOXVIRUS

1000	0.972	-3.08	111.0	43.9	22.5 ± 0.6	NA	NA
100	0.966	-3.07	111.4	43.5	23.1 ± 1.4	NA	NA
1000	0.969	-3.70	86.2	50.8	24.2 ± 1.6	NA	NA
100	0.971	-3.58	90.0	40.3	17.9 ± 1.2	NA	NA

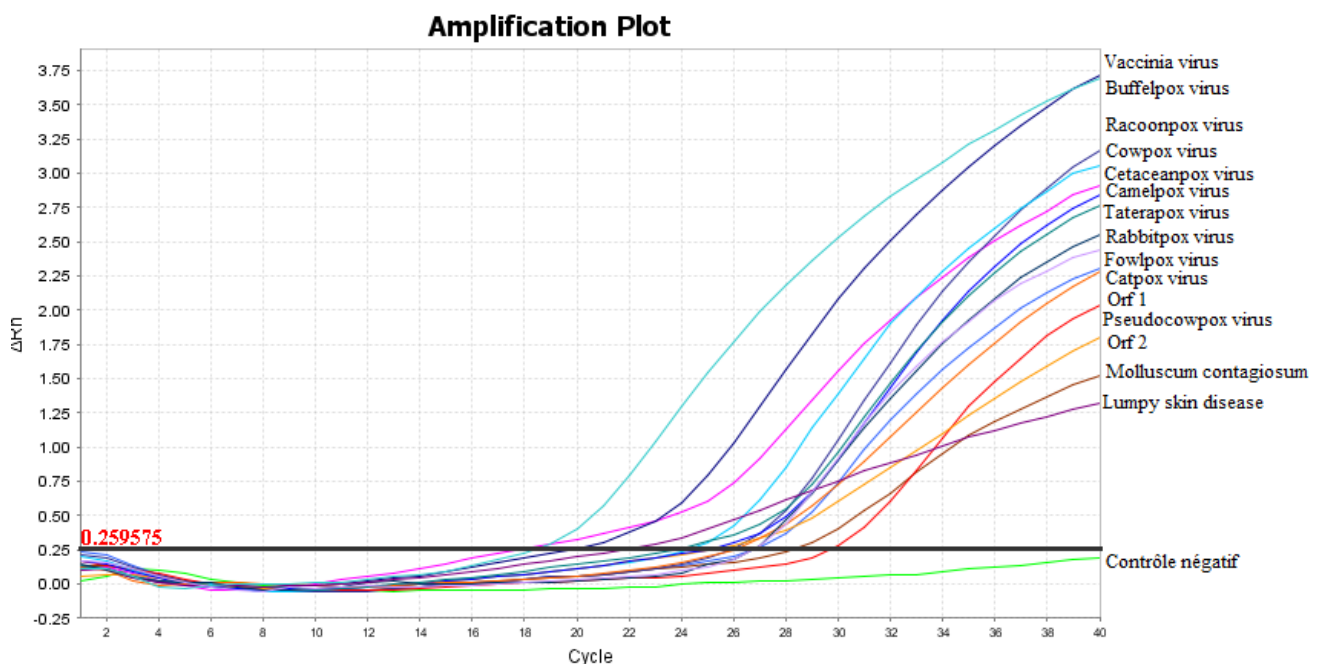
Tableau 4: performances du système en TaqMan®



# Système TaqMan®

## SENSIBILITE, REPRODUCTIBILITE, PERFORMANCES ET COMPARAISON A LA ROUTINE

Après de nombreux essais de différentes combinaisons de sonde, nous sommes arrivés à la conclusion qu'une sonde totalement "pan-pox" donc très dégénérée ne donnait pas des résultats aussi sensibles que le Système en SybrGreen®. Nous avons donc travaillé avec un mélange incluant un "supplément d'amorce" qui cible plus spécifiquement les *Parapoxvirus*. Nous avons soumis notre système en TaqMan® aux mêmes évaluations de performance que le système en SybrGreen®. Le  $R^2$  est compris entre 0.950 et 0.990. La pente est comprise entre -3.83 et -3.01 et l'efficacité entre 82.2 et 115.1%. Les limites de détection (dernière dilution donnant un signal de fluorescence pour les 4 dépôts) sont comprises entre 100 et 10 000 copies d'ADN dans le milieu réactionnel selon les plasmides. Comme pour le système en SybrGreen®, l'amplification des parapox est moins efficace comparée aux autres espèces. Pour la répétabilité nous avons procédé de la même manière que décrit pour le système SybrGreen® mais nous avons cette fois-ci travaillé avec les Ct et non plus les Tm. L'écart type maximal est à 1.8 Ct pour la répétabilité et 2.0 Ct pour la reproductibilité. Concernant la comparaison au système de routine, notre système est comparable voire meilleur que nos systèmes de routine excepté pour les parapoxvirus pour lesquels notre système est

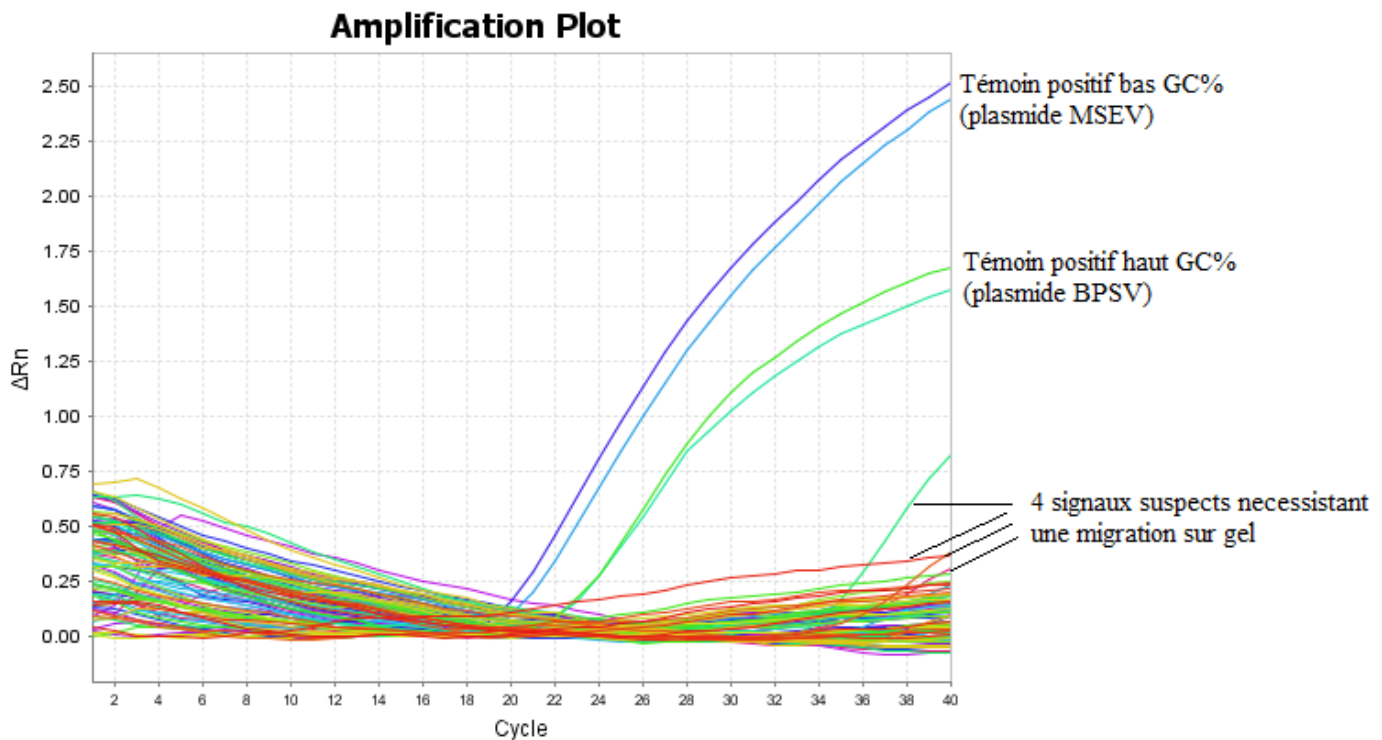


globalement un peu moins performant.

**Figure 9:** Courbes obtenues en système TaqMan pour les ADN issus de souches de poxvirus

## SPECIFICITE

La spécificité du système avec sonde par rapport au système en SybrGreen® est considérablement améliorée. Seulement 3% (en moyenne) des échantillons humains persistent à émettre un signal de fluorescence douteux. Ces signaux sont généralement faibles et non reproductibles lors d'une vérification par une seconde PCR. La spécificité sur les prélèvements d'insectes est de l'ordre de 95%.



**Figure 10:** Exemple de faux positifs en système TaqMan® sur un panel de 85 biopsies cutanée humaines. Après migration ces 4 échantillons ont révélé une bande unique à 300pdb et le séquençage n'a pas été possible car l'amplification était non reproductible.

**Tableau 5:** Détails des échantillons testés pour déterminer la spécificité des deux systèmes. Les chiffres (données brutes et pourcentages) correspondent aux nombre d'échantillons émettant un signal douteux qui nécessite une analyse par migration sur gel.

### Essais de spécificité

	Total	Données brutes		Pourcentage	
		SybrGreen	TaqMan	SybrGreen	TaqMan
Pharynx	93	4	0	4%	0%
Bio. Cutanée	85	28	4	33%	5%
Serum	8	0	0	0%	0%
Liq. Articulaires	8	3	0	38%	0%
Os	8	0	0	0%	0%
Urines	8	0	0	0%	0%
Vagin	8	2	0	25%	0%
Selles	8	2	0	25%	0%
Sang total	20	16	1	80%	5%
Salive	8	7	1	87%	12%
Valve Cardiaque	8	2	0	25%	0%
LCR	8	1	1	12%	12%
Ganglion	8	7	0	90%	0%
Tiques	80	15	4	19%	5%
Phlébotomes	93	0	0	0%	0%

Le système en TaqMan® présente donc une sensibilité similaire au système en SybrGreen®. Son avantage principal est une haute spécificité et surtout une interprétation des résultats facilitée comparativement aux règles instaurées pour le SybrGreen®. Cependant, en cas de vrai positif, il est impossible de savoir quelle catégorie de poxvirus est détectée sans séquençage alors que le système en SybrGreen® permet déjà une distinction entre haut et bas GC%.

# DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Concernant la détection de fluorescence, nous avons travaillé avec deux systèmes : un système de SybrGreen® avec un intercalant d'ADN et un système TaqMan® avec une sonde d'hydrolyse (FAM-MGB). Notre système a été testé avec succès sur toutes les souches de poxvirus que nous possédions ainsi que sur les plasmides contenant les séquences d'intérêt de poxvirus plus rares (y compris les *Entomopoxvirinae*). Les deux modes de détection présentent chacun des avantages et des inconvénients (Tableau 6). Ils sont toutefois performants et reproductibles. Leur utilisation peut être complémentaire.

**Tableau 6:** comparaison des deux systèmes de détections

SybrGreen®	TaqMan®
Sensibilité équivalente entre les deux systèmes	Sensibilité équivalente entre les deux systèmes
Règles d'interprétation en fonction des courbes de fusions fastidieuses	Interprétation facilitée : présence d'un signal de fluorescence ou non
Mauvaise spécificité surtout pour les prélèvements humains, de l'ordre de 70%	Bonne spécificité de l'ordre de 95%
Possibilité de différencier les poxvirus à haut ou bas GC% grâce à la température de fusion	Aucun indice sur le type de poxvirus sans passer par le séquençage ou par une autre PCR
Peu coûteux	Coût de la sonde FAM-MGB en grande quantité à prendre en compte

Notre système a des limites de détection très satisfaisantes si on considère son très large spectre. Dans la littérature on retrouve des systèmes spécifiques d'espèce avec des limites de détections de l'ordre de quelques dizaines de copies d'ADN<sup>75,121</sup>. Les systèmes conçus pour détecter la variole peuvent descendre jusqu'à 5 copies d'ADN<sup>65</sup>. Notre système possède des limites de détections majoritairement comprises entre 100 et 1000 copies d'ADN dans le milieu réactionnel. Les espèces de *Parapoxvirus* présentent des limites de détection plus élevées, à 10 000 copies d'ADN. Les *Parapoxvirus* sont des poxvirus à haut GC%. Avec le *Molluscum contagiosum* (et le *Nile crocodilepox virus*), ils ont un génome à part et cette évolution particulière par rapport au reste des autres poxvirus est actuellement inexplicée. Cependant cette branche de poxvirus semblent plutôt homogène puisque le système publié en 2010 par Li et al<sup>126</sup> est particulièrement robuste pour le système à haut GC%. Nous avons essayé différentes combinaisons d'amorces et de sondes pour améliorer la détection des *Parapoxvirus* malheureusement nous n'avons trouvé aucune combinaison qui nous permettait

de garder une aussi bonne sensibilité que sur les bas GC%. Nous avons donc décidé de ne pas "favoriser" les poxvirus haut GC% au détriment des bas GC% compte tenu de la diversité de ces derniers et donc du potentiel à découvrir de nouvelles espèces. Nous avons pu cependant mettre notre système à l'épreuve sur des poxvirus à haut GC% sur des ADN extraits directement de prélèvements. Nous avons pu détecter très précocement le *Molluscum contagiosum* à partir de de prélèvements cutanés. Nous avons également pu détecter des *Parapoxvirus* à partir d'extraits de tiques de bovins (*Pseudocowpox virus* et *Bovine Papular Stomatidis*). Ces tests sont donc rassurants sur la capacité "pan-pox" de notre système. De plus les cas de parapoxviroses rapportés dans la littérature donnent des nodules et des pustules pouvant être ulcéreuses. Les parapox se multiplient au sein de ces lésions cutanées localisées et les charges virales sont alors explosives. Même si notre système possède une limite de détection de 10 000 copies d'ADN, son utilisation reste possible sur un prélèvement cutané en cas de suspicion clinique de poxvirose.<sup>131,132</sup>

Concernant la spécificité de notre système, l'ajout d'une sonde a permis de diminuer significativement l'amplification non spécifique observée pour des prélèvements humains en SybrGreen® jusqu'à environ 5% des échantillons. Nous avons essayé différentes combinaisons d'amorces et de sondes pour limiter cette amplification non spécifique mais nous perdions en capacité de détection des poxvirus. Les échantillons potentiellement positifs sont donc vérifiés par une seconde PCR et passés sur gel. En cas de bande à 100 nucléotides nous passons les amplicons en NGS.

Dans les projets futurs, afin d'améliorer encore la spécificité, nous allons tester différents types de sondes spécifiques de genres ou de groupes de poxvirus sur la région amplifiée. Une sonde "pan-avipox", une sonde "pan-entomopox", une sonde "pan-haut GC%" et une sonde pour le reste de *Chordopoxvirinae*. Ainsi nous pourrions confirmer un résultat positif sans passer par migration sur gel ou NGS et cela nous permettrait d'avoir une première idée du poxvirus retrouvée. Enfin, afin d'améliorer la détermination de l'espèce détectée par notre système, nous travaillons actuellement à développer une PCR standard nichée sur ce même gène afin d'obtenir des amplicons de grande taille (500 à 1000bp) que nous pourrions séquencer par NGS.

Maintenant que le système est au point, nous allons commencer à l'utiliser à grande échelle pour la recherche de poxvirus. Pour cela, la routine hospitalière nous permet d'effectuer des recherches dans de nombreux prélèvements humains. L'UVE travaillant sur les arboviroses permet de fournir des cohortes d'insectes issus de différents pays. Le CNR des poxvirus associé à l'UVE est également un partenaire de premier plan pour permettre la

découverte de nouveaux poxvirus. Enfin, nous sommes actuellement en train de mettre en place un partenariat avec une école vétérinaire pour pouvoir récupérer des prélèvements d'animaux domestiques et sauvages, terrestre et aquatiques. En parallèle, au sein du laboratoire de l'UVE, nous sommes actuellement en train de travailler au développement de méthodes adaptées pour l'extraction et le séquençage du génome entier des poxvirus. Ainsi nous aurons la possibilité de séquencer de nouveaux poxvirus au laboratoire. Les poxvirus qui seront découverts et séquencés à l'UMR ont vocation à intégrer notre collection de souches virales européenne EVAg ce qui, en fournissant ces virus à l'ensemble de la communauté scientifique, permettra aux laboratoires qui s'intéressent aux poxvirus de mieux comprendre leur réplication leur origine, leur adaptation à l'hôte, leur pathogénicité ou encore les moyens de lutter contre eux.

# CONCLUSION

Les poxvirus constituent actuellement un défi de santé publique. La variole a été éradiquée grâce à la stratégie vaccinale de l'OMS mais également à l'absence de réservoir non humain. Depuis l'arrêt de la vaccination antivariolique et la diminution globale de l'immunité croisée, le virus Monkeypox reste le poxvirus le plus pathogène. Des cas sporadiques ou épidémiques ont été signalés dans des pays d'Afrique occidentale et centrale avec des taux de létalité de 1 à 10% et une transmission interhumaine. La fréquence des cas humains et animaux augmente progressivement et des éclosions d'autres infections à *Orthopoxvirus*, tels que le virus Cowpox, le virus Camelpox et le virus Buffalopox sont rapportées. De plus, les infections à *Parapoxvirus* et *Yatapoxvirus* (découvert récemment) suggèrent que d'autres genres pourraient constituer un problème de santé publique à l'avenir<sup>31,31,133,134</sup>. Cependant, leurs réservoirs naturels et leur capacité à changer d'hôte doivent être clarifiés. Par conséquent, les médecins et les vétérinaires doivent être mieux préparés à la réémergence de poxvirus connus ainsi qu'à l'émergence potentielle de poxvirus encore inconnus.

Les génomes des poxvirus sont parmi les plus complexes et les plus diversifiés parmi les virus connus. Les virus récemment découverts de la sous-famille des *Entomopoxvirinae* confirment que les poxvirus sont des virus très anciens qui existent probablement depuis le début de la vie animale. Leur évolution, parallèle à celle du règne animal, suggère que de nombreuses espèces restent à découvrir. A l'appui de cette hypothèse, la littérature rapporte fréquemment la découverte fortuite de nouveaux poxvirus. Actuellement, aucune étude systématique à grande échelle sur l'homme, les animaux ou l'environnement n'a été rapportée. Les nouveaux outils de biologie moléculaire tels que la métagénomique ont un coût important et nécessitent une instrumentation spécifique hors de portée de certains laboratoires. Par conséquent, la mise en place d'outils capables de découvrir rapidement de nouveaux poxvirus et de détecter tous les poxvirus connus et inconnus est attendue.

Ici, nous rapportons et validons les performances du premier système de détection PCR en temps réel ciblant une séquence nucléotidique ultra-conservée de poxvirus. La mise au point de ce système a été longue et complexe, mais nous avons maintenant la possibilité de l'utiliser à visée épidémiologique ou diagnostique. Il pourra donc être utilisé en médecine humaine ou vétérinaire face à une présentation clinique évocatrice de poxvirose. Il pourra être utilisé en épidémiologie systématique pour la découverte de nouvelles espèces de poxvirus (particulièrement dans le domaine des entomopoxvirus encore peu exploré) ou de nouveaux

réservoirs. En effet les coûts de la métagénomique ou du NGS ne sont pas encore adaptés au screening systématiques de grandes cohortes d'échantillons à l'aveugle.

Ce travail constitue un accélérateur de découvertes car d'autres laboratoires auront finalement la possibilité de découvrir eux-mêmes de nouveaux poxvirus. Ce système simple de qPCR, promet ainsi d'accéder à la partie immergée de l'iceberg du monde des poxvirus.



# BIBLIOGRAPHIE

1. Babkin, I. V. & Babkina, I. N. Molecular Dating in the Evolution of Vertebrate Poxviruses. *Intervirology* **54**, 253–260 (2011).
2. Spaulding, W. B. Donald R. Hopkins: Princes and Peasants: Smallpox in History. *Can. Bull. Med. Hist.* **1**, 132–134 (1984).
3. Macaulay, T. B. *The History of England from the Accession of James II.* (1848).
4. Ruffer, M. A. Pathological note on the royal mummies of the Cairo Museum. *Studies in the Paleopathology of Egypt* 166–178 (1921).
5. Littman, R. J. & Littman, M. L. The Athenian Plague: Smallpox. *Trans. Proc. Am. Philol. Assoc.* **100**, 261 (1969).
6. Virlovet, C., Tran, N. & Faure, P. *Rome, cité universelle de César à Caracalla 70 av J.-C.-212 apr. J.-C.* (2018).
7. Fenner, F. *et al.* *Smallpox and its eradication.* (Geneva : World Health Organization, 1988).
8. Duffy, J. Smallpox and the Indians in the American colonies. *Bull. Hist. Med.* **25**, 324–341 (1951).
9. Fitz, R. Review of The Effect of Smallpox on the Destiny of the Amerindian. *William Mary Q.* **3**, 454–456 (1946).
10. Mann, C. C. *1492 Nouvelles révélations sur les Amériques avant Christophe Colomb.* (Albin Michel, 2007).
11. Darmon, P. Vaccins et vaccinations avant Jenner: une querelle d'antériorité. *Hist. Économie Société* **3**, 583–592 (1984).
12. Jean-François Guégan & Marc Choisy. *Introduction à l'épidémiologie intégrative des maladies infectieuses et parasitaires.* (2008).
13. J. Austruy. *Origine de la vaccine.* (Ecole nationale vétérinaire, 1874).
14. Cartwright, K. From Jenner to modern smallpox vaccines. *Occup. Med.* **55**, 563–563 (2005).
15. Riedel, S. Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. *Proc. Bayl. Univ. Med. Cent.* **18**, 21–25 (2005).
16. Jenner, E. *An Inquiry Into the Causes and Effects of the Variolae Vaccinae, a Disease Discovered in Some of the Western Counties of England, Particularly Gloucestershire, and Known by the Name of the Cow Pox.* (Author, 1800).

17. Tan, S. Y. Edward Jenner (1749-1823): conqueror of smallpox. *Singapore Med. J.* **45**, 507–508 (2004).
18. Antoine, G., Scheiflinger, F., Dorner, F. & Falkner, F. G. The Complete Genomic Sequence of the Modified Vaccinia Ankara Strain: Comparison with Other Orthopoxviruses. *Virology* **244**, 365–396 (1998).
19. Belongia, E. A. & Naleway, A. L. Smallpox vaccine: the good, the bad, and the ugly. *Clin. Med. Res.* **1**, 87–92 (2003).
20. Schrick, L. *et al.* An Early American Smallpox Vaccine Based on Horsepox. *N. Engl. J. Med.* **377**, 1491–1492 (2017).
21. Biraben, J.-N. La diffusion de la vaccination en France au XIXe siècle. *Ann. Bretagne Pays Ouest* **86**, 265–276 (1979).
22. Marengo, C. 'Majeur et vacciné': idéologie et prévention. *Sci. Soc. Santé* **2**, 135–165 (1984).
23. Ilic, M. & Ilic, I. The last major outbreak of smallpox (Yugoslavia, 1972): The importance of historical reminders. *Travel Med. Infect. Dis.* **17**, 69–70 (2017).
24. Buller, R. M. & Fenner, F. Poxviruses. 387–408 (2009). doi:10.1128/9781555815981.ch18
25. Essbauer, S., Meyer, H., Porsch-Özcürümez, M. & Pfeffer, M. Long-Lasting Stability of Vaccinia Virus (Orthopoxvirus) in Food and Environmental Samples. *Zoonoses Public Health* **54**, 118–124 (2007).
26. Walsh, D. Poxviruses: Slipping and sliding through transcription and translation. *PLOS Pathog.* **13**, e1006634 (2017).
27. Karlstam, E., Tarjan, M., Sundell, E. & Scheltdorf, A. Collaborative Pathology in a Case of Human Pox Virus Dermatitis. *J. Comp. Pathol.* **158**, 137 (2018).
28. Eaglesham, J. B., Pan, Y., Kupper, T. S. & Kranzusch, P. J. Viral and metazoan poxins are cGAMP-specific nucleases that restrict cGAS–STING signalling. *Nature* (2019). doi:10.1038/s41586-019-0928-6
29. Pauli, G. *et al.* Orthopox Viruses: Infections in Humans. *Transfus. Med. Hemotherapy* **37**, 351–364 (2010).
30. Moss, B. Poxvirus DNA Replication. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, a010199–a010199 (2013).

31. Zhao, G. *et al.* The Genome of Yoka poxvirus. *J. Virol.* JVI.00637-11 (2011). doi:10.1128/JVI.00637-11
32. Theze, J. *et al.* New Insights into the Evolution of Entomopoxvirinae from the Complete Genome Sequences of Four Entomopoxviruses Infecting *Adoxophyes honmai*, *Choristoneura biennis*, *Choristoneura rosaceana*, and *Mythimna separata*. *J. Virol.* **87**, 7992–8003 (2013).
33. Tu, S.-L. *et al.* Characterization of Eptesipoxvirus, a novel poxvirus from a microchiropteran bat. *Virus Genes* 1–12 (2017). doi:10.1007/s11262-017-1485-4
34. Ibrahim, M. S. *et al.* Complete Genome Sequence of the Embu Virus Strain SPAn880. *Genome Announc.* **2**, e01155-14 (2014).
35. Afonso, P. P. *et al.* Biological characterization and next-generation genome sequencing of the unclassified Cotia virus SPAn232 (Poxviridae). *J. Virol.* JVI.07162-11 (2012). doi:10.1128/JVI.07162-11
36. O’Dea, M. A. *et al.* Genomic characterization of a novel poxvirus from a flying fox: evidence for a new genus? *J. Gen. Virol.* **97**, 2363–2375 (2016).
37. Stephen, A. A., Leone, A. M., Toplon, D. E., Archer, L. L. & Wellehan, J. F. X. Characterization of an Avipoxvirus From a Bald Eagle (*Haliaeetus leucocephalus*) Using Novel Consensus PCR Protocols for the rpo147 and DNA-Dependent DNA Polymerase Genes. *J. Avian Med. Surg.* **30**, 378–385 (2016).
38. Lawson, B. *et al.* Emergence of a Novel Avian Pox Disease in British Tit Species. *PLoS ONE* **7**, e40176 (2012).
39. Tuomi, P. A. *et al.* Novel poxvirus infection in northern and southern sea otters (*Enhydra lutris kenyoni* and *Enhydra lutris neiris*), alaska and california, USA. *J. Wildl. Dis.* **50**, 607–615 (2014).
40. Pandey, G. S. *et al.* Poxvirus infection in Nile crocodiles (*Crocodylus niloticus*). *Res. Vet. Sci.* **49**, 171–176 (1990).
41. Ramos, M., Coutinho, S., Matushima, E. & Sinhorini, I. Poxvirus dermatitis outbreak in farmed Brazilian caimans (*Caiman crocodilus yacare*). *Aust. Vet. J.* **80**, 371–372 (2002).
42. Gjessing, M. C. *et al.* Salmon gill poxvirus, the deepest representative of the Chordopoxvirinae. *J. Virol.* JVI.01174-15 (2015). doi:10.1128/JVI.01174-15

43. Gjessing, M. C., Thoen, E., Tengs, T., Skotheim, S. A. & Dale, O. B. Salmon gill poxvirus, a recently characterized infectious agent of multifactorial gill disease in freshwater- and seawater-reared Atlantic salmon. *J. Fish Dis.* **40**, 1253–1265 (2017).
44. Nylund, A. *et al.* Morphogenesis of salmonid gill poxvirus associated with proliferative gill disease in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway. *Arch. Virol.* **153**, 1299–1309 (2008).
45. Baxby, D. Poxvirus hosts and reservoirs. *Arch. Virol.* **55**, 169–179 (1977).
46. Meadows, K. P., Tying, S. K., Pavia, A. T. & Rallis, T. M. Resolution of Recalcitrant Molluscum Contagiosum Virus Lesions in Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients Treated With Cidofovir. *Arch. Dermatol.* **133**, 987–990 (1997).
47. López-Bueno, A., Parras-Moltó, M., López-Barrantes, O., Belda, S. & Alejo, A. Recombination events and variability among full-length genomes of co-circulating molluscum contagiosum virus subtypes 1 and 2. *J. Gen. Virol.* **98**, 1073–1079 (2017).
48. Trama, J. P., Adelson, M. E. & Mordechai, E. Identification and genotyping of molluscum contagiosum virus from genital swab samples by real-time PCR and Pyrosequencing. *J. Clin. Virol.* **40**, 325–329 (2007).
49. Hosamani, M. *et al.* Differentiation of Sheep Pox and Goat Poxviruses by Sequence Analysis and PCR-RFLP of P32 Gene. *Virus Genes* **29**, 73–80 (2004).
50. Gaskell, R. *et al.* Natural and experimental pox virus infection in the domestic cat. *Vet. Rec.* **112**, 164–170 (1983).
51. Bennett, M., Gaskell, C. J., Gaskell, R. M., Baxby, D. & Gruffydd-Jones, T. J. Poxvirus infection in the domestic cat: some clinical and epidemiological observations. *Vet. Rec.* **118**, 387–390 (1986).
52. Martland, M., Fowler, S., Poulton, G. & Baxby, D. Pox virus infection of a domestic cat. *Vet. Rec.* **112**, 171–172 (1983).
53. Baxby, D. Human poxvirus infection after the eradication of smallpox. *Epidemiol. Amp Infect.* **100**, 321–334 (1988).
54. Mauldin, M. *et al.* Cowpox virus: What's in a Name? *Viruses* **9**, 101 (2017).
55. Prabhu, M. Camelpox and Buffalopox: Two Emerging and Re-emerging Orthopox Viral Diseases of India. *Adv. Anim. Vet. Sci.* **3**, 527–541 (2015).
56. Doshi, R. H. *et al.* Epidemiologic and Ecologic Investigations of Monkeypox, Likouala Department, Republic of the Congo, 2017. *Emerg. Infect. Dis.* **25**, 281–289 (2019).

57. Woolhouse, M. E. J. & Gowtage-Sequeria, S. Host Range and Emerging and Reemerging Pathogens. *Emerg. Infect. Dis.* **11**, 1842–1847 (2005).
58. Grossegeesse, M., Doellinger, J., Haldemann, B., Schaade, L. & Nitsche, A. A Next-Generation Sequencing Approach Uncovers Viral Transcripts Incorporated in Poxvirus Virions. *Viruses* **9**, 296 (2017).
59. Haller, S. L., Peng, C., McFadden, G. & Rothenburg, S. Poxviruses and the evolution of host range and virulence. *Infect. Genet. Evol.* **21**, 15–40 (2014).
60. Berche, P. The threat of smallpox and bioterrorism. *Trends Microbiol.* **9**, 15–18 (2001).
61. Alibek, K. & Handelman, S. *Biohazard: the chilling true story of the largest covert biological weapons program in the world, told from the inside by the man who ran it.* (Random House, 1999).
62. Lane, H. C., Montagne, J. L. & Fauci, A. S. Bioterrorism: A clear and present danger. *Nat. Med.* **7**, nm1201-1271–1271 (2001).
63. Noyce, R. S., Lederman, S. & Evans, D. H. Construction of an infectious horsepox virus vaccine from chemically synthesized DNA fragments. *PLOS ONE* **13**, e0188453 (2018).
64. Kupferschmidt, K. Labmade smallpox is possible, study shows. *Science* **357**, 115–116 (2017).
65. Kulesh, D. A. *et al.* Smallpox and pan-Orthopox Virus Detection by Real-Time 3'-Minor Groove Binder TaqMan Assays on the Roche LightCycler and the Cepheid Smart Cycler Platforms. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 601–609 (2004).
66. Wagar, E. Bioterrorism and the Role of the Clinical Microbiology Laboratory. *Clin. Microbiol. Rev.* **29**, 175–189 (2016).
67. Kurth, A. *et al.* Orthopoxvirus Detection in Environmental Specimens during Suspected Bioterror Attacks: Inhibitory Influences of Common Household Products. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 32–37 (2008).
68. Breman, J. G. & Henderson, D. A. Diagnosis and Management of Smallpox. *N. Engl. J. Med.* **346**, 1300–1308 (2002).
69. LeDuc, J. W. & Becher, J. Current status of smallpox vaccine. *Emerg. Infect. Dis.* **5**, 593–594 (1999).
70. Andrei, G. & Snoeck, R. Cidofovir Activity against Poxvirus Infections. *Viruses* **2**, 2803–2830 (2010).

71. Bray, M. *et al.* Cidofovir Protects Mice against Lethal Aerosol or Intranasal Cowpox Virus Challenge. *J. Infect. Dis.* **181**, 10–19 (2000).
72. De Clercq, E. Cidofovir in the treatment of poxvirus infections. *Antiviral Res.* **55**, 1–13 (2002).
73. Duraffour, S. *et al.* Emergence of Cowpox: Study of the Virulence of Clinical Strains and Evaluation of Antivirals. *PLoS ONE* **8**, e55808 (2013).
74. Smith, G. L. & McFadden, G. Smallpox: anything to declare? *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 521 (2002).
75. Atkin, J. W., Radford, A. D., Coyne, K. P., Stavisky, J. & Chantrey, J. Detection of squirrel poxvirus by nested and real-time PCR from red (*Sciurus vulgaris*) and grey (*Sciurus carolinensis*) squirrels. *BMC Vet. Res.* **6**, 33 (2010).
76. Kane, O. J. *et al.* Avian Pox in Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*). *J. Wildl. Dis.* **48**, 790–795 (2012).
77. Baxby, D., Ashton, D. G., Jones, D. M. & Thomsett, L. R. An outbreak of cowpox in captive cheetahs: virological and epidemiological studies. *Epidemiol. Amp Infect.* **89**, 365–372 (1982).
78. Fenner, F. & Nakano, J. H. Poxviridae: The Poxviruses. in *Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases Principles and Practice* 177–210 (Springer, New York, NY, 1988). doi:10.1007/978-1-4612-3900-0\_10
79. Lakis, N. S. *et al.* Novel Poxvirus Infection in an Immune Suppressed Patient. *Clin. Infect. Dis.* **61**, 1543–1548 (2015).
80. Barraviera, S. R. C. S. Diseases caused by poxvirus - orf and milker's nodules: a review. *J. Venom. Anim. Toxins Trop. Dis.* **11**, 102–108 (2005).
81. Goldsmith, C. S. *et al.* Emergence of Previously Unknown Poxviruses. *Microsc. Microanal.* **22**, 1184–1185 (2016).
82. David, L. *et al.* Nodule d'Orf: second génome viral décrit et séquencé chez l'homme. *Ann. Dermatol. Vénérologie* **145**, S292 (2018).
83. Andreani, J. *et al.* Atypical Cowpox Virus Infection in Smallpox-Vaccinated Patient, France. *Emerg. Infect. Dis.* **25**, 212–219 (2019).
84. Ninove, L. *et al.* Cowpox Virus Transmission from Pet Rats to Humans, France. *Emerg. Infect. Dis.* **15**, 781–784 (2009).
85. Wolfs, T. F. W., Wagenaar, J. A., Niesters, H. G. M. & Osterhaus, A. D. M. E. Rat-to-human transmission of Cowpox infection. *Emerg. Infect. Dis.* **8**, 1495–1496 (2002).

86. Czerny, C. P., Zeller-Lue, C., Eis-Hübinger, A. M., Kaaden, O. R. & Meyer, H. Characterization of a cowpox-like orthopox virus which had caused a lethal infection in man. *Arch. Virol. Suppl.* **13**, 13–24 (1997).
87. Smithson, C. *et al.* Two novel poxviruses with unusual genome rearrangements: NY\_014 and Murmansk. *Virus Genes* 1–15 (2017). doi:10.1007/s11262-017-1501-8
88. Damaso, C. R., Esposito, J. J., Condit, R. C. & Moussatché, N. An emergent poxvirus from humans and cattle in Rio de Janeiro State: Cantagalo virus may derive from Brazilian smallpox vaccine. *Virology* **277**, 439–449 (2000).
89. Poxvirus Dilemmas. *N. Engl. J. Med.* **339**, 2027–2028 (1998).
90. Verheust, C., Goossens, M., Pauwels, K. & Breyer, D. Biosafety aspects of modified vaccinia virus Ankara (MVA)-based vectors used for gene therapy or vaccination. *Vaccine* **30**, 2623–2632 (2012).
91. Bhanuprakash, V. *et al.* Camel pox: epidemiology, diagnosis and control measures. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **8**, 1187–1201 (2010).
92. Bera, B. C. *et al.* Zoonotic cases of camel pox infection in India. *Vet. Microbiol.* **152**, 29–38 (2011).
93. Bray, M. & Babiuk, S. Camel pox: Target for eradication? *Antiviral Res.* **92**, 164–166 (2011).
94. Duraffour, S., Meyer, H., Andrei, G. & Snoeck, R. Camel pox virus. *Antiviral Res.* **92**, 167–186 (2011).
95. Kriz, B. A study of camel pox in Somalia. *J. Comp. Pathol.* **92**, 1–8 (1982).
96. Baxby, D. Smallpox-like viruses from camels in Iran. *The Lancet* **300**, 1063–1065 (1972).
97. Gubser, C. & Smith, G. L. The sequence of camel pox virus shows it is most closely related to variola virus, the cause of smallpox. *J. Gen. Virol.* **83**, 855–872 (2002).
98. Kolhapure, R. M. *et al.* Investigation of buffalopox outbreaks in Maharashtra State during 1992–1996. *Indian J. Med. Res.* **106**, 441–446 (1997).
99. Venkatesan, G. *et al.* Emerging and re-emerging zoonotic buffalopox infection: a severe outbreak in Kolhapur (Maharashtra), India. *Vet Ital* **46**, 10 (2010).
100. Zafar, A. *et al.* Nosocomial Buffalopoxvirus Infection, Karachi, Pakistan. *Emerg. Infect. Dis.* **13**, 902–904 (2007).
101. Essbauer, S., Pfeffer, M. & Meyer, H. Zoonotic poxviruses. *Vet. Microbiol.* **140**, 229–236 (2010).

102. Rimoin, A. W. *et al.* Endemic Human Monkeypox, Democratic Republic of Congo, 2001–2004. *Emerg. Infect. Dis.* **13**, 934–937 (2007).
103. Durski, K. N. *et al.* Emergence of Monkeypox — West and Central Africa, 1970–2017. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **67**, 306–310 (2018).
104. Yinka-Ogunleye, A. *et al.* Reemergence of Human Monkeypox in Nigeria, 2017. *Emerg. Infect. Dis.* **24**, 1149–1151 (2018).
105. Vaughan, A. *et al.* Two cases of monkeypox imported to the United Kingdom, September 2018. *Eurosurveillance* **23**, (2018).
106. Mahalingam, S., Damon, I. K. & Lidbury, B. A. 25 years since the eradication of smallpox: why poxvirus research is still relevant. *Trends Immunol.* **25**, 636–639 (2004).
107. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Multistate outbreak of monkeypox--Illinois, Indiana, and Wisconsin, 2003. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **52**, 537–540 (2003).
108. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Update: multistate outbreak of monkeypox--Illinois, Indiana, Kansas, Missouri, Ohio, and Wisconsin, 2003. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **52**, 589–590 (2003).
109. Lefkowitz, E. J., Wang, C. & Upton, C. Poxviruses: past, present and future. *Virus Res.* **117**, 105–118 (2006).
110. Upton, C., Slack, S., Hunter, A. L., Ehlers, A. & Roper, R. L. Poxvirus Orthologous Clusters: toward Defining the Minimum Essential Poxvirus Genome. *J. Virol.* **77**, 7590–7600 (2003).
111. Hughes, A. L., Irausquin, S. & Friedman, R. The evolutionary biology of poxviruses. *Infect. Genet. Evol.* **10**, 50–59 (2010).
112. Ehlers, A., Osborne, J., Slack, S., Roper, R. L. & Upton, C. Poxvirus Orthologous Clusters (POCs). *Bioinformatics* **18**, 1544–1545 (2002).
113. Offerman, K., Carulei, O., van der Walt, A. P., Douglass, N. & Williamson, A.-L. The complete genome sequences of poxviruses isolated from a penguin and a pigeon in South Africa and comparison to other sequenced avipoxviruses. *BMC Genomics* **15**, 463 (2014).
114. Gyuranecz, M. *et al.* Worldwide Phylogenetic Relationship of Avian Poxviruses. *J. Virol.* **87**, 4938–4951 (2013).
115. Olson, V. A. *et al.* Real-Time PCR System for Detection of Orthopoxviruses and Simultaneous Identification of Smallpox Virus. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 1940–1946 (2004).



116. Mangana-Vougiouka, O. *et al.* Sheep poxvirus identification by PCR in cell cultures. *J. Virol. Methods* **77**, 75–79 (1999).
117. Maksyutov, R. A., Gavrilova, E. V., Meyer, H. & Shchelkunov, S. N. Real-time PCR assay for specific detection of cowpox virus. *J. Virol. Methods* **211**, 8–11 (2015).
118. McLysaght, A., Baldi, P. F. & Gaut, B. S. Extensive gene gain associated with adaptive evolution of poxviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 15655–15660 (2003).
119. Li, Y., Olson, V. A., Laue, T., Laker, M. T. & Damon, I. K. Detection of monkeypox virus with real-time PCR assays. *J. Clin. Virol.* **36**, 194–203 (2006).
120. Eshoo, M. W. *et al.* Rapid and High-Throughput pan-Orthopoxvirus Detection and Identification using PCR and Mass Spectrometry. *PLOS ONE* **4**, e6342 (2009).
121. Gelaye, E. *et al.* A novel HRM assay for the simultaneous detection and differentiation of eight poxviruses of medical and veterinary importance. *Sci. Rep.* **7**, (2017).
122. Lee, L. H. & Lee, K. H. Application of the polymerase chain reaction for the diagnosis of fowl poxvirus infection. *J. Virol. Methods* **63**, 113–119 (1997).
123. Ghalyanchilangeroudi, A., Hosseini, H. & Morshed, R. Molecular characterization and phylogenetic Analysis of avian pox virus isolated from pet birds And commercial flocks, in iran. *Slov. Vet. Res.* **55**, (2018).
124. Gelaye, E. *et al.* Molecular characterization of orf virus from sheep and goats in Ethiopia, 2008–2013. *Virol. J.* **13**, 34 (2016).
125. Pestova, Y., Byadovskaya, O., Kononov, A. & Sprygin, A. A real time high-resolution melting PCR assay for detection and differentiation among sheep pox virus, goat pox virus, field and vaccine strains of lumpy skin disease virus. *Mol. Cell. Probes* **41**, 57–60 (2018).
126. Li, Y., Meyer, H., Zhao, H. & Damon, I. K. GC content-based pan-pox universal PCR assays for poxvirus detection. *J. Clin. Microbiol.* **48**, 268–276 (2010).
127. Afonso, C. L. *et al.* The Genome of *Melanoplus sanguinipes* Entomopoxvirus. *J. Virol.* **73**, 533–552 (1999).
128. Sievers, F. & Higgins, D. G. Clustal Omega, accurate alignment of very large numbers of sequences. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **1079**, 105–116 (2014).
129. Vaerman, J. L., Saussoy, P. & Ingargiola, I. Evaluation of real-time PCR data. 3
130. Nitsche, A. Real-Time PCR Detection of Parapoxvirus DNA,. *Clin. Chem.* **52**, 316–319 (2005).

131. Müller, G. *et al.* Parapoxvirus Infection in Harbor Seals ( *Phoca vitulina* ) from the German North Sea. *Vet. Pathol.* **40**, 445–454 (2003).
132. Chakhunashvili, G. *et al.* Parapoxvirus Infections in the Country of Georgia: A Case Series. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **98**, 1870–1875 (2018).
133. Downie, A. W. *et al.* Tanapox: A New Disease Caused by a Pox Virus. *BMJ* **1**, 363–368 (1971).
134. Stich, A., Meyer, H., Köhler, B. & Fleischer, K. Tanapox: first report in a European traveller and identification by PCR. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **96**, 178–179 (2002).

## SERMENT DE GALIEN

*Je jure, en présence de mes maîtres de la Faculté, des conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes condisciples :*

- ❖ D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- ❖ D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- ❖ De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.*
- ❖ En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.*

*Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.*

*Que je sois couvert d'opprobre, méprisé de mes confrères, si j'y manque.*



Les *Poxviridae* représentent une large famille de virus à ADN dont le génome peut atteindre 300 kpb. A l'image du règne animal, ils sont extrêmement diversifiés et peuvent infecter les mammifères, les oiseaux, les reptiles, les poissons et même les insectes comme l'atteste la découverte récente des *Entomopoxvirinae*. En santé humaine, la variole est un poxvirus qui a marqué l'histoire en raison de ses innombrables victimes mais qui a également permis une avancée médicale majeure à la fin du XVIIIème siècle. En effet, la découverte d'une immunité croisée contre la variole conférée par un poxvirus animal proche permettra la mise au point du principe de vaccination et l'éradication totale de la variole. De ce fait, depuis les années 1980 et l'arrêt de la vaccination obligatoire contre la variole, l'immunité générale des populations contre les poxvirus est en train de diminuer. Contrairement à la variole qui était strictement humaine, beaucoup d'autres poxvirus n'ont pas une aussi haute spécificité d'hôte et sont capable d'infecter l'homme. On voit donc régulièrement éclore des poxviroses zoonotiques chez l'homme comme le *Monkeypox virus* qui est maintenant endémique dans certains pays d'Afrique. La littérature rapporte qu'un genre génétiquement éloignés de la variole (les *Yatapoxvirus*) est également capable d'infecter les primates et l'homme. Parallèlement les connaissances sur les spécificités d'hôte et les réservoirs de l'ensemble des poxvirus sont encore insuffisantes pour prévoir les changements d'hôte, la pathogénicité et donc le risque d'émergences.

Au vu de l'état actuel des connaissances et des dernières études de datation par biologie moléculaire nous pensons que la majorité des poxvirus animaliers restent encore à découvrir ainsi que leurs réservoirs (i). En raison de la "place vacante" laissée par la variole plusieurs théories mettent en avant le risque d'émergence d'un nouveau poxvirus chez l'homme (ii). Actuellement il n'existe aucun système de PCR totalement "pan-pox" rapporté dans la littérature (iii). Les systèmes actuels sont focalisés sur les espèces ou les genres d'intérêt humain ou vétérinaire mais ne permettent pas de détecter les poxvirus plus rares ou encore inconnus. C'est donc pour ces trois principales raisons que nous avons travaillé à la mise au point d'un système de PCR en temps réel qui ciblerait une séquence conservée chez tous les *Poxviridae*.

La littérature rapportait déjà 49 gènes conservés entre tous les *Chordopoxvirinae* (poxvirus de vertébrés). Nous avons donc blasté les séquences protéiques de ces gènes candidats sur une banque de donnée contenant uniquement des séquences d'*Entomopoxvirinae*. Pour les gènes donnant de bons scores, nous avons cherché manuellement des séquences conservées entre tous les poxvirus permettant la mise au point d'un système de qPCR. Nous n'avons trouvé qu'une seule région permettant de tester deux amorces. C'est une séquence courte d'une centaine de nucléotides vers l'extrémité 5' du gène E6R (impliqué dans la morphogénèse des virions). La mise au point technique fût longue et complexe car nos amorces sont tout de même très dégénérées et possèdent une température de fusion plus basse que les systèmes conventionnels.

Nous avons testé notre système sur différentes souches de poxvirus fournies par nos collaborateurs (APHM, EVAg, CNR des *Orthopoxvirus*) ainsi que sur les gènes synthétiques pour mimer des poxvirus plus rares et pour quantifier les performances de notre système. Notre système est performant ( $R^2$  compris entre 0.95 et 0.99), sensible (limites de détection entre 100 et 1000 copies d'ADN sans le milieu de réaction hotmis pour deux espèces dont le seuil est à 10 000 copies), répétable et reproductible (écart type reproductibilité < 1°C pour le SybrGreen® et < 2Ct pour le TaqMan®). Concernant la spécificité, le système en SybrGreen® initialement mis au point n'était pas assez spécifique. Nous observions 30% de fluorescence non spécifique avec des courbes de fusion aux bonnes températures. Cela nous a amené à rajouter une sonde d'hydrolyse FAM-MGB. Après ajustement nous sommes arrivés à une spécificité de 95% en système TaqMan®. Pour les poxvirus concernés, notre système est comparable aux systèmes utilisés en routine hospitalière sauf pour le groupe *Parapoxvirus* pour lequel notre système est un peu moins performant.

Nous rapportons dans ce travail le premier système de qPCR "pan-pox" testé et validé sur des ADN issus de souches et des ADN synthétiques quantifiés. Ce travail constitue un véritable accélérateur de découvertes car ce système, contrairement à la métagénomique, est accessible à tous. Son utilisation peut être diagnostique comme épidémiologique et promet l'accès à la partie immergée des poxvirus.