



AIX-MARSEILLE UNIVERSITE
FACULTE DE MEDECINE DE MARSEILLE
ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE
UMR 190 « Emergence des pathologies virales »
Aix-Marseille Université – IRD 190 – Inserm 1207 – EFS – IRBA

THESE DE DOCTORAT Présentée par

Léa LUCIANI
Née le 14 avril 1991 à Marseille

*En vue de l'obtention du grade universitaire de Docteur
Mention : Pathologie Humaine
Spécialité : Maladies infectieuses*

Les Poxvirus et leur implication en santé humaine : Mise au point d'un système de PCR en temps réel « pan-pox » et étude épidémiologique de séro-neutralisation du *Vaccinia virus* et du *Cowpox virus*

Soutenue publiquement le 8 Décembre 2021

Composition du jury :

Monsieur le Docteur Jean Claude DESENCLOS
Monsieur le Professeur Hervé RAOUL
Madame le Docteur Alessandra FALCHI
Monsieur le Docteur Stéphane PRIET
Monsieur le Professeur Christophe PEYREFITTE
Monsieur le Professeur Xavier de LAMBALLERIE

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Président du jury
Directeur de Thèse

*"Future nations will know by history only that the loathsome smallpox has existed
and by you has been extirpated."*

Thomas Jefferson, 1806, letter to Edward Jenner

Résumé

Dans le contexte actuel, l'émergence et la réémergence des pathogènes viraux sont en constante augmentation et constituent un problème majeur de santé publique. Parmi les Poxviridae et plus particulièrement parmi le genre *Orthopoxvirus*, le plus connu reste le virus de la variole présentant une spécificité d'hôte absolue pour l'homme. Véritable fléau de l'humanité jusqu'au milieu du XX^{ème} siècle, la variole reste à ce jour la seule maladie humaine complètement éradiquée grâce à l'efficacité de la vaccination associée à l'absence de réservoir non humain. Depuis 1980 avec l'arrêt de la vaccination antivariolique l'immunité globale des populations est en train de diminuer. Cela s'associe à l'émergence chez l'homme de Poxvirus zoonotiques ayant une spécificité d'hôte élargie. C'est le cas du virus Monkeypox particulièrement inquiétant en Afrique, du Buffalopox et du Camelpox qui sévissent en Asie et du virus Cowpox de répartition ubiquitaire. Ces derniers virus appartiennent au genre des *Orthopoxvirus* cependant quelques rares cas d'infections humaines causées par des poxvirus issus d'autres genres ont été rapportés dans la littérature. Les connaissances sur les poxvirus sont actuellement limitées, depuis l'éradication de la variole en 1980 la fréquence des travaux portant sur l'implication de ces virus en médecine humaine a peu à peu diminué (hormis au début des années 2000 sous la menace du bioterrorisme). Cependant les études génomiques tendent à montrer que cette famille de virus est probablement aussi ancienne et diversifiée que le monde animal. La littérature rapporte très régulièrement la découverte de nouveaux poxvirus encore inconnus y compris chez les insectes. Les changements actuels impactant le climat et la biodiversité créent des conditions facilitant l'émergence d'agent pathogènes zoonotiques. Le but de ce travail est d'améliorer les connaissances sur ces virus présentant un risque d'émergence important.

La première partie a été axée sur le développement d'un système de PCR en temps réel avec une capacité de détection « Pan-pox ». La grande diversité génétique des Poxviridae ainsi que la complexité de leur nomenclature génomique ont compliqué la mise au point d'un tel système. Cependant l'existence de cette technique permettant une détection rapide et peu coûteuse de tous poxvirus, y compris ceux qui restent à découvrir, possède sa place dans l'arsenal diagnostique pour une application en médecine humaine ou vétérinaire et en épidémiologie.

La seconde partie de ce travail a porté sur une étude épidémiologique de séro-neutralisation de grande ampleur avec le virus de la vaccine et le virus Cowpox. L'échantillonnage principal, issu de donneurs de sang, regroupait 4448 personnes répartis dans quatre régions de France différentes. Des serums issus d'Afrique, d'Asie et d'Amérique du Sud ont également été testés. Ces données épidémiologiques récentes dressent un état des lieux de l'immunité anti-orthopoxvirus explorant sa répartition géographique et démographique ainsi que la réactivité croisée entre ces deux virus.

Abstract

In the current context, the emergence and re-emergence of viral pathogens are constantly increasing and constitute a major public health problem. Among the Poxviridae and more particularly among the *Orthopoxvirus* genus, the best known is the smallpox virus, which is absolutely host-specific for humans. A real scourge of humanity until the middle of the 20th century, smallpox remains to this day the only human disease completely eradicated thanks to the effectiveness of vaccination associated with the absence of a non-human reservoir. Since 1980, with the cessation of smallpox vaccination, global population immunity has been declining. This is associated with the emergence in humans of zoonotic poxviruses with an extended host specificity. This is the case of the Monkeypox virus, which is particularly worrying in Africa, the Buffalopox virus and the Camelpox virus, which are present in Asia, and the ubiquitous Cowpox virus. The latter viruses belong to the *Orthopoxvirus* genus, although a few rare cases of human infections caused by poxviruses from other genera have been reported in the literature. Knowledge about poxviruses is currently limited, since the eradication of smallpox in 1980 the frequency of work on the involvement of these viruses in human medicine has gradually decreased (except in the early 2000s under the threat of bioterrorism). However, genomic studies tend to show that this family of viruses is probably as old and diverse as the animal kingdom. The literature regularly reports the discovery of new, as yet unknown poxviruses, including in insects. Current changes in climate and biodiversity are creating conditions that facilitate the emergence of zoonotic pathogens. The aim of this work is to improve our knowledge of these viruses that present a significant risk of emergence and/or re-emergence.

The first part focused on the development of a real-time PCR system with a "Pan-pox" detection capability. The great genetic diversity of the Poxviridae and the complexity of their genomic nomenclature have complicated the development of such a system. However, the existence of this technique, which allows rapid and inexpensive detection of all poxviruses, including those yet to be discovered, has its place in the diagnostic arsenal for application in human or veterinary medicine and epidemiology.

The second part of this work involved a large-scale epidemiological sero-neutralisation study with vaccinia virus and Cowpox virus. The main sample, drawn from blood donors, included 4448 individuals from four different regions of France. Sera from Africa, Asia and South America were also tested. These recent epidemiological data provide an overview of anti-orthopoxvirus immunity, exploring its geographical and demographic distribution as well as the cross-reactivity between these two viruses.

Remerciements

Je remercie chaleureusement les membres du jury le Dr. Alessandra Falchi, et le Pr. Christophe Peyrefitte pour avoir accepté spontanément de lire de manuscrit, de siéger à la soutenance et de juger mon travail.

Je remercie le Pr. Hervé Raoul et le Dr. Jean Claude Désenclos pour leur qualité de rapporteur. Je les remercie sincèrement pour leur temps précieux qu'ils ont consacré à l'amélioration de ce travail.

Je souhaite également remercier les personnes ayant contribué à l'élaboration de cette thèse : Dr. Stéphane Priet pour son aide en biologie moléculaire et dans la rédaction de l'article correspondant et le Dr. Nathanaël Lapidus pour la qualité de notre collaboration statistique et son optimisme matinal.

Je remercie tout particulièrement le Pr. Xavier de Lamballerie pour son intérêt, son encadrement, ses enseignements, ses conseils en tout genre et surtout pour sa bienveillance.

J'ai une pensée pour les membres de la grande famille de l'UVE, pour toutes les personnes qui ont pris le temps d'écouter, d'aider, d'innover et de me soutenir ces dernières années. Pour ces personnes passionnées qui font l'âme du laboratoire et pour tous ces collègues qui deviennent plus que ça.

Je remercie également tous mes amis, anciens et nouveaux, les générations d'internes, les mentors et toutes les personnes croisées pour quelques minutes ou plusieurs années qui ont contribué à façonner ce que je suis.

Enfin je tiens à remercier plus que tout ma famille pour leur soutien sans faille depuis toujours et tout le temps, merci Papi et Mamie, merci Papa, merci Margot et merci Maman.

Abréviations

ACEV : Anomala cuprea entomopoxvirus

ADN : Acide désoxyribonucléique

AHEV : Adoxophyes honmai entomopoxvirus

AMU : Aix-Marseille Université

AMEV : Amsca moorei entomopoxvirus

APHA : Animal and Plant Health Agency (UK)

APHM : Assistance publique - hôpitaux de Marseille

ARN : Acide ribonucléique

ATCC : American Type Culture Collection

BCG : Bacille de Calmette et Guérin (vaccin)

BDNI : Base de Données Nationale d'Identification

BF : Burkina Faso

BPSV : Bovine papular stomatitis virus

CDC : Centers for Disease Control and Prevention (USA)

CBEV : Choristoneura bienis entomopoxvirus

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CNR : Centre National de référence

CREV : Choristoneura rosaceana entomopoxvirus

Ct : Cycle threshold : Cycle seuil

ECP : effet cytopathogène

EFS : Etablissement Français du sang

ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay

EVAg : European Virus Archive – Global

FLI : Friedrich Loeffler Institute (Germany)

FNRCO : National Reference Center of Orthopoxvirus: Centre national de référence des Orthopoxvirus

GM-CSF : Granulocyte-macrophage - colony-stimulating factor

HCSP : Haut Conseil de Santé Publique

ICTV : International Committee on Taxonomy of Viruses

IHU : Institut hospitalo-universitaire (Méditerranée Infection)

IL : Interleukine

INRA : Institut national pour la recherche agronomique

INSEE : Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques

ITRs : Inverted terminal repeats : séquences inverses terminales répétées

JSD : Jean-Sélim Driouich

LOD : Limit of detection

MOI : Multiplicity of infection

MSEV : Melanopus sanguinipes entomopoxvirus

MVA: Modified Vaccinia Ankara

NGS : Next Generation Sequencing

NYCBOH : New York City Board of Health (souche de vaccine utilisée en Amérique)

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ORF : Open reading frames

N/A: non-applicable

Nt : Nucléotides

PACA : Provence Alpes Côte d'Azur

Pb : Paire de bases

PCR : Polymerase Chain Reaction

PI : Pirbright Institute (UK)

PRIAM : Perception du Risque Arboviral autour de la Méditerranée

RKI : Robert Koch Institut (Germany)

SIDA : Syndrome de l'immunodéficience acquise

TCID50 : Median Tissue Culture Infectious Dose

Tm : Melting temperature

UCPP : Université de Corse Pascal Paoli

UVE : Unité des virus émergents

VEKTOR : Institut d'État de virologie et de biotechnologie russe

VST : Veterinary school of Toulouse: école vétérinaire de Toulouse

WR : Western Reserve (souche de *Vaccinia virus* utilisée en laboratoire)

YMTV : Yaba monkey tumor virus

Structure du manuscrit

Ce manuscrit se découpe en 4 chapitres.

Le **1^{er} chapitre** constitue une introduction à ce travail. Il débute par une partie historique sur la variole et la vaccination. Puis les différentes familles de poxvirus et leurs caractéristiques seront présentées. Enfin, une troisième partie traitera du risque d'émergence lié à ces virus et introduira les différentes hypothèses de ce travail.

Le **2^{ème} chapitre** s'articule autour du développement d'un système de PCR en temps réel ayant la capacité de détecter tous les Poxviridae (article publié). Seront également présentés deux projets annexes sur la détection de *Parapoxvirus* par PCR dans des tiques.

Le **3^{ème} chapitre** traite de l'immunité générée par les poxvirus et présente les études épidémiologiques de séro-neutralisation du virus de la vaccine et du Cowpox menées à l'UVE sur différentes populations.

Le **4^{ème} chapitre** constitue la discussion et la conclusion globale de ce travail.

CHAPITRE I : INTRODUCTION ET HISTORIQUE	13
La variole : poxvirus fléau de l'humanité	13
Les poxvirus à la base d'une avancée majeure : la vaccination	14
Comment la vaccine remporta la partie	15
L'état actuel des connaissances sur les poxvirus	20
GENERALITES	20
ESPECES RECENSEES ET RESERVOIRS	22
LES NOUVELLES ESPECES	29
LA NOTION DE RESERVOIR	29
Risques et enjeux depuis l'arrêt de la vaccination antivariolique	31
LA QUESTION DU BIOTERRORISME	32
LES CAS ET EPIDEMIES	33
Objectifs et Hypothèses	36
DETECTION MOLECULAIRE DES POXVIRUS	37
ETAT DES LIEUX SEROLOGIQUE	38
 CHAPITRE II : DEVELOPPEMENT D'UN SYSTEME DE PCR EN TEMPS REEL « PAN-POX »	 39
Méthodes diagnostiques des poxvirus	39
DIAGNOSTIC CLINIQUE	39
DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE	39
Rappels généraux sur la technique de PCR	40
Intérêts et challenge du système de PCR « Pan-Pox »	42
Les grandes étapes de développement du système et publication	44
POSTULAT DE DEPART ET ANALYSES BIOINFORMATIQUES	44
MISE AU POINT TECHNIQUE	45
TEST DU SYSTEME A GRANDE ECHELLE	48
TIQUES ET PARAPOXVIRUS	49
Conclusion du Chapitre II : bilan du système « pan-pox »	50

CHAPITRE III : SERO-NEUTRALISATION	92
Poxvirus et Immunologie	92
GENERALITES	92
LES ANTICORPS ANTI-ORTHOPOXVIRUS ET IMMUNITE CROISEE	93
LES DIFFERENTS TYPES DE VACCINS ANTI-VARIOLIQUES	95
HISTORIQUE DE LA VACCINATION EN FRANCE	96
Immunité croisée inter-genre	98
CULTURE VIRALES HORS ORTHO ET PARA-POXVIRUS	99
CULTURE VIRALE DE L'ORF (PARAPOXVIRUS) ET ESSAIS DE SERO-NEUTRALISATION	101
CULTURE VIRALE DES ORTHOPOXVIRUS (VACCINIA ET COWPOX VIRUS)	103
CONCLUSION	104
Etudes de séro-neutralisation menées à l'UVE	105
METHODES	105
RESULTATS SERO-NEUTRALISATION VACCINE POPULATIONS ETRANGERES ET POPULATION ANIMALE	111
RESULTATS POPULATIONS CORSE ET APHM	113
RESULTATS PRIAM	122
CHAPITRE IV: DISCUSSION, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	132
RÉFÉRENCES	140

Chapitre I :

INTRODUCTION ET HISTORIQUE

"The smallpox was always present, filling the churchyards with corpses, tormenting with constant fears all whom it had stricken, leaving on those whose lives it spared the hideous traces of its power, turning the babe into a changeling at which the mother shuddered, and making the eyes and cheeks of the bighearted maiden objects of horror to the lover."

T.B. Macaulay, The History of England from the Accession of James II (1685-1688), Vol IV

La variole : 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.[1] 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.[2] La variole, "le plus terrible de tous les ministres de la mort"[3] est présente dans toutes les grandes étapes de l'humanité. Des traces de variole furent retrouvées sur la momie de Ramsès V (1157 avant JC)[4] et la "peste antonine" épidémie qui supprima 30% de la population du monde Gréco-romain était probablement due à la variole.[5,6] Hugues Capet compte parmi ses nombreuses victimes. En l'an mille, grâce aux guerres et au commerce, la variole est établie sur le pourtour méditerranéen ainsi que dans les régions peuplées d'Asie. Les croisades acheveront de disséminer le virus dans les régions encore épargnées.[7] 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 cause restent difficile, 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.[8–10] Au début du XVIII^{ème} siècle, la population Européenne est estimée à 100 millions et la

variole était responsable de 400 000 décès annuels (dont Louis XV en 1774) et un tiers des survivants était aveugle.[7] 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 XXème siècle : Joseph Staline survécu à la variole enfant et fit retoucher ses portraits politiques pour atténuer les marques cutanées. Le dernier cas eut lieu en 1977 mais plus de 100 millions de cas de variole ont été dénombrés pour le seul XX^{ème} 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.[11,12] Les résultats de cette technique étant hautement aléatoires, la variolisation a été totalement supplantée par la découverte de la vaccination.

Le Cowpox 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 et les bras. La notion d'immunisation contre la variole par les pustules de vaches atteintes du cowpox est 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".[13] 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 Jesty en 1774 a réussi, grâce au cowpox, à introduire une immunité chez sa femme et ses enfants au cours d'une épidémie de variole.[14,15] L'histoire retiendra cependant le médecin anglais Edward Jenner comme père de la vaccination.[11] A partir de 1788, Jenner mènera avec la rigueur scientifique requise ses premiers travaux sur la vaccination et publia ses rapports sur 40 sujets.[16] 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.[17] Le terme vaccination sera officialisé au début du XIXème siècle.



Photo 1: Edward Jenner et ses premiers essais de vaccination fin du XVIIIème 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.[18,19] L'origine exacte de la vaccine est actuellement toujours discutée. 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 le virus Horsepox[20]. Ce dernier 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 des virus cowpox et horsepox.[13,20] Faudrait-il rendre sa place d'honneur à l'orsepox 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 dans un premier temps reste la source principale de virus 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).[21] 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 syphilis. En 1870 l'armée Française essuie 175 000 cas de variole dont 23 740 morts contre 297 dans l'armée Allemande correctement vaccinée. Devant l'importante efficacité de la vaccination, le 15 Février 1902 la France rend obligatoire la vaccination antivariolique chez tous les nourrissons avec des re-vaccinations à 3 et 20 ans pour les civils et tous les 3 ans pour les militaires.[22] Au début du XXème siècle la vaccination en série à distance de l'animal est possible grâce aux découvertes successives de deux techniques de conservation du virus actif : conservation par la glycérine (1899) et conservation par dessiccation sous congélation (1917). Ces avancées technologiques permettent la distribution du vaccin à grande échelle et marquent un tournant dans la lutte de l'humanité contre la variole. Les campagnes de vaccination systématiques réussirent en quelques décennies à éradiquer le fléau en Europe, un seul cas militaire fut recensé durant la première guerre mondiale. La dernière épidémie en France date de 1955, causée par des soies contaminées rapportées de Saïgon elle fit 16 morts dans la commune de Vannes (Morbihan).[21] 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.[23] 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 épidémiques. 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 varioles sont détenues dans deux laboratoires de confinement renforcé agréés par l'OMS aux Etats Unis (CDC d'Atlanta) et en Russie (VEKTOR Koltsovo).



Photo 2: 1904 Dr. Allan Warner, Resident Medical Officer to the Isolation Hospital in Leicester. Deux garçons exposés à la même source de variole, l'un a été vacciné, l'autre non...

Pour clôturer la partie historique, des représentations graphiques des différentes pandémies qu'a subi l'Humanité et leur répercussion en nombre de morts sont présentées en pages 19, 20 et 21. Ainsi le nombre de victimes de la variole est estimé à 56 millions ce qui en fait la deuxième pandémie la plus mortelle derrière la pandémie de peste bubonique et devant la grippe espagnole. Il faut cependant garder à l'esprit que la variole a également sévit sous forme d'épidémies plus restreintes mais régulières au long des siècles. Ces représentations ne prennent pas en compte d'autres pathologies infectieuses comme la tuberculose qui ne génère pas de pandémie à proprement parler mais qui serait l'agent infectieux ayant le plus grand nombre de victimes dans l'histoire de l'Humanité.[24]

HISTORY OF PANDEMICS

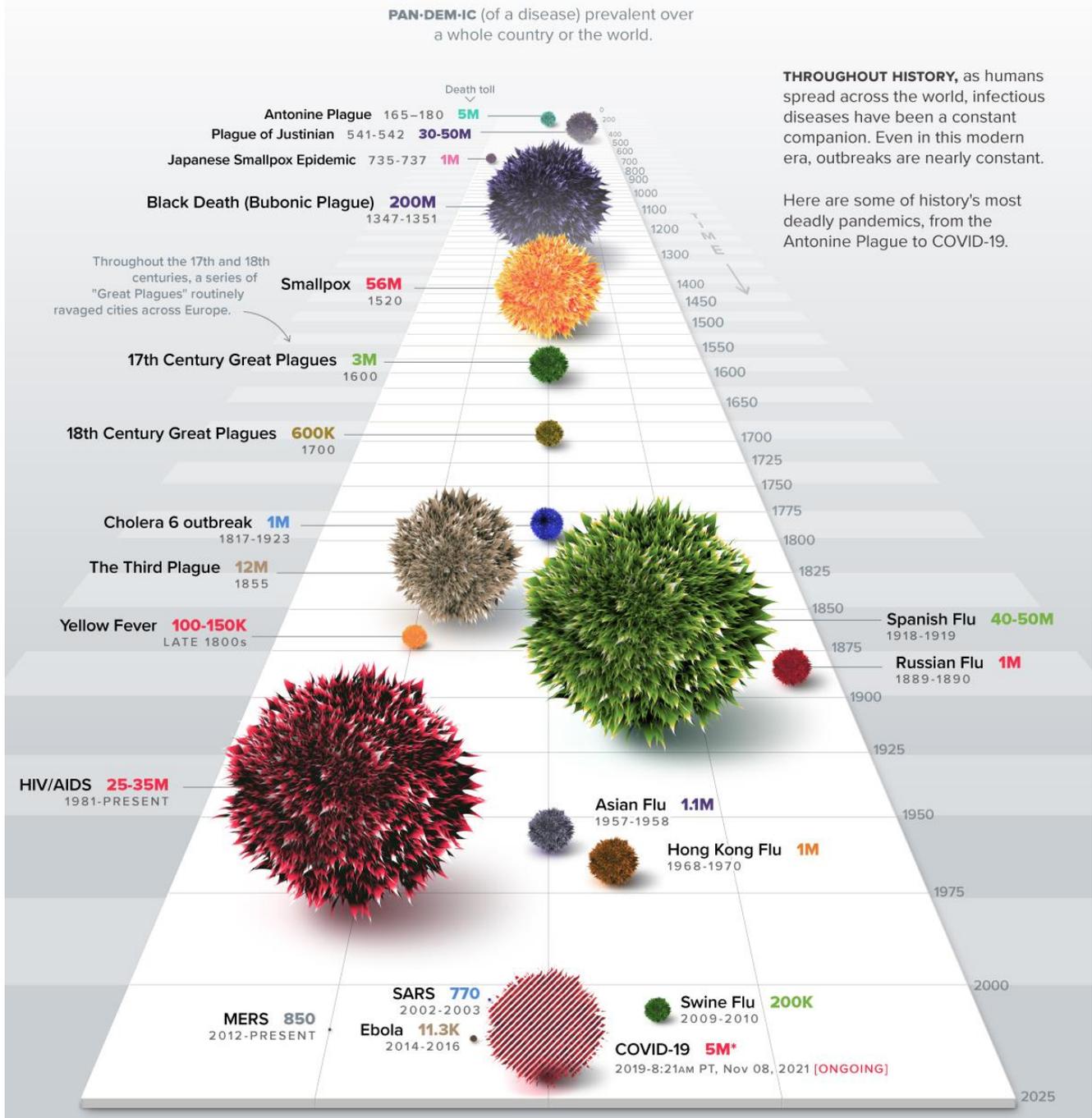


Figure 1 : Représentation des différentes pandémies sur une frise chronologique selon le site <https://www.visualcapitalist.com/history-of-pandemics-deadliest/> utilisant les sources CDC, OMS, BBC, Wikipedia, Historical records, Encyclopedia Britannica et Johns Hopkins University.

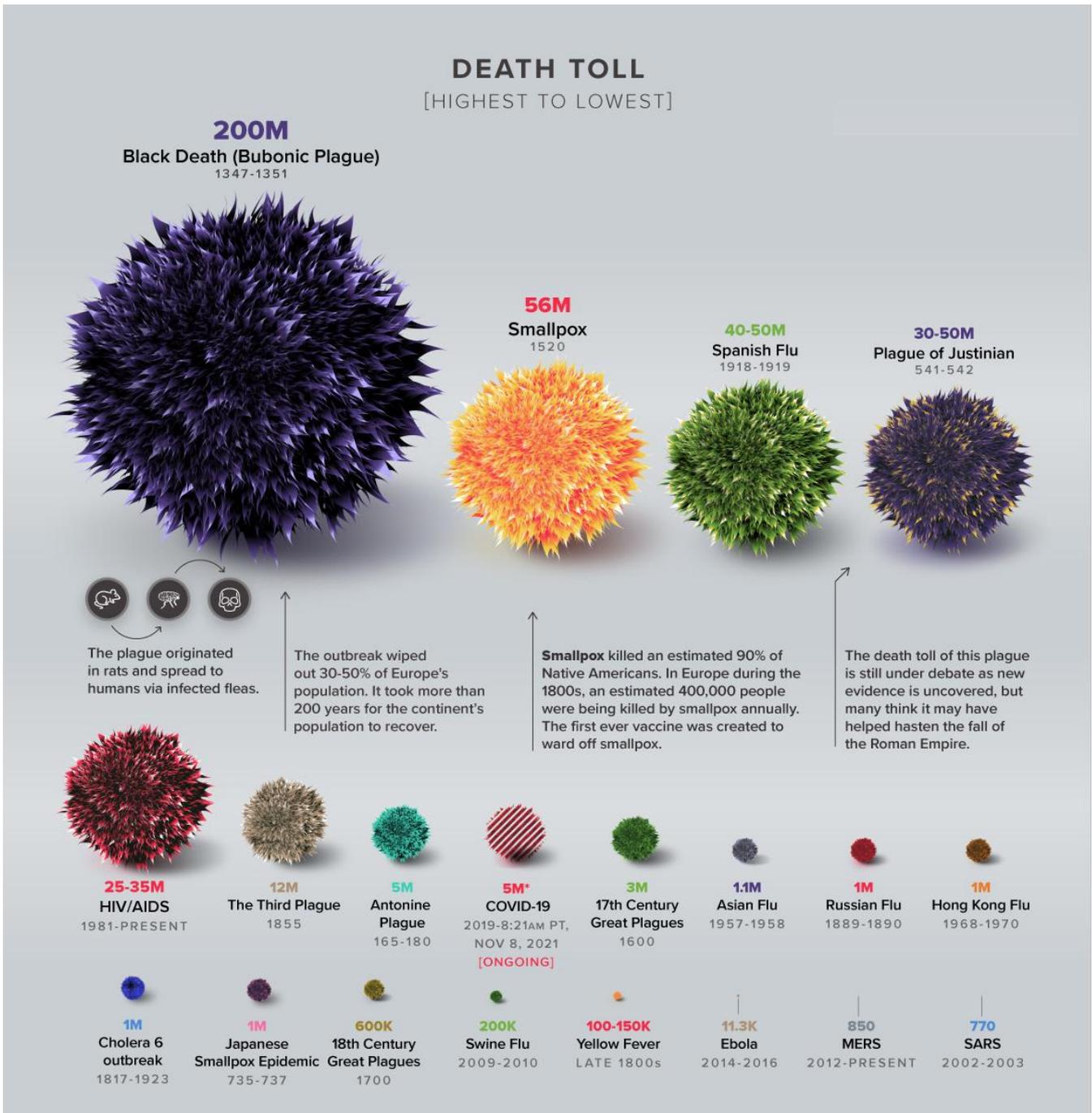


Figure 2 : Représentation des différentes pandémies par nombre de morts. A noter que la « peste Antonine » selon certains historiens pourrait être mal nommée et serait en vérité due à la variole. <https://www.visualcapitalist.com/history-of-pandemics-deadliest/> utilisant les sources CDC, OMS, BBC, Wikipedia, Historical records, Encyclopedia Britannica et Johns Hopkins University.

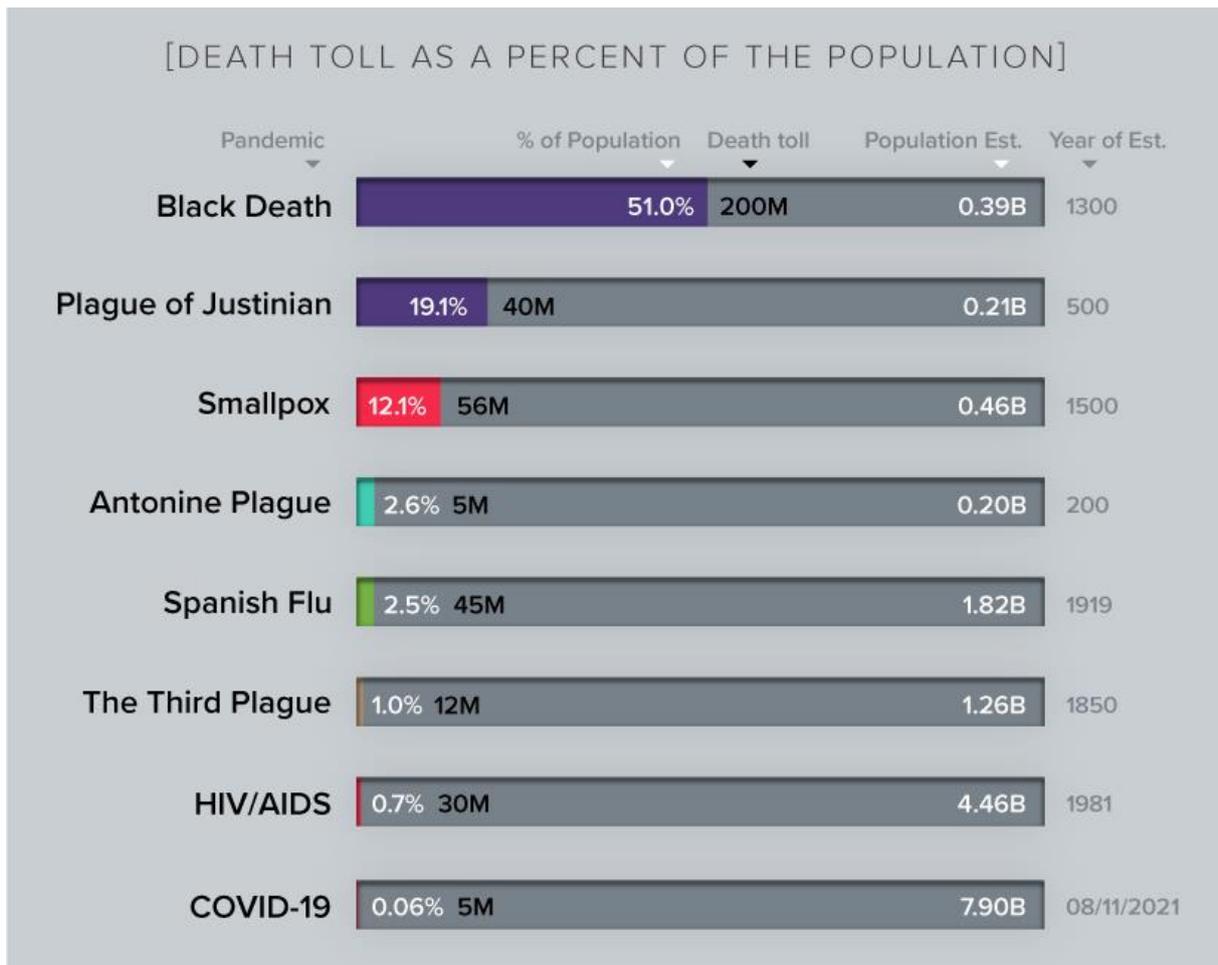


Figure 3 : Pourcentage de victimes des différentes pandémie selon le site <https://www.visualcapitalist.com/history-of-pandemics-deadliest/> utilisant les sources CDC, OMS, BBC, Wikipedia, Historical records, Encyclopedia Britannica et Johns Hopkins University.

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.[25] 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.[26] 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.[27] 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.[28]

Les gènes précoces codent pour des enzymes impliquées dans la réplication du génome et dans la neutralisation de la réponse immunitaire de l'hôte.[29] Certaines protéines agissent comme des antagonistes des cytokines. Leur mode d'action précis (antagonistes direct, antagoniste par homologie...) dépend de l'espèce du poxvirus et de son historique de coévolution avec son hôte.[30] 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).[31]

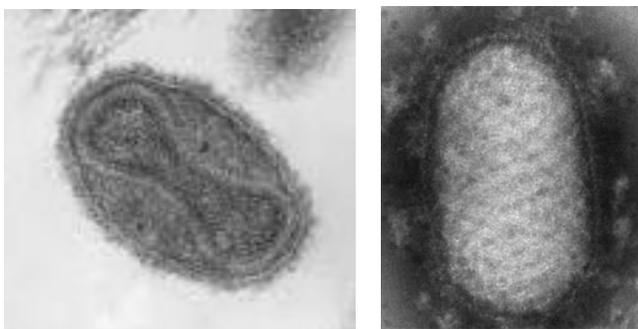


Photo 3: virus de la variole (à gauche) et de l'Orf (à droite) en microscopie électronique

ESPECES RECENSEES ET RESERVOIRS

Selon le 9^{ème} rapport de l'ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) sortie initialement en 2009 et mis à jour en 2019, 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, des tableaux exhaustifs de toutes les espèces actuellement répertoriées par l'ICTV est proposé en Tables 1, 2 et 3.

Les Chordopoxvirinae

Les *Chordopoxvirinae* infectent les vertébrés. Depuis 2019, cette sous famille comprend 18 genres identifiés ainsi que des espèces non encore affiliées :

- *Avipoxvirus* (poxvirus aviaires)
- *Capripoxvirus* (concernent les caprins et les ovins)
- *Centapoxvirus* (deux espèces une infectant les campagnols et l'autre retrouvée dans des moustiques d'Afrique[32])
- *Cervidopoxvirus* (infecte les cervidés)
- *Crocodylidpoxvirus* (une espèce référencée infectant les crocodiles du Nile)
- *Leporipoxvirus* (concerne les lapins, les lièvres et les écureuils)
- *Macropopoxvirus* (infecte les kangourous)
- *Molluscipoxvirus* (une seule espèce : *Molluscum contagiosum*, seul autre poxvirus strictement humain)
- *Mustelpoxvirus* (décrit chez la loutre)
- *Orthopoxvirus* (genre contenant la variole ainsi que la majorité des poxvirus de mammifères et potentiellement transmissibles à l'homme)
- *Oryzopoxvirus* (décrit chez la souris et les primates)
- *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)
- *Proropopoxvirus* (infecte les renards)
- *Salmonpoxvirus* (décrit chez le saumon)
- *Sciuripoxvirus* (décrit chez les écureuils)
- *Suipoxvirus* (concerne les porcins)
- *Vespertilionpoxvirus* (infecte les chauve-souris)
- *Yatapoxvirus* (infectent les primates, une espèce transmissible à l'homme)

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* ont suivi 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[1]. Le tout premier poxvirus remonterait quant à lui à avant la séparation des vertébrés comme l'atteste la présence de poxvirus chez les invertébrés : les Entomopoxviridae.

Les Entomopoxvirinae

Les *Entomopoxvirinae* de découverte plus récente, infectent les insectes. Cette sous-famille comprend 4 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)
- *Deltaentomopoxvirus* (une espèce infectant la sauterelle (orthoptère))

Les études sur les entomopoxvirus ont commencé à la fin des années 1990. Au 1^{er} Août 2021 il y 17 génomes complets (pour 8 espèces différentes) 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.[33]

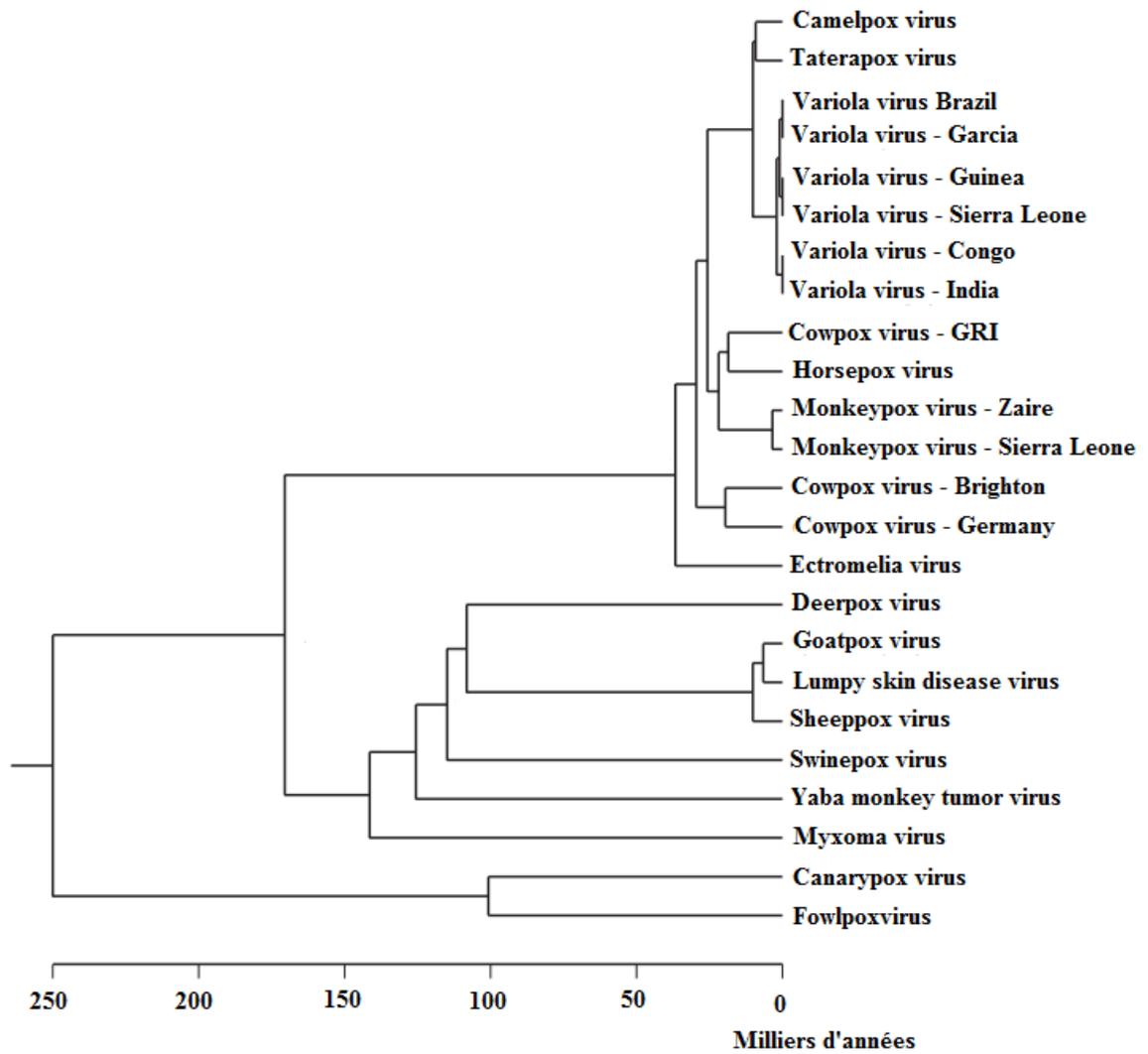


Figure 4: Evolution des Chordopoxvirinae selon l'approche de l'horloge moléculaire Bayésienne. D'après Babkin, I. V. & Babkina, I. N. *Molecular Dating in the Evolution of Vertebrate Poxviruses. Intervirology* 54, 253–260 (2011).

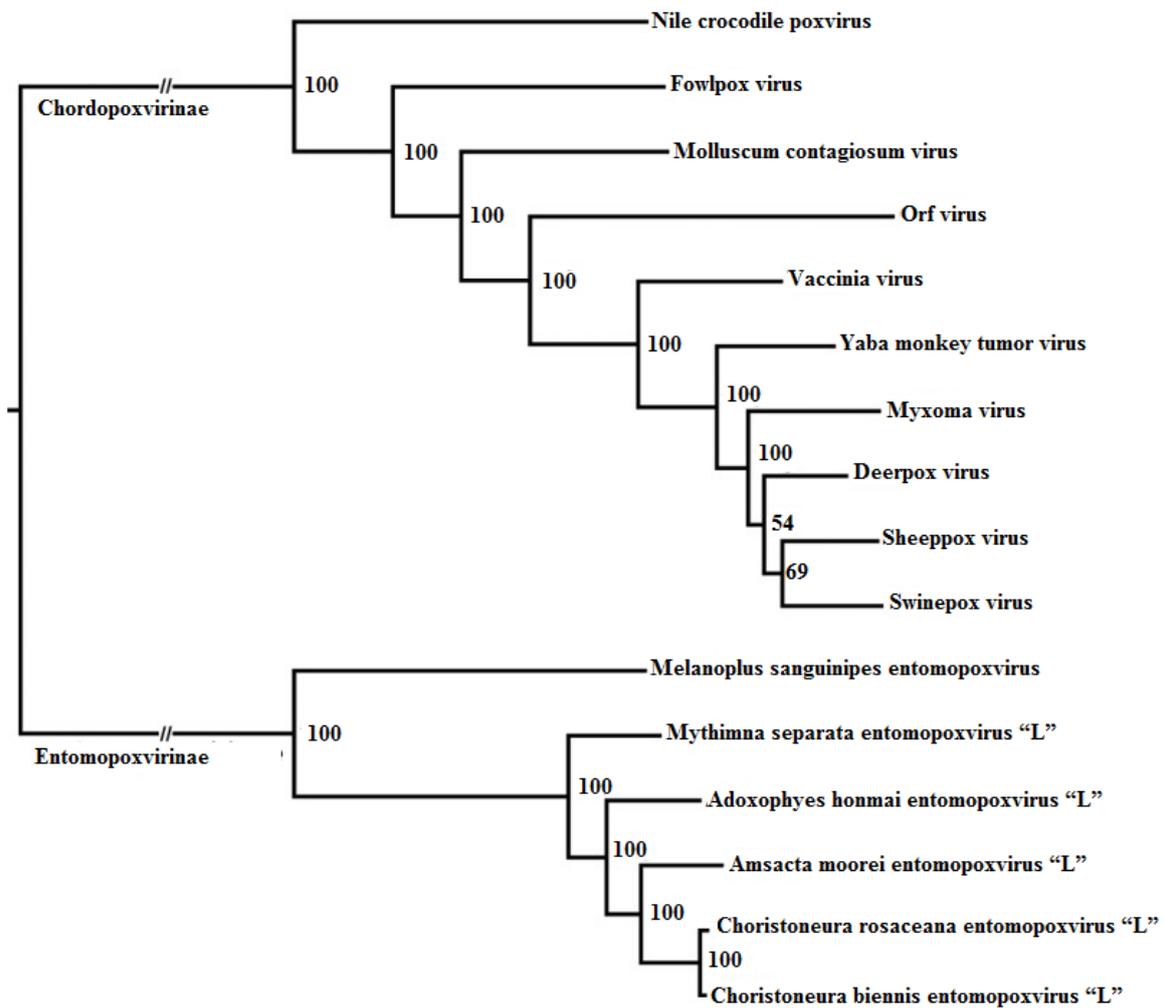


Figure 5: Figure 2: Arbre phylogénétique des poxvirus intégrant les Entomopoxvirinae. Cet arbre est construit selon un alignement de 49 gènes conservés des poxvirus. D'après Theze, J. et al. *New Insights into the Evolution of Entomopoxvirinae from the Complete Genome Sequences of Four Entomopoxviruses Infecting Adoxophyes honmai, Choristoneura biennis, Choristoneura rosaceana, and Mythimna separata.* *J. Virol.* 87, 7992–8003

CHORDOPOXVIRIDAE	
AVIPOXVIRUS	<i>Canarypox virus</i>
	<i>Crowpox virus</i>
	<i>Fowlpox virus</i>
	<i>Juncopox virus</i>
	<i>Mynahpox virus</i>
	<i>Peacockpox virus</i>
	<i>Penguinpox virus</i>
	<i>Pigeonpox virus</i>
	<i>Psittacinepox virus</i>
	<i>Quailpox virus</i>
	<i>Sparrowpox virus</i>
	<i>Starlingpox virus</i>
	<i>Turkeypox virus</i>
CAPRIPOXVIRUS	<i>Goatpox virus</i> <i>Lumpy skin disease virus</i> <i>Sheeppox virus</i>
CERVIDPOXVIRUS	<i>Mule deerpox virus</i>
LEPORIPOXVIRUS	<i>Hare fibroma virus</i>
	<i>Myxoma virus</i>
	<i>Rabbit fibroma virus</i>
	<i>Squirrel fibroma virus</i>
MOLLUSCIPOXVIRUS	<i>Molluscum contagiosum</i>
ORTHOPOXVIRUS	<i>Camelpox virus</i>
	<i>Cowpox virus</i>
	<i>Ectromelia virus</i>
	<i>Monkeypox virus</i>
	<i>Raccoonpox virus</i>
	<i>Taterapox virus</i>
	<i>Vaccinia virus</i>
	<i>Variola virus</i>
	<i>Volepox virus</i>
	PARAPOXVIRUS
<i>Bovine papular stomatitis virus</i>	
<i>Camel contagious exthyma</i>	
<i>Chamois contagious exthyma</i>	
<i>Grey sealpox virus</i>	
<i>Orf virus</i>	
<i>Pseudocowpox virus</i>	
<i>Red deerpox virus</i>	
SUIPOXVIRUS	<i>Swinepox virus</i>
YATAPOXVIRUS	<i>Tanapox virus</i>
	<i>Yaba monkey tumor virus</i>
Espèces non classifiées	<i>California harbor seal poxvirus</i>
	<i>Cotia virus</i>
	<i>Dolphinpox virus</i>
	<i>Embupox virus</i>
	<i>Grey kangaroopox virus</i>
	<i>Marmosetpox virus</i>
	<i>Molluscum-like poxvirus</i>
	<i>Nile crocodilepox virus</i>
	<i>Quokkapox virus</i>
	<i>Red kangaroopox virus</i>
	<i>Salangapox virus</i>
	<i>Spectacledpox virus</i>
<i>Yokapox virus</i>	

ENTOMOPOXVIRIDAE	
ALPHA-EPV	<i>Anomala cuprea</i> (ACEV)
	<i>Anphodisu tasmaniae</i> (ATEV)
	<i>Demodema boranensis</i> (DBEV)
	<i>Dermolepida albohirtum</i> (DAEV)
	<i>Figulus subleavis</i> (FSEV)
	<i>Geotrupes sylvaticus</i> (GSEV)
<i>Melolontha melolontha</i> (MMEV)	
BETA-EPV	<i>Acrobasis zelleri</i> (AZEVE)
	<i>Amsancta moorei</i> (AMEV)
	<i>Arphia conspersa</i> (ACOEVE)
	<i>Choristoneura bienis</i> (CBEV)
	<i>Choristoneura conflicta</i> (CCEV)
	<i>Choristoneura diversuma</i> (CDEV)
	<i>Choristoneura fumiferana</i> (CFEV)
	<i>Chorizagrotis auxiliars</i> (CXEV)
	<i>Heliothis armigera</i> (HAEV)
	<i>Locusta migratoria</i> (LMEV)
<i>Oedalus senigalensis</i> (OSEV)	
<i>Operophtera brumata</i> (OBEV)	
<i>Schistocera gregari</i> (SGEV)	
GAMMA-EPV	<i>Aedes aegypti</i> (AAEV)
	<i>Camptochironomus tentans</i> (CTEV)
	<i>Chironomus attenuatus</i> (CAEV)
	<i>Chironomus luridus</i> (CLEV)
	<i>Chironomus plumosus</i> (CPEV)
<i>Geldichironomus haloprasimus</i> (GHEV)	
Autres espèces	<i>Diachasmimorpha</i> (DIEV)
	<i>Melanoplus sanguinipes</i> (MSEV)

Table 1: Classification des Poxviridae par l'ICTV en 2018 (début du travail de thèse)

CHORDOPOXVIRIDAE	
AVIPOXVIRUS	<i>Canarypox virus</i>
	<i>Flamingopox virus</i>
	<i>Fowlpox virus</i>
	<i>Juncopox virus</i>
	<i>Mynahpox virus</i>
	<i>Penguinpox virus</i>
	<i>Pigeonpox virus</i>
	<i>Psittacinepox virus</i>
	<i>Quailpox virus</i>
	<i>Sparrowpox virus</i>
	<i>Starlingpox virus</i>
	<i>Turkeypox virus</i>
	CAPRIPOXVIRUS
<i>Lumpy skin disease virus</i>	
<i>Sheeppox virus</i>	
CENTAPOXVIRUS	<i>Murmansk microtusopox virus</i>
	<i>Yokapox virus</i>
CERVIDPOXVIRUS	<i>Mule deerpox virus</i>
CROCODYLIDPOXVIRUS	<i>Nile crocodilepox virus</i>
LEPORIPOXVIRUS	<i>Hare fibroma virus</i>
	<i>Myxoma virus</i>
	<i>Rabbit fibroma virus</i>
	<i>Squirrel fibroma virus</i>
MACROPOPOXVIRUS	<i>Eastern kangaroopox virus</i>
	<i>Western kangaroopox virus</i>
MOLLUSCIPOXVIRUS	<i>Molluscum contagiosum</i>
MUSTELPOXVIRUS	<i>Sea otterpox virus</i>
ORTHOPOXVIRUS	<i>Abatino macacapox virus</i>
	<i>Akhmeta virus</i>
	<i>Camelpox virus</i>
	<i>Cowpox virus</i>
	<i>Ectromelia virus</i>
	<i>Monkeypox virus</i>
	<i>Raccoonpox virus</i>
	<i>Skunkpox virus</i>
	<i>Taterapox virus</i>
	<i>Vaccinia virus</i>
<i>Variola virus</i>	
<i>Volepox virus</i>	
ORYZOPOXVIRUS	<i>Cotia virus</i>
PARAPOXVIRUS	<i>Bovine papular stomatitis virus</i>
	<i>Grey sealpox virus</i>
	<i>Orf virus</i>
	<i>Pseudocowpox virus</i>
<i>Red deerpox virus</i>	
PTEROPOXVIRUS	<i>Pteropox virus</i>
SALMONPOXVIRUS	<i>Salmon gillpox virus</i>
SCIURIPOXVIRUS	<i>Squirrelpox virus</i>
SUIPOXVIRUS	<i>Swinepox virus</i>
VESPERTILIONPOXVIRUS	<i>Eptesipox virus</i>
YATAPOXVIRUS	<i>Tanapox virus</i>
	<i>Yaba monkey tumor virus</i>

ENTOMOPOXVIRIDAE	
ALPHA-EPV	<i>Anomala cuprea</i> (ACEV)
	<i>Anhodisu tasmaniae</i> (ATEV)
	<i>Demodema boranensis</i> (DBEV)
	<i>Dermolepida albohirtum</i> (DAEV)
	<i>Figulus subleavis</i> (FSEV)
	<i>Geotrupes sylvaticus</i> (GSEV)
	<i>Melolontha melolontha</i> (MMEV)
BETA-EPV	<i>Acrobasis zelleri</i> (AZEV)
	<i>Adoxophyes honmai</i> (AHEV)
	<i>Amsancta moorei</i> (AMEV)
	<i>Arphia conspersa</i> (ACOEV)
	<i>Choristoneura bienis</i> (CBEV)
	<i>Choristoneura conflicta</i> (CCEV)
	<i>Choristoneura diversuma</i> (CDEV)
	<i>Choristoneura fumiferana</i> (CFEV)
	<i>Choristoneura rosaceana</i> (CREV)
	<i>Chorizagrotis auxiliars</i> (CXEV)
	<i>Heliothis armigera</i> (HAEV)
	<i>Locusta migratoria</i> (LMEV)
	<i>Mythimna separata</i> (MSEV)
	<i>Oedalus senigalensis</i> (OSEV)
<i>Operophtera brumata</i> (OBEV)	
<i>Schistocera gregari</i> (SGEV)	
GAMMA-EPV	<i>Aedes aegypti</i> (AAEV)
	<i>Camptochironomus tentans</i> (CTEV)
	<i>Chironomus attenuatus</i> (CAEV)
	<i>Chironomus luridus</i> (CLEV)
	<i>Chironomus plumosus</i> (CPEV)
<i>Geldichronomus haloprasimus</i> (GHEV)	
DELTA-EPV	<i>Melanoplus sanguinipes</i> (MSEV)
Autre espèce	<i>Diachasmimorpha</i> (DIEV)

Table 2: Classification des Poxviridae par l'ICTV mise à jour en 2019.

CHORDOPOXVIRIDAE		Hôtes	
C H O R D O P O X V I R I D A E	AVIPOXVIRUS	<i>Canarypox virus</i> <i>Flamingopox virus</i> <i>Fowlpox virus</i> <i>Juncopox virus</i> <i>Mynahpox virus</i> <i>Penguinpox virus</i> <i>Pigeonpox virus</i> <i>Psittacinepox virus</i> <i>Quailpox virus</i> <i>Sparrowpox virus</i> <i>Starlingpox virus</i> <i>Turkeypox virus</i>	Oiseaux
	CAPRIPOXVIRUS	<i>Goatpox virus</i> <i>Lumpy skin disease virus</i> <i>Sheeppox virus</i>	Caprins et Ovins
	CENTAPOXVIRUS	<i>Murmansk microtuspox virus</i> <i>Yokapox virus</i>	Campagnole nordique, Isolé à partir de Moustiques Afrique
	CERVIDPOXVIRUS	<i>Mule deerpox virus</i>	Cervidés
	CROCODYLIDPOXVIRUS	<i>Nile crocodilepox virus</i>	Crocodiles
	LEPORIPOXVIRUS	<i>Hare fibroma virus</i> <i>Myxoma virus</i> <i>Rabbit fibroma virus</i> <i>Squirrel fibroma virus</i>	Lièvre, Lapin, Souris, Ecureuil
	MACROPOXVIRUS	<i>Eastern kangaroopox virus</i> <i>Western kangaroopox virus</i>	Kangourou
	MOLLUSCIPOXVIRUS	<i>Molluscum contagiosum</i>	Homme
	MUSTELPOXVIRUS	<i>Sea otterpox virus</i>	Loutre
	ORTHOPOXVIRUS	<i>Abatino macacapox virus</i> <i>Akhmeta virus</i> <i>Camelpox virus</i> <i>Cowpox virus</i> <i>Ectromelia virus</i> <i>Monkeypox virus</i> <i>Raccoonpox virus</i> <i>Skunkpox virus</i> <i>Taterapox virus</i> <i>Vaccinia virus</i> <i>Variola virus</i> <i>Volepox virus</i>	Mammifères multiples dont l'Homme
	ORYZOPOXVIRUS	<i>Cotia virus</i>	Souris et primates
	PARAPOXVIRUS	<i>Bovine papular stomatitis virus</i> <i>Grey sealpox virus</i> <i>Orf virus</i> <i>Pseudocowpox virus</i> <i>Red deerpox virus</i>	Mammifères multiples (bétail principalement) et l'Homme
	PTEROPOXVIRUS	<i>Pteropox virus</i>	Chauve-souris
	SALMONPOXVIRUS	<i>Salmon gillpox virus</i>	Saumon
	SCIURIPOXVIRUS	<i>Squirrelepox virus</i>	Ecureuil
	SUIPOXVIRUS	<i>Swinepox virus</i>	Porcins
	VESPERTILIONPOXVIRUS	<i>Eptesipox virus</i>	Chauve-souris
	YATAPOXVIRUS	<i>Tanapox virus</i> <i>Yaba monkey tumor virus</i>	Primates

Table 3: détails des espèces d'hôtes naturels pour chaque genre de Chordopoxviridae

LES NOUVELLES ESPECES

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 amène à la création régulière de nouveaux genres tant leur diversité génétique est importante.[34] 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.[35,36] 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[34,37], les oiseaux[38,39], les otaries[40], d'autres mammifères[41], les reptiles[42–44], les poissons[45–47] etc... La classification des poxvirus selon l'ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) évolue régulièrement. En 2018 il n'existait que 11 genres parmi les *Chordopoxviridae* et 3 genres pour les *Entomopoxviridae*. Les nouvelles espèces découvertes étaient classées en attendant dans une section « autres ». En 2019 une nouvelle classification est élaborée par l'ICTV basée sur des caractéristiques phylogéniques mais également en fonction de l'hôte sur lequel le poxvirus est isolé. Dans cette nouvelle classification les *Chordopoxviridae* comptent désormais 18 genres et 1 genre a été ajouté aux *Entomopoxviridae*. Cependant certaines espèces anciennement « non classifiées » n'ont pas pu être rattachées à un nouveau genre et ont pour l'instant disparues de la classification 2019 (cf Tables 1 et 2).

LA NOTION DE RESERVOIR

Dès 1977, D. Baxby[48] se penche sur la diversité des poxvirus 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[49–51] est également strictement humain, cependant, sa pathogénicité se limite habituellement aux enfants et est bénigne (hormis quelques cas extensifs décrits chez les immunodéprimés sévères).[49] 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 le genre *Capripoxvirus*, les virus Sheeppox et le Goatpox peuvent infecter indifféremment les ovins ou les caprins.[52] Certaines espèces de poxvirus sont capables d'infecter des espèces animales plus éloignées. Le virus Cowpox par exemple est capable d'infecter les ovins, les équins, et l'homme (cf historique) mais il est également pathogène pour les chats et les rongeurs.[53–56] A noter cependant que le cas de l'espèce *Cowpox virus*

est particulier car il existe plusieurs sous-groupes. La génomique de cette espèce nécessiterait un important travail de reclassement car certains « Cowpox virus » sont très différentes et ont probablement été classés un peu vite.[57] Leur pouvoir pathogène chez les rongeurs est variable, plusieurs études sérologiques montrent des taux de prévalence importants chez les rongeurs (jusqu'à 70% pour certaines espèces)[58] alors qu'ils sont peu ou pas symptomatiques.[59] Dans ce travail de thèse, afin de constituer des témoins positifs pour la séro-neutralisation contre le virus cowpox (cf. chapitre 4), nous avons inoculé une souche de Cowpox virus à deux hamsters Syriens (*Mesocricetus auratus*) en sous-cutané. Les deux hamsters n'ont pas présenté de symptômes visibles (aucun pustule) cependant les serum recueillis 30 jours post infection présentaient d'importants taux d'anticorps neutralisants. Toutes ces données tendent à placer les rongeurs comme réservoir de certains *Orthopoxvirus*. [60–63]

Les retombées cliniques des changements d'hôtes sont difficiles à prédire. Par exemple, les virus Myxoma et Rabbit fibroma sont deux virus du genre *Lepriopoxvirus*. Leur hôte naturel est le lapin américain chez qui l'infection est modérément grave. Cependant le Myxoma chez le lapin européen est hautement létal alors que le Rabbit fibroma 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 chez les lapins européens contrairement au Myxoma ? [64]

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 virus Camelpox 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.[65] 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.[66] Enfin, une revue récente[67] s'est intéressée à ces différences de spécificité d'hôte entre les espèces et à la variabilité de certains « host range genes » censés conférer une facilité de changement d'hôte. Cette revue conclue de manière assez surprenante à l'absence d'association entre la diversité de ces gènes et la capacité de changement d'hôtes des espèces étudiées, remettant en cause la nomenclature confondante des « host range genes ».

Risques et enjeux depuis l'arrêt de la vaccination antivariolique

"Better to be scared by the improbable possibility than to be unprepared for the catastrophic reality"

Citation de Christopher Shayà propos du risque de (ré)émergence des poxvirus.[68]

Depuis l'éradication de la variole, la vaccination a été abandonnée. Les personnes nées après 1980/85 n'ont pas bénéficié du schéma de vaccination complet. 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 d'autres virus du genre *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.[69] On sait que trois genres de poxvirus zoonotiques sont capables d'infecter l'homme : *Orthopoxvirus*, *Parapoxvirus* et *Yatapoxvirus*. Parmi les *Orthopoxvirus*, l'espèce *Monkeypox virus* est la plus alarmante. De nombreuses épidémies ont été décrites en Afrique si bien qu'on parle aujourd'hui de « zones d'endémies » dans certaines régions. Un paragraphe est dédié au virus du Monkeypox en page 36. De plus, les poxvirus potentiellement émergents n'auront plus à faire face à la concurrence de la variole, en effet durant des siècles d'évolution de l'humanité, la variole était si répandue que les survivants étaient immunisés contre les autres *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.[70] Pour certains auteurs l'un des risques principaux serait l'émergence d'un *Orthopoxvirus* zoonotique mieux adapté à l'homme (un virus Monkeypox ou Camelpox par exemple 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* [71] mettent les poxvirus à large capacité d'hôte au centre du problème. Les Cowpox virus par exemple serait une menace car ils contiennent le plus grand ensemble de gènes immuno-régulateurs et possèdent une importante capacité d'adaptation.[29]

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.[72] Nous avons vu qu'il n'existe pas de réservoir naturel autre que l'homme. La question d'une réémergence naturelle est peu probable mais reste envisageable avec la décongélation de corps conservés dans le permafrost par exemple. 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 un des 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 (VEKTOR oblast de Novossibirsk) en possèdent environ 150.[73] En pratique, il est impossible de savoir si absolument tous les laboratoires et les équipes ont obtempéré. Des souches ont pu être stockées secrètement (de grandes quantités de variole ont été produites à but d'armement microbiologique dans les années 1970[74,75]), 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 le virus Horsepox [76,77], un Orthopoxvirus aujourd'hui disparu 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.[78–80] Aux États-Unis, on estime que 15 millions de doses de vaccin seraient disponibles[81] et diluables jusqu'à 40 millions (minimum requis pour faire face à une réelle menace).[82] Il existe également des stocks et des recherches sur les antiviraux ayant un effet sur les Orthopoxvirus, le cidofovir et le técovirimat principalement. [83–87]

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[71], mais également en fonction de l'exposition chronique au virus. Par exemple le Squirrelpox 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).[88] 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. Les populations d'écureuils roux sont alors naïves vis-à-vis du Squirrelpox 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. Sous nos latitudes, les Anglais observent une décimation des populations de mésanges.[39] Cela permet la découverte régulière de nouvelles espèces de poxvirus aviaires.[38,89]

Une épidémie vétérinaires grave de Cowpox virus a été rapportée chez des singes en captivités[90]. 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* est désormais la seule espèce strictement humaine. Contrairement à la variole, c'est un poxvirus bénin. Il est responsable d'une éruption pustuleuse chez les enfants limitée et 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 contagiosum* peut poser problème chez les sujets fortement immunodéprimés. Chez des patients atteints de SIDA par exemple (la transmission peut alors être sexuelle[91]) les lésions peuvent être extensives et nécessitent un traitement par cidofovir.[49–51]

Parmi les autres genres, 3 sont capables d'infecter l'homme : les *Parapoxvirus*, les *Orthopoxvirus* et les *Yatapoxvirus*. A noter également que l'espèce *Yokapox virus* (genre *Centapoxvirus*) a causé un cas anecdotiques chez une personne immunodéprimée[92]. Le genre *Yatapoxvirus* regroupe deux espèces infectant les primates dont une, le *Tanapox virus*, est capable d'infecter l'homme. Ce virus a été décrit pour la première fois entre 1957 et 1962 lors d'une épidémie au Kenya, Congo et Zaïre. Depuis seuls quelques cas sporadiques ont été rapportés et aucune transmission inter-humaine n'a été

observée.[93,94] Les Parapoxvirus comme l'Orf virus et le Pseudocowpox 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".[95] Plusieurs cas ont été rapportés chez les éleveurs de chèvres[28] ou chez les chasseurs de daims.[96] Dans notre étude sur la mise au point d'un système de PCR « pan-pox », 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.[97]

Pour les orthopoxviroses, nous allons nous focaliser sur 3 virus responsables d'épidémies : le Buffalopox, le Camelpox et le Monkeypox. Notons tout de même que plusieurs cas de Cowpox sont décrits dans la littérature récente.[98] Des cas par contamination à partir de rats domestiques[61,99] ou de chats[100] 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.[101,102] 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[103] et certaines rongeurs locaux ont pu jouer le rôle de réservoir.[104]

Enfin, notons que des cas d'orthopoxviroses provoquées par l'administration de la vaccine lors de campagne de vaccination chez les sujets immunocompétents et immunodéprimés ont également été décrits (vaccin vivant atténué).[105] Cela a conduit dans les années 1990 au développement de souches modernes de vaccine (comme la souche Vaccinia Ankara modifiée)[106] qui sont extrêmement atténuées, utilisables comme vecteur de vaccin recombinant même chez l'immunodéprimé.[107]

Cas du Buffalopox virus et du Camelpox virus

Le Camelpox, touche les camélidés. Il se transmet comme la variole par contact cutané ou inhalation.[66,108,109] 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.[110] La transmission par les arthropodes serait alors "mécanique" plutôt que réellement vectorielle.[65] Le Camelpox est grave voire mortel surtout chez les jeunes 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.[111,112] Les retombées cliniques chez l'homme seraient limitées mais le Camelpox inquiète car son génome est un des plus proche de la variole.[113]

Le Buffalopox virus n'est pas défini comme une espèce en tant que telle par l'ICTV 2019. Il appartient au genre *Orthopoxvirus*, probable déclinaison du Cowpox, il est actuellement en augmentation en Asie centrale (plus de 150 cas rapportés en Inde).[66] Il se transmet aux vaches domestiques et sévit sous forme d'épidémies dans les villages.[114,115] 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.[116] 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 étant contaminé par du Buffalopox.

[Le cas du Monkeypox virus](#)

De tous les cousins de la variole, le Monkeypox virus est le plus préoccupant. Dès 1988, des cas sont rapportés en Afrique (plus de 400 cas recensés au Zaïre).[56] A noter cependant que des études a posteriori ont montré qu'il y avait probablement une surestimation des cas par confusion avec la varicelle.[117,118] Le taux de mortalité du Monkeypox en Afrique varie de 1.5% à 11% selon les études.[71,91,117,118] 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 multipliée 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.[63,118] Au Nigéria, on assiste ces dernières années à une réémergence du Monkeypox (épidémie de 2017-2018 avec plus de 140 cas suspects dont 42 confirmés) alors que le dernier cas avait été décrit en 1978.[119,120] A noter que suite à cette épidémie, deux cas ont été rapportés au Royaume Uni à quelques jours d'écart. Les deux hommes revenaient du Nigéria (un militaire en déplacement et un touriste) et ont déclaré les symptômes sur le sol anglais après avoir voyagé par bateau, train et avion.[121] Une transmission interhumaine d'un des deux patients à une infirmière a été rapportée. Les trois patients ont été traités sans complication par brincidofovir, une prodrogue du cidofovir.

En 2003, les Etats-Unis ont connu une épidémie de Monkeypox chez l'homme 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.[122] Au total, 79 cas de Monkeypox humain seront diagnostiqués en quelques semaines dans plusieurs Etats (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 antivariolique préventive durant cette épidémie. Aucun mort n'est à déplorer et aucune transmission interhumaine n'a été objectivée durant cette épidémie.[123,124]



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 campaign

Objectifs et Hypothèses

L'accumulation des connaissances sur les poxvirus apparaît limitée comparativement à d'autres pathologies infectieuses. En s'aidant du site PubMed, si on ajoute les mots clés « poxvirus », « smallpox » et « Vaccinia virus » on observe un nombre de publications annuelles stable d'environ 600/an de 1960 à 1980. En 1983 le nombre de publication est quasiment nul. Puis, de 1985 à 1999, les publications ré augmentent jusqu'à 800/an avec le développement de vaccins de deuxième et troisième générations et l'émergence du monkeypox virus en Afrique. Entre 2000 et 2004 on observe un pic important de publications en raison des nombreux financements alloués à ce sujet suite aux attaques bioterroristes à l'anthrax. Si on ajoute le mot clé « bioterroriste » le nombre de publications annuelles atteint 1800. Cependant, depuis 2005 le nombre de publications sur les poxvirus ne cesse de diminuer. En moyenne entre 1980 et 2020 en additionnant le nombre de publications annuelles reliées aux mots clés « poxvirus » ou « smallpox » ou « Vaccinia virus » on atteint seulement 725 publications/an. Les seuls mots clés « influenza virus » et « tuberculosis » pour la même période réfèrent respectivement à 2691 publications/an et 3407 publications/an. Pour information, 2020 et 2021, le mot clé « SARS-CoV-2 » est relié à 65 540 publications/an. Cependant, comme expliqué précédemment, le risque d'émergence ou de re-émergence des poxvirus est réel. L'objectif de ce travail de thèse mené au sein de l'UVE (unité des virus émergents) est d'enrichir les connaissances des communautés scientifiques et médicales afin d'être mieux préparé à une éventuelle (re)-émergence de poxvirus. Ce risque est multifactoriel et dépend à la fois des capacités de changement d'hôte virales et de l'état d'immunisation des populations.

Pour cela ce travail se découpe en deux objectifs :

- La détection directe par biologie moléculaire de tous les poxvirus
- Un état des lieux de la séroprévalence anti-orthopoxvirus dans différentes populations

DETECTION MOLECULAIRE DES POXVIRUS

Hypothèse

Malgré l'importante hétérogénéité génomique des poxviridae, quelques articles de la littérature scientifique rapportent des séquences de gènes conservées entre différents chordopoxviridae. Nous supposons qu'un examen génomique approfondi des génomes nous permettrait d'identifier des séquences conservées parmi tous les poxviridae y compris chez les entomopoxviridae. La découverte

de telles séquences permettrait de développer un outil de détection élargie « pan-pox » par biologie moléculaire allant au-delà des systèmes actuellement existant basés sur le GC%.

Nous proposons donc le développement d'un système de PCR en temps réel basé sur une région conservée chez tous les poxvirus avec plusieurs applications :

- Une application diagnostique simplifiée devant une suspicion de poxvirose humaine ou vétérinaire
- Une application en recherche par son utilisation sans *a priori* à grande échelle sur des prélèvements humains, animaux ou environnementaux. Cela permettrait de :
 - Découvrir de nouvelles espèces et de nouveaux genres non encore connus (comme le laisse supposer la littérature qui rapporte chaque année de nouvelles espèces sur infection vétérinaire)
 - Découvrir de nouveaux réservoirs et ainsi aider à la compréhension de la circulation infra-clinique des poxvirus

Dans la première partie de ce travail nous avons développé un système de PCR en temps réel « pan-pox » et nous avons testé un grand nombre de prélèvements humains et d'arthropodes dans le but d'identifier des poxvirus.

ETAT DES LIEUX SEROLOGIQUE

Hypothèses

Au vu des données de la littérature, nous supposons que l'immunité anti-orthopoxvirus des populations doit se composer à la fois d'une immunité résiduelle chez les personnes ayant bénéficié de la vaccination anti-variolique et d'une immunité due à une exposition naturelle à d'autres orthopoxvirus. Nous supposons également qu'il existe une immunité croisée importante entre les orthopoxvirus.

Pour tester ces hypothèses et quantifier la part respective des immunisations naturelles et post-vaccinales, nous avons mesuré les titres d'anticorps neutralisant le virus de la vaccine et le Cowpox virus dans des serums humains issus de différentes régions de France et du monde.

Chapitre II :

DEVELOPPEMENT D'UN SYSTEME DE PCR EN TEMPS REEL « PAN-POX »

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 et plus ou moins nécrotiques en fonction du virus impliqué. L'animal de contamination peut être moins évident (animaux domestiques possibles, rongeurs, chats etc...). 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. Au stade papuleux l'examen anatomopathologique montre 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 détection de l'ADN viral 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.

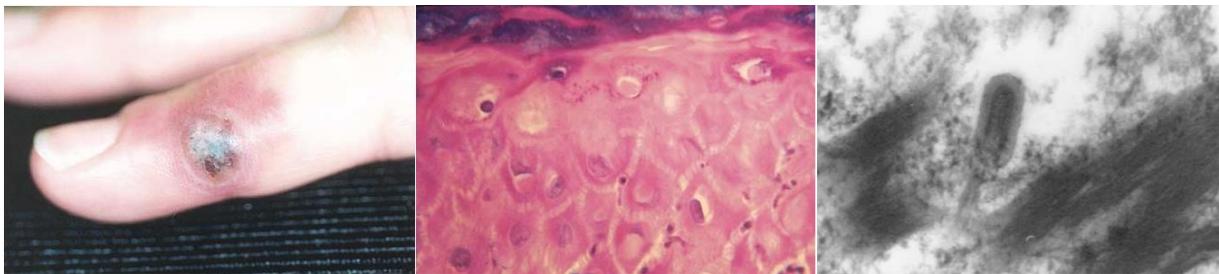


Photo 5 : Trois étapes de diagnostic d'une parapoxvirose. Stade clinique (nodule du trayeur unique). L'analyse anatomopathologique de la biopsie (coloration à l'hématoxyline-éosine x400) révèle une spongiose avec inclusions cytoplasmiques et intranucléaires caractéristique d'une infection à poxvirus. 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.

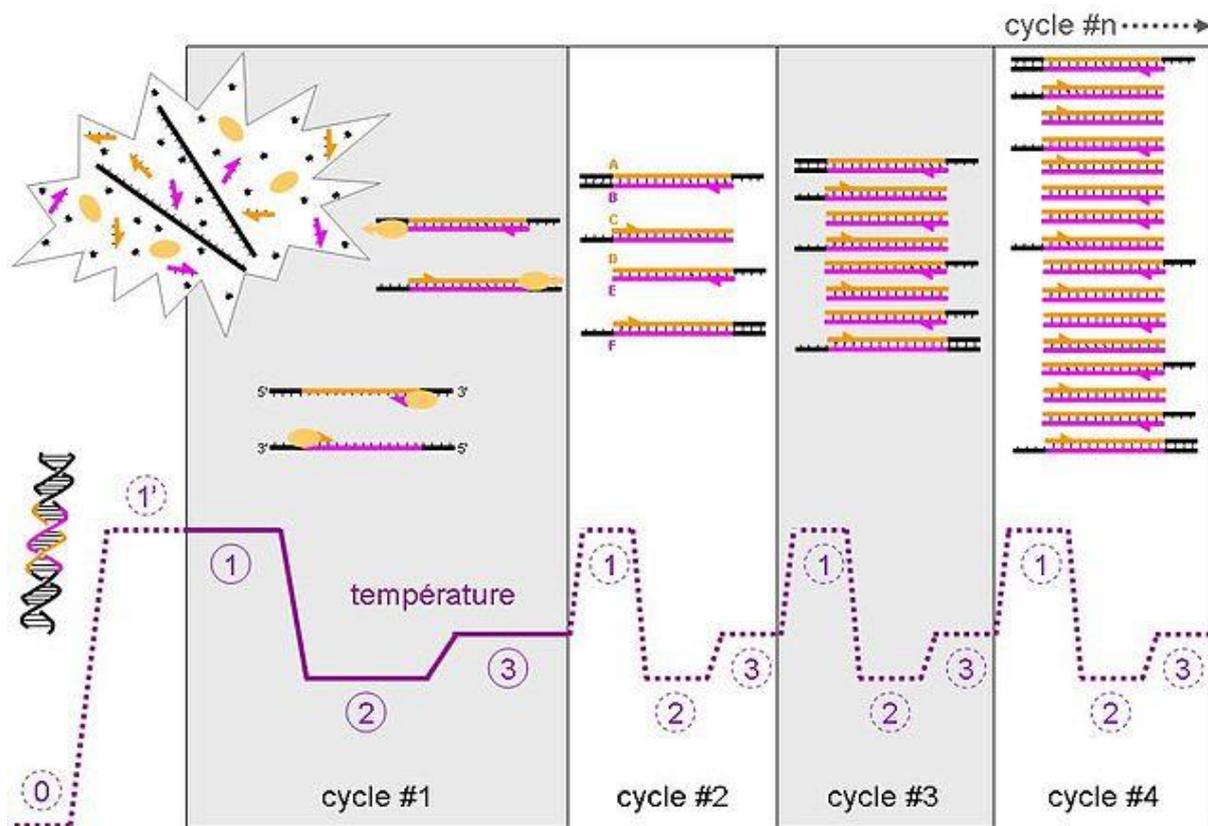


Figure 6: Schéma récapitulatif du principe de PCR

Enfin, la phase d'élongation permet de synthétiser le brin d'ADN matriciel (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 d'eau chaude du parc Yellowstone d'une des premières bactéries extrêmophiles : *Thermus aquaticus*. Cette bactérie, vivant usuellement entre 50 et 80°C, a permis de fournir la « Taq polymérase » qui fonctionne de manière optimale à 72°C. Ces étapes sont ainsi répétées plus d'une trentaine de fois grâce aux

automates thermocycleurs qui permettent une variation très 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 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 du système de PCR « Pan-Pox »

Les poxviridae possèdent un des génomes les plus complexes du règne viral. La structure est globalement similaire entre les différents genres mais le contenu des gènes est fonction de l'hôte.[125] 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.[125–127] Les Orthopoxvirus[126,128] et les Avipoxvirus[129] font partis des clades les plus diversifiés. Par exemple, les Avipoxvirus 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.[129,130] Dans la sous-famille des *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.[126,127] Dans ce contexte on comprend que la réalisation d'un système de PCR « pan-poxviridae » comprenant les deux sous-familles *Chordopoxvirinae* et *Entomopoxvirinae* 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.[131] Il existe quasiment un système de PCR spécifique pour chaque espèce d'intérêt humain ou vétérinaire.[132,133] 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[134] parmi les Chordopoxvirinae a permis la mise au point de systèmes "pan-*Orthopoxvirus*".[37,40,78] Les gènes conservés E9L[135] ou rpo147[136] entre autres sont souvent utilisés. Chez l'homme, des systèmes regroupant les genres *Parapoxvirus* et *Orthopoxvirus* ont été développés. Il s'agit effectivement des principaux genres responsables de zoonoses humaines. Cependant de par leurs compositions nucléotidiques très différentes, les systèmes utilisés combinent plusieurs jeux d'amorces dans des systèmes multiplex.[137] Des systèmes pour les genres impliqués en santé vétérinaire ont également été développés. Pour le genre *Avipoxvirus* (clade extrêmement hétérogène) le gène 4b[138] codant pour une protéine du core est autant utilisé pour la détection que pour la classification.[39,130,139] Le genre *Capripoxvirus* fait également l'objet du développement de nombreux systèmes centrés sur les gènes A32L et B2L.[140] 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.[52,131,141]

En 2010, Li *et al.*[142] (collaboration Américaine et Allemande) publie 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 le genre *Parapoxvirus* et le *Molluscum contagiosum*. A noter que le *Nile crocodilepox virus* présente un génome à 61% de GC mais à l'époque de l'étude, il n'a pas été considéré. Les 6 autres genres de *Chordopoxvirinae* testés dans cet article ont un génome à bas GC% (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 en SybrGreen® de savoir dans quelle catégorie se trouve le poxvirus. L'approche de Li *et al.* 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'appartient pas au genre *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 genres. Les *Avipoxvirus* ont été exclus d'emblée de l'étude en raison de leur haut taux de recombinaison génétique et aucun

entomopox (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, le système « pan-pox » de Li *et al.* a fait ses preuves en permettant la découverte de l'espèce *Yokapox virus*. [32,102]

En ce qui concerne la sous famille des *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*. [143] Leurs taux de GC% et bas (de 20 à 50%).

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 *Avipoxvirus* qui est le plus diversifié et ne devrait pas fonctionner 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 coûteuse. L'application en diagnostic humain dépendra des performances par rapport aux systèmes déjà existant. En revanche, son utilisation en screening systématique, permettrait la découverte de nouvelles espèces, de nouveaux genres ou des chainons évolutifs manquants. Cela aiderait à nous préparer à une éventuelle émergence de poxvirus inattendus. 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.

Les grandes étapes de développement du système et publication

Ce projet ayant abouti à un article scientifique publié, le but de ce paragraphe est uniquement de présenter le raisonnement que nous avons suivi, le détail des résultats se trouve dans l'article ci-après.

POSTULAT DE DEPART ET ANALYSES BIOINFORMATIQUES

Nous avons supposé que pour cibler tous membres de la famille des *Poxviridae*, nous devions trouver une séquence conservée entre les sous-familles *Entomopoxvirinae* et les *Chordopoxvirinae*. Logiquement, si une telle séquence existe, elle devrait être conservée chez tous les poxvirus. Pour ce faire nous avons dans un premier temps sélectionné dans la littérature scientifique un panel de gènes conservés chez tous les *Chordopoxvirinae* : nous en avons trouvé 49. [45,126] Nous avons ensuite

constitué une base de données contenant toutes les séquences protéiques des entomopoxvirinae disponibles sur GenBank. Puis, grâce à un outil de « Blast interne » mis au point dans l'UVE, nous avons blasté une par une les 49 séquences protéiques potentiellement conservées d'un Monkeypox virus sur notre base « Entomopox ». Seulement une dizaine de séquences protéiques ont donné un résultat potentiel. Pour chacun de ces 10 gènes (et homologues), nous avons sélectionné un panel réduit d'espèces représentatif de la diversité des poxvirus (au moins un représentant de chaque genre (entomo- et chordopoxvirinae dont le génome complet était disponible sur GenBank). Enfin nous avons aligné les séquences potentiellement conservées des espèces du panel et avons analysé manuellement les alignements afin de trouver une région qui permettait le design d'un système de PCR. Parmi tous les alignements étudiés nous n'avons trouvé qu'une seule séquence potentielle d'une centaine de nucléotides se trouvant au début du gène VETFS (Vaccinia virus early gene transcription factor small subunit (ORF : D6R)). Pour vérifier le potentiel de cette séquence nous avons récupéré les homologues D6R de toutes les espèces disponibles sur GenBank et un nouvel alignement nous a confirmé que cette séquence était bien (relativement) conservée parmi tous les poxvirus. Malgré quelques divergences de nucléotides importantes principalement entre les entomopoxvirinae et les chordopoxvirinae nous avons décidé qu'elle serait la cible de notre PCR « pan-pox ».

MISE AU POINT TECHNIQUE

La mise au point technique permettant de trouver le bon équilibre entre sensibilité et spécificité a été longue et délicate. Nous avons commencé par un système de SybrGreen® car initialement la séquence amplifiée ne nous semblait pas assez conservée entre les deux amorces pour concevoir une sonde. Nous avons cherché « à tâtons » le bon couple d'amorces (nous avons testé 10 amorces sens et 12 amorces anti-sens en faisant varier le nombre de dégénérescence et/ou d'inosines) et le bon protocole d'amplification (amorces avec des Tm très bas). Le système en SybrGreen® permettait de différencier les haut et les bas GC% grâce à la température de fusion des amplicons. Les « haut GC% » (*Parapoxvirus* et le *Molluscum contagiosum*) présentaient un Tm autour de 80°C alors que « les bas GC% » étaient compris entre 72 et 75°C. Bien qu'assez sensible, nous avons eu un important problème de spécificité avec ce système en raison de la température d'hybridation basse et de la forte dégénérescence des amorces.

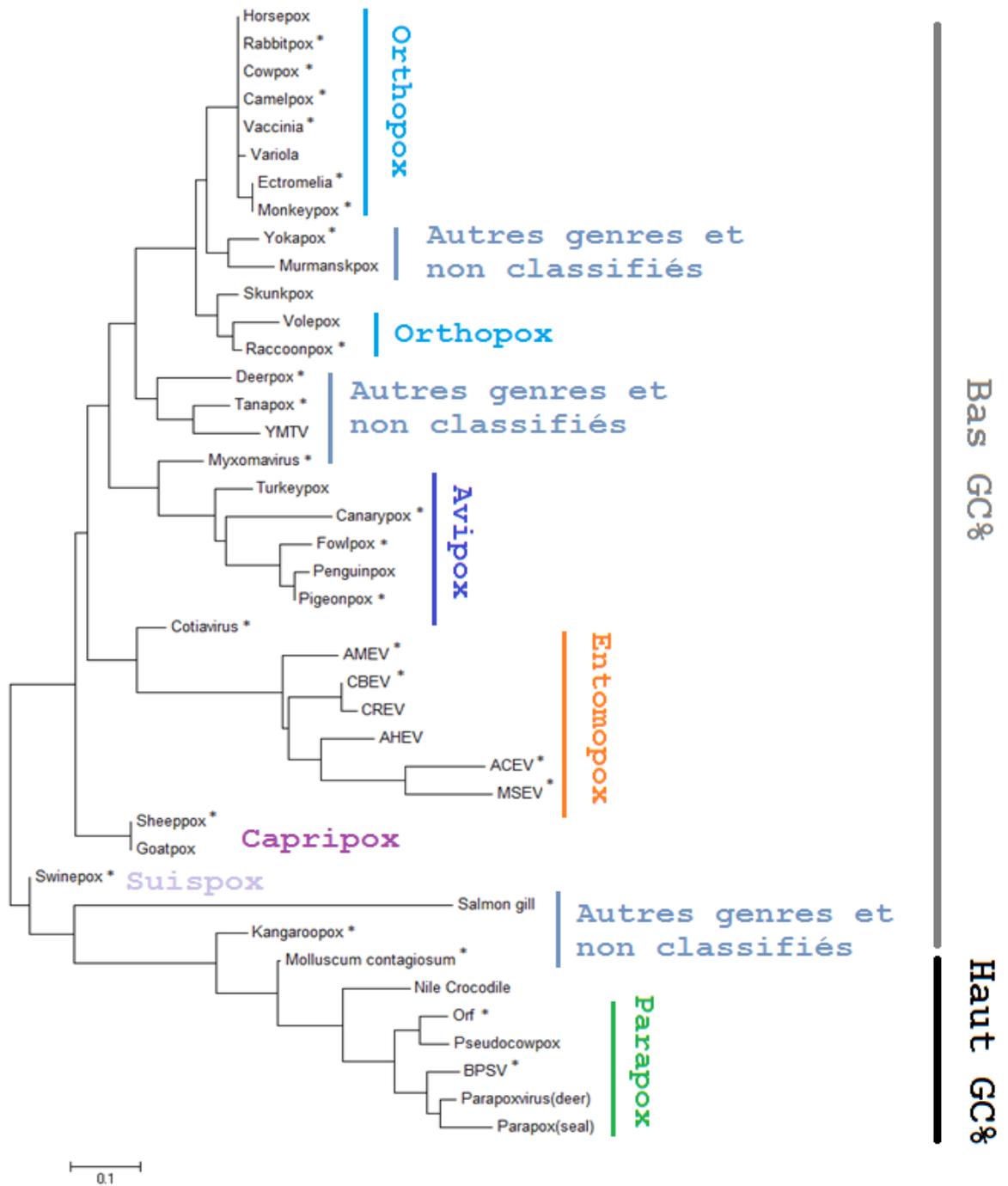


Figure 7: Arbre phylogénétique en Maximum likelihood (1000 bootstraps, MEGA 7) basé sur la séquence du gène D6R (et ses homologues) amplifiée par le système « pan-pox ». Les astérisques indiquent les séquences qui ont été testées dans notre étude (ADN ou plasmides synthétiques).

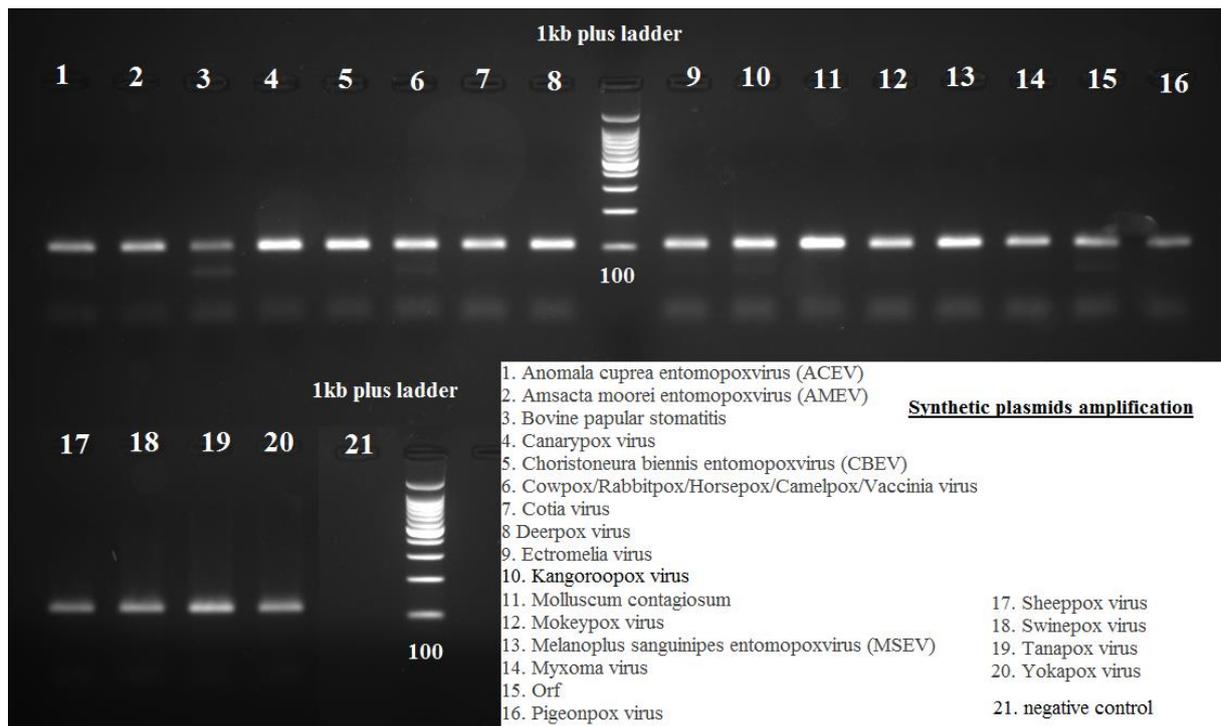


Figure 8: Photo (gel d'agarose) du fragment amplifié par le système Pan-pox (104 nucléotides)

Synthetic genes Melting curve Plot

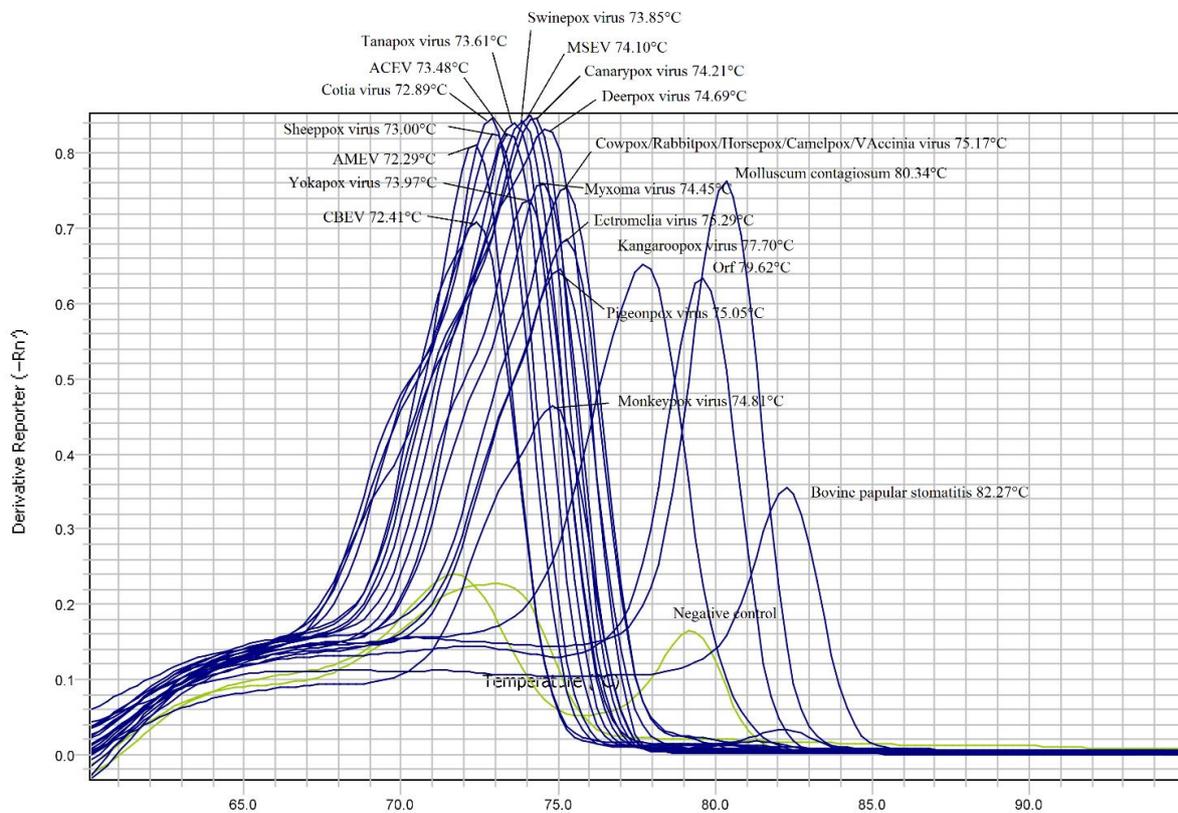


Figure 9: courbes de fusions des amplicons issus des différentes espèces de poxvirus

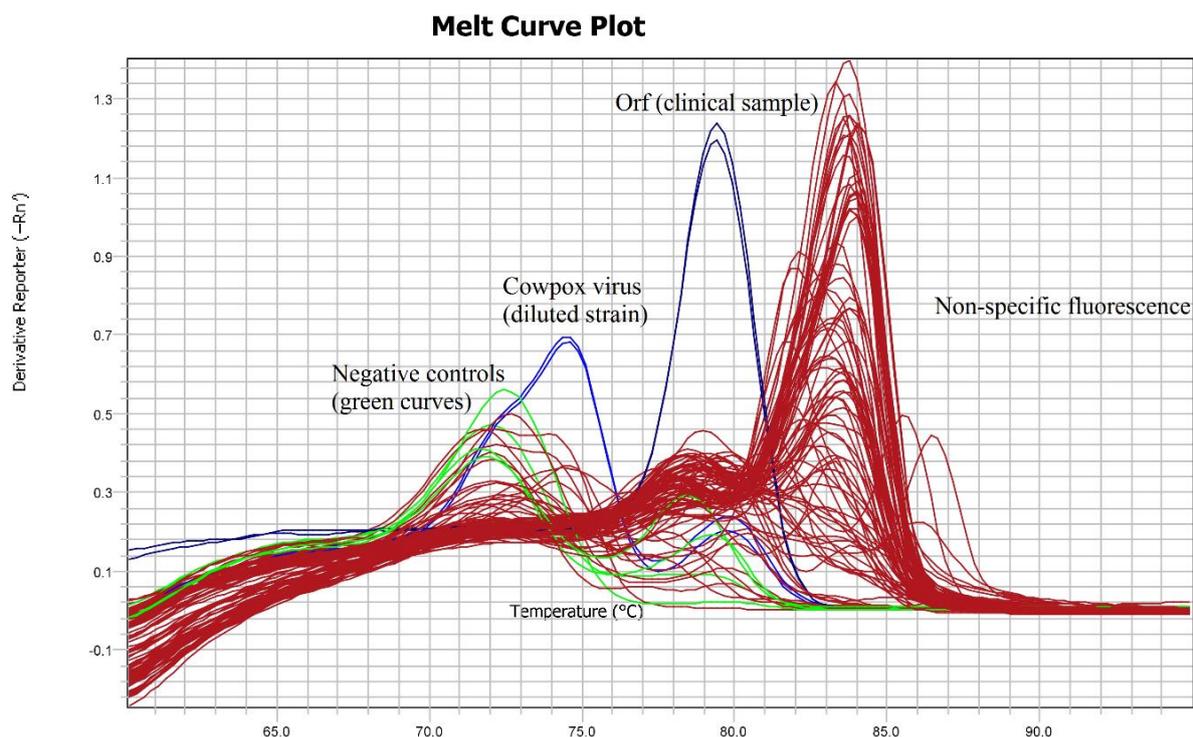


Figure 10: courbes de fusion résultant d'amplification non spécifiques, en fonction des expériences, certains prélèvements présentaient parfois des T_m superposées aux T_m d'intérêt.

Par la suite nous avons réussi à rajouter une sonde pour augmenter la spécificité (13 sondes testées). Le système a été testé sur différentes cibles représentatives de la diversité des poxvirus : soit des extraits d'ADN de souches virales de la collection EvaGé ou envoyés par des laboratoires partenaires soit des plasmides synthétiques (Figures 3 et 4 des « supplemental data »). Ces tests nous ont confirmé que notre système était capable de détecter au moins un poxvirus par genres connus en 2019 ainsi que les espèces non classifiées (*Chordopoxviridae* et *Entomopoxviridae*). Ensuite, grâce à la quantification des plasmides des calculs de limites de détection du système ont pu être effectués. Toutes ces données sont présentées dans l'article « A novel and sensitive real-time PCR system for universal detection of poxviruses » publié dans Scientific reports.

TEST DU SYSTEME A GRANDE ECHELLE

Une fois le système mis au point, conformément à notre hypothèse de départ nous l'avons testé à grande échelle afin d'en établir la spécificité et, par la même occasion, de trouver des poxvirus. Nous avons testé à l'aveugle sur plusieurs centaines de prélèvements humains de tout type issus de l'APHM. Tous les positifs que nous avons eu étaient des *Molluscum contagiosum*. Nous avons également testé

le système sur des extraits d'arthropodes : des phlébotomes (pas de positifs) et des tiques dans lesquelles nous avons trouvé de nombreux positifs. Après exploration avec l'étudiant qui travaillait sur ces tiques, il s'agissait d'espèces du genre *Parapoxvirus* déjà connues et détectables par un système pan-parapox. Les données propres au système « pan-pox » sur les prélèvements humains et d'arthropodes sont présentées dans l'article « A novel and sensitive real-time PCR system for universal detection of poxviruses » publié dans Scientific reports. Concernant la découverte de parapoxvirus dans les extraits de tiques, il s'agissait de deux projets concomitants au développement du système « pan-pox » qui sont détaillés dans le paragraphe suivant.

TIQUES ET PARAPOXVIRUS

Nous avons eu l'occasion de collaborer avec deux étudiants travaillant sur les pathogènes transmis par les tiques. Achille Ouedraogo a travaillé sur des tiques provenant du Burkina Faso (bétail bovins) et Vincent Cicculi sur des tiques de Corse (bovins, chevaux, moutons et sangliers). Le travail de Achille a abouti à une publication scientifique ci-après « Detection of Two Species of the Genus Parapoxvirus (Bovine Papular Stomatitis Virus and Pseudocowpox Virus) in Ticks Infesting Cattle in Burkina Faso » publié dans Microorganisms. Celui sur les tique de Corse « Molecular detection of Parapoxvirus in Ixodidae ticks collected from cattle in Corsica » vient d'être accepté dans Veterinary Medicine and Science. Dans les deux cas nous avons identifié, de manière un peu fortuite, l'ADN de deux parapoxvirus : les virus pseudocowpox (PCPV) et bovine papular stomatitis (BPSV) par PCR en temps réel dans les tiques récoltées sur les bovins uniquement. Nous avons utilisé des systèmes pan-*Parapoxvirus* et des systèmes spécifiques de chaque espèce pour confirmation. Nous avons également pu tester notre système « pan-pox » en cours de développement à ce moment-là et inclure ces données dans la publication. Parmi les tiques positives plusieurs espèces étaient concernées : *Amblyomma spp.* et *Hyalomma spp.* pour le Burkina Faso et *Hyalomma spp.* et *Rhipicephalus bursa* pour la Corse. A noter que aucun virus du genre *Orthopoxvirus* n'a été détecté dans les tiques collectées en Corse ou du Burkina Faso. Ces deux travaux soulèvent la question du rôle des tiques dans la transmission des poxvirus. En effet d'autres études similaires montrent que de l'ADN de parapoxvirus (et d'orthopoxvirus)[144] peut être retrouvé dans les tiques attachées sur le bétail (symptomatique ou asymptomatique).[145] Cependant pour le moment la transmission par contact direct entre les animaux reste le principal moyen de contamination admis.[146] Il est impossible de savoir si les tiques elles-mêmes sont infectées ou si elles sont simplement vectrices du virus en raison du contact avec la peau de l'animal. Le rôle de la tique dans la transmission et la pathogénicité des parapoxviroses zoonotiques et humaines n'est pas clairement identifié. Cela permet juste de confirmer qu'il existe une circulation environnementale complexe et infra-clinique de parapoxvirus impliquant le bétail bovin et les tiques

dans différentes régions du globe. Compte tenu des enjeux actuels concernant l'émergence des pathologies virales dans le contexte de la diminution de biodiversité et du changement des interactions entre les faunes domestiques, d'élevage et sauvages, la surveillance et le renfort des connaissances à ce sujet semble nécessaire.

Conclusion du Chapitre II : bilan du système « pan-pox »

Ce système a été conçu grâce à un alignement de séquences conservées entre l'ensemble des *Poxviridae*. Du fait de leur diversité génétiques le système mis au point n'est pas « classique », en effet les amorces et sondes utilisées sont multiples et présentent de nombreuses dégénérescences. La mise au point technique a été un véritable challenge. Lors de son évaluation nous avons testé ce système dans l'objectif de découvrir de nouveaux poxvirus ou d'en trouver dans des prélèvements atypiques. Parmi les prélèvements humains tous les positifs étaient du *Molluscum contagiosum* (dont un écouvillon pharyngé chez un patient immunodéprimé) et des cas d'Orf (avec forte suspicion clinique). Lors de son utilisation à grande échelle chez des arthropodes nous avons trouvé des positifs dans des ADN extraits de tiques (déjà décrit dans la littérature) en parallèle de deux étudiants qui utilisaient des systèmes pan-parapoxvirus. Malgré sa sensibilité et sa spécificité, l'utilisation du système pan-pox à grande échelle dans le cadre de ce travail de thèse ne nous pas permis de découvrir de nouvelles espèces ou de nouveaux réservoirs. Nous espérons donc que sa diffusion dans le milieu scientifique permettra d'atteindre cet objectif.



OPEN

A novel and sensitive real-time PCR system for universal detection of poxviruses

Léa Luciani¹✉, Lucia Inchauste¹, Olivier Ferraris^{1,2}, Rémi Charrel¹, Antoine Nougairède¹, Géraldine Piorkowski¹, Christophe Peyrefitte^{1,2}, Stéphane Bertagnoli³, Xavier de Lamballerie¹ & Stéphane Priet¹

Success in smallpox eradication was enabled by the absence of non-human reservoir for smallpox virus. However, other poxviruses with a wider host spectrum can infect humans and represent a potential health threat to humans, highlighted by a progressively increasing number of infections by (re)emerging poxviruses, requiring new improved diagnostic and epidemiological tools. We describe here a real-time PCR assay targeting a highly conserved region of the poxvirus genome, thus allowing a pan-Poxvirus detection (Chordopoxvirinae and Entomopoxvirinae). This system is specific (99.8% for vertebrate samples and 99.7% for arthropods samples), sensitive (100% for vertebrate samples and 86.3% for arthropods samples) and presents low limit of detection (<1000 DNA copies/reaction). In addition, this system could be also valuable for virus discovery and epidemiological projects.

The successful global eradication of smallpox (caused by the *Variola virus*) in 1980 was an unprecedented victory for humankind and preventive medicine, making the world free of one of its most dangerous diseases. This was achievable due to the adoption of a World Health Organization vaccination strategy, which exploited the absence of a non-human poxvirus reservoir and the cross-reactive immunity induced by the related avirulent strain, viz., *Vaccinia virus*. *Vaccinia virus* and *Variola virus* are both members of the genus *Orthopoxvirus* within the *Chordopoxvirinae* subfamily.

Paradoxically, this triumph created a situation in which the subsequent cessation of vaccination has rendered the global human population vulnerable to (ortho)poxvirus infections. This is illustrated by the gradual increase in numbers of infections by (re)emerging members of the genus *Orthopoxvirus*, including *Monkeypox*^{1,2}, *Cowpox*³, *Camelpox* and *Buffalopox virus*⁴. Among these viruses, *Monkeypox virus* is the most pathogenic with a case fatality rate of 1–10% and an attack rate of 9% in the 1980s that was recently reassessed to 50% due to a decrease in the prevalence of smallpox vaccine. *Cowpox virus* does not appear to be capable of human-to-human transmission but can infect various hosts, particularly rodents, which, with a sero-prevalence rate up to 70%⁵, seem to have a role in its dissemination. The *Camelpox virus*, whose genome is very similar to that of smallpox, has a mortality rate of 10–30% in camels, but its precise impact on humans has not yet been evaluated. *Buffalopox virus*, which is responsible for localized epidemics in Central-Asia⁶, is yet poorly studied although a sero-prevalence study in human have shown that 17% of unvaccinated population have antibodies against *Buffalopox virus*, suggesting a sub-clinical circulation in this region⁴. Other genera can cause human poxvirosis like *Molluscipoxvirus* (prevalence of 5 to 11% in children⁷), the zoonotic *Parapoxvirus*⁸ (common infection in people in contact with infected sheep and cattle), *Yatapoxvirus*⁹ (affecting humans and primates in Africa) or the strain NY_014 recently discovered in an immunocompromised patient which seems to be close to a new genus: *Centapoxvirus*¹⁰. Poxviruses are ubiquitous, known to infect a broad-spectrum of hosts, and their capacity to switch hosts is only partly understood and is unpredictable^{11,12}. These observations imply that (re)emerging poxviruses from several genera could constitute a public health concern in the future. Consequently, there is a need for physicians and veterinarians to be better prepared for the re-emergence of already known poxviruses and for the potential emergence of yet unknown ones.

The diagnosis of known poxvirus infections combines clinical examination and molecular biology. The real-time PCR systems developed to date only enable the detection of poxviruses implicated in human (mainly from the genera *Orthopoxvirus*¹³ and *Parapoxvirus*¹⁴) and veterinary diseases¹⁵. Although broader spectrum systems

¹Unité des Virus Émergents (UVE: Aix-Marseille Univ-IRD 190-Inserm 1207), Marseille, France. ²Centre National de Référence-Laboratoire Expert Orthopoxvirus, Institut de Recherche Biomédicale Des Armées (IRBA), 91220 Brétigny-sur-Orge, France. ³IHAP, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, Toulouse, France. ✉email: lea.luciani@hotmail.fr

was published in 2010 and 2014, they were conventional PCR system that excludes members from several genera and *Entomopoxvirinae*^{16,17}. No qPCR system capable of detecting all poxviruses is therefore currently available. Such a tool would be less burdensome, faster and more accurate than conventional PCR and could meet future needs for diagnosis and discovery of new poxviruses.

Here, we report and validate the performance of a qPCR detection system, targeting a nucleotide sequence conserved in all poxviruses, and capable not only of detecting known pathogenic poxviruses but also any other poxviruses from the *Chordopoxvirinae* and *Entomopoxvirinae* subfamilies.

Results

To establish a real-time PCR system able to detect any poxviruses, we first looked for a conserved gene within the entire *Poxviridae* family genome¹⁸. The Monkeypox virus D6R homologous genes (70 kDa small subunit of early gene transcription factor VETF) were the only ones displaying a conserved region of at least 100 nucleotides suitable for primers/probes design (Fig. 1A and Supplemental Fig. 1 and detailed in the method section). Numerous primers (10 forward and 12 reverse) and 13 probes were designed and evaluated, alone or mixed, on synthetic plasmids containing the sequence of the target conserved region of 22 different virus species among 13 genera of the *Chordo-* and *Entomopoxvirinae* subfamilies. After this optimization process, the combination of one forward and two reverse primers, with four probes gave the best results on all synthetic standards.

The resulting qPCR system, hereafter named panPox, was then assessed for sensitivity on all synthetic plasmids. The detection limit (DNA copies/reaction) was 100 for 12 species and 1000 for the others (Fig. 1B and Supplemental Table 1). High reproducibility during varying test conditions and between operators was demonstrated by the coefficients of variation (CVs) of intra-assay variability lower than 4% (Supplemental Table 1). Similar results for inter-assay variability were obtained (data not shown).

Poxvirus strains and positive clinical specimens (11 different species) were further used to evaluate the efficiency of the panPox assay through Ct value comparison to previously published qPCR systems that are routinely used in French hospitals and veterinarian facilities (Fig. 1C and Supplemental Table 2). As expected, the entire samples positive for a given poxvirus were detected by the panPox system, showing that it has been always as effective as the pan-genera reference systems^{13,14} on species from *Ortho-* and *Parapoxvirus* genera and the extremely sensitive *Myxoma* virus-specific system¹⁹. Some minor differences (~ 1Ct) between panPox and reference systems were observed for *Buffalopox* and *Myxoma* virus but these differences were not considered significant given a qualitative positive/negative assay. In contrast, a significant difference (~ 7 Cts) was observed for *Raccoonpox* virus, reflecting the inability of the panOrthopox reference system to detect this strain. Indeed, the alignment of the target site sequences of the reference system (Supplemental Fig. 2), which was designed only for human pathogenic poxviruses, confirmed that *Raccoonpox* virus was not detected by the reference system as effectively as by our system. Human clinical samples (blood and cutaneous) known to be positive for other DNA viruses (n = 26) were also used to demonstrate that there was no cross-reactivity against cytomegalovirus, human adenovirus, Epstein Barr virus, varicella zoster virus, herpes simplex virus and herpesvirus 6. Finally, we also controlled that a non-specific amplification of genomic DNA did not exist when using the panPox system (Supplemental Table 2).

A prospective analysis of a large collection of biological samples, including human samples (n = 1744), from various swabs, biological fluids, and biopsies, and crushed arthropod (ticks and sandflies) samples (n = 793) from the different geographical origins was performed to evaluate the specificity and sensitivity of the panPox assay (Fig. 1D and Supplemental Table 3). Each human sample was tested under routine hospital conditions with panOrtho¹³ and -Parapoxvirus¹⁴ systems, revealing 2 cases of Orf virus (also diagnosed clinically). The remaining specimens were presumed negative for poxviruses, except 4 samples with a clinical suspicion of *Molluscum contagiosum*. The positive cases (6/6) of poxvirus were all detected by the panPox system. Among 1738 presumably negative specimens, 98.7% (1716/1738) proved to be negative by the panPox assay and 1.1% (19/1738) displayed doubtful and late positive curves but were non-reproducible in a second PCR and were thus considered negative. Three samples gave late positive and reproducible curves but were negative using NGS sequencing and thus were considered to be false positives. The panPox system therefore had a specificity of 99.8% (1735/1738) on human specimens. Crushed arthropod samples from sandflies (n = 564), cattle ticks (n = 98), wild boar ticks (n = 77) and ticks found attached on patients (n = 54) were then tested using the panPox, and routine panOrtho¹³ and panParapoxvirus¹⁴ systems. Among those samples, only cattle ticks displayed some positives (22/98) using a panParapoxvirus system (confirmed by NGS). Most of these parapoxvirus-infected ticks were confirmed by the panPox assay (19/22), but 3 false negatives were obtained and 2/771 (0.26%) false positives were detected by the panPox assay but not by the reference systems and NGS sequencing. The panPox system therefore exhibited a specificity of 99.7% (769/771) and a sensitivity of 86.4% (19/22) on arthropod specimens (Fig. 1D and Supplemental Table 3).

Discussion

Forty years after the eradication of smallpox, the world of poxviruses remains under-explored, paving the way for a potential threat to human health caused by a (re)emerging poxvirus. The development of rapid and inexpensive molecular biology tools, that can improve our understanding of poxviruses and their epidemiology and also enable the detection of known and yet to be discovered viruses, will benefit both human and veterinary health.

In this study, we have described the first qPCR system, panPoxvirus, targeting a conserved nucleotide sequence amongst all *Poxviridae*. This nucleotide sequence is located within the Monkeypox virus D6R gene, which belongs to the so-called 49 “core” genes of poxviruses. The “core” genes are involved in key functions such as replication, transcription, and virion assembly and are, by definition, present and conserved among all *Poxviridae*, including new variants or emerging viruses^{18,20}. In addition, the panPox system used degenerate primers and

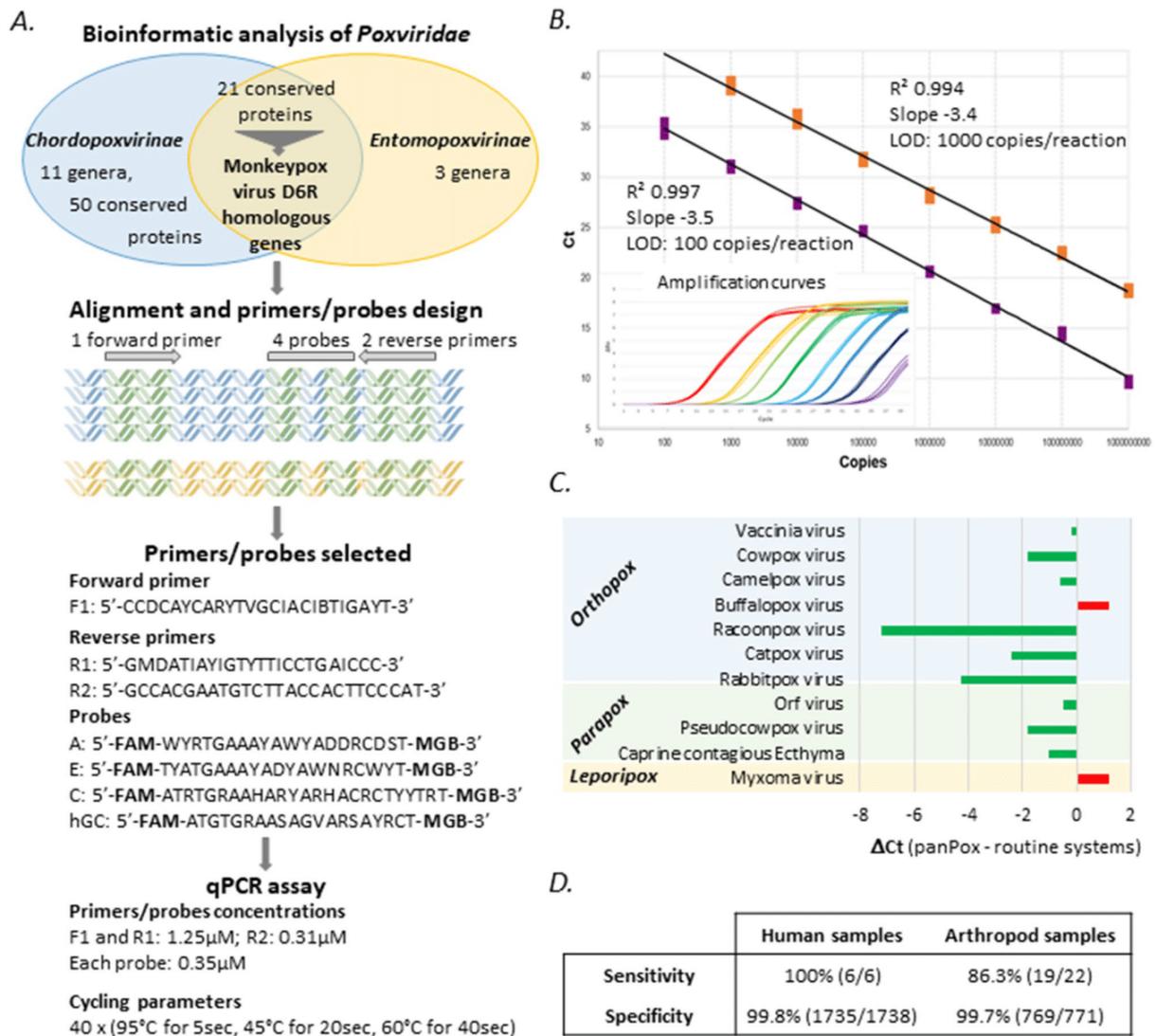


Figure 1. Development of a panPox real-time PCR system. (A) Workflow of panPox qPCR assay design. The bibliographic and bioinformatic analysis enables the identification of conserved genes between *Chordopoxvirinae* and *Entomopoxvirinae*. Protein blast of *Chordopoxvirinae* sequences on *Entomopoxvirinae* database identified 21 conserved proteins. Alignment of candidate genes (highest Blast scores) facilitated the design of a qPCR system combining 1 forward and 2 reverse primers and 4 probes and targeting the Monkeypox virus D6R gene and homologs. The DNA icon was obtained from the Pixabay image bank (mcmurryjulie). (B) Limits of detection and reproducibility examples. DNA standards corresponding to the *Bovine papular stomatitis virus* (BPSV) (orange squares) and *Monkeypox virus* (purple squares) are shown. The parameters of the standard curve and the limit of detection (LOD) are described next to the standard curve. The insert shows the amplification plot of *Monkeypox virus* standards at 10⁹ (red), 10⁸ (yellow), 10⁷ (light green), 10⁶ (dark green), 10⁵ (light blue), 10⁴ (dark blue), 10³ (black) and 10² (purple) copies/reaction repeated in quadruplicate. (C) Comparison of the panPox system against Myxoma-specific or panOrthopoxvirus and panParapoxvirus qPCR systems (detailed in Supplemental Methods). The results are expressed as Ct value differences between panPox and routine systems. (D) Sensitivity and specificity description on a large panel of human and arthropod samples.

probes that detect members from the *Entomo-* and *Chordopoxvirinae* subfamilies while being phylogenetically distant. As a result, although recent estimates have suggested a higher point mutation rate for poxviruses than for other dsDNA viruses²¹, the sensitivity and/or specificity of the system should not suffer from potential point mutations. In contrast, pan-genera systems, which are used as routine and are designed only based on human pathogenic poxvirus sequences, can be affected by point mutations. Indeed, these pan-genera systems could thus fail to detect some phylogenetically distant viruses, as it has been observed with *Raccoonpox virus* and the panOrthopox reference system. Altogether, all poxviruses, even those not yet discovered, should be detected

by this system. Nevertheless, it is worth noting that the use of degenerate primers and probes tends to increase the limit of detection (LOD). However, as clinical specimens typically contain high loads of poxviral DNA, the LOD does not remain to be a critical factor. Besides, this system demonstrated sensitivity on known poxviruses at least equivalent to previously published generic panOrtho¹³ and panParapoxvirus¹⁴ assays in human (sensitivity of 100%) and veterinary samples but not in arthropods (sensitivity of 86%). The panPox also showed no cross-reactivity with other DNA viruses and a specificity higher than 99% for human or arthropod samples. This system could thus be substituted for those used as routine.

To date, the diagnosis of suspected poxvirus infections is carried out through a combination of clinical examination and molecular biology, which only allow, mainly through qPCR, the detection of the genera *Orthopoxvirus*¹³ and *Parapoxvirus*¹⁴ and certain veterinary diseases¹⁵. A positive result can be confirmed by a second qPCR to determine the species. However, in case of a negative result, e.g. due to a new emerging poxvirus or in the presence of a non-ortho- or non-parapoxvirus such as members of the genera *Yatapoxvirus*, the use of another often time-consuming technology (such as sequencing or/and electron microscopy) is required. Therefore, even if the panPox system does not enable the identification of the genus or species of the virus, it is a powerful, low-cost, first-line diagnostic tool for the detection of all known poxviruses and, in addition, it could also avoid a false negative result in the event of a poxvirus infection not detected by current routine systems. Furthermore, because of its ability to detect both *Chordopoxvirinae* and *Entomopoxvirinae*, it should also enable the discovery of new species within these subfamilies. A real-time PCR system makes a massive screening program largely affordable and time-saving compared with a metagenomic sequencing approach, thus simplifying the discovery of new species. However, the species of the newly discovered virus will then require a characterization using other biotechnological approach such as sequencing. Finally, the demonstration that this system is usable for veterinary purposes, should ensure early detection of poxviruses in wild, farmed and domestic animals, which may constitute reservoirs. The panPoxvirus diagnostic system could therefore be valuable in preventing zoonotic episodes.

Materials and methods

DNA samples. Quantified synthetic plasmids (GenScript) containing the target sequence from the *Monkeypox virus* D6R orthologous genes were used as standards. Confirmed poxviral DNA samples were obtained from the National Reference Centre for Orthopoxvirus (France), the Animal and Plant Health Agency (UK), the veterinary school of Toulouse (France), the Pirbright Institute (UK). Human clinical samples known to be positive for a given poxvirus or other DNA viruses or samples presumed negative for a poxvirus were obtained from the Assistance publique-Hôpitaux de Marseille hospital (APHM, France). All methods were carried out in accordance with relevant guidelines and regulations. All experimental protocols were approved by the Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé (ANSM) under numbers 2012-A01563-40, 2012-A01549-34, 2012-A01589-43, 2012-A01590-43, 2012-A01591-42, 2012-A01593-40, 2012-A01599-34, 2013-A00960-45, 2013-A00961-44, 2013-A00962-43, 2013-A00960-45, 2013-A01536-39, 2015-A00884-45. Written informed consent was obtained from all participants. DNA samples from arthropods (Ticks and sandflies) and the cell lines A549, Vero, BHK-21, PK1, and C6/36, were available at the Unité des virus émergents (France). For viral strains or biological samples, DNAs were extracted by the EZ1 Virus Mini Kit v2.0 (QIAGEN).

Real-time PCR target determination and primers/probes design. To find a conserved target sequence among the entire *Poxviridae* family, the sequences of the 50 proteins known to be conserved among the *Chordopoxvirinae*¹⁸ were blasted (version 2.8.1+) on the *Entomopoxvirinae* protein sequences available in GenBank (Fig. 1A). Only 21 proteins displayed similarity amongst the *Poxviridae* family (Supplemental Table 4). The ORF sequence of the first 10 genes with the best E-value was recovered from GenBank for several representative species within each genus of the family *Poxviridae*. Multiple alignments of nucleotide and amino acid sequences were then performed using ClustalW in MEGA 7 software. Only the alignment of the homologs of Monkeypox virus D6R gene revealed a conserved region of at least 100 nucleotides usable for primers (a forward primer F1, two reverse primers R1 and R2) and probes (four probes A, E, C, and hGC) design (Fig. 1A and Figure S1).

The assay was standardized using 3.5 µL of samples per assay and the EXPRESS qPCR-SuperMix kit (ThermoFisher) on a QuantStudio-12 K-Flex (Applied Biosystems).

Real-time PCR assay protocol. The qPCR protocol was standardized using a EXPRESS One-Step SuperScript qRT-PCR SuperMix kit (ThermoFisher), using 1.25 µM of primer F1 and R1 and 0.312 µM of primer R2, 0.375 µM of each hydrolysis probe (A, E, C and hGC), and the following thermal cycling program: 95 °C for 5 min, and then 40 cycles of 95 °C for 5 s, 45 °C for 20 s and 60 °C for 40 s. The reactions were performed in 96-well plates and run on a QuantStudio 12 K Flex real-time PCR system (Applied Biosystems). Samples (3.5 µL) were added in a final volume of 10 µL. Each assay included negative and positive controls.

Positive and false positive samples validation. Reference qPCR assays including pan-genera systems for Orthopoxvirus¹³, and Parapoxvirus¹⁴, and myxomatosis-specific system¹⁹ were used. For Avipoxviruses detection, standard PCR systems were used²². NGS sequencing of the amplicons from the reference PCR assays were also performed.

Performances of the panPox real-time PCR assay. The performance of the panPox system was evaluated following the recommendations of Vaerman et al.²³. Amplification efficiency, slope, and R² were determined by the QuantStudio Real-time PCR software (Applied Biosystems). The limits of detection (LOD) for each species were determined by performing 4 replicates with the corresponding plasmid templates diluted tenfold from 10⁹ to 10 copies/reaction. LOD was defined as a >95% detection rate at a given DNA concentration. The intra-

and inter-assay variability were determined using the plasmids appropriately diluted to obtain high and low concentrations of the standards (10^6 and 10^4 copies/reaction). Eight of each dilution (high or low) of plasmid were tested per assay. The assay was repeated 3 times on different dates with different operators and separated over several weeks. To evaluate the assay precision, the Ct mean, standard deviations and coefficients of variation (CVs) were calculated. To determine the assay specificity, poxviral and presumed negative human, animal and arthropod biological samples were used. Human samples known to be highly positive for other DNA viruses were also used.

NGS sequencing. After quantification using Qubit dsDNA HS Assay Kit and Qubit 2.0 fluorometer (ThermoFisher Scientific) of purified PCR products from qPCR assays, libraries were built adding barcodes, for sample identification, and primers using the AB Library Builder System (ThermoFisher Scientific). To ensure equimolar pooling of the barcoded samples, a quantification step was included, using the 2100 Bioanalyzer instrument (Agilent Technologies). An emulsion PCR of the pools and loading on-chip was performed using the automated Ion Chef instrument (ThermoFisher). The S5 Ion torrent (Thermo Fisher Scientific) was used for sequencing following the manufacturer's instructions. A de novo contig was produced using CLC genomics workbench software (Qiagen) and a blast was performed to identify the poxviral species amplified.

Received: 28 July 2020; Accepted: 22 December 2020

Published online: 19 January 2021

References

- Durski, K. N. *et al.* Emergence of monkeypox—West and Central Africa, 1970–2017. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **67**, 306–310 (2018).
- Beer, E. M. & Rao, V. B. A systematic review of the epidemiology of human monkeypox outbreaks and implications for outbreak strategy. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **13**, (2019).
- Duraffour, S. *et al.* Emergence of cowpox: study of the virulence of clinical strains and evaluation of antivirals. *PLoS ONE* **8**, e55808 (2013).
- Prabhu, M. Camelpox and buffalopox: two emerging and re-emerging orthopox viral diseases of India. *Adv. Anim. Vet. Sci.* **3**, 527–541 (2015).
- Oldal, M. *et al.* Serologic survey of orthopoxvirus infection among rodents in Hungary. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **15**, 317–322 (2015).
- Kolhapure, R. M. *et al.* Investigation of buffalopox outbreaks in Maharashtra State during 1992–1996. *Indian J. Med. Res.* **106**, 441–446 (1997).
- Olsen, J. R., Gallacher, J., Piguat, V. & Francis, N. A. Epidemiology of molluscum contagiosum in children: a systematic review. *Fam. Pract.* **31**, 130–136 (2014).
- Karlstam, E., Tarjan, M., Sundell, E. & Scheltdorf, A. Collaborative pathology in a case of human pox virus dermatitis. *J. Comp. Pathol.* **158**, 137 (2018).
- 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).
- Smithson, C. *et al.* Two novel poxviruses with unusual genome rearrangements: NY_014 and Murmansk. *Virus Genes* <https://doi.org/10.1007/s11262-017-1501-8> (2017).
- 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).
- Oliveira, G., Rodrigues, R., Lima, M., Drummond, B. & Abrahão, J. Poxvirus host range genes and virus-host spectrum: a critical review. *Viruses* **9**, 331 (2017).
- 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 Cyler platforms. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 601–609 (2004).
- Nitsche, A., Büttner, M., Wilhelm, S., Pauli, G. & Meyer, H. Real-time PCR detection of parapoxvirus DNA. *Clin. Chem.* **52**, 316–319 (2006).
- 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).
- 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).
- 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).
- 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).
- Albini, S. *et al.* Development and validation of a Myxoma virus real-time polymerase chain reaction assay. *J. Vet. Diagn. Investig. Off. Publ. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn. Inc.* **24**, 135–137 (2012).
- Gubser, C. Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis. *J. Gen. Virol.* **85**, 105–117 (2004).
- Babkin, I. V. & Babkina, I. N. Molecular dating in the evolution of vertebrate poxviruses. *Intervirology* **54**, 253–260 (2011).
- 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).
- Vaerman, J. L., Saussoy, P. & Ingargiola, I. Evaluation of real-time PCR data. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* **18**, 212–214 (2004).

Acknowledgements

We thank Pr. Ernest A. Gould for his careful and critical reading of the manuscript.

Author contributions

L.L. and S.P. wrote the manuscript. L.L. and L.I. carried out the experiments and G.P. carried out the NGS sequencing. S.P., A.N., R.C. and X.L. supervised this project and corrected the manuscript. O.F., C.P. and S.B. provided poxvirus strains and DNA.

Funding

This work was supported by the European Union's Horizon 2020 Research and Innovation Program through the European Virus Archive goes global project (<http://www.european-virus-archive.com/>) [Grant Number 653316].

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81376-4>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to L.L.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021

	Forward Primer	Probes	Reverse Primer	
Entomopoxvirinae				
	TACCACAAATATTACCATCAATTAGCAACATAGATTATCTATATAAAACATGTCGTGAAATAATAAAAGTGTGTGCCTATTTCATAAAGATGGGATCGGGCAAGACAAATGATATCTTGT	TGAAATAATAAAAGTGTGTGCCTATTTCATAAAGATGGGATCGGGCAAGACAAATGATATCTTGT	CGGGCAAGACAAATGATATCTTGT	ACEV AP013055
	TAGCGCAAATACTTCCACATCAATAGCAACACTTGATTTCTTATATCAAACCTGTAATAAATCGATAATAGTGTATATATTTCATAAAATGGGATCTGGAAAGACGATTAATCTCTTT	TAATAAATCGATAATAGTGTATATATTTCATAAAATGGGATCTGGAAAGACGATTAATCTCTTT	TGGAAAGACGATTAATCTCTTT	AHEV NC021247
	TTGCTCAAATTTGGCTCATCAGTAGCAACATAGATTCTTTTATATCAAATGTAAATAATGCTAATAGTGTCTTTTATGTTTCATAAAATGGGATCTGGTAAAGACAAATTAATCTCTTT	AAATAATGCTAATAGTGTCTTTTATGTTTCATAAAATGGGATCTGGTAAAGACAAATTAATCTCTTT	TGGTAAAGACAAATTAATCTCTTT	AMEV NC002520
	TTGCCAAATATTACCCATCAACTGCCAACATCGATTCTTTTATATCAAATGTAAATTCCAAATAAGTGTCTTTTATATTTCATAAAATGGGATCTGGCAAAACAAATTAATCACTAT	AAATTCCAAATAAGTGTCTTTTATATTTCATAAAATGGGATCTGGCAAAACAAATTAATCACTAT	TGGCAAAACAAATTAATCACTAT	CBEV NC021248
	TTGGCAAATATTACCCATCAACTGCCAACATCGATTCTTTTATATCAAATGTAAATTCCAAATAAGTGTCTTTTATATTTCATAAAATGGGATCTGGCAAAACAAATTAATCACTAT	AAATTCCAAATAAGTGTCTTTTATATTTCATAAAATGGGATCTGGCAAAACAAATTAATCACTAT	TGGCAAAACAAATTAATCACTAT	CREV NC021249
	TACCACAAATATTACCCATCAATTAGCAACATAGATTCTTTAAATGAAAGTTCATTAAGGAAAAAAAGTGTATGTTATTTCATAAGATGGGATCGGAAAAACATAAATCACTAT	TAAGGAAAAAAAGTGTATGTTATTTCATAAGATGGGATCGGAAAAACATAAATCACTAT	CGGAAAAACATAAATCACTAT	MSEV AF063866
Chordopoxvirinae				
	TTCCAAATATTTACCCATCAACTAGCAACGTGAGCTACTTGTAAAAACATATAGATCAAATGAAAGCGTACTGTTATTTTCATATATGGGATCTGGTAAAACTATTAATGCCGTGT	AGATCAAATGAAAGCGTACTGTTATTTTCATATATGGGATCTGGTAAAACTATTAATGCCGTGT	TGGTAAAACTATTAATGCCGTGT	Canarypox NC005309
	TTCCATAATCTTACCCATCAATTAGCTACTTGGAATTACTTTTAAAGGACTATACAGATCAAATGAAAGCGTCTGTTGTTTCATATATGGGATCGGGAAGAACATTAATAGCACGTGC	AGATCAAATGAAAGCGTCTGTTGTTTCATATATGGGATCGGGAAGAACATTAATAGCACGTGC	TGGGAAGAACATTAATAGCACGTGC	Fowlpox NC002188
Aviropoxvirus	TTCCATAATCTTACCCATCAATTAGCTACTTGGAATTACTTTTAAAGGACTATACAGATCAAATGAAAGCGTCTGTTGTTTCATATATGGGATCGGGAAGAACATTAATAGCACGTGC	AGATCAAATGAAAGCGTCTGTTGTTTCATATATGGGATCGGGAAGAACATTAATAGCACGTGC	TGGGAAGAACATTAATAGCACGTGC	Penguinpox NC024446
	TTCCATAATCTTACCCATCAATTAGCTACTTGGAATTACTTTTAAAGGACTATACAGATCAAATGAAAGCGTCTGTTGTTTCATATATGGGATCGGGAAGAACATTAATAGCACGTGC	AGATCAAATGAAAGCGTCTGTTGTTTCATATATGGGATCGGGAAGAACATTAATAGCACGTGC	TGGGAAGAACATTAATAGCACGTGC	Pigeonpox NC024447
	TACCAAATATATTACCCATCAATTAGCCACGTTGGAATTACTTACAGAACATATAGATCAGAAAGTAAAGCGTATATGTTTCATATATGGGATCTGGAAAAACATTAATAGCACAT	AGATCAGAAAGTAAAGCGTATATGTTTCATATATGGGATCTGGAAAAACATTAATAGCACAT	TGGAAAAACATTAATAGCACAT	Turkeypox NC028238
Orthopoxvirus				
	TACCAACTATATTAACCCATCAGTAGCTAGCTACTGATGATTACTAGTTAGAACTATCAGATGAGAAAGAGAGCGTGTATGTTTCATATATGGGATCGGTAAGAACAAATAAAGCGCTTGT	AGATGAGAAAGAGAGCGTGTATGTTTCATATATGGGATCGGTAAGAACAAATAAAGCGCTTGT	TGGTAAGAACAAATAAAGCGCTTGT	Buffalopox MG599038
	TACCAACTATATTAACCCATCAGTAGCTAGCTACTGATGATTACTAGTTAGAACTATCAGATGAGAAAGAGAGCGTGTATGTTTCATATATGGGATCGGTAAGAACAAATAAAGCGCTTGT	AGATGAGAAAGAGAGCGTGTATGTTTCATATATGGGATCGGTAAGAACAAATAAAGCGCTTGT	TGGTAAGAACAAATAAAGCGCTTGT	Camelpox AT09089
	TACCAACTATATTAACCCATCAGTAGCTAGCTACTGATGATTACTAGTTAGAACTATCAGATGAGAAAGAGAGCGTGTATGTTTCATATATGGGATCGGTAAGAACAAATAAAGCGCTTGT	AGATGAGAAAGAGAGCGTGTATGTTTCATATATGGGATCGGTAAGAACAAATAAAGCGCTTGT	TGGTAAGAACAAATAAAGCGCTTGT	Cowpox KY549144
	TACCGACTATATTAACCCATCAGTAGCTAGCTACTTGTAGATTACTAGTTAGAACTATCAGATGAGAAAGAGAGCGTGTATGTTTCATATATGGGATCGGGTAAGAACAAATAAAGCGCTTGT	AGATGAGAAAGAGAGCGTGTATGTTTCATATATGGGATCGGGTAAGAACAAATAAAGCGCTTGT	TGGGTAAGAACAAATAAAGCGCTTGT	Ectromelia virus NC004105
	TACCAACTATATTAACCCATCAGTAGCTAGCTACTGATGATTACTAGTTAGAACTATCAGATGAGAAAGAGAGCGTGTATGTTTCATATATGGGATCGGTAAGAACAAATAAAGCGCTTGT	AGATGAGAAAGAGAGCGTGTATGTTTCATATATGGGATCGGTAAGAACAAATAAAGCGCTTGT	TGGTAAGAACAAATAAAGCGCTTGT	Ectromelia virus NC004105
	TACCAACTATATTAACCCATCAGTAGCTAGCTACTTGTAGATTACTAGTTAGAACTATCAGATGAGAAAGAGAGCGTGTATGTTTCATATATGGGATCGGTAAGAACAAATAAAGCGCTTGT	AGATGAGAAAGAGAGCGTGTATGTTTCATATATGGGATCGGTAAGAACAAATAAAGCGCTTGT	TGGTAAGAACAAATAAAGCGCTTGT	Monkeypox KJ642614
	TACCAACTATATTAACCCATCAGTAGCTAGCTACTGATGATTACTAGTTAGAACTATCAGATGAGAAAGAGAGCGTGTATGTTTCATATATGGGATCGGTAAGAACAAATAAAGCGCTTGT	AGATGAGAAAGAGAGCGTGTATGTTTCATATATGGGATCGGTAAGAACAAATAAAGCGCTTGT	TGGTAAGAACAAATAAAGCGCTTGT	Rabbitpox AY484669
	TACCTACTATATTAACCCATCAGTAGCTAGCTACTGATGATTACTAGTTAGAACTATCAGATGAGAAAGAGAGCGTGTATGTTTCATATATGGGATCGGTAAGAACAAATAAAGCGCTTGT	AGATGAGAAAGAGAGCGTGTATGTTTCATATATGGGATCGGTAAGAACAAATAAAGCGCTTGT	TGGTAAGAACAAATAAAGCGCTTGT	Raccoonpox NC027213
	TACCTACTATATTAACCCATCAGTAGCTAGCTACTGATGATTACTAGTTAGAACTATCAGATGAGAAAGAGAGCGTGTATGTTTCATATATGGGATCGGTAAGAACAAATAAAGCGCTTGT	AGATGAGAAAGAGAGCGTGTATGTTTCATATATGGGATCGGTAAGAACAAATAAAGCGCTTGT	TGGTAAGAACAAATAAAGCGCTTGT	Skunkpox KU749310
	TACCTACTATATTAACCCATCAGTAGCTAGCTACTGATGATTACTAGTTAGAACTATCAGATGAGAAAGAGAGCGTGTATGTTTCATATATGGGATCGGTAAGAACAAATAAAGCGCTTGT	AGATGAGAAAGAGAGCGTGTATGTTTCATATATGGGATCGGTAAGAACAAATAAAGCGCTTGT	TGGTAAGAACAAATAAAGCGCTTGT	Volepox NC031033
	TACCAACTATATTAACCCATCAGTAGCTAGCTACTGATGATTACTAGTTAGAACTATCAGATGAGAAAGAGAGCGTGTATGTTTCATATATGGGATCGGTAAGAACAAATAAAGCGCTTGT	AGATGAGAAAGAGAGCGTGTATGTTTCATATATGGGATCGGTAAGAACAAATAAAGCGCTTGT	TGGTAAGAACAAATAAAGCGCTTGT	Vaccinia DQ439815
	TACCAACTATATTAACCCATCAGTAGCTAGCTACTGATGATTACTAGTTAGAACTATCAGATGAGAAAGAGAGCGTGTATGTTTCATATATGGGATCGGTAAGAACAAATAAAGCGCTTGT	AGATGAGAAAGAGAGCGTGTATGTTTCATATATGGGATCGGTAAGAACAAATAAAGCGCTTGT	TGGTAAGAACAAATAAAGCGCTTGT	Variola KY358055
Molluscipoxvirus	TCCCACAACATCCGCGCAACAGGCTGGCTAGCGCTGGACTTCCCTGCTGGCAGCATCCGCGATGAGAAACAAGCGGTGTGCTGTTCCACATCATGGGCTCGGGCAAGACCATCAACCGCGCTGC	CGCGATGAGAAACAAGCGGTGTGCTGTTCCACATCATGGGCTCGGGCAAGACCATCAACCGCGCTGC	TGGGCAAGACCATCAACCGCGCTGC	Molluscum contagiosum KY040276
Parapoxvirus	TGCCCGGCATCCGCGCAACAGCTGCGGACCGTGGACTTTCTCGTCCGCCGCTCCGCGCAGCGGGGTGAGCGTCCCTCCCTTCACATCATGGGCTCGGGCAAGACCGTCAACCGCGCTGC	GCGCAGCGGGGTGAGCGTCCCTCCCTTCACATCATGGGCTCGGGCAAGACCGTCAACCGCGCTGC	TGGGCAAGACCGTCAACCGCGCTGC	BPSV KM87571
	TGCCCGGCATCCGCGCAACAGCTGCGGACCGTGGACTTTCTCGTCCGCCGCTCCGCGCAGCGGGGTGAGCGTCCCTCCCTTCACATCATGGGCTCGGGCAAGACCGTCAACCGCGCTGC	GCGCAGCGGGGTGAGCGTCCCTCCCTTCACATCATGGGCTCGGGCAAGACCGTCAACCGCGCTGC	TGGGCAAGACCGTCAACCGCGCTGC	Orf KP010356
	TGCCCGGCATCCGCGCAACAGCTGCGGACCGTGGACTTTCTCGTCCGCCGCTCCGCGCAGCGGGGTGAGCGTCCCTCCCTTCACATCATGGGCTCGGGCAAGACCGTCAACCGCGCTGC	GCGCAGCGGGGTGAGCGTCCCTCCCTTCACATCATGGGCTCGGGCAAGACCGTCAACCGCGCTGC	TGGGCAAGACCGTCAACCGCGCTGC	Deer parapox NC025963
	TGCCCGGCATCCGCGCAACAGCTGCGGACCGTGGACTTTCTCGTCCGCCGCTCCGCGCAGCGGGGTGAGCGTCCCTCCCTTCACATCATGGGCTCGGGCAAGACCGTCAACCGCGCTGC	GCGCAGCGGGGTGAGCGTCCCTCCCTTCACATCATGGGCTCGGGCAAGACCGTCAACCGCGCTGC	TGGGCAAGACCGTCAACCGCGCTGC	Seal parapox NC035188
	TGCCCGGCATCCGCGCAACAGCTGCGGACCGTGGACTTTCTCGTCCGCCGCTCCGCGCAGCGGGGTGAGCGTCCCTCCCTTCACATCATGGGCTCGGGCAAGACCGTCAACCGCGCTGC	GCGCAGCGGGGTGAGCGTCCCTCCCTTCACATCATGGGCTCGGGCAAGACCGTCAACCGCGCTGC	TGGGCAAGACCGTCAACCGCGCTGC	Pseudocowpox NC013804
Crocodylidpoxvirus	TCCCACAACATCCGCGCAACAGGCTGGCTAGCGCTGGACTTCCCTGCTGGCAGCATCCGCGATGAGAAACAAGCGGTGTGCTGTTCCACATCATGGGCTCGGGCAAGACCATCAACCGCGCTGC	CGCGATGAGAAACAAGCGGTGTGCTGTTCCACATCATGGGCTCGGGCAAGACCATCAACCGCGCTGC	TGGGCAAGACCATCAACCGCGCTGC	Nile crocodilepox DQ356948
Capripoxvirus	TACCAAATAATTACCCATCAATTAGCTACTATTAGACTATTAAGAAAGTATTAGATGAAAAATAAAGGTGTACTTTTCATATATGGGATCTGGAAAAACAAATAATGCAATTAAT	AGATGAAAAATAAAGGTGTACTTTTCATATATGGGATCTGGAAAAACAAATAATGCAATTAAT	TGGAAAAACAAATAATGCAATTAAT	Goatpox KX576657
	TACCAAATAATTACCCATCAATTAGCTACTATTAGACTATTAAGAAAGTATTAGATGAAAAATAAAGGTGTACTTTTCATATATGGGATCTGGAAAAACAAATAATGCAATTAAT	AGATGAAAAATAAAGGTGTACTTTTCATATATGGGATCTGGAAAAACAAATAATGCAATTAAT	TGGAAAAACAAATAATGCAATTAAT	Sheeppox NC004002
Yatapoxvirus	TTCCAAACAATCTTACCGCATCAATTAGCAACACTTGCATATCTAGTTAGAAAGTATAAAGATGATGAAAAATAAAGGTGTACTTTTCATATATGGGATCTGGCAAAACAAATAATAGCACATTT	AGATGAAAAATAAAGGTGTACTTTTCATATATGGGATCTGGCAAAACAAATAATAGCACATTT	TGGCAAAACAAATAATAGCACATTT	Tanapox EF420157
	TTCCAAACAATCTTACCGCATCAATTAGCAACACTTGCATATCTAGTTAGAAAGTATAAAGATGATGAAAAATAAAGGTGTACTTTTCATATATGGGATCTGGCAAAACAAATAATAGCACATTT	AGATGAAAAATAAAGGTGTACTTTTCATATATGGGATCTGGCAAAACAAATAATAGCACATTT	TGGCAAAACAAATAATAGCACATTT	YMTV NC005179
Suipoxvirus	TACCCAAATAATTACCCATCAATTAGCTACTATTAGACTATTAAGAAAGTATTAGATGAAAAATAAAGGTGTACTTTTCATATATGGGATCTGGCAAAACAAATAATAGCACATTT	AGATGAAAAATAAAGGTGTACTTTTCATATATGGGATCTGGCAAAACAAATAATAGCACATTT	TGGCAAAACAAATAATAGCACATTT	Swinepox NC003389
Leporipoxvirus	TCCCTAACATATTGGCCATCAATTAGCCAGCTTGGAATTACTTAGTAAAGGATCAAGATGAGAAATAAAGCGTACTGTTGTTTCATATATGGGATCTGGCAAAACAAATAATAGCACATTT	AGATGAGAAATAAAGCGTACTGTTGTTTCATATATGGGATCTGGCAAAACAAATAATAGCACATTT	TGGCAAAACAAATAATAGCACATTT	Myxoma virus KY548804
Centapoxvirus	TACCTACTATATTACCCATCAACTTAGCTACTGATGATTAATTAGTTAGAACTATTAAGATGAAAAACAAGAGCGTATTAATGTTTCATATATGGGATCTGGTAAAAACAAATAATAGCACATTT	AGATGAAAAACAAGAGCGTATTAATGTTTCATATATGGGATCTGGTAAAAACAAATAATAGCACATTT	TGGTAAAAACAAATAATAGCACATTT	Yokapox NC015960
Cervidpoxvirus	TCCCTAAATAATTACCCATCAATTAGCTACTGATGATTAATTAGTTAGAACTATTAAGATGAAAAACAAGAGCGTACTGTTGTTTCATATATGGGATCTGGAAAAACAAATAATAGCACATTT	AGATGAAAAACAAGAGCGTACTGTTGTTTCATATATGGGATCTGGAAAAACAAATAATAGCACATTT	TGGAAAAACAAATAATAGCACATTT	Deerpox NC006966
Not yet classified	TACCAAATAATTACCCATCAATTAGCCACGTTGGAATTTCTTGTGTAAGAAATAAAGATGAAAAATAAAGCGTCTTATATATTTCATATATGGGATCTGGAAAAACAAATAATAGCACATTT	AGATGAAAAATAAAGCGTCTTATATATTTCATATATGGGATCTGGAAAAACAAATAATAGCACATTT	TGGAAAAACAAATAATAGCACATTT	Cotia virus NC016924
	TCCCAACATCCACCCGATCAGCTGGCTAGCTGGACTTTCTGCTAGCAGTATTCAGACAGAAATAACAGCGTGTGCTGCTATTCACATATATGGGCTCGGCAAGACCATAAATCGCGCTAC	AGACAGAAATAACAGCGTGTGCTGCTATTCACATATATGGGCTCGGCAAGACCATAAATCGCGCTAC	TGGCAAGACCATAAATCGCGCTAC	Kangarooxox MF467281
	TACCAACTATATTACCCATCAACTAGCTACTTGATTAATTTAGTCAGAAACCATAGATGAAACACAGGAGTGTATATGTTTCATATATGGGATCTGGTAAAAACAAATAATAGCACATTT	AGATGAAACACAGGAGTGTATATGTTTCATATATGGGATCTGGTAAAAACAAATAATAGCACATTT	TGGTAAAAACAAATAATAGCACATTT	Murmansk poxvirus MF001304
	GACTGACTATTTACCCATCACTAGCTGGCTACTGATTTTGGCCGTAAGAAACCATCAATGATAATAAATGTCAGCCATGATTTTCATGACATGGGAAGTGGTAAAGCATTAATAGCACATTT	AGAAACCATCAATGATAATAAATGTCAGCCATGATTTTCATGACATGGGAAGTGGTAAAGCATTAATAGCACATTT	TGGTAAAGCATTAATAGCACATTT	Salmonax KT159937

Supplemental Figure 1: Alignment of the nucleotide sequences of the region targeted by the panPox system was performed using ClustalW in MEGA 7 software. The localisation of the primers and probes are indicated as grey rectangles. The exact nucleotide sequence of the primers and probes is depicted in Figure 1A.

	OPE9L R2057	OPE9L p19245	OPE9L F1880	
Old world	MK910851 Camelpox virus LR812035 Cowpox virus LT966077 Vaccinia virus LR800244 Variola virus	GTGCAACTCTTAA GCGGA GCGTATGAGTATA --- TTCAGT TGAAGTGTAGCCTGTTTT --- ATCTG GCTCTCTCTGCCAA AATGTTCTT	GTGCAACTCTTAA GCGGA GCGTATGAGTATA --- TTCAGT TGAAGTGTAGCCTGTTTT --- ATCTG GCTCTCTCTGCCAA AATGTTCTT	GTGCAACTCTTAA GCGGA GCGTATGAGTATA --- TTCAGT TGAAGTGTAGCCTGTTTT --- ATCTG GCTCTCTCTGCCAA AATGTTCTT
New world	KU749309 Raccoonpox virus NC031038 Skunkpox virus NC031033 Volepox virus	GTGCAACTCTTGTCTGATGCGTATGAGTAGA --- TTCAGT TGAAGTGTAGCCTGTTTT --- ATCTAGCTCTTCTGCCAAG AATGTTCTGT	GTGCAACTCTTGTCTGATGCGTATGAGTAGA --- TTCAGT TGAAGTGTAGCCTGTTTT --- ATCTAGCTCTTCTGCCAAG AATGTTCTGT	GTGCAACTCTTGTCTGATGCGTATGAGTAGA --- TTCAGT TGAAGTGTAGCCTGTTTT --- ATCTAGCTCTTCTGCCAAG AATGTTCTGT

Supplemental Figure 2: Detail of the alignment of the E9L gene targeted by the pan-Orthopoxvirus system used for the comparison of the panPox system. This figure highlights the differences between the Old World Orthopoxviruses on which the system was designed and the Old World Orthopoxviruses (including the Raccoonpox virus). This explains the important differences of Ct with our system which targets a more conserved gene which is not impacted by the recent genomic evolution of Orthopoxviruses.

Virus Genus	Virus	Genetic material	Origin	Limit of detection (copies / reaction)	R ²	Slope	Amplification efficiency (%)	Coefficient of Variation (%) 10 ⁶ copies	Coefficient of Variation (%) 10 ⁴ copies
CHORDOPOXVIRINAE				CHORDOPOXVIRINAE					
AVIPOX	Canarypox virus	Synthetic plasmid	Genscript®	1000	0.993	-2.8	128.9	3.5	0.7
	Pigeonpox virus	Synthetic plasmid	Genscript®	1000	0.991	-3.1	111.8	2.7	1.5
CAPRIPOX	Sheeppox virus	Synthetic plasmid	Genscript®	100	0.987	-3.6	98.1	2.9	0.7
CERVIDPOX	Deerpox virus	Synthetic plasmid	Genscript®	100	0.997	-2.8	129.6	1.9	1.1
LEPORIPOX	Myxoma virus	Synthetic plasmid	Genscript®	1000	0.999	-3.3	99.6	2.4	1.4
CROCODYLIDPOX	Nile crocodilepox virus	Synthetic plasmid	Genscript®	1000	0.982	-3.2	104.7	2.8	0.7
MOLLUSCIPOX	Molluscum contagiosum	Synthetic plasmid	Genscript®	100	0.999	-3.2	103.5	1.4	1.7
ORTHOPOX	Monkeypox virus	Synthetic plasmid	Genscript®	100	0.976	-3.0	116.8	2.7	2.4
	Camelpox/Cowpox/Vaccinia virus	Synthetic plasmid	Genscript®	100	0.999	-3.1	112.6	1.8	2.4
	Ectromelia virus	Synthetic plasmid	Genscript®	100	0.997	-2.8	129.5	2.9	1.7
PARAPOX	Bovine papular stomatitis (BPSV)	Synthetic plasmid	Genscript®	1000	0.998	-3.1	112.6	2.5	1.6
	Orf	Synthetic plasmid	Genscript®	100	0.999	-3.5	99.6	3.3	1.3
SUIPOX	Swinepox virus	Synthetic plasmid	Genscript®	100	0.977	-2.9	119.5	2.1	2.3
YATAPOX	Tanapox virus	Synthetic plasmid	Genscript®	100	0.993	-3.5	92.4	2.3	1.4
OTHERS	Cotia virus	Synthetic plasmid	Genscript®	1000	0.999	-3.3	101.3	2.3	2.4
	Kangaroox virus	Synthetic plasmid	Genscript®	1000	0.986	-3.3	100.8	2.1	2.0
	Salmonpox virus	Synthetic plasmid	Genscript®	1000	0.988	-3.0	116.1	1.5	1.7
	Yokapox virus	Synthetic plasmid	Genscript®	100	0.995	-2.7	133.7	0.9	2.1
ENTOMOPOXVIRINAE				ENTOMOPOXVIRINAE					
ALPHAEPV	ACEV	Synthetic plasmid	Genscript®	1000	0.986	-3.5	90.6	1.5	1.5
BETAEPV	CBEV	Synthetic plasmid	Genscript®	100	0.993	-3.4	96.6	2.6	2.0
	AMEV	Synthetic plasmid	Genscript®	1000	0.983	-3.3	101.9	1.4	1.0
GAMMAEPV	MSEV	Synthetic plasmid	Genscript®	100	0.984	-3.0	116.9	3.9	2.1

Supplemental Figure 3: Description of the target sequence containing plasmids of 22 poxvirus species used to determine the limit of detection (LOD) and the repeatability for high and low copy number. LOD is expressed as copies per qPCR reaction and repeatability was evaluated as the coefficient of variation (Standard deviation (SD) divided by the mean and expressed as a percentage). The parameters of the standard curve obtained (R², Slope and amplification efficiency) are detailed. The coefficients of variation are calculated for high and low concentrations of the standards (10⁶ and 10⁴ copies/reaction).

Virus Family	Virus (clinical suspicion ^a)	Strain / isolate	Genetic material	Origin	Routine systems (Ct)	panPox system (Ct)	Difference of Ct
CHORDOPOXVIRIDAE							
ORTHOPOX	Camelpox virus	Unknown	DNA	FNRCO	26.5 ^b	25.9	-0.6
	Cowpox virus	UVE/CPXV/2009/FR/LP	Strain	UVE/EVAg	27.4 ^b	25.6	-1.8
		Lille L09-1	DNA	FNRCO	23.8 ^b	23.1	-0.7
	Buffalopox virus	Unknown	DNA	FNRCO	22.3 ^b	23.5	+1.2
	Raccoonpox virus	VR838	DNA	FNRCO	33.8 ^b	26.6	-7.2
	Catpox virus	Unknown	DNA	FNRCO	26.2 ^b	23.8	-2.4
	Vaccinia virus	Western Reserve	Strain	FNRCO	13.8 ^b	13.6	-0.2
Rabbitpox virus	Unknown	DNA	FNRCO	24.5 ^b	20.2	-4.3	
PARAPOX	Orf	vir/0076	DNA	APHA	25.5 ^c	25.0	-0.5
	Pseudocowpox virus	vir/0074	DNA	APHA	27.6 ^c	25.8	-1.8
	Caprin contagious Ecthyma	-	Goat sample ^a	VST	17.0 ^c	16.0	-1.0
MOLLUSCIPOX	Molluscum contagiosum	-	Human sample ^a	VST	N/A ^e	25.1	N/A
LEPORIPOX	Unknow (Myxoma virus)	-	Rabbit sample ^a	VST	23.0 ^d	24.2	+1.2
CAPRIPOX	Lumpy skin disease	Bovine/V1-13-06/2006/Egypt	Strain	PI	N/A ^e	19.0	N/A
AVIPOX	Unknow (Avian Poxvirus)	-	Turkey sample ^a	VST	N/A ^e	18.2	N/A
	Unknow (Avian Poxvirus)	-	Chicken sample ^a	VST	N/A ^e	17.9	N/A
	Unknow (Avian Poxvirus)	-	Chicken sample ^a	VST	N/A ^e	20.1	N/A
	Unknow (Avian Poxvirus)	-	Chicken sample ^a	VST	N/A ^e	23.2	N/A
	Unknow (Avian Poxvirus)	-	Eagle sample ^a	VST	N/A ^e	18.7	N/A
	Unknow (Avian Poxvirus)	-	Carribbean Flamingo ^a	VST	N/A ^e	18.5	N/A
	Fowlpox virus	isolate 92	Strain	APHA	N/A ^e	23.1	N/A
OTHERS	Cetaceanpox virus	Unknown	DNA	APHA	N/A ^e	18.8	N/A

Supplemental Figure 4: Comparison of panPox and routine systems on poxvirus DNA from strains, human and animal samples. The origin and type of DNA used is described. Ct values obtained with the panPox and routine systems are depicted. Ct value differences between panPox and the routine test system were calculated. APHA: Animal and Plant Health Agency (UK). APHM: Assistance Publique Hôpitaux de Marseille (France) FNRCO: National Reference Center of Orthopoxvirus (France) PI: Pirbright Institute (UK) UVE/EVAg: Unité des virus émergents (France) / EVAg: www.european-virus-archive.com VST: Veterinary school of Toulouse (France) ^aSuspicion based on clinical examination Routine systems are from Kulesh et al for Orthopoxviruses^b, Nichte et al for Parapoxviruses^c, Kwit E et al for myxomatosis^d. ^eNo qPCR system available N/A: non-applicable

	Samples	Origin	Number of samples	Number of positives		Clarifications
				Routine systems ^a	panPox system	
HUMAN DNA	Lymph nodes biopsies	APHM, France	146	0	0	
	Pharynx and throats swabs	APHM, France	813	0	2	1 <i>Molluscum contagiosum</i> in immunosuppressed patient, 1 false positive
	Cutaneous samples (swabs and biopsies)	APHM, France	423	2	6	2 Orf cases, 3 <i>Molluscum contagiosum</i> , 1 false positive
	Others (various swabs, blood, vagina, biological liquids, liver and renal biopsies etc...)	APHM, France	362	0	1	1 false positive
ARTHROPO DS DNA	Human Ticks	APHM, France	54	0	1	
	Cattle Ticks	UVE, Burkina Faso	98	22	20	1 false positive, 3 false negative
	Wild Boar Ticks	UVE, Corsica	77	0	0	
	Sandflies	UVE, Turkey	564	0	0	
CELL LINES DNA	A549	Human, lung, ATCC	2	0	0	
	Vero	Cercopithecus aethiops kidney, ATCC	2	0	0	
	BHK-21	Syrian golden hamster, kidney, ATCC	2	0	0	
	LLC-PK1	Sus scrofa, kidney, ATCC	2	0	0	
	C6/36	Aedes albopictus, larva, ATCC	2	0	0	

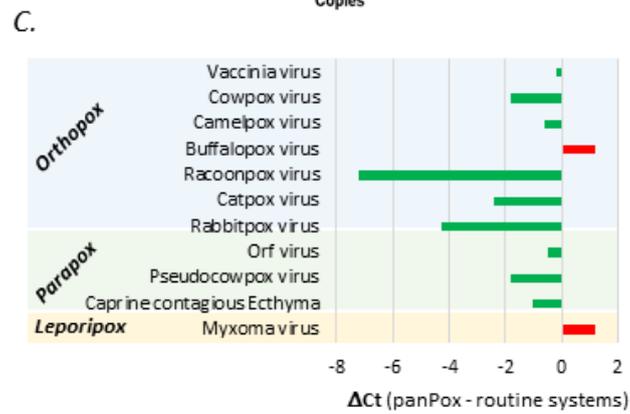
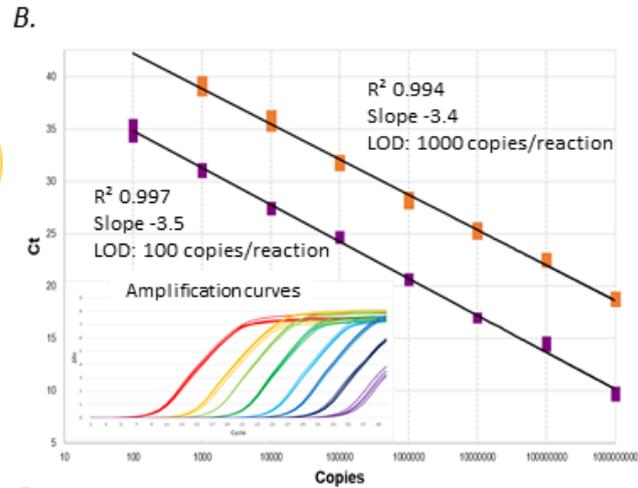
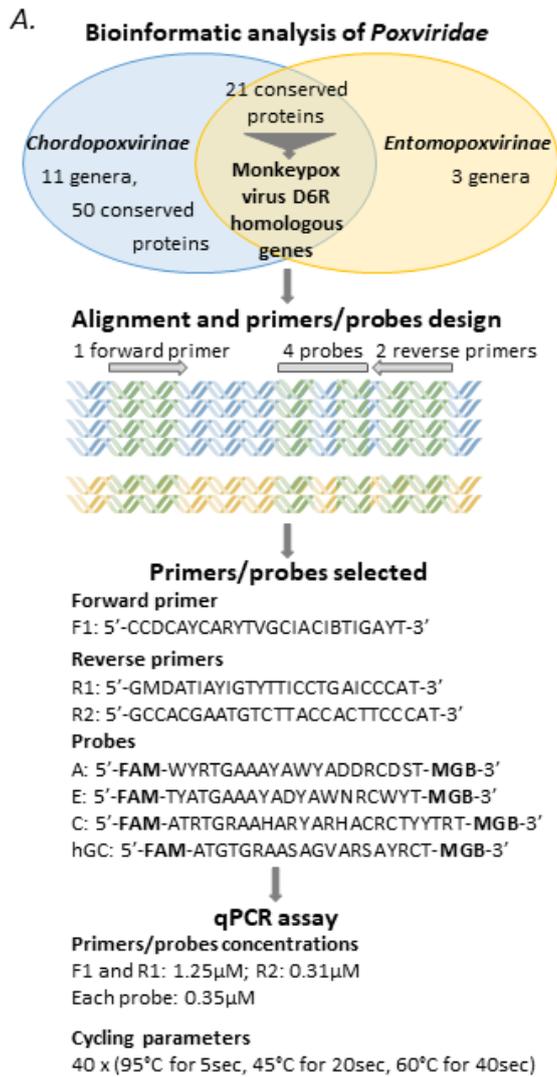
Supplemental Figure 5: Sensitivity and specificity of the panPox system. Biological specimens and their origin are described. The numbers of specimens tested positive with the panPox and routine systems are shown.

^aRoutine systems used are from Kulesh et al for Orthopoxviruses and Nichte et al for Parapoxviruses

Genes	Bit score	Hsp score	Query cover (%)	Identity (%)	E-value
D6R	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
E6R	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

Supplemental Figure 6 : Protein Blast results. According to the literature, 49 genes are conserved among the Chordopoxvirinae. To find sequences also conserved in Entomopoxvirinae, the protein sequences of the 49 candidates from Monkeypox virus were blasted against the Entomopoxvirinae protein sequence database. Only 21/49 genes showed conservation; the others produced no results.

ERRATUM Figure 1A corrigée (erratum en cours de publication suite à une erreur dans la figure principale, il manque deux nucléotides dans la séquence de l'amorce R1)



D.

	Human samples	Arthropod samples
Sensitivity	100% (6/6)	86.3% (19/22)
Specificity	99.8% (1735/1738)	99.7% (769/771)



Article

Detection of Two Species of the Genus Parapoxvirus (Bovine Papular Stomatitis Virus and Pseudocowpox Virus) in Ticks Infesting Cattle in Burkina Faso

Achille Ouedraogo^{1,2}, Léa Luciani³, Olivier Zannou^{2,4}, Abel Biguezoton², Laura Pezzi^{3,5}, Laurence Thirion³, Adrien Belem⁶, Claude Saegerman⁴, Rémi Charrel³ and Laetitia Lempereur^{1,*}

- ¹ Laboratory of Parasitology and Parasitic Diseases, Center for Fundamental and Applied Research for Animal and Health (FARAH), Faculty of Veterinary Medicine, ULiège, 4000 Liège, Belgium; achillouedraogo@gmail.com
 - ² Unité Maladies à Vecteur et Biodiversité (UMaVeB), Centre International de Recherche-Développement sur l'Élevage en zone Subhumide (CIRDES), Bobo-Dioulasso 01, Burkina Faso; olivier_mahuton@yahoo.fr (O.Z.); babels005@yahoo.fr (A.B.)
 - ³ Unité des Virus Émergents (UVE: Aix Marseille Univ, IRD 190, INSERM U1207, IHU Méditerranée Infection), 13005 Marseille, France; lea.luciani@hotmail.fr (L.L.); laura.pezzi@studio.unibo.it (L.P.); laurence.thirion@ird.fr (L.T.); remi.charrel@univ-amu.fr (R.C.)
 - ⁴ Research Unit in Epidemiology and Risk Analysis Applied to Veterinary Sciences (UREAR-ULiège), Center for Fundamental and Applied Research for Animal and Health (FARAH), Faculty of Veterinary Medicine, ULiège, 4000 Liège, Belgium; claude.saegerman@ulg.ac.be
 - ⁵ Université de Corse Pascal Paoli, Laboratory of Virology, UR7310 BIOSCOPE, 20250 Corte, France
 - ⁶ Laboratoire de Santé Animale Tropicale, Institut du Développement Rural, Université Nazi BONI, Bobo-Dioulasso 01, Burkina Faso; belemamg@hotmail.fr
- * Correspondence: llempeur@hotmail.com; Tel.: +32-(0)-4-3664-093

Received: 11 March 2020; Accepted: 20 April 2020; Published: 28 April 2020



Abstract: The molecular identification of arboviruses in West Africa is of particular interest, due to their zoonotic potential in a population living in close contact with livestock, and in a region where the livestock migration across borders raises the risk of diseases infection and dissemination. The aim of the study was the screening of potential circulating arboviruses and the assessment of their zoonotic implications. Therefore, ticks were collected on cattle located in three provinces of eastern Burkina Faso. Tick pools were tested using a panel of genus-specific real-time assays targeting conserved regions of parapoxvirus, orthopoxvirus, flavivirus and phlebovirus. On the 26 farms visited, a total of 663 ticks were collected. Four genera and six tick species were morphologically identified, with *Amblyomma variegatum* and *Hyalomma* spp. being the most represented species. No arboviruses were found. However, this study highlights the presence of pseudocowpox virus (8.2%) and bovine papular stomatitis virus (5.8%) among the positive tick pools. BPSV positive ticks were found in herds sharing water and pastures resources and with a history of seasonal transhumance. Therefore, common grazing and the seasonal transhumance are likely to support the transmission of the virus. This could have important health and economic impacts, especially regarding transboundary cattle movements.

Keywords: bovine papular stomatitis; pseudocowpox; virus; arbovirus; poxviridae; cattle ticks; West Africa; Burkina Faso

1. Introduction

In West Africa, cattle farming is of great importance, as it generates income for a large part of the population [1]. However, infectious diseases represent an important constraint by hindering

production and productivity, causing huge economic losses. Additionally, the zoonotic impact of these diseases is often neglected, especially in African countries. Vectors are able to transmit a wide range of pathogens, including parasites, bacteria and viruses, particularly an arthropod borne virus group named “arbovirus”. A panel of arboviruses, mainly including families of flaviridae and bunyaviridae, are highly present in Africa. In the family of flaviviridae, most of the species belonging to the flavivirus genus are zoonotic arboviruses [2]. They are transmitted between vertebrate hosts by mosquitoes or ticks across a wide range of geographical distribution. In Africa, most of these viruses are of particular medical importance, with dengue, yellow fever and zika viruses being significant public health threats [3]. Additionally, virulent strains of West Nile virus originating from Africa emerged, especially in Europe and the United States, causing viral encephalitis in humans, horses, camelids, and birds [2–4]. The family of bunyaviridae also includes important zoonotic arboviruses such as the Rift Valley fever virus (RVFV) belonging to the genus phlebovirus, and the Crimean-Congo hemorrhagic fever virus (CCHFV), belonging to nairovirus. RVFV can cause severe diseases in both humans and animals, resulting in significant economic losses due to death and abortion, especially in livestock animals [4]. CCHFV is an emerging problem in many parts of the world [5]. The main vector is represented by *Hyalomma* tick species infesting wild and domestic ruminants. This disease could affect humans; primarily farmers, veterinarians and others coming in contact with livestock and infected ticks [4,6,7]. Despite their harmful effects, arboviruses and other viruses in general have received limited research attention in West Africa. In addition to the arboviruses, the family of poxviridae, mainly represented by the genera parapoxvirus and orthopoxvirus, includes viruses affecting livestock animals and humans such as the pseudocowpox virus (PCPV) and the bovine papular stomatitis virus (BPSV). Commonly, they cause mild diseases in cattle, although they are able to induce a significant loss of productivity [8,9]. Occasionally, humans can be infected through direct contact with the lesions of infected animals. Clinical manifestations are observed on hands, and they are thus presented as occupational zoonotic diseases [10]. Besides the direct transmission, other viruses of this family could also be transmitted throughout vectors such as the agent of the lumpy skin disease. This disease is well known on the African continent, where it is transmitted by flies and ticks [10,11].

Disease surveillance is often neglected, especially in animals, mainly due to the limited resources and presently, for security reasons, due to armed conflicts. Therefore, using the tick species harbored by domestic animals as virus sentinels is a convenient and cost-effective manner for monitoring the circulation of potential pathogens in this region. The aim of this study is to provide information on arboviruses circulating in ticks infecting cattle in eastern Burkina Faso. Here, their molecular identification is of particular interest, due to their zoonotic potential in populations living in close contact with livestock, and where the traditional livestock migration across borders raises the risk of diseases' infection and dissemination.

2. Materials and Methods

2.1. Ticks Collection and Morphological Identification

Ticks were collected from July to August 2017 on zebu cattle (*Bos indicus*) located in the provinces of Gourma (12°03'41.65"N, 0°21'30.35"E), Komienga (11°24'59.99"N, 0°54'59.99"E) and Tapoa (12°14'58.95"N, 1°40'33.85"E), in eastern Burkina Faso (Figure 1). Herds were randomly selected among a list of volunteers in each province. The inclusion criteria at the herd level were the minimum size of 50 heads per herd and the minimal distance of 2 km separating contiguous herds. The cattle of both sexes were selected and classified in two groups according to their age: 3– to 12-months-old (young) and over 12-months-old (adult). The identification code was attributed to each cattle, and each sampling point was characterized by the name of the locality and GPS coordinates. The whole skin of animals was inspected, and ticks were collected manually. Ticks were stored in collection jars with lids previously drilled and closed with compress, in order to allow their survival until returning to the laboratory. Containers were then placed in a plastic bin, with a damp mop on the bottom. Once in the

lab, ticks were sorted and only live specimens were used in the study. Moreover, farm owners were asked to provide information on the health status of the animals, through a standardized questionnaire. At the laboratory, ticks were identified at species level at room temperature under stereomicroscope, using an identification key [12] and immediately stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

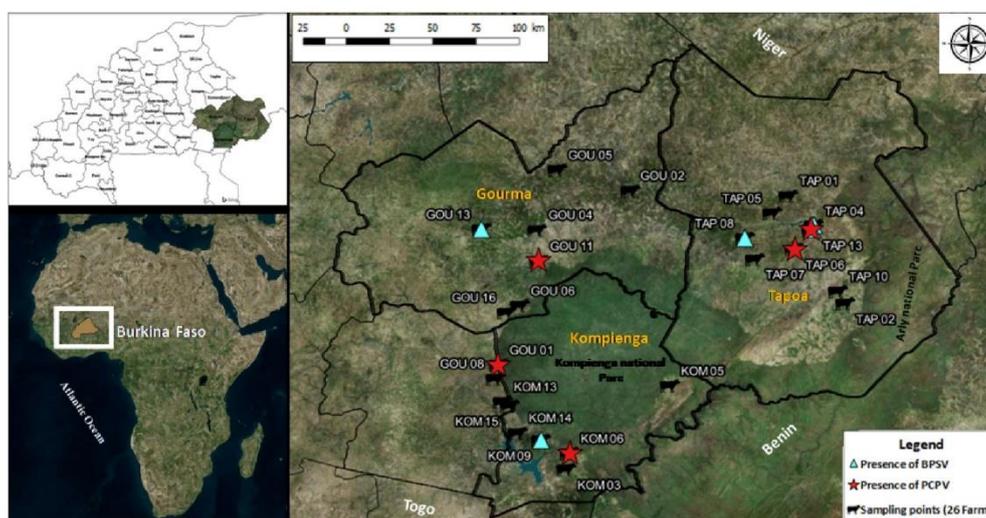


Figure 1. Localization of tick collection and positive pools of ticks in the study area (Eastern Burkina Faso) Gou: Gourma; Kom: Kompienga; Tap: Tapoa.

2.2. Nucleic Acids Extraction

Ticks belonging to the same species and collected from the same animal were pooled together. Pools of ticks were crushed using the mixer millMM400 (RETSCH®, Haan, Germany) in HBSS (Hanks's Balanced Salt Solution, ThermoFisher, USA) at 30 cycles/s for 30 min, followed by centrifugation at $6160g$ for 10 min. Total nucleic acid extraction was performed on a QIAcube HT (Qiagen®, Venlo, The Netherlands), using a QIAamp Cadore Pathogen kit, according to the manufacturer's instructions. Eluates were stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, while a part of the crushed pools was stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.3. Real-Time PCR

Tick pools were tested using a panel of genus-specific real-time assays targeting conserved regions of parapoxvirus, orthopoxvirus, flavivirus and phlebovirus (Table 1). Positive PCR samples ($ct < 35$) to these genus-specific assays were submitted to species-specific real-time PCR, targeting highly conserved gene sequences (Table 1). Among parapoxvirus, ORF virus, PCPV and BPSV have been tested [13]. In addition, RVFV [14], and CCHF [15] were tested using a specific assay. Molecular assays were performed with SuperScript III Platinum One-Step qPCR kit (Invitrogen-Thermo Fisher Scientific®, Waltham, Ma, USA) in a BioRad CFX96 thermal cycler, software version 3.1 (BioRad Laboratories, Irvine, Ca, USA). Sequencing was subsequently applied to all positive samples ($ct < 35$) to both generic and specific PCR, using next generation sequencing (Ion Torrent, Life Technologies and CLC Genomics Workbench software, Waltham, Ma, USA). Primers used for the sequencing were those targeting the B2L gene [16]. Detection rates of DNA viruses were compared using Fisher exact test ($p < 0.05$). The data analysis was conducted using the R statistical software (version 3.6.1).

Table 1. Primers and probes used for genus- and species-specific real-time PCR assays.

Genus or Species	Primer/Probe	5'→3' Sequence	Target	Position	Amplicon Size (bp)	Concentration	Reference
Pan-Parapox viruses	Forward	TCGATGCGGTGCAGCAC	B2L	599-683	85	7.5 pmol	[16]
	Reverse Probe	GCGGCGTATTCTTCGGAC FAM-TGCGGTAGAAAGCC-NFQ-MGB				7.5 pmol 2.5 pmol	
Pan-Parapox viruses	Forward	CGCGGCTCTGGTCTTG	J6R	771-855	85	0.4 µmol	[13]
	Reverse Probe	CAGCATCAACCTCTCTACATCA FAM-CCACGAAGCTGCGCAGCAT-BHQ1				0.4 µmol 200 nmol/L	
Orf virus (ORF)	Forward	GAGTTCGAGGAGATGATCTTGA	ORFV_J6R	697-764	68	0.4 µmol	
	Reverse Probe	FAM-GCCGAGGAGCAGGTCA CTCGATCACGGCGCT-BHQ1				0.4 µmol 200 nmol/L	
Bovine papular stomatitis virus (BPSV)	Forward	GAGATGATCTTGATGTTGCTACT	BPSV_J6R	665-755	91	0.4 µmol	
	Reverse Probe	FAM-TGGGCATGATCGTGAAGTAC ATCATCGCGCGCTGGATCAC-BHQ1				0.4 µmol 200 nmol/L	
Pseudocowpox virus (PCPV)	Forward	CCGACTACATCCGGAACA	PCPV_J6R	62609-62675	67	0.4 µmol	
	Reverse Probe	CGCACGGCTTGCT FAM-CTCACGCAGAAGATCTTCGTGAAGTAC-BHQ1				0.4 µmol 200 nmol/L	
pan-Orthopox virus	OPE9L-F1880	GAA CAT TTT TGG CAG AGA GAG CC	HA (I7R)		177	0.5 µM	[17]
	OPE9L-R2057 OPE9L-p1924S-MGB	CAA CTC TTA GCC GAA GCG TAT GAG FAM-CAG GCT ACC AGT TCA A-MGBNFQ				0.5 µM 0.1 µM	
Pan-Flaviviruses	PF1	TGYRTBTAYAACATGATGGG	NS5		93	20 µM	[18]
	PF2	GTGTCCCADCCDGDGTRTC				20 µM	
Rift Valley Fever Virus	RVS	AAAGGAACAATGGACTCTGGTCA	G2	349-417	94	1 µM	[14]
	RVAs RVP	CACTTCTTACTACCATGTCTCCCAAT AAAGCTTTGATATCTCTCAGTGCCTCCAA				1 µM 0.2 µM	
Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus	RWCF	CAAGGGTACCAAGAAAATGAAGAAGGC	S	1068-1223	181	600 nM	[15]
	RWCR SE01	GCCACAGGGATTGTCCAAAGCAGAC FAM-ATCTACATGCACCTGTGTGTGACA-TAMRA				600 nM 100 nM	
Pan-Phlebovirus	Phlebo forward 1	TTTGCTTATCAAGGATTTGATGC	N	210-400	370	50 pmol	[19]
	Phlebo forward 2	TTTGCTTATCAAGGATTTGACC				50 pmol	
	Phlebo reverse	TCAATCAGTCCAGCAAAGCTGGATGCATCAT				50 pmol	

2.4. Phylogenetic Analysis

After a blast search (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), sequences were aligned using Mega_X_10.1.7 (<https://www.megasoftware.net/>). Thereafter, a neighbor-joining phylogenetic tree was generated. The percentage of bootstraps were calculated for 100 replicates.

3. Results

3.1. Ticks Collection and Identification

Of the 26 farms visited (9 in Gourma, 7 in Komienga and 10 in Tapoa), a total of 663 ticks were collected on 102 cattle inspected (15 in Gourma; 40 in Komienga and 47 in Tapoa), all of them being infested by at least one tick. Four genera and six tick species were morphologically identified (Table 2). The most abundant species was *Amblyomma variegatum* (480/663; 72.4%), followed by *Hyalomma truncatum* (106/663; 16%) and *H. marginatum rufipes* (70/663, 10.6%). *Rhipicephalus lunulatus* and *R. (Boophilus) geigy* were found only in Tapoa, while *R. sanguineus* was not collected in Gourma (Table 2). A total of 171 pools were established and tested for virus detection.

Table 2. Number of ticks collected in cattle in three provinces of eastern Burkina Faso.

Tick Species	Gourma	Komienga	Tapoa	Total No. (%)
<i>A. variegatum</i>	6	222	252	480 (72.4)
<i>H. truncatum</i>	7	48	51	106 (16.0)
<i>H. m. rufipes</i>	9	23	38	70 (10.6)
<i>R. lunulatus</i>	–	–	3	3 (0.5)
<i>R. sanguineus</i>	–	1	1	2 (0.3)
<i>R. (B.) geigy</i>	–	–	2	2 (0.3)
Total No. (%)	22 (3.3)	294 (44.3)	347 (52.3)	663

3.2. Viruses Detected in Ticks

Among the 171 pools, 24 pools (14%) were found positive for parapoxvirus genus-specific PCR. All other genus-specific PCR provided negative results. Of the total pools, 14/171 (8.2%) were positive for PCPV and 10/171 (5.8%) for BPSV based on their specific PCR and subsequent sequences analyses (Table 3). Out of the six tick species for which specimens were collected during this study, three species were found to be infected with PCPV: i.e., *A. variegatum* (7/14 pools), *H. m. rufipes* (4/14 pools), *H. truncatum* (3/14 pools), whereas two species were carrying BPSV: i.e., *A. variegatum* (9/10 pools) and *H. truncatum* (1/10 pools) (Table 4). The pools including other tick species were negative for both PCPV and BPSV. The infection rates for each virus species were not statistically significant within tick species ($p > 0.05$).

Table 3. Parapoxvirus detection in pools of ticks collected in each province of eastern Burkina Faso.

		<i>A. variegatum</i>	<i>H. m. rufipes</i>	<i>H. truncatum</i>	Total
Gourma	PCPV	0/4	2/9	0/6	2/19
	BPSV	1/4	0/9	0/6	1/19
Komienga	PCPV	1/37	0/14	0/12	1/63
	BPSV	2/37	0/14	0/12	2/63
Tapoa	PCPV	6/46	2/20	3/19	11/85
	BPSV	6/46	0/20	1/19	7/85
Total	PCPV	7/87	4/43	3/37	14/167
	BPSV	9/87	0/43	1/37	10/167

Table 4. Positive tick species pools for bovine papular stomatitis virus (BPSV) and pseudocowpox virus (PCPV).

Pools ID	Tick Species	Farms ID	Cattle ID	Province	Virus Detected
24	<i>A. variegatum</i>	Gou13	12	Gourma	BPSV
12	<i>A. variegatum</i>	Kom09	72	Kompienga	BPSV
19	<i>A. variegatum</i>	Kom09	76	Kompienga	BPSV
4	<i>A. variegatum</i>	Tap09	75	Tapoa	BPSV
45	<i>A. variegatum</i>	Tap04	183	Tapoa	BPSV
78	<i>A. variegatum</i>	Tap08	335	Tapoa	BPSV
94	<i>A. variegatum</i>	Tap08	333	Tapoa	BPSV
180	<i>A. variegatum</i>	Tap08	334	Tapoa	BPSV
181	<i>A. variegatum</i>	Tap08	334	Tapoa	BPSV
81	<i>H. truncatum</i>	Tap08	335	Tapoa	BPSV
37	<i>H. m. rufipes</i>	Gou01	419	Gourma	PCPV
56	<i>H. m. rufipes</i>	Gou11	94	Gourma	PCPV
52	<i>A. variegatum</i>	Kom06	17	Kompienga	PCPV
83	<i>A. variegatum</i>	Tap06	306	Tapoa	PCPV
110	<i>A. variegatum</i>	Tap06	307	Tapoa	PCPV
58	<i>A. variegatum</i>	Tap06	309	Tapoa	PCPV
63	<i>A. variegatum</i>	Tap06	310	Tapoa	PCPV
64	<i>A. variegatum</i>	Tap06	310	Tapoa	PCPV
86	<i>H. truncatum</i>	Tap06	306	Tapoa	PCPV
65	<i>H. truncatum</i>	Tap06	310	Tapoa	PCPV
109	<i>H. m. rufipes</i>	Tap06	307	Tapoa	PCPV
66	<i>H. m. rufipes</i>	Tap06	310	Tapoa	PCPV
177	<i>A. variegatum</i>	Tap09	341	Tapoa	PCPV
176	<i>H. truncatum</i>	Tap09	341	Tapoa	PCPV

Gou: Gourma, Kom: Kompienga, Tap: Tapoa; A.: *Amblyomma*; H.: *Hyalomma*; H.m.: *Hyalomma marginatum*.

3.3. Phylogenetic Analysis

The respective virus sequences were identical and only the longest sequence of each species was included in the phylogenetic analysis. The BPSV sequence obtained (MT122761) showed 100% identity, with a BPSV strain previously evidenced in the USA (KJ137717.1). As well, the closest strain of PCPV sample (MT122762) was a PCPV strain from Mexico (KJ137718.1), with 98.99% identity on 97% of the studied sequence. The neighbor-joining phylogenetic tree (Figure 2) showed a clustering of the sequences into two main groups, I and II, each containing the two viral species. The group I included subgroups A and B. The BPSV sequence from the present study gathered with a BPSV sample from USA within subgroup B. Meanwhile, the PCPV studied sequence was within the subgroup A, with other PCPV samples from Latin America and the Middle East (Figure 2). Group II comprised subgroups C and D and gathered reference samples from Europe and Africa (Figure 2). These gatherings were confirmed by a reticulate tree, built using the median joining network method in PopArt software (Figure 3).

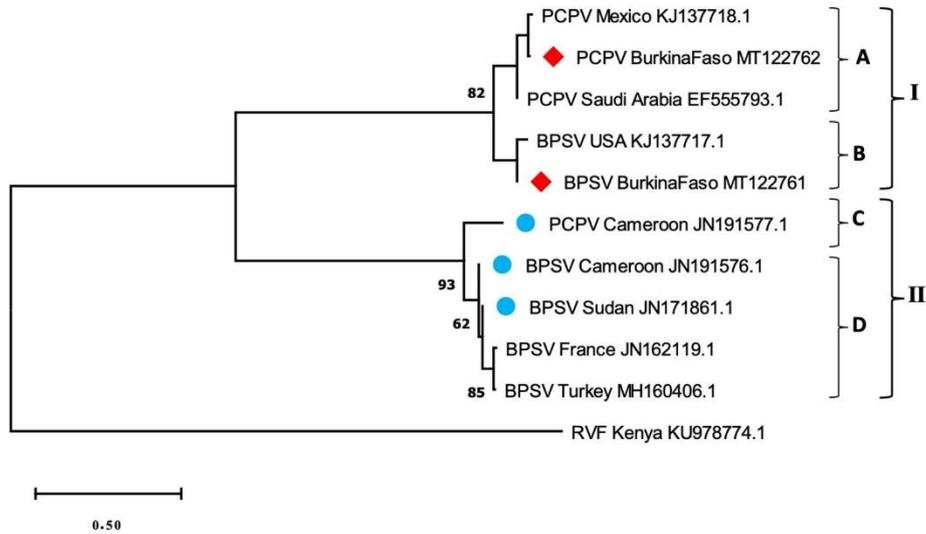


Figure 2. Neighbor-joining phylogenetic tree based on the partial sequences of the major envelope protein (B2L) gene of Bovine Papular Stomatitis and Pseudocowpox virus. Origins and accession numbers of reference sequences of BPSV (Bovine Papular Stomatitis Virus), PCPV (Pseudocowpox virus) as well as that of RVFV (Rift Valley Fever Virus) are indicated. Blue circles refer to samples from elsewhere in Africa, while red squares correspond to our samples from Burkina Faso.

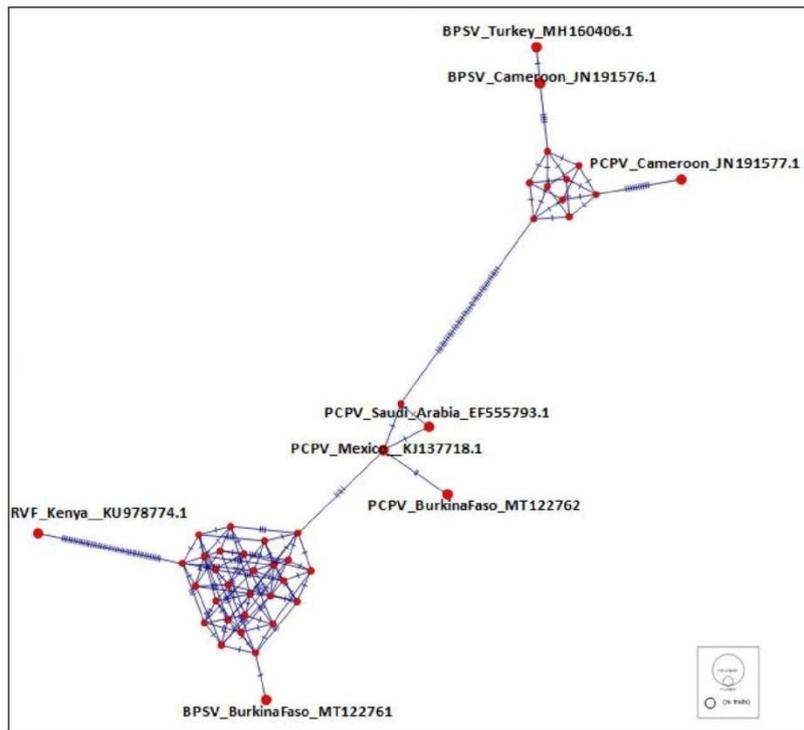


Figure 3. Reticulate tree, built with median joining network method.

4. Discussion

Several arboviruses have recently emerged and are now widespread across Africa, such as West Nile, Chikungunya and Zika viruses [18,20]. This region is now considered to contribute to the largest share of emerging vector-borne and zoonotic diseases [3]. Nevertheless, some areas are completely unexplored regarding these diseases, which is the case in Eastern Burkina Faso. The implementation of vectors and pathogens surveillance is facing many constraints, such as the limited resources and the unfavorable field conditions, with climatic and security factors being the most important limitations. The aim of the study was the screening of potential circulating arboviruses and the assessment of their zoonotic implications. Interestingly, no arbovirus was detected, despite the fact that adequate conditions for the preservation of the living ticks were strictly enforced. However, this study highlighted the presence of two parapoxviruses, PCPV and BPSV, in ticks collected from cattle in Eastern Burkina Faso. The tick species collected were expected to be found in the region, with *A. variegatum* and *Hyalomma* spp. being the most represented [19,21]. *A. variegatum* showed the highest detection rate for BPSV, while PCPV was found in the second most-represented species, *H. m. rufipes*. The natural interaction between ticks and parapoxvirus detected in our study remains unknown. The virus transmission most likely occurs by direct contact between infected and susceptible animals [10], although mechanical transfer by flies or ticks can probably occur as described for another poxvirus, the lumpy skin disease virus [11,22,23]. Domestic cattle are considered to be the main reservoir of both PCPV and BPSV, although buffalo were also reported to be a competent reservoir [24]. In this study, ticks collected in 3 herds of the Tapoa province were found positive for BPSV. It is noticeable that these herds were sharing water and pastures resources and that wildlife reserves are present in the area. Additionally, owners reported a history of seasonal transhumance via the same route. Taking into account the high environmental stability of poxvirus [25], common grazing that allows livestock to freely access natural resources shared with other herds and wildlife, the seasonal transhumance is likely to support the transmission of the virus. This could have important health and economic impacts, especially regarding transboundary cattle movements.

Besides their similarity to reference samples, studied samples seem to be closer to American samples than those from East and Central Africa. Such result suggests more gene flow between BPSV and PCPV from West Africa and America than with other regions. It could result from bovine importation from America to West Africa in order to improve local bovine production. For instance, Gir and Girolando were imported from Brazil to Benin and Côte d'Ivoire around 2002–2004 [26]. As well, the importation of Girolando from Brazil to Burkina Faso occurred in 1999. Moreover, although more analyses are needed to confirm some results of the current study, the differences between West African samples of BPSV and PCPV and those from East and Central Africa emphasize the pattern of cattle domestication in Africa [27].

Furthermore, it is noteworthy that the inspected cattle during field work were all asymptomatic, although the owners of positive herds described historical reports of clinical cases in cattle and humans (personal communication). It has been previously reported that parapoxvirus PCR positive can be identified from both symptomatic and asymptomatic ruminants [28]. Thus, it is likely that the sampled cattle were either healthy carriers of parapoxvirus and that the tick species found positive became infected through their blood meal, or that the ticks were already infected with parapoxviruses by feeding on domestic or wild animals before they clung to the exposed cattle. The lesions due to PCPV and BPSV in humans are often neglected and underreported by farmers. Although tick screening is not sufficient for the evaluation of the health status of the animal, this supports the relevance of the use of collected ticks for pathogens surveillance, especially for potential zoonotic diseases. Whether or not ticks play a role in the transmission of PCPV and/or BPSV remains to be studied, however, our findings represent preliminary data, serving as a basis for future studies. The cases of virus detection in vectors in West Africa remain poorly documented. The surveillance in animals and vectors may serve as an alert system to detect zoonotic arbovirus outbreaks such as Crimean Congo hemorrhagic fever, West Nile or Rift Valley fever viruses [18,28,29], and this is something which should be encouraged.

Author Contributions: Conceptualization: L.L. (Laetitia Lempereur), R.C. and A.B. (Adrien Belem); investigation, A.O., O.Z.; laboratory work: A.O., O.M., L.L. (Léa Luciani), L.P., L.T.; writing—original draft preparation: A.O.; writing—review and editing: A.B. (Abel Biguezoton), C.S., R.C., L.L. (Laetitia Lempereur) and A.B. (Adrien Belem); supervision: L.L. (Laetitia Lempereur), R.C. and A.B. (Abel Biguezoton). All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Academy of Research and Higher Education (ARES-CCD). Laura Pezzi holds a PhD grant funded by the University of Corsica Pasquale Paoli, Corte 20250, France.

Acknowledgments: The authors acknowledge all laboratory technicians and participating farmers.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Nugteren, H.; Le Côme, C. *Libérer le Potentiel du Pastoralisme Pour Développer L’afrique de l’Ouest*; Fred Zaal, Thea Hilhorst et Jacqueline Sluijs; KIT and SNV: Amsterdam, The Netherlands, 2016.
2. Venter, M. Assessing the zoonotic potential of arboviruses of African origin. *Curr. Opin. Virol.* **2018**, *28*, 74–84. [[CrossRef](#)]
3. Swei, A.; Couper, L.I.; Coffey, L.L.; Kapan, D.; Bennett, S. Patterns, drivers, and challenges of vector-borne disease emergence. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2020**, *20*, 159–170. [[CrossRef](#)]
4. Fall, G.; Di Paola, N.; Faye, M.; Dia, M.; de Melo Freire, C.C.; Loucoubar, C.; de Andrade Zanotto, P.M.; Faye, O. Biological and phylogenetic characteristics of West African lineages of West Nile virus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2017**, *11*. [[CrossRef](#)]
5. Favier, C.; Chalvet-Monfray, K.; Sabatier, P.; Lancelot, R.; Fontenille, D.; Dubois, M.A. Rift Valley fever in West Africa: The role of space in endemicity. *Trop. Med. Int. Heal.* **2006**, *11*, 1878–1888. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Filippitzi, M.E.; Goumperis, T.; Robinson, T.; Saegerman, C. Microbiological Zoonotic Emerging Risks, Transmitted Between Livestock Animals and Humans (2007–2015). *Transbound. Emerg. Dis.* **2017**, *64*, 1059–1070. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Underwood, W.J.; Blauwiel, R.; Delano, M.L.; Gillesby, R.; Mischler, S.A.; Schoell, A. Biology and Diseases of Ruminants (Sheep, Goats, and Cattle). In *Laboratory Animal Medicine*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2015; pp. 623–694.
8. Sule, W.F.; Oluwayelu, D.O.; Hernández-Triana, L.M.; Fooks, A.R.; Venter, M.; Johnson, N. Epidemiology and ecology of West Nile virus in sub-Saharan Africa. *Parasit. Vectors* **2018**, *11*, 414. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Huang, T.; Tulman, E.R.; Diel, D.G.; Khatiwada, S.; Sims, W.; Edwards, J.F.; Wen, X.; Kutish, G.F.; Rock, D.L.; Delhon, G. Coinfection with multiple strains of bovine papular stomatitis virus. *Arch. Virol.* **2015**, *160*, 1527–1532. [[CrossRef](#)]
10. Büttner, M.; Rziha, H.-J. Parapoxviruses: From the Lesion to the Viral Genome. *J. Vet. Med. Ser. B* **2002**, *49*, 7–16. [[CrossRef](#)]
11. Poxviridae. In *Fenner’s Veterinary Virology*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2017; pp. 157–174.
12. Walker, A.R.; Bouattour, A.; Camicas, J.L.; Estrada-Peña, A.; Horak, I.; Latif, A.A.; Pegram, R.G.; Preston, P.M. *Ticks of Domestic Animals in Africa: A Guide to Identification of Species*; Bioscience Reports: Edinburgh, UK, 2014.
13. Zhao, H.; Wilkins, K.; Damon, I.K.; Li, Y. Specific qPCR assays for the detection of orf virus, pseudocowpox virus and bovine papular stomatitis virus. *J. Virol. Methods* **2013**, *194*, 229–234. [[CrossRef](#)]
14. Drosten, C.; Götting, S.; Schilling, S.; Asper, M.; Panning, M.; Schmitz, H.; Günther, S. Rapid detection and quantification of RNA of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Rift Valley fever virus, dengue virus, and yellow fever virus by real-time reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* **2002**, *40*, 2323–2330. [[CrossRef](#)]
15. Wölfel, R.; Paweska, J.T.; Petersen, N.; Grobbelaar, A.A.; Leman, P.A.; Hewson, R.; Georges-Courbot, M.C.; Papa, A.; Günther, S.; Drosten, C. Virus Detection and Monitoring of Viral Load in Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Patients. *Emerg. Infect. Dis.* **2007**, *13*, 1097–1100. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Nitsche, A.; Büttner, M.; Wilhelm, S.; Pauli, G.; Meyer, H. Real-Time PCR Detection of Parapoxvirus DNA. *Clin. Chem.* **2006**, *52*, 316–319. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

17. Kulesh, D.A.; Baker, R.O.; Loveless, B.M.; Norwood, D.; Zwiers, S.H.; Mucker, E.; Hartmann, C.; Herrera, R.; Miller, D.; Christensen, D.; 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 Cyler platforms. *J. Clin. Microbiol.* **2004**, *42*, 601–609. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Cook, S.; Moureau, G.; Harbach, R.E.; Mukwaya, L.; Goodger, K.; Ssenfuka, F.; Gould, E.; Holmes, E.C.; de Lamballerie, X. Isolation of a novel species of flavivirus and a new strain of Culex flavivirus (Flaviviridae) from a natural mosquito population in Uganda. *J. Gen. Virol.* **2009**, *90*, 2669–2678. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Lambert, A.J.; Lanciotti, R.S. Consensus Amplification and Novel Multiplex Sequencing Method for S Segment Species Identification of 47 Viruses of the Orthobunyavirus, Phlebovirus, and Nairovirus Genera of the Family Bunyaviridae. *J. Clin. Microbiol.* **2009**, *47*, 2398–2404. [[CrossRef](#)]
20. Sohier, C.; Haegeman, A.; Mostin, L.; De Leeuw, I.; Van Campe, W.; De Vleeschauwer, A.; Tuppurainen, E.S.; van den Berg, T.; De Regge, N.; De Clercq, K. Experimental evidence of mechanical lumpy skin disease virus transmission by Stomoxys calcitrans biting flies and Haematopota spp. horseflies. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 20076. [[CrossRef](#)]
21. Kabore, H.; Salembere, M.S.; Tamboura, H.H. Seasonal Variation of Ticks on Cattle in Burkina Faso. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1998**, *849*, 398–401. [[CrossRef](#)]
22. Stachurski, F. Invasion of West African cattle by the tick Amblyomma variegatum. *Med. Vet. Entomol.* **2000**, *14*, 391–399. [[CrossRef](#)]
23. Sprygin, A.; Pestova, Y.; Wallace, D.B.; Tuppurainen, E.; Kononov, A.V. Transmission of lumpy skin disease virus: A short review. *Virus Res.* **2019**, *269*, 197637. [[CrossRef](#)]
24. Laguardia-Nascimento, M.; Sales, É.B.; Gasparini, M.R.; de Souza, N.M.; da Silva, J.A.; Souza, G.G.; Carani, F.R.; dos Santos, A.F.; Rivetti Júnior, A.V.; Camargos, M.F.; et al. Detection of multiple viral infections in cattle and buffalo with suspected vesicular disease in Brazil. *J. Vet. Diagn. Investig.* **2016**, *28*, 377–381. [[CrossRef](#)]
25. Rheinbaben, F.V.; Gebel, J.; Exner, M.; Schmidt, A. Environmental resistance, disinfection, and sterilization of poxviruses. In *Poxviruses*; Mercer, A.A., Schmidt, A., Weber, O., Eds.; Birkhäuser: Birkhäuser, Basel, 2007; pp. 397–405.
26. Madder, M.; Adehan, S.; de Deken, R.; Adehan, R.; Lokossou, R. New foci of Rhipicephalus microplus in West Africa. *Exp. Appl. Acarol.* **2012**, *56*, 385–390. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Hanotte, O.; Bradley, D.G.; Ochieng, J.W.; Verjee, Y.; Hill, E.W.; Rege, J.E.O. African Pastoralism: Genetic Imprints of Origins and Migrations. *Science (80-)* **2002**, *296*, 336–339. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Lederman, E.R.; Tao, M.; Reynolds, M.G.; Li, Y.; Zhao, H.; Smith, S.K.; Sitler, L.; Haberling, D.L.; Davidson, W.; Hutson, C.; et al. An Investigation of a Cluster of Parapoxvirus Cases in Missouri, Feb–May 2006: Epidemiologic, Clinical and Molecular Aspects. *Animals* **2013**, *3*, 142–157. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Boussini, H.; Lamien, C.E.; Nacoulma, O.G.; Kabore, A.; Poda, G.; Viljoen, G.J. Prevalence of Rift Valley fever in domestic ruminants in the central and northern regions of Burkina Faso: -EN- -FR- Prévalence de la fièvre de la vallée du Rift chez les ruminants domestiques dans les régions centrale et septentrionale du Burkina Faso -ES- Prevalencia de la fiebre del Valle del Rift en ruminantes domésticos de las regiones central y septentrional de Burkina Faso. *Rev. Sci. Tech. L'oise* **2014**, *33*, 893–901. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Title:

Molecular detection of Parapoxvirus in Ixodidae ticks collected from cattle in Corsica, France

Running title:

Molecular detection of Parapoxvirus in ticks.

Authors :

Cicculli Vincent^{1,2}, Ayhan Nazli², Luciani Léa², Pezzi Laura², Maitre Apolline¹, Decarreaux Dorine¹, N. de Lamballerie Xavier², Paoli Jean-Christophe³, Vial Laurence⁴, Charrel Remi² and Falchi Alessandra¹.

¹ Laboratoire de Virologie, EA7310, Université de Corse-Inserm, 20250 Corte, France

² Unité Des Virus Emergents (UVE : Aix Marseille Université, IRD 190, Inserm 1207, IHU Méditerranée Infection), 13000 Marseille, France

³ UR045 Laboratoire de Recherches sur le Développement de l'Élevage, Institut National de la Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement, Corte, France

⁴ UMR CIRAD-INRA ASTRE (Animal, Health, Territories, Risks and Ecosystems) Department BIOS, Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier, Cedex 5, France

Author Contributions:

VC, NA and AF conceived the study, analysed data and draft the manuscript. VC, LP, LL, DD and AM microbiological diagnosis. DD, AM and VC collected ticks. XdL, LV, J-C P and RC draft the manuscript.

Acknowledgement:

We are grateful to the staff of the slaughterhouse of Ponte-Leccia for their help in collecting ticks. This work was supported by Corsican Territorial Collectivity and the University of Corsica.

Conflict of Interest Statement

The authors of the work have no conflict of interests to disclose.

Ethical statement

No ethical approval was required, as this study does not involve clinical trials or experimental procedures. The cattle inspected were slaughtered for human consumption. Living sheep and Horses were examined with the assistance of their owner. This study did not involve endangered or protected species. The wild boars collected were legally hunted during the hunting season.

Abstract

Background

Several viruses belonging to the family Poxviridae can cause infections in humans and animals. In Corsica, livestock farming (sheep, goats, pigs, and cattle) is mainly mixed, leading to important interactions between livestock, wildlife, and human populations. This could facilitate the circulation of zoonotic diseases, and makes Corsica a good example for studies of tick-borne diseases.

Objectives

To gain understanding on the circulation of Poxviruses in Corsica, we investigated their presence in tick species collected from cattle, sheep, horses, and wild boar, and characterized them through molecular techniques.

Methods

Ticks were tested using specific primers targeting conserved regions of sequences corresponding to two genera: Parapoxvirus and Orthopoxvirus.

Results

A total of 3555 ticks were collected from 1549 different animals (687 cattle, 538 horses, 106 sheep, and 218 wild boars). They were tested for the presence of Parapoxvirus DNA on one hand and Orthopoxvirus DNA on the other hand using Pangeneric real-time TaqMan assays. Orthopoxvirus DNA was detected in none of the 3555 ticks. Parapoxvirus DNA was detected in 6.6% (36/544) of ticks collected from 23 cows from 20 farms. The remaining 3011 ticks collected from horses, wild boars, and sheep were negative. The infection rate in cow ticks was 8.0% (12/148) in 2018 and 6.0% (24/396) in 2019 ($p = 0.57$). Parapoxvirus DNA was detected in 8.5% (5/59) of *Hyalomma scupense* pools, 8.2% (15/183) of *Hyalomma marginatum* pools, and 6.7% (16/240) of *Rhipicephalus bursa* pools ($p = 0.73$). We successfully amplified and sequenced 19.4% (7/36) of the positive samples which all corresponded to Pseudocowpox virus.

Conclusions

Obviously, further studies are needed to investigate the zoonotic potential of Pseudocowpox virus and its importance for animals and public health

Introduction

Viruses belonging to the *Orthopoxvirus* and *Parapoxvirus* genera are large, enveloped, linear double-stranded DNA viruses in the family *Poxviridae* [1]. Poxviruses are of major veterinary and human importance and infect various vertebrates and invertebrates, including humans. The genus *Parapoxvirus* contains five virus species: Orf virus, Bovine papular stomatitis virus, Pseudocowpox virus, and Parapoxvirus of red deer in New Zealand [2]. There are three known zoonotic *Orthopoxvirus* species: *Monkeypox virus*, *Cowpox virus*, and *Vaccinia virus* which are associated with outbreaks in Africa, Europe, South America, and Asia [3]. Humans are susceptible to Monkeypox virus, Cowpox virus, Vaccinia virus, Bovine papular stomatitis virus, Orf virus and Pseudocowpox virus. Although the complete host range of these viruses is unclear, domestic animals such as sheep, goats, cats, dogs, and dairy cows can be infected with *Orthopoxvirus* and/or *Parapoxvirus* [9]. Infected humans play an important role in the spread of *Orthopoxvirus* and *Parapoxvirus* among domestic animals, especially during milking and other livestock-related occupational activities [1,9]. Clinically, the exanthematous lesions caused by zoonotic *Orthopoxvirus* and *Parapoxvirus* species are very similar, especially in humans and cows, and can be diagnosed in areas of *Orthopoxvirus* /*Parapoxvirus* cocirculation [4].

Recently, the presence of two *Parapoxvirus* (Pseudocowpox virus and Bovine papular stomatitis virus) was reported in ticks collected from zebu cattle in Eastern Burkina Faso [5]. Although the natural interaction between ticks and the detected *Parapoxvirus* in that study is unknown, this finding shows that ticks may be a good indicator of the spread of these pathogens.

In Corsica, a French Mediterranean island, ticks of the genus *Ixodes*, *Hyalomma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, and *Rhipicephalus* have been identified and can act as vectors for a variety of emerging diseases [6-11]. Since, mixed livestock farming (sheep, goats, pigs, and cattle) is extensive in Corsica, high interactions between livestock, wildlife, and human populations can facilitate the circulation of zoonotic diseases in the island. To our knowledge, there has been no investigation of the presence of poxviruses in domestic and wild animals in Corsica. Thus, the aim of this study was to provide new information about the potential circulation of *Parapoxvirus* and *Orthopoxvirus* by investigating their presence in tick species collected from cattle, sheep, horses, and wild boars in Corsica.

Material and Methods

Study area and collection of ticks

Ticks were collected: i) in May and June, 2019 from one sheep-breeding farm located in the center of Corsica (42.298899N, 9.153161E); ii) between July and December, 2018 and January and December, 2019 from cattle in the Ponte-Leccia slaughterhouse, which is the main active slaughterhouse in Corsica; iii) from August to December, 2018 and 2019 (hunting season) from wild boars in the northeast of Corsica; and iv) between March and August, 2019 from horses on farms after they had been used for horseback riding in the natural environment across Corsica (Figure 1).

For each animal, all ticks were collected and kept alive until identification and storage. Living ticks were identified at species level under a stereomicroscope using an identification key, and immediately stored at -80°C [12].

DNA extraction and polymerase chain reaction (PCR) detection

Ticks were washed once in 70% ethanol for 5 min and then twice in distilled water for 5 min. Ticks were analyzed as pools consisting of 1–6 ticks of the same species, same stage, and collected from the same animal (Table 2). Individual ticks or pools of ticks were crushed in minimal essential medium containing antibiotics and fungicide, using the TissueLaser II (Qiagen, Hilden, Germany) at 30 cycles/s of 3 min. DNA extraction was performed on a QIAcube HT (Qiagen) using a QIAamp Cadzor Pathogen Minikit, according to the manufacturer's instructions. DNA was eluted in 100 µl of buffer and stored at –80 °C. Extraction was monitored by systematic spiking of each sample with MS2 bacteriophage and subsequent quantitative PCR (qPCR) to assess PCR-inhibitory factors. Individual ticks or tick pools were tested using a set of qPCR assays for the detection of *Parapoxvirus* [13, 14] (Table 1).

Reactions were performed on a 96-well Applied Biosystems™ QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System using QuantiFast Pathogen. Internal and negative controls were included in each run. Samples with Ct ≥ 32 were considered as negative. Positive samples detected using qPCR were then analyzed by two different PCR protocols to obtain DNA fragments for sequencing (Table 1). The two PCR protocols target a 992 bp B2L gene fragment (open reading frame ORF 011) and a 1,170 bp region within ORF 032. The ORF 011 (B2L) locus is a well-known and commonly used target gene for sequence analysis and comparison of *Parapoxvirus* DNA. Moreover, ORF 032 is highly heterogeneous and provides an excellent basis for the assessment of the relationship between and within *Parapoxvirus* species [15]. Positive samples were purified and sequenced using an Applied Biosystems model 3730XL (Fisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France). The newly generated sequences were aligned using X (ClustalW, Muscle, Mafft) via Mega X [16].

Sequence alignment and phylogenetic analysis

For comparative analysis, additional partial B2L gene and ORF 032 sequences of other *Parapoxvirus* were retrieved from GenBank and screened to remove short and duplicate sequences [17]. The final data set for phylogenetic analyses comprised 15 sequences for B2L, including three PCPV sequences from this study, one Pseudocowpox virus from cattle, one from reindeer, two from humans, four Orf virus, and four Bovine popular stomatitis virus. The final data set for phylogenetic analyses of ORF 032 comprised 24 sequences including seven Pseudocowpox virus sequences from this study, one Pseudocowpox virus from cattle, one from reindeer, three from humans, eight Orf virus, and four Bovine popular stomatitis virus. Phylogenetic analyses were inferred using the maximum likelihood estimation method implemented in Mega X [16]. The bootstrap consensus tree was conducted with 1000 replicates.

Statistical analysis

The pathogens detected in pools were expressed as the percentage and minimum infection rate (maximum likelihood estimation (MLE)) method with 95% confidence intervals (CIs) based on the assumption that each PCR-positive pool contained at least one positive tick [18]. Infection rate of DNA viruses were compared by using Fisher exact test ($p < 0.05$). The analysis was conducted using the R statistical platform (version 3.1.2) [19].

Results

Tick collection and morphological identification

In total, 3555 ticks were collected from 1549 different animals (687 cattle, 538 horses, 106 sheep, and 218 wild boars) (Table 2). Of these, 3490 (98%) were adult ticks and 1529 (43%) were female ticks. Overall, 1566 ticks were collected from 687 cattle from 83 different cattle-breeding farms (Table 2). The most abundant species was *R. bursa* (n = 820; 52% of ticks collected in cattle) followed by *H. marginatum* (n = 441; 28%), *H. scupense* (n = 152; 10%), *B. annulatus* (n = 78; 5%), *I. ricinus* (n = 59; 4%), *R. sanguineus* s.l (n = 6; 0.4%) and *H. punctata* (n = 4; 0.3%) (Figure 1B). In total, 685 ticks were collected from 218 wild boars. The most abundant species was *Dermacantor marginatus* (n = 662; 96.6% of ticks collected in wild boars), followed by *I. ricinus* (n = 13; 2%), *R. bursa* (n = 9; 1.3%), and *H. marginatum* (n = 1; 0.1%). A total of 1285 ticks were collected from 538 horses from 21 farms. The most abundant species was *H. marginatum* (n = 707; 55% of ticks collected in horses), followed by *R. bursa* (n = 578; 45%). Thirty ticks were collected from 106 sheep. The only collected species was *R. bursa* (n = 30; 100%).

Detection of pathogens

Overall *Parapoxvirus* DNA was detected in 6.6% (36/544) of tick pools collected from 23 cows from 20 farms (Table 3 and Figure 1) with an infection rate (MLE) of 2.36% (95% CI: 1.68-3.21%). The *Parapoxvirus* DNA detection was of 8% (12/148) in 2018 and of 6.0% (24/396) in 2019 ($p = 0.57$) with a MLE of 2.45% (95% CI: 1.32-4.07%) and of 2.32% (95% CI: 1.52-3.36%), respectively (Table 2).

The *Parapoxvirus* DNA infection rate detected in *H. marginatum*, *H. scupense* and *R. bursa* was not significantly different between these three tick species ($p = 0.73$) (Table 2). The 2018 infection rate of *R. bursa* (7%; 6/86) (MLE = 1.71% (95% CI: 0.68-3.43%)) was similar to that observed in 2019 (6.5%; 10/154) (MLE = 2.25% (95% CI: 1.13-3.92%)) ($p = 1$). Similar infection rates were also observed for *H. marginatum* in 2018 (10.1%, 6/59) (MLE = 4.53% (95% CI: 1.83-8.97%)) and 2019 (7.6%, 9/124) (MLE = 3.04% (95% CI: 1.47-5.42%)) ($p = 0.57$). *H. scupense* was collected only in 2019 (Table 2). *Parapoxvirus* DNA was not detected in tick pools collected from horses, wild boars, or sheep. *Orthopoxvirus* DNA was not identified in any of the 3555 ticks collected.

Phylogenetic analysis

We successfully sequenced 19.4% (7/36) of the positive tick pools. The seven sequences were obtained from ticks collected from five cows belonging to seven farms (Table 3). Three B2L sequences were obtained from two *H. marginatum* pools and from one *R. bursa* pool. The phylogenetic tree based on B2L gene sequences indicated that the three samples showed 99% and 100% nucleotide and amino acid identity, respectively. The three sequences showed 99% nucleotide identity and 100% amino acid identity with *Parapoxvirus* strain 3/07 (Genbank: KF478804) detected from cattle in Germany, with strain VR634 (Genbank: GQ329670) detected in humans in the USA and strain B074 (Genban: KF478803) detected in humans in Germany. The seven ORF 032 gene sequences were obtained from four *R. bursa* pools and three *H. marginatum* pools. The seven sequences showed 99% to 100% nucleotide and amino

acid identity with each other, 98% and 99.8% nucleotide and amino acid identity, respectively, with strain 3/07 (Genbank: KF478816), and 95% and 99.5% nucleotide and amino acid identity, respectively, with strain VR634 (Genbank: GQ329670). Overall, phylogenetic tree analysis based on amino acid sequences of B2L and ORF 032 genes (Figures 2 and 3) showed that the B2L and the ORF 032 gene of *Parapoxvirus* detected in ticks collected from cattle in Corsica were similar to each other and grouped together with Pseudocowpox virus.

Discussion

We report evidence of the detection of *Parapoxvirus* DNA in three main tick species collected from cattle in Corsica. PPV DNA was detected at similar rates in pools of *H. marginatum*, *H. scupense*, and *R. bursa* ticks, and throughout the entire 2018–2019 period of collection, showing that *Parapoxvirus* may circulate endemically in Corsica. The results of this study showed that overall *Parapoxvirus* DNA was detected in 6.6% of tick pools collected from 23 cows from 20 farms, demonstrating the wide circulation of poxviruses in bovine herds in Corsica. Sequence analyses showed that at least 19% of the *Parapoxvirus* DNA detected in ticks belonged to Pseudocowpox virus. In the phylogenetic reconstruction, all Corsican Pseudocowpox viruses clustered with previously published European sequences of Pseudocowpox viruses detected in cattle and humans. Although *Parapoxvirus* is reportedly present in cattle worldwide [20–22], there is no published record of the disease at the human or animal health level in Corsica. Therefore, this report marks the first identification of *Parapoxvirus* and Pseudocowpox virus in the island. The detection rate of *Parapoxvirus* DNA in 6.6% of tick pools collected in this study was lower than the detection rate (14% *Parapoxvirus* DNA) reported in ticks collected from cattle in Burkina Faso [5], although the percentage of positive Pseudocowpox virus was similar (8.2%). No detection of *Parapoxvirus* DNA in ticks collected from the other animal species (horses, wild boar, and sheep) and identification of *Parapoxvirus* in different tick species suggesting that ticks became infected through their blood meal from infected cattle and probably do not contribute to virus circulation. No *Orthopoxvirus* DNA was found in ticks collected during this study in Corsica. This could be explained by the capacity for reinfection of the *Parapoxvirus* group and the subsequent permanent circulation of that virus in the same herd, thereby inhibiting infection with the *Orthopoxvirus* group [23]. However, coinfections of Pseudocowpox virus and *Orthopoxvirus* have been described in samples from lesions in cows and humans during bovine vesicular disease outbreaks in Brazil in 2015 [24]. These two viruses have also been detected in milk from affected dairy cows [25].

Finding the DNA of *Parapoxvirus* in feeding ticks is only a marker of circulation of this genus in the cattle population; this detection cannot highlight the role of ticks in the transmission or circulation of these viruses. Implication of ticks in epidemiological cycle of *Parapoxvirus* should be tested in laboratory through vector competence studies to have a comprehensive idea of their real implication. Moreover, we have no data on the impact on animal health of *Parapoxvirus* positive tick hosts. Working with pooled ticks has several advantages but inevitably poses problems with prevalence estimates. Seven of the 36 positive samples were able to be sequenced and analysis showed the presence of Pseudocowpox virus. Hence, it is possible that other viruses of the genus were present.

In conclusion, this study showed that *Parapoxvirus* circulates in cattle in Corsica. Therefore, a broad surveillance is crucial to provide data that elucidate the origin and dissemination

dynamics of *Parapoxvirus* to investigate the prevalence of *Parapoxvirus* infections in the cattle population and identify infection risks for other animals and humans.

Acknowledgements

We are grateful to the staff of the slaughterhouse of Ponte-Leccia for their help in collecting ticks. This work was supported by Corsican Territorial Collectivity and the University of Corsica.

Conflict of Interest Statement

The authors of the work have no conflict of interests to disclose.

References

1. McFadden, G., *Poxvirus tropism*. Nat Rev Microbiol, 2005. **3**(3): p. 201-13.
2. Buttner, M. and H.J. Rziha, *Parapoxviruses: from the lesion to the viral genome*. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health, 2002. **49**(1): p. 7-16.
3. Singh, R.K., et al., *Buffalopox: an emerging and re-emerging zoonosis*. Anim Health Res Rev, 2007. **8**(1): p. 105-14.
4. Inoshima, Y., A. Morooka, and H. Sentsui, *Detection and diagnosis of parapoxvirus by the polymerase chain reaction*. J Virol Methods, 2000. **84**(2): p. 201-8.
5. Ouedraogo, A., et al., *Detection of Two Species of the Genus Parapoxvirus (Bovine Papular Stomatitis Virus and Pseudocowpox Virus) in Ticks Infesting Cattle in Burkina Faso*. Microorganisms, 2020. **8**(5).
6. Grech-Angelini, S., et al., *Tick-borne pathogens in ticks (Acari: Ixodidae) collected from various domestic and wild hosts in Corsica (France), a Mediterranean island environment*. Transbound Emerg Dis, 2020. **67**(2): p. 745-757.
7. Cicculi, V., et al., *Molecular investigation of tick-borne pathogens in ixodid ticks infesting domestic animals (cattle and sheep) and small rodents (black rats) of Corsica, France*. Ticks Tick Borne Dis, 2019. **10**(3): p. 606-613.
8. Cicculi, V., et al., *First molecular detection of Rickettsia africae in a tropical bont tick, Amblyomma variegatum, collected in Corsica, France*. Exp Appl Acarol, 2019. **77**(2): p. 207-214.
9. Cicculi, V., et al., *Molecular screening of Anaplasmataceae in ticks collected from cattle in Corsica, France*. Exp Appl Acarol, 2020. **81**(4): p. 561-574.
10. Cicculi, V., et al., *First detection of Ehrlichia minasensis in Hyalomma marginatum ticks collected from cattle in Corsica, France*. Vet Med Sci, 2019. **5**(2): p. 243-248.
11. Cicculi, V., et al., *Molecular Detection of Spotted-Fever Group Rickettsiae in Ticks Collected from Domestic and Wild Animals in Corsica, France*. Pathogens, 2019. **8**(3).
12. A. Estrada-Pena, A.B., J.L. Camicas, A.R. Walker, *Ticks of Veterinary and Medical Importance: The Mediterranean Basin. A Guide of Identification of Species*. Vol. University of Zaragoza Press, Zaragoza): University of Zaragoza Press, Zaragoza, 2014.
13. Nitsche, A., et al., *Real-time PCR detection of parapoxvirus DNA*. Clin Chem, 2006. **52**(2): p. 316-9.
14. 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, 2004. **42**(2): p. 601-9.
15. Friederichs, S., et al., *Comparative and retrospective molecular analysis of Parapoxvirus (PPV) isolates*. Virus Res, 2014. **181**: p. 11-21.
16. Kumar, S., et al., *MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms*. Mol Biol Evol, 2018. **35**(6): p. 1547-1549.

17. Altschul, S.F., et al., *Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs*. Nucleic Acids Res, 1997. **25**(17): p. 3389-402.
18. Sosa-Gutierrez, C.G., et al., *Tick-borne rickettsial pathogens in questing ticks, removed from humans and animals in Mexico*. J Vet Sci, 2016. **17**(3): p. 353-60.
19. Team, R.D.C., *R: a language and environment for statistical computing* 2015.
20. Cargnelutti, J.F., et al., *An outbreak of pseudocowpox in fattening calves in southern Brazil*. J Vet Diagn Invest, 2012. **24**(2): p. 437-41.
21. Ohtani, A., et al., *First isolation and genetic characterization of pseudocowpox virus from cattle in Japan*. Virol J, 2017. **14**(1): p. 172.
22. Ziba, M.W., et al., *First detection and molecular characterisation of pseudocowpox virus in a cattle herd in Zambia*. Virol J, 2020. **17**(1): p. 152.
23. Andrew A. Mercer, A.S., and Olaf Weber, *Genus Parapoxvirus*. Nature Public Health Emergency Collection, 2007.
24. Abrahao, J.S., et al., *Human Vaccinia virus and Pseudocowpox virus co-infection: clinical description and phylogenetic characterization*. J Clin Virol, 2010. **48**(1): p. 69-72.
25. de Oliveira, T.M.L., et al., *Vaccinia virus detection in dairy products made with milk from experimentally infected cows*. Transbound Emerg Dis, 2018. **65**(1): p. e40-e47.

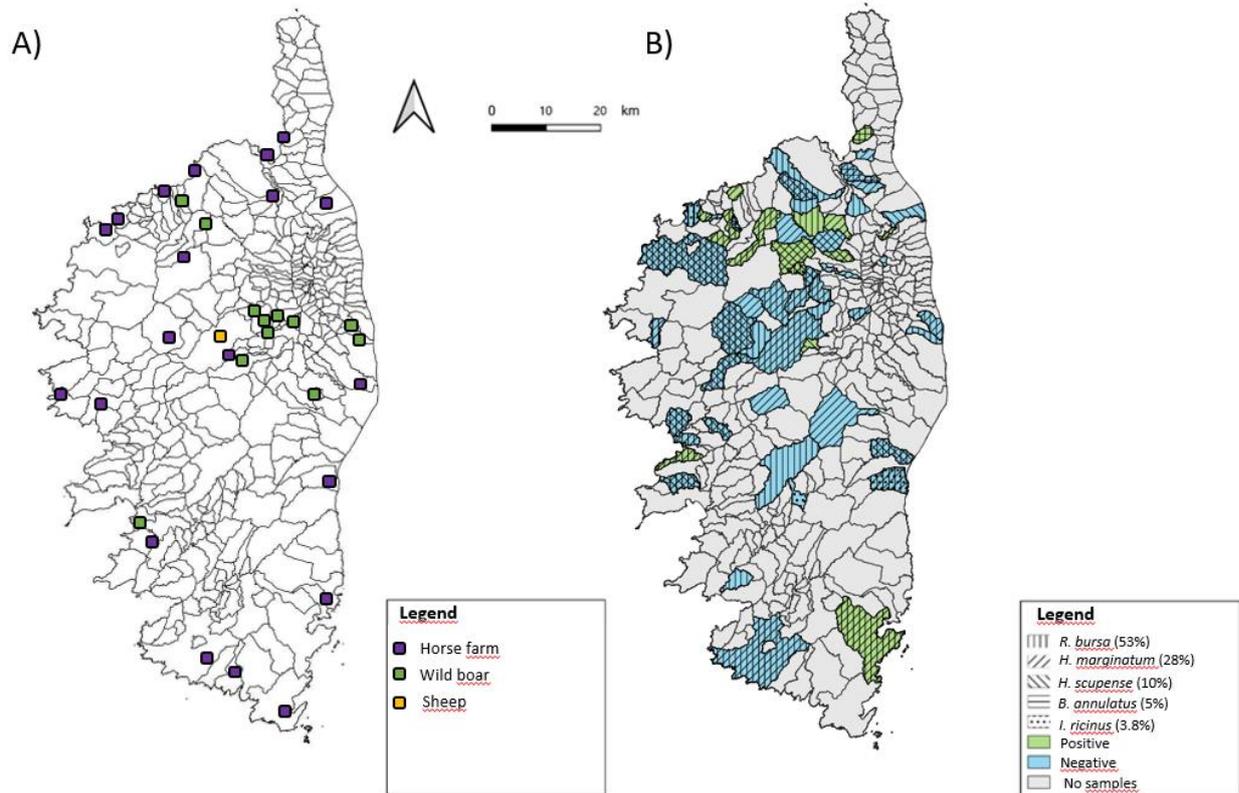


Figure 1: A) Map of Corsica, France, indicating the tick collection sites and the animal species and farm
 B) Tick species and positive pools of ticks collected from cattle in the study area, Corsica. *R. sanguineus* (n=6) and *H. punctata* (n=4) were not included.

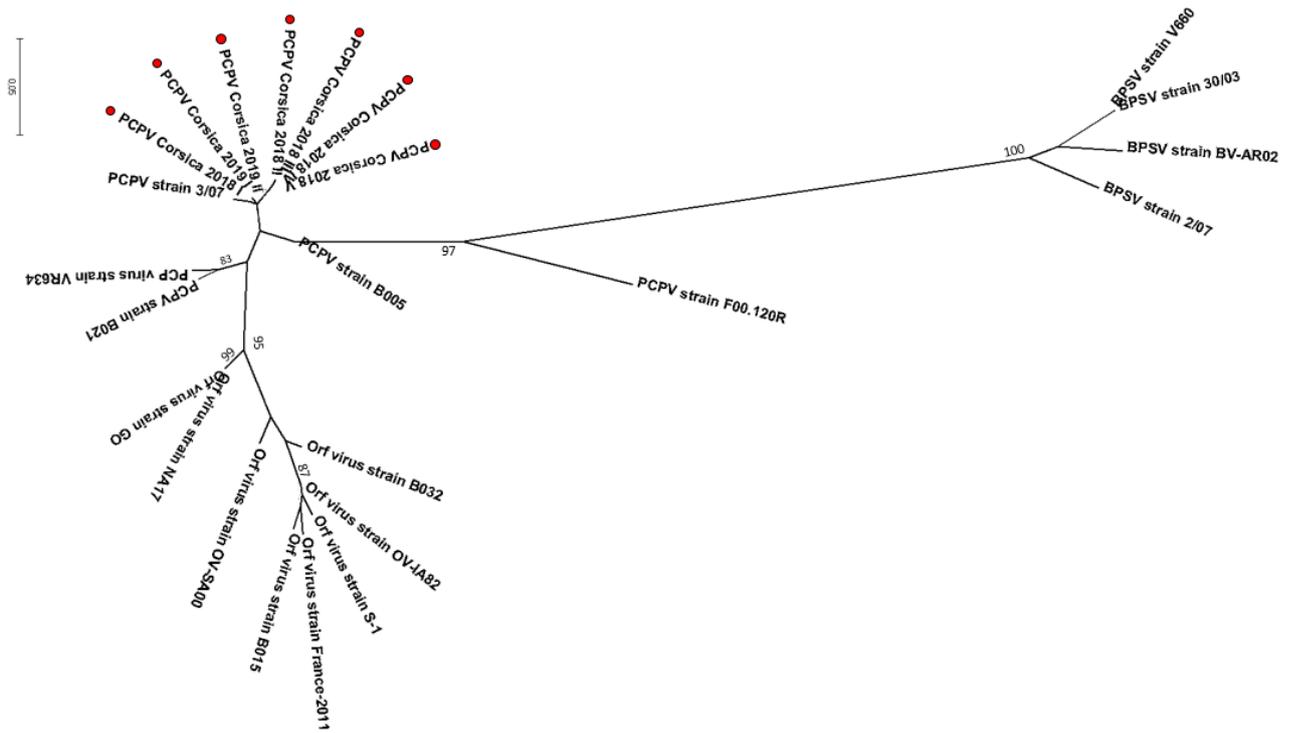


Fig 2: Phylogenetic radiation tree of Parapoxvirus-group based deduced of 292 amino acid sequences of ORF032 gene of Parapoxvirus. The analysis was performed using a maximum-likelihood method with JTT matrix-based model with 1000 replicates (only values higher than 70% are shown). This analysis involved 24 amino acid sequences.

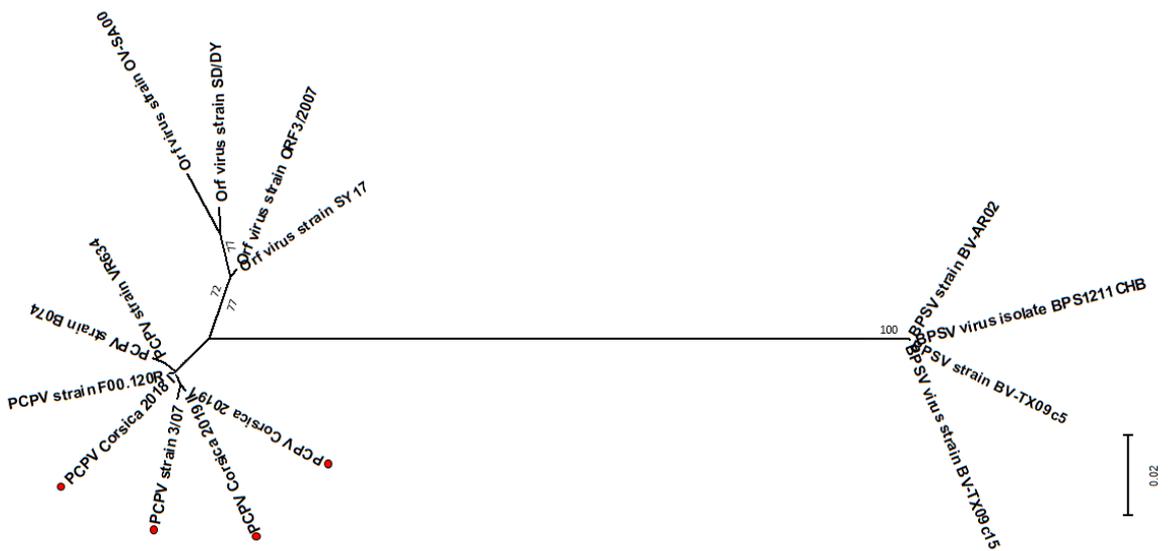


Fig 3: Phylogenetic radiation tree of Parapoxvirus-group based deduced of 297 amino acid sequences of B2L gene of Parapoxvirus. The analysis was performed using a maximum-likelihood method with JTT matrix-based model with 1000 replicates (only values higher than 70% are shown). This analysis involved 15 amino acid sequences.

Tables

Table 1. Primers and probes used for detection and amplification of *Parapoxvirus* and *Orthopoxvirus*

Genus or species	Primer and probe	5' -->3' Sequence	Gene	Reference
<i>Pan-Parapox virus</i>	Forward	TCGATGCGGTGCAGCAC	B2L	[13]
	Reverse	GCGGCGTATTCTTCTCGGAC		
	Probe	TGCGGTAGAAGCC		
<i>pan-Orthopox virus</i>	Forward	GAA CAT TTT TGG CAG AGA GAG CC	HA (J7R)	[14]
	Reverse	CAA CTC TTA GCC GAA GCG TAT GAG		
	Probe	CAG GCT ACC AGT TCA A		
<i>Pan-Parapox virus</i>	Forward	GTG CGC GAA GGT GTC GTC CA	ORF 011 (B2L)	[15]
	Reverse	ATGTGGCCGTTCTCCTCCATC		
<i>Pan-Parapox virus</i>	Forward	CGAGCTTTAAATAGTGAAACACAGC	ORF 032	[15]
	Reverse	GCACCATCATCCTGTA CTTCCTC		

Table 2: Distribution of tick species by host and pools positive for *Parapoxvirus* DNA 2018/2019

Number of Pools with <i>n</i> Ticks										Number of positive pools detected by Real- Time Pan-Parapoxvirus PCR				
Cattle 2019 (n=456)														
Number of Individual Ticks or Ticks per Pool (<i>n</i>)	<i>R. bursa</i>	<i>H. marginatum</i>	<i>H. scupense</i>	<i>H. punctata</i>	<i>R. sanguineus</i>	<i>B. annulatus</i>	<i>I. ricinus</i>	<i>D. marginatus</i>	Total	Pool	<i>R. bursa</i>	<i>H. marginatum</i>	<i>H. scupense</i>	Total
1	60	55	30	4	3	12	6	0	170	1	1	2	2	5
2	25	25	6	0	0	2	5	0	63	2	1	3	1	5
3	14	13	6	0	1	4	3	0	41	3	2	1	0	3
4	17	10	4	0	0	0	1	0	32	4	2	1	0	3
5	12	5	2	0	0	4	0	0	23	5	0	0	0	0
6	30	16	11	0	0	5	5	0	67	6	4	2	2	8
Total	158	124	59	4	4	27	20	0	396	Total	10	9	5	24
Number of ticks	460	305	152	4	6	78	59	0	1064	MLE (95% CI)	2.25 (1.13-3.92)	3.04 (1.47-5.42)	3.42 (1.24-7.21)	2.32 (1.52-3.36)
Cattle 2018 (n=241)														
Number of Individual Ticks or Ticks per Pool (<i>n</i>)	<i>R. bursa</i>	<i>H. marginatum</i>	<i>H. scupense</i>	<i>H. punctata</i>	<i>R. sanguineus</i>	<i>B. annulatus</i>	<i>I. ricinus</i>	<i>D. marginatus</i>	Total	Pool	<i>R. bursa</i>	<i>H. marginatum</i>	<i>H. scupense</i>	Total
1	12	25	0	0	0	0	1	0	38	1	0	2	0	2
2	7	9	0	0	0	0	1	0	17	2	2	1	0	3
3	8	14	0	0	0	0	1	0	23	3	2	3	0	5
4	15	5	0	0	0	0	0	0	20	4	0	0	0	0
5	14	5	0	0	0	0	0	0	19	5	0	0	0	0
6	30	1	0	0	0	0	0	0	31	6	2	0	0	2

Total	86	59	0	0	0	0	3	0	148	Total	6	6	0	12
Number of ticks	360	136	0	0	0	0	6	0	502	MLE (95% CI)	1.71 (0.68-3.43)	4.53 (1.83-8.97)	/	2.45 (1.32-4.07)
Cattle 2018/2019 (n=687)														
Number of Individual Ticks or Ticks per Pool (n)	<i>R. bursa</i>	<i>H. marginatum</i>	<i>H. scupense</i>	<i>H. punctata</i>	<i>R. sanguineus</i>	<i>B. annulatus</i>	<i>I. ricinus</i>	<i>D. marginatus</i>	Total	Pool	<i>R. bursa</i>	<i>H. marginatum</i>	<i>H. scupense</i>	Total
1	72	80	30	4	3	12	7	0	208	1	1	4	2	7
2	32	34	6	0	0	2	6	0	80	2	3	4	1	8
3	22	27	6	0	1	4	4	0	64	3	4	4	0	8
4	32	15	4	0	0	0	1	0	52	4	2	1	0	3
5	26	10	2	0	0	4	0	0	42	5	0	0	0	0
6	60	17	11	0	0	5	5	0	98	6	6	2	2	10
Total	244	183	59	4	4	27	23	0	544	Total	16	15	5	36
Number of ticks	820	441	152	4	6	78	65	0	1566	MLE (95% CI)	2.01 (1.18-3.14)	3.5 (2.03-5.53)	3.42 (1.24-7.21)	2.36 (1.68-3.21)
Horses 2019 (n=538)														
Number of Individual Ticks or Ticks per Pool (n)	<i>R. bursa</i>	<i>H. marginatum</i>	<i>H. scupense</i>	<i>H. punctata</i>	<i>R. sanguineus</i>	<i>B. annulatus</i>	<i>I. ricinus</i>	<i>D. marginatus</i>	Total	Pool	<i>R. bursa</i>	<i>H. marginatum</i>	<i>H. scupense</i>	Total
1	15	29	0	0	0	0	0	0	44	1	0	0	0	0
2	10	12	0	0	0	0	0	0	22	2	0	0	0	0
3	9	12	0	0	0	0	0	0	21	3	0	0	0	0
4	9	14	0	0	0	0	0	0	23	4	0	0	0	0
5	4	12	0	0	0	0	0	0	16	5	0	0	0	0
6	5	16	0	0	0	0	0	0	21	6	0	0	0	0
7	5	11	0	0	0	0	0	0	16	7	0	0	0	0

8	6	12	0	0	0	0	0	0	18	8	0	0	0	0
9	3	7	0	0	0	0	0	0	10	9	0	0	0	0
10	32	17	0	0	0	0	0	0	49	10	0	0	0	0
Total	98	142	0	0	0	0	0	0	240	Total	0	0	0	0
Number of ticks	578	707	0	0	0	0	0	0	1285					

Wild boars 2018/2019 (n=218)

Number of Individual Ticks or Ticks per Pool (n)	<i>R. bursa</i>	<i>H. marginatum</i>	<i>H. scupense</i>	<i>H. punctata</i>	<i>R. sanguineus</i>	<i>B. annulatus</i>	<i>I. ricinus</i>	<i>D. marginatus</i>	Total	Pool	<i>R. bursa</i>	<i>H. marginatum</i>	<i>H. scupense</i>	Total
1	4	1	0	0	0	0	1	33	39	1	0	0	0	0
2	1	0	0	0	0	0	2	25	28	2	0	0	0	0
3	1	0	0	0	0	0	0	22	23	3	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	2	25	27	4	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	19	19	5	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	53	53	6	0	0	0	0
Total	6	1	0	0	0	0	5	177	189	Total	0	0	0	0
Number of ticks	9	1	0	0	0	0	13	662	685					

Sheep 2019 (n=106)

Number of Individual Ticks or Ticks per Pool (n)	<i>R. bursa</i>	<i>H. marginatum</i>	<i>H. scupense</i>	<i>H. punctata</i>	<i>R. sanguineus</i>	<i>B. annulatus</i>	<i>I. ricinus</i>	<i>D. marginatus</i>	Total	Pool	<i>R. bursa</i>	<i>H. marginatum</i>	<i>H. scupense</i>	Total
1	30	0	0	0	0	0	0	0	30	1	0	0	0	0
Total	30	0	0	0	0	0	0	0	30	Total	0	0	0	0
Number of ticks	30	0	0	0	0	0	0	0	30					

Pools ID	Tick Species	Farms	Cattle ID	Number of pools per cattle	Number of cattle per Farm	Province	SAMPLE	B2L acc. No	ORF 032 acc. No			
2019 75	<i>H. marginatum</i>	CAL1	8520	5	1	CALCATOGHJU	/	/	/			
2019 78	<i>H. marginatum</i>											
2019 79	<i>H. marginatum</i>											
2019 91	<i>H. marginatum</i>	LAV1	7093	7	1	LAVATOGHJU	PCPVCorsica2019I	MW911454	MW911458			
2019 265	<i>H. marginatum</i>	OLM1	2923	4	1	OLMI-CAPPELLA	/	/	/			
2019 268	<i>H. marginatum</i>	OLM2	1273	1	1							
2019 259	<i>H. marginatum</i>	OLM3	8821	3	1	OLMU						
2019 74	<i>H. marginatum</i>	NA1	NA4	4	/	Unknown						
2019 96	<i>H. marginatum</i>		NA5	7								
2019 26	<i>H. scupense</i>	CAS1	3186	6	1	CASANOVA						
2019 27	<i>H. scupense</i>											
2019 25	<i>H. scupense</i>	MOL1	4135	1	1	MOLTIFAU						
2019 24	<i>H. scupense</i>	POP1	3256	2	1	PULASCA				/	/	/
2019 22	<i>H. scupense</i>	VAL1	4607	2	1	VALLE DI RUSTINU						
2019 306	<i>R. bursa</i>	LAV2	309	4	2	LAVATOGHJU						
2019 307	<i>R. bursa</i>											
2019 308	<i>R. bursa</i>											
2019 309	<i>R. bursa</i>											
2019 310	<i>R. bursa</i>											
2019 311	<i>R. bursa</i>											
2019 215	<i>R. bursa</i>	NA2	NA9	4								

2019 217	<i>R. bursa</i>					Unknown			
2019 218	<i>R. bursa</i>								
2019 272	<i>R. bursa</i>	FAR1	2018	1	3	FARINGULE	PCPVCorsica2019II	MW911455	MW911459
2018 2	<i>R. bursa</i>	FIL1	50	2	1	FILICETU	PCPVCorsica2018III	/	MW911462
2018 3	<i>H. marginatum</i>		50				PCPVCorsica2018I	MW911453	MW911460
2018 9	<i>R. bursa</i>	POR1	5		1	PORTIVECHJU	PCPVCorsica2018IV	/	MW911456
2018 10	<i>R. bursa</i>	SAN1	6825	5	1	SAN MARTINU DI LOTTA	/		/
2018 12	<i>R. bursa</i>		6825				PCPVCorsica2018V		MW911457
2018 13	<i>H. marginatum</i>		6825				PCPVCorsica2018II		MW911462
2018 14	<i>H. marginatum</i>		6825						
2018 15	<i>H. marginatum</i>	MON1	5687	1	1	MONTICELLU			
2018 101	<i>R. bursa</i>	ZIL1	6924	1	1	ZILIA	/		/
2018 102	<i>H. marginatum</i>	LENT1	8523	1	1	LENTU			
2018 103	<i>R. bursa</i>	PIE1	621	1	1	PIETRALBA			
2018 105	<i>H. marginatum</i>	PIE2	1823	1	2	NESSA			

Table 3: Tick species pools positive for *Parapoxvirus* DNA

Chapitre III :

SERO-NEUTRALISATION

Poxvirus et Immunologie

GENERALITES

Chez l'homme, les premières données et observations sur la réponse de l'hôte à l'infection par les poxvirus proviennent de données cliniques historiques de la variole et de la vaccination. Bien que l'efficacité de la vaccine dans l'éradication de la variole n'est plus à démontrer, il s'agissait tout de même d'un virus vivant et chez certaines personnes immuno-déficientes l'administration de ce vaccin a provoqué des infections généralisées graves. Cela concernait principalement les patients présentant des anomalies de la fonction des lymphocytes T. Les patients souffrant d'agammaglobulinémie congénitale n'ont pas ou peu développé de vaccine généralisée.[7] Cela a conduit à penser dans un premier temps que la fonction des lymphocytes T était essentielle dans la guérison d'une primo-infection par un poxvirus et que le traitement par immunoglobulines administré dans les cas de vaccine généralisée ne servait qu'à contrôler le virus suffisamment longtemps pour que l'immunité cellulaire soit rétablie. Cependant, à la fin des années 2000, plusieurs études en modèles animaux montrent que les anticorps ont un rôle crucial dans la guérison d'une infection par un poxvirus.[147] Il existe de nombreux modèles murins où l'ectromelia virus (orthopoxvirus infectant la souris) a été utilisé. L'immunité contre et la guérison de l'infection par l'*Ectromelia virus* dépendent de diverses facettes des réponses immunitaires innées et adaptatives. Il s'agit notamment des fonctions effectrices des lymphocytes NK, des lymphocytes T CD4 et CD8, des macrophages, de l'oxyde nitrique, des cytokines issues des lymphocytes Th1, des interférons α , β et γ mais également des lymphocytes B.[148–155]

D'un point de vue moléculaire, les mécanismes d'échappement au système immunitaire des poxvirus ont été largement étudiés. En effet, les virus à ADN tels que les *Herpesviridae* et les *Poxviridae* possèdent l'un des inventaires les plus complets de produits génétiques servant à défendre ces virus contre la réponse immunitaire de l'hôte. L'absence de conservation des gènes immunomodulateurs entre les membres de la famille des poxvirus peut refléter des différences dans le tropisme tissulaire et contribue à expliquer les différences phénotypiques observées au cours des manifestations cliniques de

diverses maladies poxvirales. Cependant, il est possible de regrouper les genres des *Chordopoxvirinae* sur la base de la présence ou de l'absence commune de certaines protéines d'interaction avec l'hôte. Par exemple, les genres *Capripoxvirus*, *Leporipoxvirus*, *Suipoxvirus* et *Yatapoxvirus* partagent tous le même ensemble de protéines d'interaction avec l'hôte que l'on ne trouve pas dans d'autres genres des *Chordopoxvirinae*, comme un homologue de OX-2[156], une protéine mitochondriale qui inhibe l'apoptose [157] et un gène responsable de la régulation négative des molécules du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité).[158] En outre, le *Swinepox virus* et le *Yabapox virus* partagent un homologue du CMH de classe I.[159,160] En revanche, les espèces du genre *Orthopoxvirus* ont un ensemble distinct de protéines d'interaction avec l'hôte qui comprend souvent des copies multiples d'homologues du récepteur du TNF, un homologue du récepteur de l'interleukine-1 β et une absence apparente de protéines prédites qui modulent la voie de présentation de l'antigène.[161] Enfin, plusieurs homologues immunomodulateurs n'existent qu'au sein des genres *Orthopoxvirus* et *Leporipoxvirus*, comme les inhibiteurs des récepteurs Toll-like. Le *Fowlpox virus*, espèce représentative du genre *Avipoxvirus*, contient le plus grand génome des *Chordopoxvirinae* encore séquencé. Bien qu'il partage plusieurs gènes immunomodulateurs présents dans d'autres genres de *Chordopoxvirinae*, le *Fowlpox virus* contient un certain nombre de gènes uniques que l'on ne trouve pas dans d'autres genres de poxvirus, tels que des homologues putatifs de Bcl-2, β -NGF et TGF- β . [162] Enfin, le *Molluscum contagiosum* semble être unique par rapport aux autres genres de *Chordopoxvirinae* en ce qui concerne les protéines immunomodulatrices de l'hôte.[163,164]

LES ANTICORPS ANTI-ORTHOPOXVIRUS ET IMMUNITÉ CROISÉE

Quelle immunité reste-t-il de la vaccination antivariolique ?

Concernant la longévité des anticorps et de la réponse immunitaire chez l'homme plusieurs études sur l'immunité résiduelle antivariolique sont parues entre 1970 et 2010. Le début des années 2000 est particulièrement riche sur ce sujet en raison de la menace bioterroriste. Il semblerait que le taux et la réponse anticorps anti-vaccin restent stables pendant plusieurs décennies. Pour la réponse lymphocytaire T les résultats diffèrent selon les études, certaines montrent que cette réponse tend à s'affaiblir avec le temps (8 à 15ans) d'autres quelle peut persister plusieurs décennies également.[165–171] Des études épidémiologiques semblables à la nôtre, menées aux Etats Unis d'Amérique ont montré que les personnes vaccinées gardaient des anticorps anti-vaccin plusieurs décennies après vaccination sans diminution du titre (ELISA et séro-neutralisation) et que ce titre ne dépendait ni du mode d'infection (vaccination ou vraie variole) ni du nombre de ré-injections vaccinales.[172] Plusieurs études ont montré que l'exposition à la vaccin génère des lymphocytes B « mémoire à très long terme » ce

qui explique la longévité de la réponse humorale. Ces lymphocytes B mémoires spécifiques de la vaccine à « longue vie » [167,173] auraient un tropisme splénique. En effet Mamani-Matsuda *et al.*[174] ont montré qu'ils représentent 0.24% des cellules IgG+ dans la rate contre seulement 0.07% des cellules IgG+ circulantes.

Immunité croisée entre les virus du genre *Orthopoxvirus*

Parmi les *Orthopoxvirus* l'immunité croisée entre vaccine et variole a été prouvée par l'efficacité de la vaccine pour éradiquer la variole. En revanche l'immunité croisée entre les autres orthopoxvirus ne bénéficie pas d'une preuve historique aussi forte.

Pour la vaccine et le cowpox les particules virales infectieuses existent sous deux formes principales : le virus mature intracellulaire et le virus enveloppé extracellulaire. Ce dernier est composé du virus mature intracellulaire enveloppé dans une double membrane acquise à partir de l'appareil de Golgi. Les deux formes du virus peuvent être neutralisées par des anticorps, cependant, les anticorps formés contre le virus enveloppé extracellulaire ne peuvent pas neutraliser le virus mature intracellulaire et inversement. La libération des particules enveloppées est peu efficace, 1 % seulement du virus est excrété dans l'environnement extracellulaire pour le cowpox et 0.3% pour les souches de vaccine Lister et WR. Les antisérums de la vaccine neutralisent efficacement le virus extracellulaire du cowpox, ce qui indique une relation antigénique étroite dans les antigènes d'enveloppe.[175] L'efficacité immunologique de la vaccine a été testée contre une infection cutanée et intradermique par le cowpox chez le lapin : une bonne immunité est obtenue après deux injections en intramusculaires. Les lapins immunisés ont montré des "réactions de revaccination" après une infection avec le cowpox virus ce qui indique une immunité cellulaire.[176]

Le monkeypox virus a également été étudié en modèle animal (macaques) où il a été montré que les lymphocytes B spécifiques de la vaccine ou le transfert passif d'anticorps humains neutralisants la vaccine sont nécessaires à la protection de l'animal contre une infection grave.[177] Pour rappel nous savons également que le monkeypox dans les pays endémiques touche principalement les sujets jeunes (donc non vaccinés).[119]

Plus récemment, Gilchuk *et al.*[178] ont généré un large panel d'anticorps monoclonaux humains spécifiques des orthopoxvirus à partir de sous-sujets immunisés afin d'étudier la base moléculaire des réponses anticorps largement neutralisantes pour divers orthopoxvirus. Une analyse détaillée a révélé les principales spécificités des anticorps neutralisants qui ont une réactivité croisée pour la vaccine, le cowpox, le monkeypox et la variole et qui sont des facteurs déterminants de la protection dans les challenges murins. Une protection optimale nécessiterait un mélange d'anticorps monoclonaux qui ciblent plusieurs protéines membranaires.[178]

Une étude sérologique de 2011 (IgG et IgM anti-*Orthopoxvirus*) menée en au Sierra Leone[179] introduit la difficulté des études épidémiologiques sérologiques anti-*Orthopoxvirus* en raison de l'immunité croisée. En effet, d'une part il existe des différences de séoprévalence importante entre les personnes nées avant l'éradication de la variole (donc vaccinées) et les personnes nées après l'arrêt du vaccin (35% contre 15% de personnes présentant des anticorps respectivement). Ce travail montre l'impact important de l'âge dans les populations étudiées mais révèle également la possibilité de mettre en évidence une circulation d'autres *Orthopoxvirus* puisque 15% des personnes n'ayant jamais été vaccinés présentent des anticorps.

LES DIFFERENTS TYPES DE VACCINS ANTI-VARIOLIQUES

Les vaccins de première génération

Les vaccins dits « Jenneriens » sont produits en infectant différents animaux (ganglions de veaux, peaux de lapins, moutons, vaches, etc...). Il s'agit de la technique originale qui perdurera jusqu'à l'éradication de la variole en 1980. Avant les années 1960 on estime qu'il existait 67 producteurs de vaccins différents dans 45 pays. Puis dans une volonté de standardisation, l'OMS distinguera 4 souches utilisables pour la vaccination : la souche Lister (ou Elstree) en Europe, la souche New York City Board of Health (NYCBOH) utilisée en Amérique (Nord et Sud) et en Afrique de l'Ouest, la souche EM-63 (dérivée de la souche NYCBOH) qui a été utilisée en Russie et en Inde et la souche Temple of Heaven utilisée en Chine. De plus l'OMS imposera une norme sanitaire de moins de 500 germes bactériens/mL pour ces vaccins. Cependant bien qu'efficaces les vaccins de premières génération sont responsables d'importants effets secondaires tels que : myopéricardites, encéphalite et encéphalopathie post-vaccinale (incidence de 5 à 200 par million de personnes vaccinées) ; *eczema vaccinatum* (favorisé par un eczéma pré-existant) ; vaccine progressive (*vaccinia necrosum*), complication grave survenant notamment chez les personnes immunodéprimées notamment par le VIH. Cela a donc conduit au développement de vaccins respectant les normes sanitaires modernes et d'utilisation moins risquée.

Age	Inoculation accidentelle	Vaccine généralisée	Eczéma vaccinal	Vaccine progressive	Encéphalite vaccinale
< 1 an	507	394	14	0	42
1 – 4 ans	577	233	44	0.4	10
5 – 19 ans	371	140	35	2	9
> 20 ans	606	212	30	7	3.5

Table 4 : Effets indésirables de la primo-vaccination antivariolique en nb de cas/million de vaccinations d'après « Lévy-Bruhl D, Guérin N. Utilisation du virus de la variole comme arme biologique: place de la vaccination en France. *Eurosurveillance*. 2001 Nov 1;6(11):171-8 »

Les vaccins de deuxième génération

Ils correspondent à une atténuation des deux souches principales (Lister et NYCBOH) sur lignées cellulaires Vero (lignée de cellules de rein de singe vert) et MRC-5 (fibroblastes embryonnaire de poulet). Actuellement seuls le ACAM 2000 (souche NYCBOH atténuée sur Vero) est homologué par l'OMS.[180] Son utilisation n'entraîne pas de complications rare et grave telle que la vaccine disséminée cependant l'incidence des myopéricardites reste similaire à celle de son homologue de première génération (Dryvax).[181,182]

Les vaccins de troisième génération

Il s'agit de souches atténuées par passage sur un hôte alternatif. Actuellement l'OMS reconnaît Imvanex/Imvamune® (Bavarian Nordic) issu de la souche de vaccine Ankara atténuée par plus de 570 passages continus sur des fibroblastes embryonnaires primaires de poulet.[183] En raison de sa forte atténuation, cette souche n'est plus capable de se répliquer dans les lignées cellulaires humaines. Ce vaccin est indiqué pour la vaccination antivariolique active des adultes (homologué en Europe et au Canada). Les effets indésirables sont largement atténués (incluant les myopéricardites) avec ce vaccin (données issues de plus de 100 000 administrations y compris à des personnes séropositives pour le VIH et des patients présentant une dermatite atopique).

HISTORIQUE DE LA VACCINATION EN FRANCE

Seuls les vaccins de première génération ont été utilisés dans la population générale jusqu'à l'éradication de la variole. En France la vaccination a été rendue obligatoire pour tous les nourrissons en 1902 et ce jusqu'en 1978 pour la primovaccination et 1984 pour les rappels. A partir de 1961 il est clair que seuls deux vaccins ont été utilisés en France : le vaccin Pourquier (par scarification) et le vaccin Sanofi (par aiguille bifurquée), tous deux issus de la souche Lister et présentant une efficacité similaire. Avant 1960 il est un peu plus difficile d'établir avec certitude quels vaccins ont été utilisés mais il est très probable que la souche Lister reste la principale utilisée en France à cette période. Au début du XXème siècle les résultats des campagnes de vaccination sont spectaculaires si bien que dès 1930 en France la variole semble déjà être une maladie « lointaine » ou « exotique ». Cette notion de sécurité associée aux risques de la vaccination non négligeable ainsi qu'à la cicatrice disgracieuse qu'elle laissait ont probablement conduit à un relâchement de la vaccination dans la population générale à cette époque. En effet entre 1947 à 1955 la France subit ses trois dernières épidémies de variole. Il s'agit de 3 épidémies importées par des marins : à Calais et Lille, à Marseille et en Bretagne (Vannes puis extension au Morbihan) en provenance du Maghreb, d'Indochine et du Cambodge. Ces trois épidémies

totaliseront 305 cas et 29 morts. Cette rapide dissémination de la variole à la suite de réintroductions ponctuelles montre que la couverture vaccinale à cette époque n'était pas optimale.

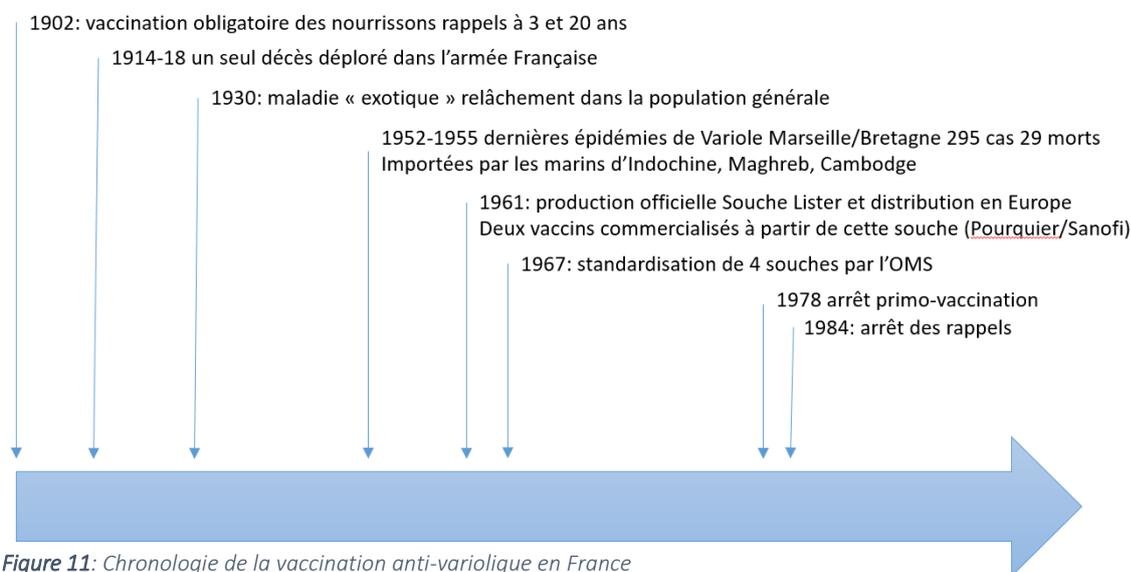


Figure 11: Chronologie de la vaccination anti-variolique en France

En 2001, santé publique France fait un état des lieux de la couverture vaccinale antivariolique supposée en France (table 5) et élabore plusieurs scénarii de réponse à une menace bioterroriste.[184] Officiellement la primo-vaccination a été arrêté en 1978 et le rappel en 1984. Théoriquement toutes les personnes nées avant 1971 ont reçu la primo-vaccination et la revaccination à 11 ans. Les personnes nées entre 1972 et 1978 ont théoriquement tous reçu la primo-vaccination mais lorsqu'ils ont été en âge du rappel (11 ans) la variole ayant été déjà déclarée éradiquée, malgré l'arrêt officiel des rappels en 1984 il est peu probable qu'ils aient reçu la revaccination. Les personnes nées après 1979 n'ont normalement jamais reçu de dose de vaccin. Concernant la couverture vaccinale estimée présentée en table 5 elle est approximative et découle de l'interrogation de personnes en 1981. On suppose que la vaccination de la population civile s'est petit à petit étiolée devant l'absence de cas depuis 1955 et les risques d'effets secondaires importants.

Année de naissance	% de la population	Couverture vaccinale théorique		Couverture vaccinale réelle estimée
		Primo-vaccination	Revaccination	
1979-2001	29	0%	0%	0%
1972-1978	10	100%	0%	50%
1966-1971	7	100%	100%	65%
<1966	54	100%	100%	90%

Table 5: Estimation du statut vaccinal de la population française vis-à-vis de la variole en 2001 (rapport Santé Publique France). Le calcul a été effectué à partir des données de population (recensement INSEE) et des données de vaccination anti-variolique de l'INSERM (Bulletin T.21, 1966 N°4, pp. 659-662)

Immunité croisée inter-genre

Durant ce travail de thèse, un des objectifs initiaux était d'explorer l'immunité croisée des différents genres de poxvirus. Nous avons donc commandé différentes souches issues de différentes espèces grâce à la collection EVAg. La culture de ces différentes souches s'est révélée très inégale et n'a pas été un franc succès pour toutes les espèces.

Virus	Provenance	Hôte	Type de Cellules
Vaccinia virus Western Reserve	UVE	Humain	HeLa, Vero
Cowpox virus UVE/CPXV/2009/FR/LP	UVE	Humain	Vero
Cowpox virus HUMPAD07/1	RKI	Humain	Hep2, Vero
Cowpox virus BEABER04/1	RKI	Castor	Hep2, Vero
Cowpox virus CheHurley	RKI	Guépard	Vero
Orf VIR/0080 and VIR/0081	APHA	Ovin	OA3TS, MDBK
Fowlpox virus isolate 92	APHA	Poulet	Œufs embryonnés, SL29
Myxoma virus « Hasi »	FLI	Lapin	RK13
Swinepox virus DK2/13	FLI	Porc	PK15
Lumpy skin disease virus Egypt 2006	PI	Bovin	OA3TS, MDBK

Table 6: liste des souches de poxvirus mis en culture dans le cadres de ce travail. Les deux souches en couleur correspondent aux souches utilisées pour l'étude de séro-neutralisation. UVE : Unité des virus émergents (France), RKI : Robert Koch Institute (Allemagne), APHA : Animal and Plant Health Agency (Royaume-Uni). FLI : Friedrich Loeffler Institute (Allemagne), PI : Pirbright Institute (Royaume-Uni).

Détail des lignées Cellulaires fournies principalement par l'ATCC (American Type Culture Collection):

Vero : Singe vert : cellules épithéliales de rein (fournisseur ATCC)

HeLa et Hep2 : Humain : cellules issues d'une métastase d'un carcinome du col de l'utérus (fournisseur ATCC)

OA3TS : Agneau : cellules de testicule (fournisseur ATCC)

MDBK : Bœuf : cellules rénales (fournisseur ATCC)

SL29 : Poulet : cellules embryonnaires (fournisseur ATCC)

RK13 : Lapin : cellules rénales (fournisseur FLI)

PK15 : Sanglier : cellules rénales (fournisseur FLI)

Pour tous les virus nous avons appliqué le même protocole : infection à 0.5 MOI en plaque de culture 6 puits. Optimisation de l'infection en faible volume durant une demi-journée à 37°C puis ajout du milieu de culture. La récolte du surnageant et du tapis cellulaire (séparément) a eu lieu tous les jours durant 6 jours. Le surnageant (3mL) a été récolté par aspiration puis centrifugé à 3 000 tours/minute avant d'être aliquoté avec une quantité d'HEPES (acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique) adaptée puis congelé. Un lavage léger des puits a été effectué avec de l'HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution) puis le tapis cellulaire a été en récolté en en « grattant » le fond du puit avec un râteau puis suspendu dans 3mL d'HBSS puis centrifugé à 5 000 tours/min afin de lyser les cellules pour récupérer le virus intra-cellulaire et culotter les débris cellulaires. Enfin, comme pour le surnageant, des aliquots ont été congelé avec HEPES. L'évolution des cultures du *Fowlpox virus* du *Lumpy skin disease virus* et du *Myxoma virus* ont été suivies par qPCR et RT q-PCR en utilisant le système pan-pox avec la gamme de gène synthétique correspondante à l'espèce étudiée comme décrit au chapitre I. Pour le *Cowpox virus*, le *Vaccinia virus* et l'*Orf virus* nous avons utilisé des systèmes pan-genres. Nous avons également suivi l'évolution du titre infectieux par TCID50[185]. Pour tous les graphiques de suivi de culture présentés dans ce chapitre on représentera :

- les TCID50 en Log₁₀ TCDI50/mL (courbes jaunes)
- la quantité d'ADN en Log₁₀ copies/mL (courbes rouges)
- la quantité d'ARN et d'ADN totale en Log₁₀ copies/mL (courbes bleues)

CULTURE VIRALES HORS ORTHO ET PARA-POXVIRUS

Trois poxvirus n'appartenant pas aux genres des *Ortho-* ou *Parapoxvirus* ont fait l'objet d'une tentative de culture :

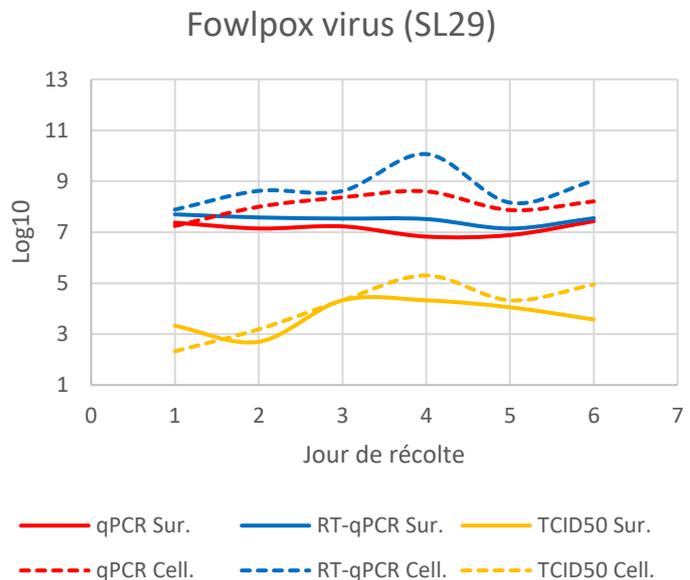
- un Fowlpox virus (genre *Avipovirus*),
- un Lumpy skin disease virus (LDSV, genre *Capripoxvirus*)
- un Myxoma virus (genre *Leporipoxvirus*)

Le Swinepox virus (genre *Suipoxvirus*) n'a quant à lui toujours pas été cultivé pour des raisons logistiques.

Fowlpox virus

Nous avons cultivé le Fowlpox virus en utilisant des cellules embryonnaires de poulet : SL29. Conformément aux recommandations du fournisseur (ATCC) nous avons cultivé ces cellules en utilisant le milieu Dulbecco's Modified Eagle avec 5% de tryptose phosphate, 1% de Pénicilline-Streptomycine, 1% de Glutamine et 5% de serum de veau fœtal. Incubation classique à 37°C avec 5% de CO₂.

On observe une très faible augmentation des TCDI50 (sachant que les ECP étant difficilement visibles) et une stagnation de la quantité d'ADN intra et extra-cellulaire. Cela n'étant pas en faveur d'une croissance virale il nous paraît difficile de conclure à un succès de culture du poxvirus aviaire.

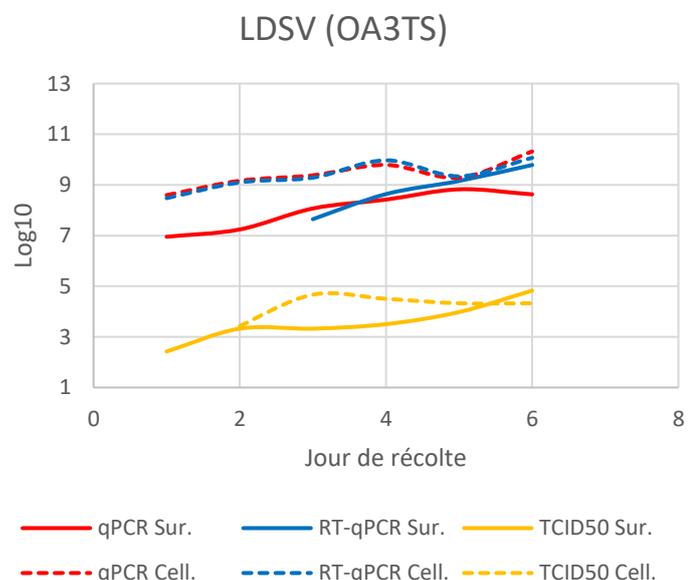


Lumpy skin disease virus (LSDV)

Nous avons cultivé le LSDV sur deux lignées cellulaires : OA3TS et MDBK. De meilleurs résultats ont été obtenus avec la première lignée. Les cellules OA3TS se cultivent avec le milieu Dulbecco's Modified Eagle avec 1% de Pénicilline-Streptomycine, 1% de Glutamine et 10% de serum de veau fœtal.

Les cellules MDBK quant à elles se cultivent avec le milieu Eagle's Minimum Essential avec 1% de Pénicilline-Streptomycine, 1% de Glutamine et 10% de serum de veau fœtal. L'incubation est classique pour les deux lignées : 37°C avec 5% de CO₂.

On observe une augmentation modérée et parallèle d'ADN intra et extra-cellulaires ainsi que des TCID50.



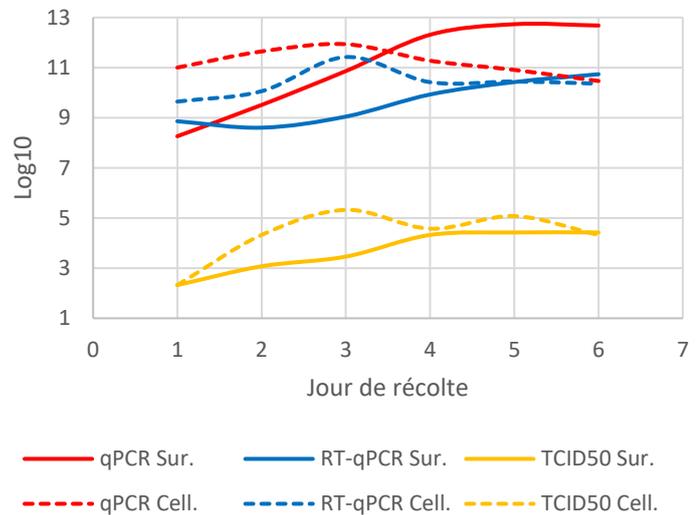
Cependant le titre infectieux est resté très bas.

Myxoma virus

Le Myxoma virus a été cultivé sur les cellules RK13 (milieu Eagle's Minimum Essential avec 1% de Pénicilline-Streptomycine, 1% de Glutamine et 10% de serum de veau foetal. Incubation classique à 37°C avec 5% de CO₂).

Une augmentation de la quantité d'ADN de 4 Log₁₀ dans le surnageant de culture associé à une diminution de la quantité intra-cellulaire ainsi qu'à une augmentation modérée des TCID50 sont en faveur d'une croissance virale.

Myxoma virus (RK13)

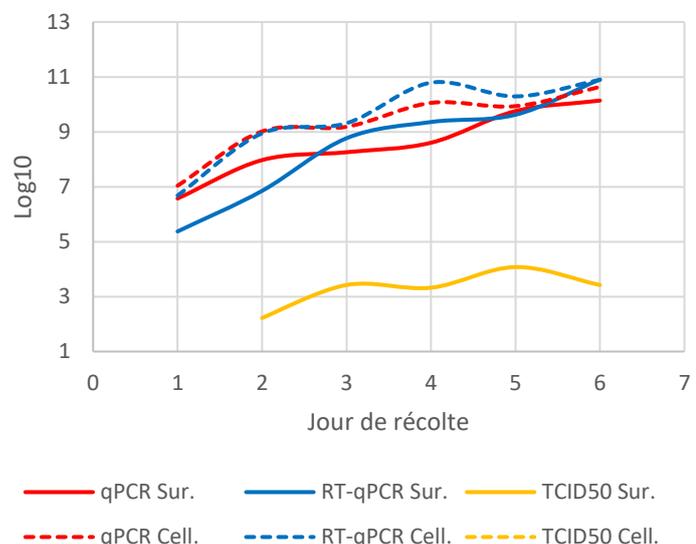


CULTURE VIRALE DE L'ORF (PARAPOXVIRUS) ET ESSAIS DE SERO-NEUTRALISATION

Culture virale

Deux souches d'Orf virus ont été cultivées sur deux lignées cellulaires : OA3TS et MDBK. Contrairement aux trois premiers virus, nous avons utilisé un système de qPCR « pan-Parapoxvirus »[186]. De meilleurs résultats ont été obtenus sur la première lignée cellulaire et il n'y avait pas de différence notable entre les deux souches. Les cellules OA3TS se cultivent avec le milieu Dulbecco's Modified Eagle avec 1% de Pénicilline-Streptomycine, 1% de Glutamine et 10% de serum de veau

Orf (OA3TS)



foetal. Les cellules MDBK quant à elles se cultivent avec le milieu Eagle's Minimum Essential avec 1% de Pénicilline-Streptomycine, 1% de Glutamine et 10% de serum de veau foetal. L'incubation est classique pour les deux lignées : 37°C avec 5% de CO₂. Une importante augmentation de la quantité d'ADN (6 Log₁₀) a été observée tant au niveau extra qu'intra-cellulaire. En revanche les titres infectieux sont restés très bas et les récoltes du virus intra-cellulaire n'ont donné aucun ECP.

Séro-neutralisation Orf

Quelques essais de séro-neutralisation ont été réalisés avec l'Orf virus. Nous avons testé les serums de 2 patients ayant présenté une infection par l'Orf. Pour une patiente nous avons deux serums : un à 6 mois et un à un an de son infection. Pour un autre patient nous avons un serum à 1 mois de l'infection. Enfin, le CNR des orthopoxvirus nous avait fait parvenir un serum de patient atteint d'Orf mais nous n'avions pas de notion temporelle. Aucun de ces échantillons n'a été capable de séro-neutraliser l'Orf virus. Nous avons également essayé d'immuniser deux hamsters en les infectant avec un surnageant de culture d'Orf. Les animaux n'ont pas développé de lésions et les sérums récoltés un mois après infection ne contenaient pas d'anticorps neutralisants.

Chez les moutons, l'infection par le virus de l'Orf induit une réponse immunitaire vigoureuse impliquant des neutrophiles, des cellules dendritiques dermiques, des cellules T, des cellules B et des anticorps. Les lymphocytes T CD4, l'IFN- γ et, dans une moindre mesure, les lymphocytes T CD8 sont impliqués dans la protection. Malgré cela, cette protection n'est que partielle et l'Orf peut infecter les ovins de manière répétée, bien que la taille des lésions et le temps de résolution soient réduits par rapport à l'infection primaire. Ceci est dû, au moins en partie, à l'action des protéines immuno-modulatrices du virus qui interfèrent avec les réponses immunitaires et inflammatoires de l'hôte. Il s'agit notamment d'une protéine de résistance à l'interféron, d'un orthologue viral de l'IL-10 des mammifères (vIL-10) et d'un inhibiteur des cytokines GM-CSF et IL-2. Le virus code également pour une protéine de virulence qui est un orthologue du facteur de croissance endothélial vasculaire des mammifères.[187] Dans l'étude de D.L. Yirrell *et al* six agneaux ont été infectés par voie épidermique par le virus de l'Orf puis réinfectés 7 semaines plus tard. Après la primo-infection, tous les animaux ont présenté des signes cliniques de l'Orf virus, à savoir la formation de vésicules qui sont devenues pustuleuses puis crouteuses. La gravité de l'infection a varié au sein du groupe mais la résolution de l'infection est survenue après environ 4 semaines pour les 6 animaux. Cependant peu d'activité lymphoproliférative sanguine a été enregistrée au cours des 4 semaines de suivi l'infection primaire, bien que tous les animaux ont présenté une séroconversion. L'infection secondaire a entraîné l'apparition très rapides de pustules dont la résolution n'a pris que 8 jours cette fois-ci. Tous les animaux ont présenté une augmentation significative du titre d'anticorps spécifiques après l'inoculation secondaire.[188] On peut donc en déduire que l'infection par l'Orf provoque une réponse immunitaire cutanée vigoureuse. Cependant, le

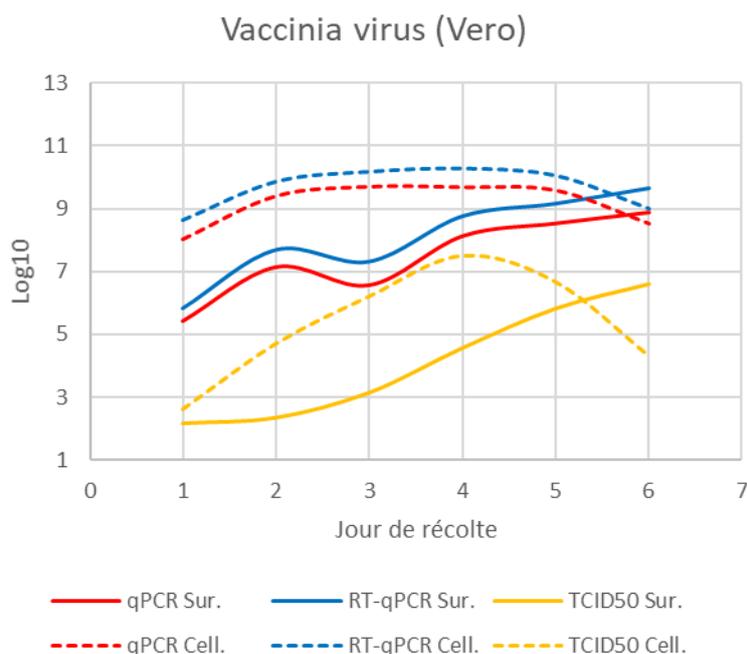
virus a acquis une série de gènes immuno-modulateurs liés à la pathogénie qui ont pour fonction de limiter (au moins de façon transitoire) l'efficacité de l'immunité de l'hôte.

Chez l'homme il existe moins de données mais une revue récente montre que la réaction immunitaire est également limitée par l'induction de cytokine anti-inflammatoires liées aux Th1 (IL-4 et IL-10 principalement).[189] Dans ce contexte, et au vu des premiers essais que nous avons effectué, il nous a paru peu relevant de continuer l'étude de sero-neutralisation humaine avec le virus de l'Orf.

CULTURE VIRALE DES ORTHOPOXVIRUS (VACCINIA ET COWPOX VIRUS)

Le suivi de culture cellulaire a été réalisé comme décrit précédemment sauf que nous avons utilisé un système de PCR en temps réel « pan-Orthopoxvirus » basé sur le gène E9L.[78]

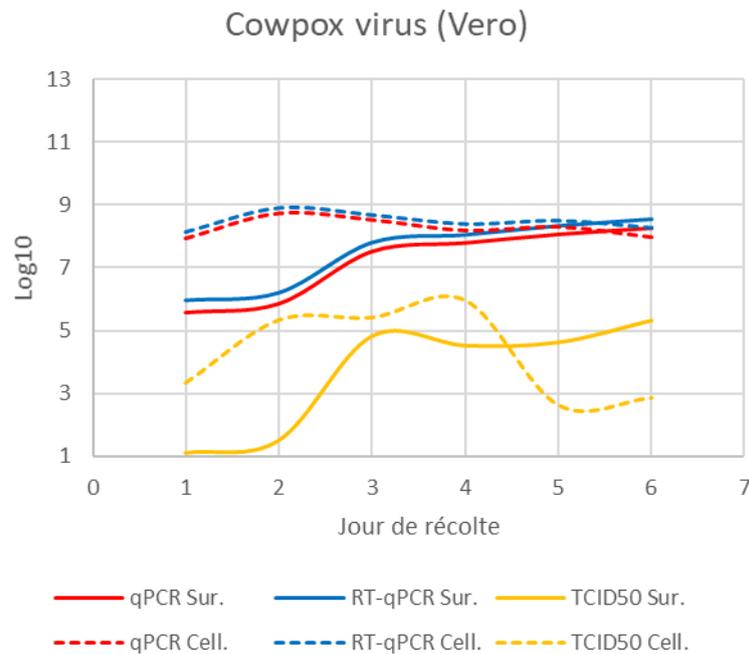
Vaccinia virus



La souche de vaccine (Western Reserve) qui a été utilisée appartient à l'unité des virus émergents. Initialement cultivées sur cellules HeLa, la souche a été très rapidement adaptée sur cellules Vero (milieu Eagle's Minimum Essential avec 1% de Pénicilline-Streptomycine, 1% de Glutamine et 10% de serum de veau fœtal. Incubation classique à 37°C avec 5% de CO₂). Le suivi de culture cellulaire montre une augmentation régulière des

quantités d'ADN/ARN et du titre infectieux dans le surnageant. Au niveau intra-cellulaire on observe une quantité d'ADN/ARN plus importante que dans le surnageant puis une diminution à partir du 5^{ème} jour. Au niveau des titres infectieux on observe une augmentation importante dès le début en intra-cellulaire puis une diminution importante à partir du 4^{ème} jour. Dans le surnageant l'augmentation des titres est importante à partir du 3^{ème} jour.

Cowpox virus



La souche de *Cowpox virus* utilisée dans cette étude appartient également à l'unité des virus émergents. Il s'agit de la souche « Compiègne » isolée en 2009 à partir d'une lésion humaine (transmission via des rats domestiques). La souche a été cultivée sur cellules Vero (milieu Eagle's Minimum Essential avec 1% de Pénicilline-Streptomycine, 1% de Glutamine et 10% de serum de veau fœtal. Incubation classique à 37°C avec 5% de CO₂).

Le suivi de la culture montre une augmentation importante de la quantité d'ADN/ARN ainsi que du titre infectieux dans le surnageant dès le 2^{ème} jour. Parallèlement, la quantité d'ADN/ARN intracellulaire diminue progressivement dès le 2^{ème} jour alors que le titre infectieux se maintient jusqu'au 4^{ème} jour avant de chuter brutalement.

CONCLUSION

Au total nous avons réussi à cultiver avec succès les deux virus du genre *Orthopoxvirus* (la vaccine et le Cowpox virus) ainsi que l'Orf (genre *Parapoxvirus*). La culture du poxvirus aviaire s'est soldée par un échec. Les cultures du *Myxoma virus* et du *LDSV* semblent avoir modérément réussi mais présentaient des ECP difficilement visibles. Par manque de temps nous n'avons pas encore mis au point un protocole de séro-neutralisation avec ces virus. Par la suite, des essais préliminaires de séro-neutralisation sur le Cowpox virus, la vaccine et l'Orf ont été réalisés. Les deux orthopoxvirus ont donné des résultats logiques et prometteurs mais l'Orf virus ne semble pas générer d'anticorps séroneutralisant même chez des sujets dont on sait qu'ils ont été infectés. Nous avons donc choisi de limiter les études de séro-neutralisation aux deux orthopoxvirus pour le moment.

Etudes de séro-neutralisation menées à l'UVE

METHODES

Production virale

Toutes les productions virales et les expériences de séro-neutralisation ont été réalisées en utilisant les cellules Vero fournies par l'ATCC (milieu Eagle's Minimum Essential avec 1% de Pénicilline-Streptomycine, 1% de Glutamine et 10% de serum de veau fœtal. Incubation classique à 37°C avec 5% de CO₂) entre le 5^{ème} et le 25^{ème} passage.

Vaccinia virus

Le virus de la vaccine utilisé provient de la collection de l'unité des virus émergents. Il s'agit d'une souche Western Reserve. Cette souche est une référence de laboratoire et non vaccinale. La production virale utilisée pour les séro-neutralisations été optimisée afin d'obtenir un ratio particules non infectieuses/particules infectieuse le plus bas possible afin de ne pas fausser la réaction de séro-neutralisation. En effet si les particules non infectieuses sont trop nombreuses les anticorps sont saturés et ne séro-neutralisent plus les particules infectieuses qui réussissent à pousser. La production de vaccine utilisée pour ce travail provient d'un surnageant de culture récolté à J6 titrant à $1.04 \cdot 10^9$ copies/mL et $1.67 \cdot 10^6$ TCID50/mL donc un ratio à 624.

Cowpox virus

Le virus du Cowpox utilisé provient de la collection de l'unité des virus émergents, il a été isolé en 2009 chez l'homme suite à une contamination via des rats domestiques. Contrairement à la vaccine, l'optimisation a été difficile car les titres infectieux restaient très bas et ce pour différentes souches testées (cf Table 5). Finalement, l'infection a été optimisée après deux passages sur cellules Vero, en utilisant des plaques 12 puits, une infection à 1 pfu pour 70 cellules, un lavage à J0 et en récoltant très précocement à J2. La production virale ainsi obtenue titrait à $6.82 \cdot 10^7$ copies/mL et $1.08 \cdot 10^5$ TCID50/mL. Le ratio ainsi obtenu (631) étant très proche de celui de la vaccine a permis d'obtenir des résultats comparables.

Après caractérisation des productions virale, le surnageant aliquoté en petit volume est congelés avec une quantité d'HEPES adéquate. Ainsi lors des séro-neutralisations les aliquots nécessaires sont décongelés et le volume non utilisé est jeté afin de ne pas re-congeler les productions virales ce qui diminuerait le titre infectieux.

Sero-neutralisation

Le même protocole de séro-neutralisation a été utilisé pour les deux virus. Les serums ont été dilués (milieu Eagle's Minimum Essential avec 1% de Pénicilline-Streptomycine, plaques 96 puits) de

1/10^{ème} au 1/80^{ème} (4 dilutions par serum) menant à une dilution finale de 1/20^{ème}, 1/40^{ème}, 1/80^{ème} et 1/160^{ème}. A noter que pour toutes les analyses statistiques les échantillons négatifs seront considérés au 1/10^{ème}. Les dilutions ont été effectuées par l'automate epMotion® 5075 (Eppendorf) pour un volume final de 50µL. Le jour même des dilutions, le virus est ajouté manuellement en volume équivalent (50µL) avec 20 TCID50/puit au final. Les plaques sont ensuite brièvement centrifugées (300 tours/minute pendant 2 minutes) puis incubées 1 heure à 37°C et 5% de CO₂. La totalité mélange serum/virus est ensuite déposé dans une plaque de culture cellulaire contenant 100µL de cellules Vero à confluence (plaque préparée la veille par un passage au 1/2, milieu Eagle's Minimum Essential avec 1% de Pénicilline-Streptomycine, 1% de Glutamine et 10% de serum de veau foetal). Les plaques de cultures sont ensuite incubées à 37°C et 5%CO₂ durant 4 jours.

Sur chaque « plaque mère » de serum est ajouté un témoin positif et un témoins négatif (eau stérile). Nous avons utilisé plusieurs témoins positifs : un standard lyophilisé d'Immunoglobulines anti-Vaccine (issus d'un donneur multivacciné par la souche Lister) fournit par le CNR des *Orthopoxvirus*[190], des serums issus de hamsters syriens immunisés et des surplus de sérums issus de personnes nées avant 1980 et fortement séro-neutralisant.

Au bout de 4 jours d'incubation les effets cytopathogènes (ECP) sont massifs et clairement visibles au microscope. Une lecture semi-automatique par les lecteurs Cytation® (BioTek) ou IncuCyte® (Sartorius) est effectuée et les photos sont importées dans une base de données interne à l'unité des virus émergents. Grâce à un programme informatique les images des 4 dilutions sont groupées et réattribuées à leur numéro de serum. La lecture est manuelle (œil humain) mais utilise les images numériques fournies par le lecteur automatisé. Chaque échantillon se voit attribuer un résultat : négatif, positif au 20^{ème}, 40^{ème}, 80^{ème} ou 160^{ème} en fonction du dernier puit où le virus a été séro-neutralisé (absence d'ECP). Les résultats sont ensuite exportés dans un tableur.

Populations étudiées

Nous avons testé 3 échantillonnages provenant de Bolivie, du Laos et du Mali et 3 échantillonnages français que nous appellerons la population APHM, la population Corse et la population PRIAM. A noter que nous avons également testé des sérums issus d'animaux corses. La vaccine a été testée sur les 6 populations. En revanche le cowpox virus a été testé uniquement les participants de PRIAM.

Bolivie

Il s'agit d'une étude de séroprévalence des virus Zika et Chikungunya chez les donneurs de sang en Bolivie.[191] De Décembre 2016 à Mars 2017 tous les donneurs de sang volontaires inclus dans la l'étude ont donné un consentement éclairé par écrit autorisant la recherche sur leurs prélèvements. Cette étude a été approuvée par le comité d'éthique de Santa Cruz. Nous avons pu tester 601 serums

de cette population provenant des villes principales (environnement urbain) de 5 départements : Santa Cruz de la Sierra (n=165) et Beni (n=102) (climat tropical) ; Cochabamba (n=151), Tarija (n=23) et La Paz (n=160) (climat subtropical plus froid sur les hauts plateaux). Cet échantillonnage comporte plus d'hommes que de femmes (sexe ratio H/F=1.37) et la population est globalement très jeune puisque l'année de naissance moyenne est 1989 ± 10 ans. Seulement 25% des personnes sont nées avant 1980. Les informations collectées pour cette étude concernaient principalement la localisation géographique ainsi que le métier des participants.

Laos

Cette étude avait pour but d'explorer l'immunité laotienne contre de nombreux pathogènes (bactérie et virus). Les collectes ont eu lieu en 2003, 2004, 2015 et 2018 à Vientiane la capitale (milieu plutôt urbain). Toutes les personnes incluses dans cette étude ont donné un consentement éclairé par écrit autorisant la recherche sur leur prélèvement. Cette étude a été approuvée par le comité d'éthique national du Laos pour la recherche en santé ainsi que par le comité d'éthique de l'Oxford Tropical Research. Cet échantillonnage compte 657 personnes et présente le sexe ratio le plus déséquilibré (H/F=1.72). En terme d'âge la répartition ressemble à la population Bolivienne avec une année de naissance moyenne à 1985 ± 9 ans et seulement 25.9% de la population née avant 1980. Nous n'avons pas d'informations épidémiologique disponible pour cette population.

Mali

Le sexe ratio de cette population est équilibré (H/F=1.02), contrairement au deux autres populations étrangère l'année de naissance moyenne est de 1980 ± 14 ans et 43% de la population est née avant 1980. Nous n'avons pas d'informations épidémiologiques pour cette étude hormis les villages de prélèvement : Leba, Tliemba, Soloba, Bougoudale et Komana et l'année de collecte : 2019.

Animaux

Ces sérums ont été obtenus avec la collaboration de Vincent Cicculi, étudiant en thèse à la faculté de Corse. Pour les mouflons et les cerfs les sérums ont été prélevés dans le cadre d'un suivi sanitaire sérologique en partenariat avec le parc naturel régional (animaux sauvages ou en semi-liberté). Les sérums de sangliers proviennent des chasseurs pour deux études supervisées par l'INRA. Seul le virus de la vaccine a été testé sur cette population.

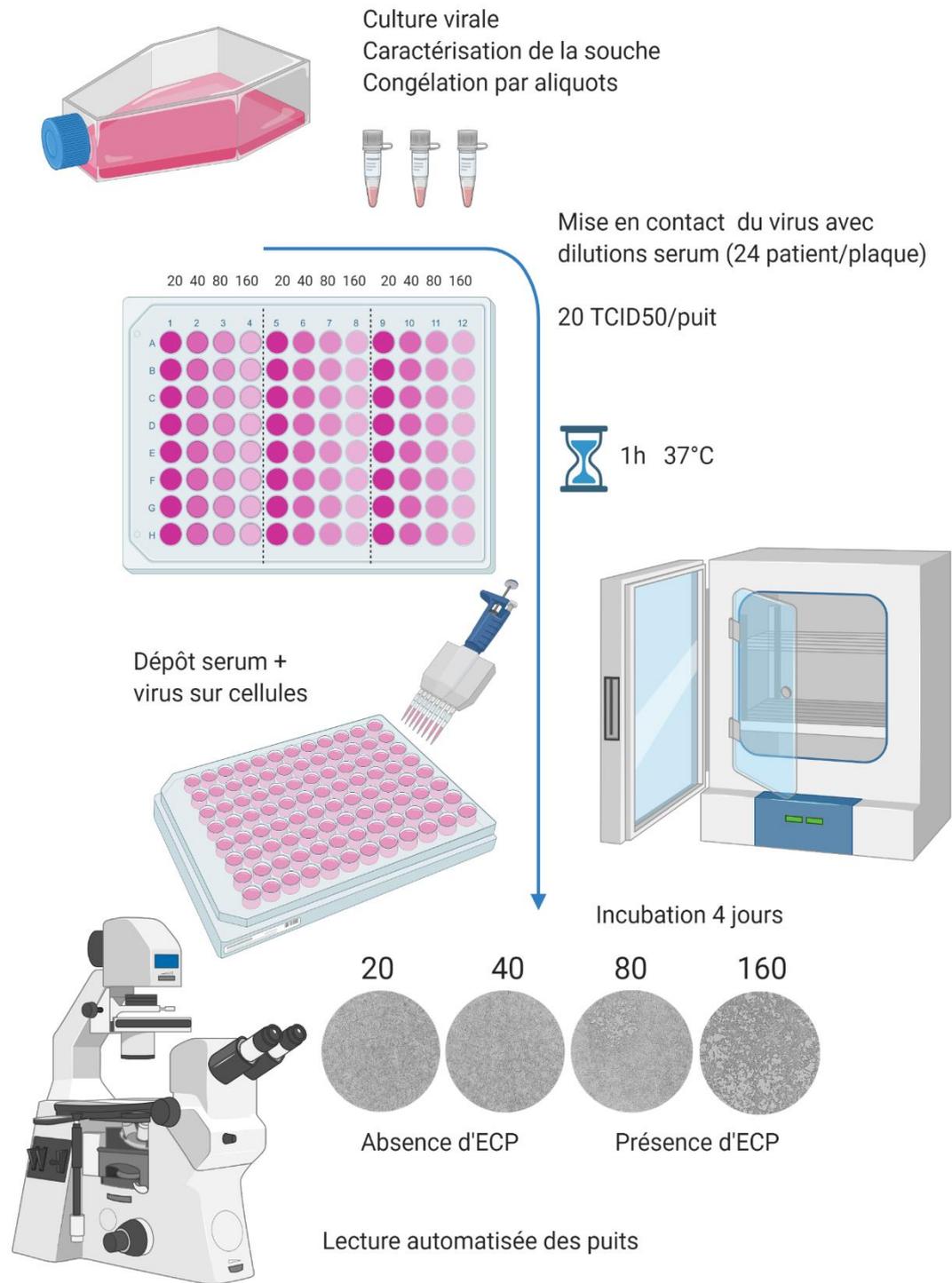


Figure 12: Protocole de séro-neutralisation utilisé pour ce travail

Corse

L'utilisation de cette population a été possible grâce à une collaboration avec l'université de Corse. Il s'agit d'un échantillonnage constitué entre 2017 et 2019 pour une étude de séro-prévalence de l'Hépatite E sur l'île. Les participants étaient soit des donneurs de sangs volontaires soit des étudiants et personnel universitaires (UCPP) soit des patients recrutés par des médecins généralistes. Le sexe ratio de cette population est un peu en faveur des femmes (H/F=0.96) et il s'agit de l'échantillonnage français en moyenne la plus jeune avec un écart type important (1979 ± 15 ans). A noter tout de même que la moitié des personnes sont nées avant 1980. Pour cette population nous disposons d'information assez poussées via un questionnaire sur les habitudes de vie et les habitudes alimentaires.

APHM

Cet échantillon a été « créé » avec un objectif de validation externe des résultats précédents. Effectivement, à ce moment-là nous avons testé 3 populations étrangères qui ne comportaient quasiment aucun patient positif contrairement à la population Corse. Nous voulions donc savoir s'il s'agissait d'une exception Corse ou du résultat des différentes stratégies de vaccination de l'OMS en fonction des pays. En utilisant des tubes de sérum surnuméraires (2021) des patients de l'APHM nous avons sélectionné les personnes en fonction de leur année de naissance. Ainsi nous avons pu tester pour les deux virus 8 sérums pour chaque décennie de 1930 à 2000 (n total = 64). Le sexe ratio de cette population est équilibré (H/F=0.96) et il s'agit donc de l'échantillon de population « la plus âgée » avec une année de naissance moyenne à 1963 ± 13 ans. Nous ne possédons pas d'informations épidémiologique pour cette population.

PRIAM

L'étude PRIAM (Perception du Risque Arboviral autour de la Méditerranée) constitue notre plus importante population. Initialement constitué pour étudier la séro-prévalence des maladies infectieuses transmises par les arthropodes. Elle regroupe 4448 sérums issus de donneurs de sang de 4 régions : Auvergne-Loire (n=837), Corse (n=168), Midi-Pyrénées (n=1738) et PACA (n=1705). L'année moyenne de naissance de cet échantillon est de 1966 ± 13 ans avec une nette majorité de personnes nées avant 1980 (83%). Le sexe ratio est légèrement en faveur des hommes (H/F=1.17). Il s'agit de la population pour laquelle nous avons le plus de données épidémiologiques disponibles (questionnaire). C'est la population qui a été le plus explorée et les résultats obtenus feront l'objet d'une publication scientifique. Le virus de la vaccine et le cowpox ont été testés sur cet échantillonnage.

Statistiques

Corse

La distribution des années de naissance a été comparée entre positifs au seuil 1/40e et négatifs par un test de Mann-Whitney. Cette proportion a été comparée entre sujets nés avant et après 1980 (arrêt de la vaccination) par un test exact de Fisher. La distribution des titres sérologiques a été

comparée entre décennies de naissance par des tests de Mann-Whitney, sur l'ensemble de l'échantillon et chez les sujets positifs au seuil 1/20^{ème} uniquement. La proportion de positifs aux seuils 1/20^{ème} e et 1/40^{ème} a été comparée entre décennies de naissance par un test de Fisher. La proportion de positifs au seuil 1/20^{ème} et la distribution des années de naissance ont été comparées entre Nord et Sud de la Corse par des tests de Mann-Whitney et de Fisher, respectivement.

Les facteurs associés au titre sérologique ont été recherchés en analyse univariée puis après ajustement sur l'année de naissance par un modèle paramétrique reposant sur une hypothèse de distribution log-normale des titres et prenant en compte la censure par intervalle des titres sérologiques.[192] Les covariables étudiées étaient les suivantes : le sexe, le statut sérologique hépatite E, les voyages hors Europe, la situation professionnelle, la situation familiale, le type d'activité professionnelle, le niveau d'étude, le type de logement, le type d'alimentation en eau, le contact avec les eaux usées, la consommation d'eau, le contact avec des animaux domestiques ou d'élevage, l'activité de chasse, le type de viande consommée et la cuisson.

PRIAM

La concordance entre les titres sérologiques anti-vaccine et anti-cowpox a été évaluée par un test de kappa non pondéré puis pondéré (pondération de 1 -0.25 k pour k dilutions d'écart entre les deux sérologies). La corrélation entre ces titres a été évaluée par un coefficient de Spearman. Les comparaisons de distributions selon le statut sérologique ont été effectuées par des tests de Mann-Whitney pour les variables quantitatives et par des tests de Fisher pour les variables catégorielles. La séroprévalence a été comparé entre chaque paire de régions par un test de Fisher (sans correction pour la multiplicité des tests). Le titre géométrique moyen a été modélisé par régression logistique en fonction de l'année de naissance selon un modèle non linéaire (splines cubiques), après stratification sur le sexe.

Les facteurs associés au titre sérologique ont été recherchés en analyse univariée puis après ajustement sur l'année de naissance par un modèle paramétrique identique à celui précédemment décrit pour la population Corse. Les covariables étudiées étaient les suivantes : la situation familiale, le type d'activité professionnelle, le niveau d'étude, le nombre de personne au foyer, le revenu du foyer, l'état de santé général, les voyages hors Europe, le type de logement, le temps passé en l'extérieur, la climatisation, l'utilisation de moustiquaires, la présence de jardin/terrasse/balcon et piscine, la ruralité du lieu d'habitation, la proximité des commerces, la présence d'étang ou de marais à proximité, le contact avec des animaux domestiques ou d'élevage, l'exposition aux moustiques et autres insectes piqueurs et aux tiques, la fréquences des piqûres et les moyens de protection utilisés.

Tous les tests étaient bilatéraux au seuil de significativité 0.05.

RESULTATS SERO-NEUTRALISATION VACCINE POPULATIONS ETRANGERES ET POPULATION ANIMALE

Animaux

Seulement 3 sérums sur 140 testés ont révélé une capacité faiblement séroneutralisante (2 mouflons et un sanglier). La majorité de cette faune ne semble donc pas être exposée à un orthopoxvirus proche de la vaccine.

Bolivie et Laos

Il s'agit de deux populations jeunes et semblables : 75% des participants sont nées après 1980 et presque personne n'est né avant 1960. Les résultats de l'étude de séro-neutralisation contre le virus de la vaccine retrouvent une écrasante majorité de négatifs : 99.5% pour la Bolivie e 96% pour le Laos. Seuls quelques personnes présentent un résultat positif et au 1/20^{ème} pour la majorité.

Mali

La population malienne présente un taux de négatifs moins élevé (82%), un taux important de positifs au 1/20^{ème} (11%) quelques personnes séro-neutralisant au 1/40^{ème} (5%) et 1/80^{ème} (0.8%). Cependant aucune personne ne séro-neutralisait au 1/160^{ème}.

Discussion

Ces premiers résultats sur les populations étrangères montrent que le taux de négatifs semble corrélé au taux de personnes nées après 1980. Cela confirme l'hypothèse principale que nous avons à savoir que la vaccination antivariolique est un facteur impactant fortement la séro-neutralisation anti-vaccine. Nous avons observé des résultats similaires pour les populations Laotienne et Boliviennes (dont l'âge des populations est comparable) ce qui laisserait supposer que l'impact géographique est limité. Cependant, ces 2 échantillons comportent au moins 25% de personnes nées avant 1980 et pourtant le taux de personnes séroneutralisant étant inférieur à 5%. Comme expliqué dans l'introduction historique, à partir de 1966 l'OMS a changé de stratégie vaccinale pour les pays en voie de développement en abandonnant la vaccination de masse pour la stratégie d'endiguement des cas. Cela pourrait expliquer pourquoi ces deux populations ne présentent quasiment pas de positif. La population malienne quant à elle présente 18% de positifs et comporte 10% de patients nés avant 1960 avec une année de naissance moyenne plus ancienne que celle des deux autres populations, ces données confortent l'influence importante de l'âge.

	Bolivie	Mali	Laos	APHM	Corse	PRIAM	Animaux
Nb d'échantillons	601	261	657	46	460	4448	140
Type d'échantillons	Serum et plasma	Plasma	Serum	Serum	Serum	Serum	Serum
Sexe ratio H/F	1.37	1.02	1.72	0.96	0.76	1.17	NA
Année de naissance moyenne \pm écart type	1989 \pm 10	1980 \pm 14	1985 \pm 9	1963 \pm 13	1979 \pm 15	1966 \pm 13	NA
Pourcentage de personnes nées après 1980	75%	58%	74%	13%	50%	17%	NA
Pourcentage de personnes nées avant 1980	25%	43%	26%	87%	50%	83%	NA
Dont nés avant 1960	0.5%	10%	0.8%	46%	12%	34%	NA

Résultats séro-neutralisation <i>Vaccinia virus</i>							
Pourcentage de Négatifs	99.5%	82%	96%	39%	67%	87%	98%
Pourcentage 1/20	0.2%	11%	3%	15%	14%	8%	1.4% (Mouflons)
Pourcentage 1/40	0.2%	5%	0.5%	20%	13%	4%	0.7% (Sanglier)
Pourcentage 1/80	0.2%	0.8%	0%	24%	6%	1%	0%
Pourcentage 1/160	0%	0%	0%	2%	1%	0.1%	0%

Table 7: Présentation des principales caractéristiques épidémiologiques des populations testées ainsi que les résultats de séro-neutralisation pour la vaccine

Contrairement aux populations étrangères, les échantillonnages français (Corse, APHM et PRIAM) incluent théoriquement des participants dont la politique vaccinale est mieux connue : une obligation vaccinale jusqu'à la fin des années 1970. Chronologiquement nous avons travaillé en premier sur la population Corse. Puis devant des résultats très différents des populations étrangères suggérant un fort impact de la vaccination nous avons constitué un petit échantillon avec des surplus des serums de patients de l'APHM choisis en fonction de leur date de naissance uniquement. Enfin nous avons travaillé avec la population de l'étude PRIAM qui est l'échantillonnage comprenant le plus grand nombre de participants en testant à la fois la vaccine et le Cowpox virus.

RESULTATS POPULATIONS CORSE ET APHM

Corse

Cette population présente un taux de positivité bien plus élevé (33%) que les populations étrangères avec un nombre important de personnes séro-neutralisant le virus de la vaccine au 1/40^{ème}, 1/80^{ème} et même 1/160^{ème}. Sur la Figure 10 on voit que l'année de naissance des personnes positive (1969±13) est significativement inférieure à l'année de naissance des négatifs (1982±14) ($p < 0.0001$ Kruskal-Wallis test).

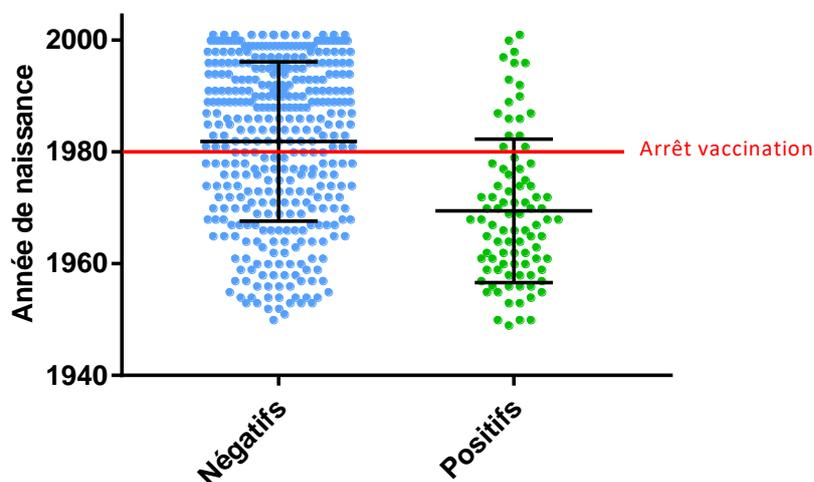


Figure 13: Années de naissance des participant en fonction de leur statut seroneutralisant pour le virus de vaccine (positifs comptés à partir de 1/20^{ème})

La figure 11 montre que la proportion de positifs chez les personnes nées avant 1980 (33%) est significativement plus élevée que la proportion de positifs chez celles nées après 1980 (7%) ($p < 0.0001$ Fisher exact test).

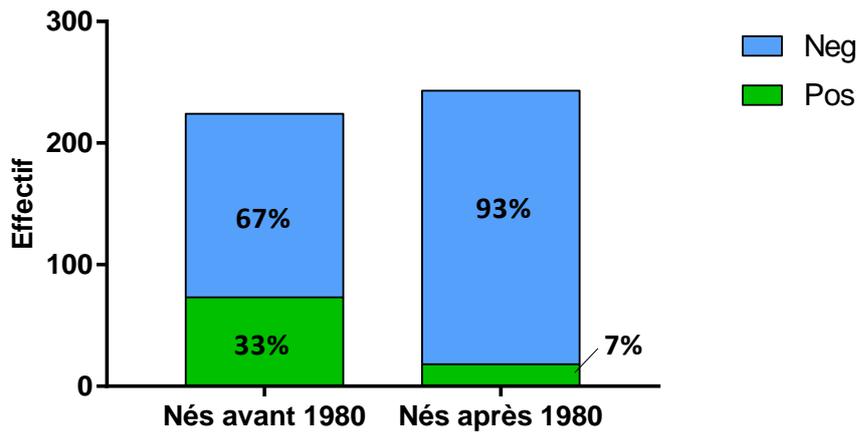


Figure 14: Proportion de participants séro-neutralisant le virus de la vaccine en fonction de leur année de naissance (positifs comptés à partir de 1/20ème)

Les Figures 12 et 13 concernent le taux d'anticorps anti-vaccine (moyenne et écart-type géométriques) et fonction de l'année de naissance (5 classes). La Figure 12 prend en compte l'ensemble des participants : positifs et négatifs (comptés au 1/10^{ème} : 10). On remarque que le titre d'anticorps est significativement plus élevé chez les participants nés avant 1980 par rapport à ceux nés après 1980 (Kruskal-Wallis test, voir p-values sur Figure 12). Aucune différence significative n'a été observée entre les classes d'âge pré- ou post-1980.

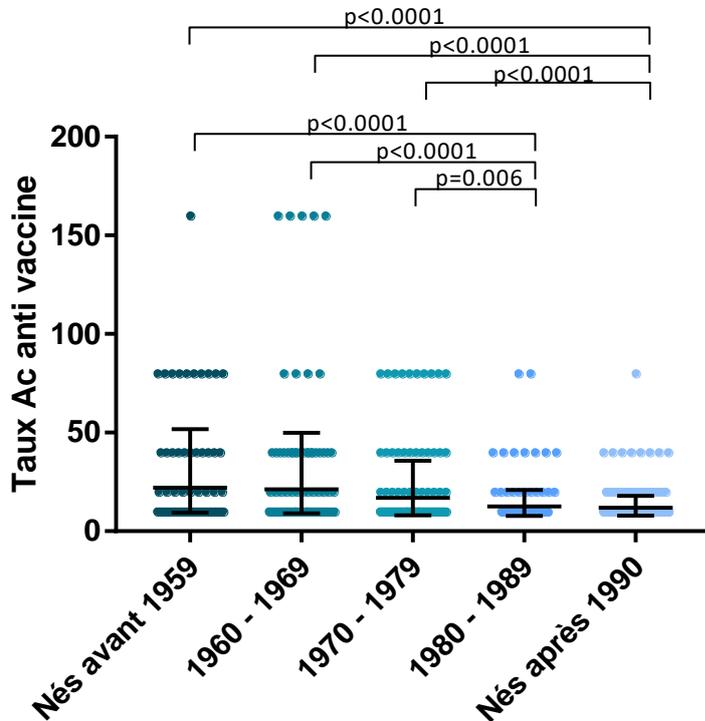


Figure 15: Taux d'Anticorps anti-vaccine en fonction de l'année de naissance, ensemble des participants.

La Figure 13 montre également les moyennes géométriques du taux d'anticorps anti-vaccine mais se concentre sur les participants positifs (à partir de $1/20^{\text{ème}}$: 20). On voit que seuls les participants nés après 1990 présentent un taux significativement plus bas que les tranches d'âge pré-1980. La tranche 1980-89 cette fois ne présente pas de différence significative avec les autres tranches d'âge (Mann-Whitney Test, voir p value sur Figure 12).

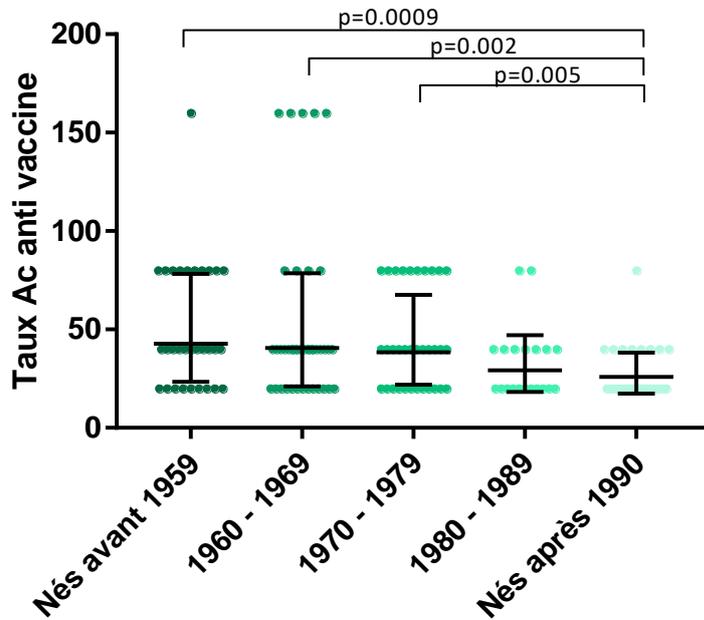
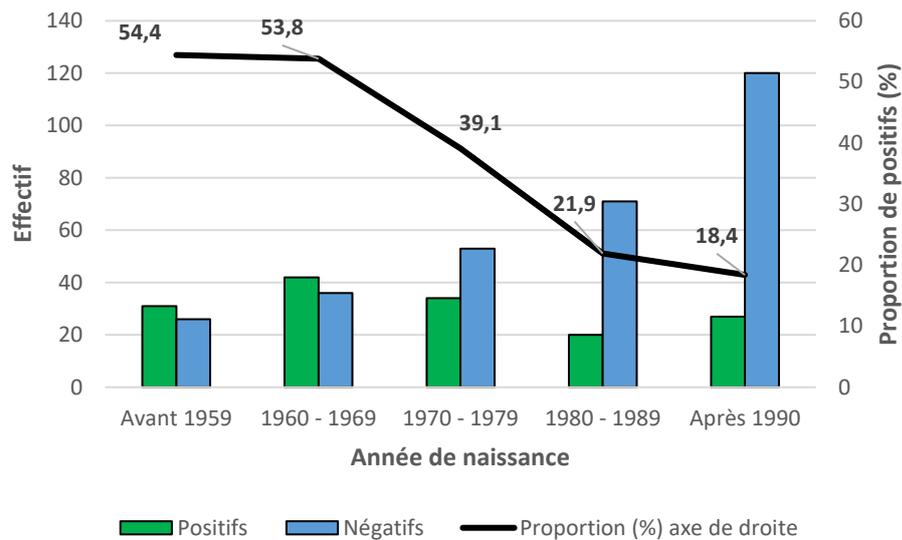


Figure 16: Taux d'Anticorps anti-vaccine en fonction de l'année de naissance, focus sur les participants positifs à partir de $1/20^{\text{ème}}$.

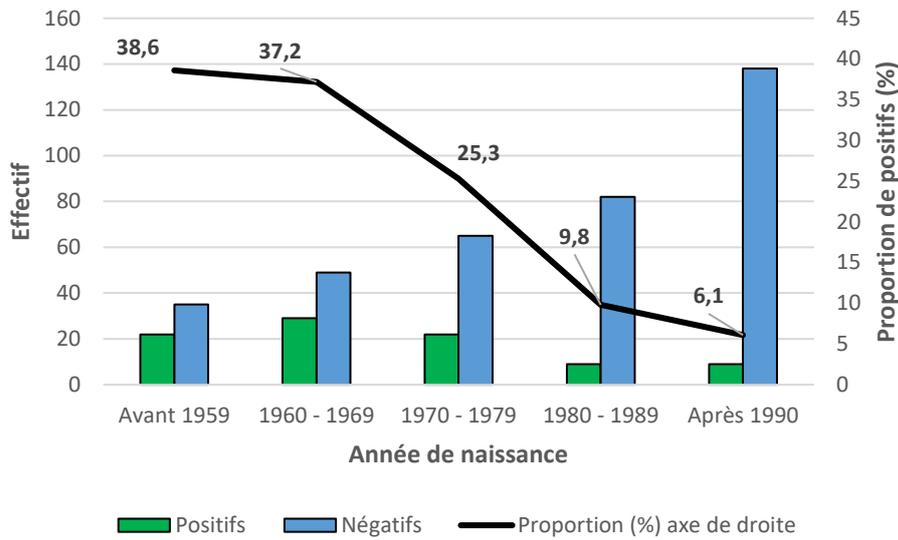
Nous avons ensuite étudié la proportion de positifs par tranche d'âge (Figure 14 et 15). Sur la figure 14 les positifs sont considérés à partir du titre $1/20^{\text{ème}}$. On observe une nette diminution de la proportion de positifs dans les années 1970 sans différence significative entre les années 1950 et 1960 ni entre 1980 et 1990. Les p-value des comparaisons de chaque tranche d'âge par Khi-Deux sont données dans le tableau accompagnant la figure.



	Après 1990	1980 - 1989	1970 - 1979	1960 - 1969
1980 - 1989	0,462	-		
1970 - 1979	0,0005	0,013	-	
1960 - 1969	<0,0001	<0,0001	0,057	-
Avant 1959	<0,0001	<0,0001	0,071	0,95

Figure 17: Proportion de positifs (à partir de $1/20^{\text{ème}}$) par tranche d'âge et table des p-value (Chi-square test)

La figure 15 considère les positifs à partir de 1/40^{ème}. On observe une cinétique comparable à la figure 14 : une diminution des positifs dans les années 1970 sans différence significative entre les années 1950 et 1960 ni entre 1980 et 1990. Cependant, avec ce seuil de positivité, les années 1970 ne diffèrent pas significativement des années 1960 et 1950. Cela renforce encore le rôle de la vaccination.



	Après 1990	1980 - 1989	1970 - 1979	1960 - 1969
1980 - 1989	0,285	-	-	-
1970 - 1979	<0,0001	0,007	-	-
1960 - 1969	<0,0001	<0,0001	0,099	-
Avant 1959	<0,0001	<0,0001	0,09	0,867

Figure 18: Proportion de positifs (à partir de 1/40^{ème}) par tranche d'âge et table des p-value (Chi-square test)

Nous nous sommes ensuite intéressé à la géographie grâce aux codes postaux des participants. Une simple localisation sur carte en utilisant un code couleur pour la proportion de positifs nous a montré qu'au Sud de la Corse nous n'avions presque aucun positif. Si on établit une limite au milieu du golfe d' Ajaccio on obtient 115 participants au Sud et 345 participants au Nord sans différence significative d'âge ($p=0.533$ Mann Whitney test). La proportion de positifs au Nord s'élève à 25.2% contre seulement 2.9% au Sud ce qui est significativement plus bas ($p<0.0001$ Fisher exact test), Figure 16.

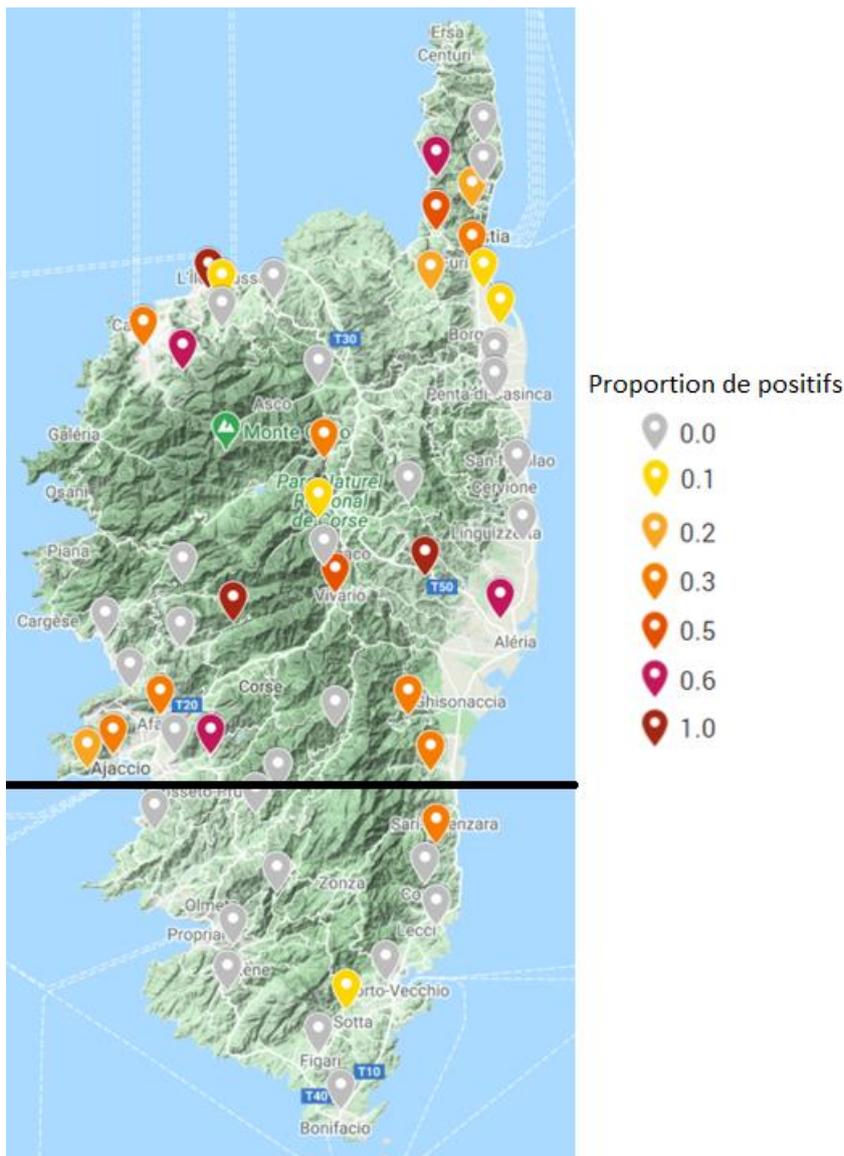


Figure 19: répartition géographique de la proportion de positifs (comptés à partir de 1/20ème) en fonction des codes postaux des participants.

Enfin, lors de la collecte des prélèvements pour cette étude les participants ont rempli un questionnaire sur leur mode de vie. Ce questionnaire, initialement élaboré pour une étude sur l'hépatite E, se concentre principalement sur le mode de vie et le mode de consommation alimentaire (proximité des élevages, cuisson des viandes, qualité de l'eau etc...). Pour chaque paramètre du questionnaire nous avons calculé le facteur multiplicatif de la moyenne géométrique du titre afin de déterminer si certains paramètres influençaient positivement ou négativement la séro-neutralisation anti-Vaccine. Hormis l'année de naissance, aucune variable testée n'était associée au titre anti-vaccine. Cependant, initialement, nous avons tout de même pu observer une tendance globale dans cette population. En effet certains paramètres comme :

- une sérologie hépatite E positive
- une activité professionnelle agricole
- le contact avec des élevages
- le contact avec des eaux usées
- le fait de chasser

Seraient des facteurs associés positivement avec un titre d'anticorps anti-Vaccine plus élevé que la moyenne (non significatif). Les orthopoxvirus étant des virus zoonotiques nous pensions donc que logiquement le milieu « rural » devait avoir un impact sur la séroprévalence. Cependant après ajustement sur l'âge des participants nous n'avons pas retrouvé cette tendance. Il semblerait donc que l'âge reste le principal facteur influençant le titre d'anticorps anti-vaccine et que les populations plus âgées en Corse seraient globalement plus rurales.

APHM

La Figure 17 montre les résultats des patients inclus dans cet échantillon. Pour rappel il s'agit d'une petite population que nous avons constitué avec des surplus de serums de l'APHM. On remarque que quasiment tous les patients nés avant 1950 séro-neutralisent la Vaccine. Entre 1950 et 1980 seulement 44% des patients séro-neutralisent et à partir de 1974 plus personne ne séro-neutralise hormis un patient né en 1996 au 1/20^{ème}.

Année	Titre	Année	Titre	Année	Titre	Année	Titre	Année	Titre	Année	Titre	Année	Titre
1930	20	1940	40	1953	40	1961	10	1971	40	1983	10	1990	10
1932	80	1941	40	1953	40	1964	40	1972	20	1984	10	1992	10
1933	40	1945	20	1954	10	1965	10	1972	40	1985	10	1993	10
1934	20	1946	80	1954	10	1966	10	1973	40	1985	10	1993	10
1934	40	1948	10	1956	10	1967	10	1974	10	1986	10	1995	10
1936	20	1948	20	1958	10	1967	20	1974	10	1987	10	1996	20
1936	40	1948	80	1958	20	1967	10	1978	10	1987	10	1996	10
1937	80			1958	10	1968	20	1979	10	1988	10	1996	10
				1959	40							1997	10
												1998	10
Années 1930		Années 1940		Années 1950		Années 1960		Année 1970		Années 1980		Années 1990	
													Années 2000
													2000
													2000
													2002
													2003
													2003
													2003
													2005

Figure 20: résultats individuels des 64 patients inclus dans l'échantillonnage APHM

La figure 18 montre le taux d'anticorps anti-vaccin (moyenne et écart-type géométriques) et fonction de la décennie de naissance. Les p-value des comparaisons de chaque tranche d'âge par Khi-Deux sont données dans le tableau accompagnant la figure. On confirme qu'il existe une différence significative du taux d'anticorps anti-vaccin entre les années 1930-40 et post-1980.

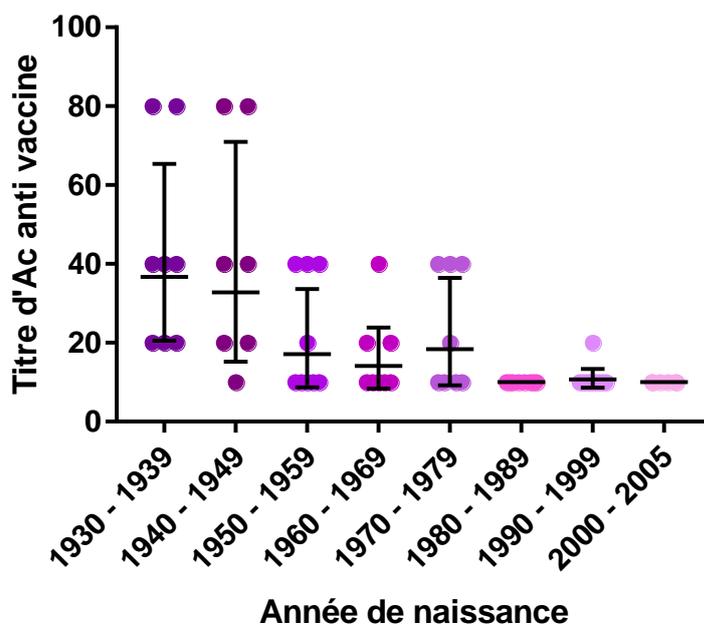


Figure 21: Titres d'anticorps anti-Vaccin par décennie et table des p-value (Chi-square test)

Discussion

Les résultats de ces deux populations Françaises semblent montrer que la vaccination est le facteur largement majoritaire générant des anticorps anti-vaccin. En revanche, il ne semble pas y avoir d'effet clairement « on-off » au moment de l'arrêt de la vaccination puisque le pourcentage de positifs décroît progressivement de 1960 à 1980. De plus, il ne semble pas y avoir d'immuno-senescence puisque, parmi les participants positifs, les taux d'anticorps sont plus élevés chez les sujets vaccinés de

longue date contrairement aux participants nés à la fin des années 1970 (à noter cependant que ces derniers n'ont probablement reçu qu'une injection). Enfin, la population Corse introduit la question de la répartition géographique et donc d'un potentiel rôle environnemental même si les questionnaires n'ont pas permis d'identifier des facteurs impactant.

RESULTATS PRIAM

Au total, dans l'étude PRIAM, il y a 4 448 personnes pour qui nous avons des résultats de sero-neutralisation pour la vaccine et le cowpox virus associés à un questionnaire. L'étude a été menée sur 4 régions dont voici les effectifs ainsi que l'année de naissance moyenne.

- **Auvergne-Loire** : 837 participants (1966 +/- 13 ans)
- **Corse** : 168 participants (1966 +/- 12 ans)
- **Midi-Pyrénées** : 1 738 participants (1966 +/- 13 ans)
- **PACA** : 1 705 participants (1967 +/- 13 ans)

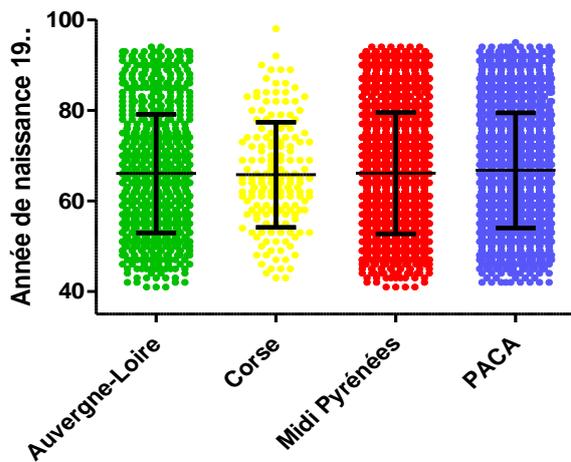


Figure 22: Répartitions des effectifs de la population PRIAM en fonction de la région de prélèvement et de l'année de naissance : pas de différence significative entre les 4 groupes

Corrélation entre la vaccine et le Cowpox virus

Au total nous avons obtenu 77% (3443/4448) de personnes « doubles négatives » (ne séro-neutralisant ni la vaccine, ni le cowpox). Presque 8% (350 personnes) séro-neutralisent les 2 virus au moins au 1/20^{ème}. Un nombre important de personnes (641 soit 14%) séro-neutralisent un seul des deux virus au 1/20^{ème}. Le détail de ces effectifs est donné dans les deux tables suivantes.

		COWPOX					
		10	20	40	80	160	
VACCINE	10	3 443 (77%)	407 (9,2%)	4 (0,09%)	2 (0,05%)	1 (0,02%)	81% concordants
	20	234 (5,3%)	85 (1,9%)	42 (0,9%)	5 (0,11%)	0	18% une dilution d'écart
	40	7 (0,12%)	77 (1,7%)	62 (1,7%)	12 (0,27%)	3 (0,07%)	0,5% deux dilutions d'écart
	80	0	4 (0,09%)	31 (0,7%)	21 (0,47%)	3 (0,07%)	0,06% trois dilutions d'écart
	160	0	1 (0,02%)	0	2 (0,05%)	2 (0,05%)	0,02% quatre dilutions d'écart
		160	0	1 (0,02%)	0	2 (0,05%)	2 (0,05%)

Table 8: répartition des effectif en fonction du titre séro-neutralisant Vaccine et Cowpox virus (n=3 443)

		COWPOX				
		20	40	80	160	
VACCINE	20	85 (24%)	42 (12%)	5 (1,4%)	0	49% concordants
	40	77 (22%)	62 (18%)	12 (3,4%)	3 (0,9%)	48% une dilution d'écart
	80	4 (1,1%)	31 (8,9%)	21 (6%)	3 (0,9%)	3,4% deux dilutions d'écart
	160	1 (0,3%)	0	2 (0,6%)	2 (0,6%)	0,3% trois dilutions d'écart
		160	1 (0,3%)	0	2 (0,6%)	2 (0,6%)

Table 9: répartition des effectifs des personnes séro-neutralisant à au moins 1/20ème les deux virus (n=350)

A noter que toutes les personnes présentant une différence de titre supérieure à 2 dilutions d'écart entre les deux virus ont fait l'objet d'une vérification supplémentaire.

Des analyses statistiques ont été effectuées afin de comparer les titres d'anticorps anti-vaccine et anti-cowpox qui semblent a priori corrélés puisque plus de 95% présente le même taux ou une dilution d'écart. Le kappa (mesure du degré de concordance compris entre 0 et 1) est estimé à 0.30 ce qui est assez faible, notamment du fait de l'important nombre de personnes séro-neutralisant un seul virus au 1/20^{ème}.

Le kappa pondéré est estimé à 0.48. Ce coefficient reste cependant peu adapté dans notre situation car il est classiquement destiné à estimer l'agrément entre plusieurs évaluateurs via une méthode identique. Le coefficient de corrélation (Spearman) entre les deux sérologies était estimé à 0.68, ce qui conforte l'hypothèse d'une corrélation élevée entre ces titres. Le nombre important de personnes discordant entre 1/10^{ème} et 1/20^{ème} ne permet pas d'obtenir des statistiques satisfaisant les standards habituels. Cependant, usuellement, du fait de la complexité de la méthode, une dilution d'écart est

considérée comme équivalente. Hormis quelques rares patients qui présentent plus de 2 dilutions d'écart (et pour qui nous n'avons pour le moment pas d'explication), la majorité (>95%) de l'échantillon présente une concordance de titres, y compris parmi les personnes positives. Cela confirme donc l'hypothèse épidémiologique d'une immunité croisée entre ces deux virus du genre *Orthopoxvirus*.

Définition des positifs

Contrairement aux autres échantillons, PRIAM a été testé pour deux virus, 19% des personnes ne présentant pas exactement le même taux pour les deux virus nous avons dû réfléchir à une manière de classer les positifs. Nous avons tâtonné avec trois types de classification en fonction des résultats de séro-neutralisation pour les deux virus :

- **Classification 1:** Positifs = tout ce qui n'est pas double négatif
 - Doubles négatifs: 3 443 (77%), année de naissance: 1968 +/- 13ans
 - Doubles positifs et discordants: 1 005 (33%), année de naissance: 1961 +/- 10,5ans
- **Classification 2:** Positifs = tout ce qui est double positif
 - Doubles négatifs et discordants: 4 098 (92%), année de naissance: 1967 +/- 13ans
 - Doubles positifs: 350 (8%), année de naissance: 1959 +/- 9ans
- **Classification 3:** Positifs = moyenne des deux titres ≥ 20
 - Négatifs: 4 084 (92%), année de naissance: 1967 +/- 13ans
 - Positifs: 364 (8%), année de naissance: 1959 +/- 9ans

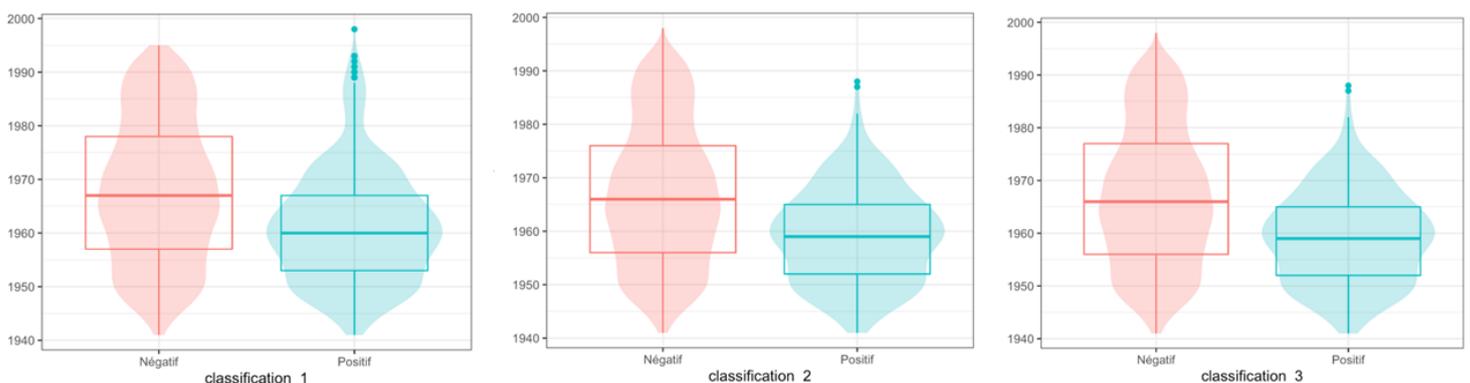


Figure 23: répartition des effectifs en fonction de la date de naissance en fonction des 3 classifications envisagées.

La 1^{ère} classification inclut dans les positifs tous les participants présentant un titre d'anticorps au 1/20^{ème} pour seulement un virus. Par rapport à notre hypothèse de départ cette classification est intéressante car elle inclut dans les positifs des participants nés après l'arrêt de la vaccination antivariolique. Les classifications 2 et 3 sont plus « drastiques » sur la définition des positifs. Dans la classification 2 seuls les participants présentant des titres sérologiques $\geq 1/20$ ^{ème} pour les deux virus

sont considérés comme positifs. Pour la classification 3 nous avons effectué une moyenne des titres des deux virus. Seuls les participants dont la moyenne est $\geq 1/20^{\text{ème}}$ sont considérés comme positifs. Les classifications 2 et 3 excluent des positifs la totalité des participants nés après 1980. Cependant, au vu de la forte immunité croisée observée entre ces deux orthopoxvirus, il nous semblait plus scientifiquement robuste d'exclure des positifs les patients présentant un titre faible uniquement pour un des deux virus. De ce fait nous n'avons pas utilisé la classification 1. Les classifications 2 et 3 donnent des répartitions semblables des positifs et des négatifs. Nous avons cependant choisi de travailler avec la classification 3 car elle inclut dans les positifs 14 participants qui étaient fortement positifs pour un virus et négatifs pour l'autre. Même si nous n'avons pas d'explication pour ces discordances nous ne voulions pas exclure ces personnes des positifs d'autant plus que ces résultats ont été vérifiés sur une seconde mesure.

Association avec l'année de naissance

Tout comme les populations françaises précédentes, l'âge (et donc la vaccination) est le facteur principal associé à la séro-neutralisation. Nous avons retrouvé les mêmes résultats généraux que la population Corse et la population APHM à savoir une séroprévalence plus importante chez les personnes nées avant 1960 puis une diminution progressive jusqu'à une négativation quasi-totale pour les personnes nées après l'arrêt de la vaccination. La séroprévalence des personnes nées avant 1960 est plus élevée chez les hommes que chez les femmes (15% vs. 9%, $p < 0.001$). Cette différence n'avait pas été observée sur la population Corse pour la même tranche d'âge (41% de positifs pour les hommes, 66% pour les femmes, $p = 0.201$).

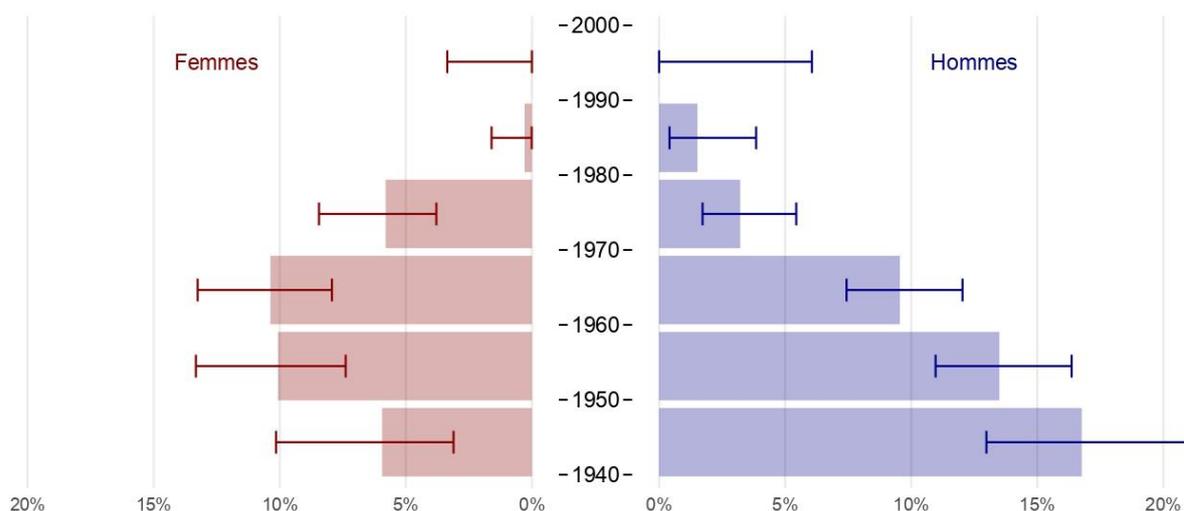


Figure 24: Proportion de positifs et intervalle de confiance à 95% (selon la classification 3) en fonction de la décennie de naissance et du sexe.

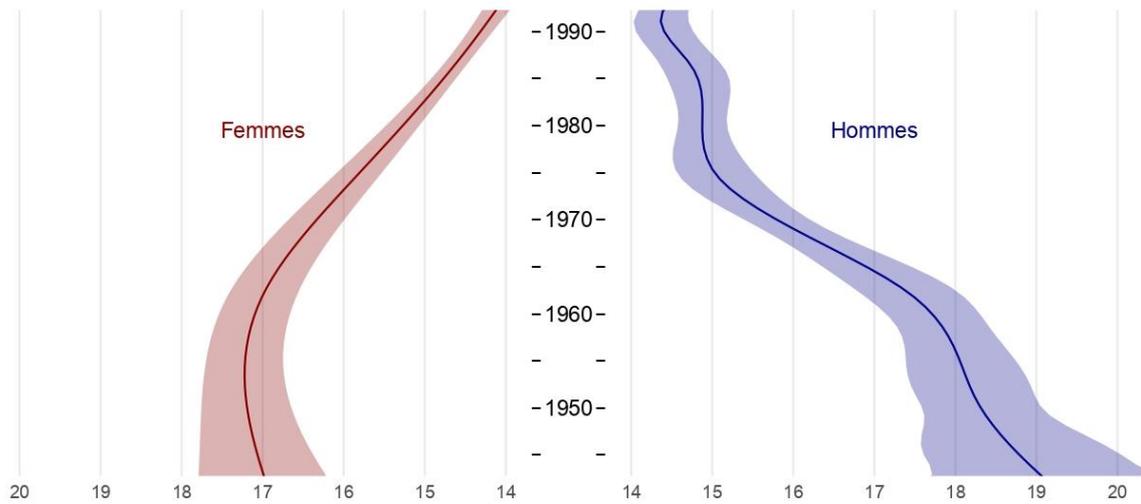


Figure 25: Titre moyen d'anticorps et intervalle de confiance à 95% (selon la classification 3) en fonction de l'année de naissance et du sexe

Répartition géographique

La population issue de PRIAM est l'échantillon français le plus étendu géographiquement puisqu'il couvre 4 régions. Nous avons observé des différences significatives dans la séroprévalence entre les différentes régions (alors qu'il n'y a pas de différence significative dans la répartition de l'âge des participants cf. Figure 19). On observe des différences significatives presque entre toutes les régions sauf Midi-Pyrénées vs Corse et Auvergne-Loire vs PACA. Ces différences se retrouvent à la fois au niveau du pourcentage de positifs (Figure 23) et du titre moyen d'anticorps (Figure 24).

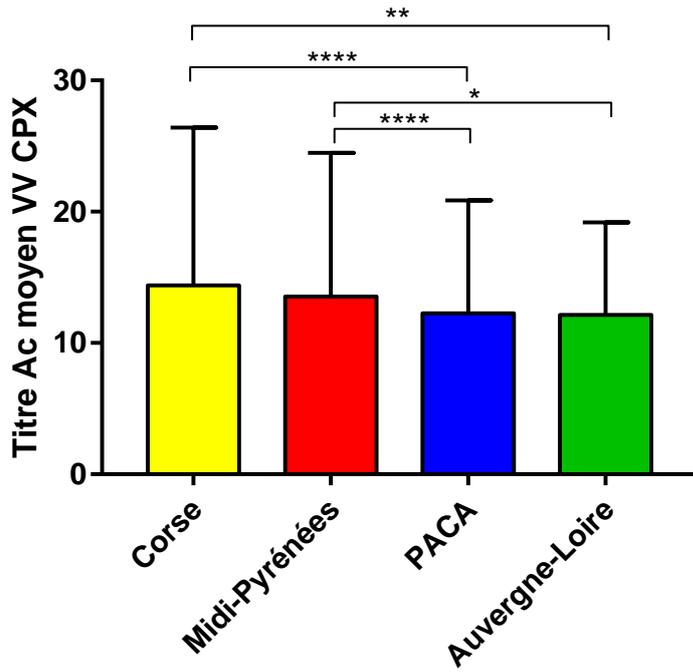
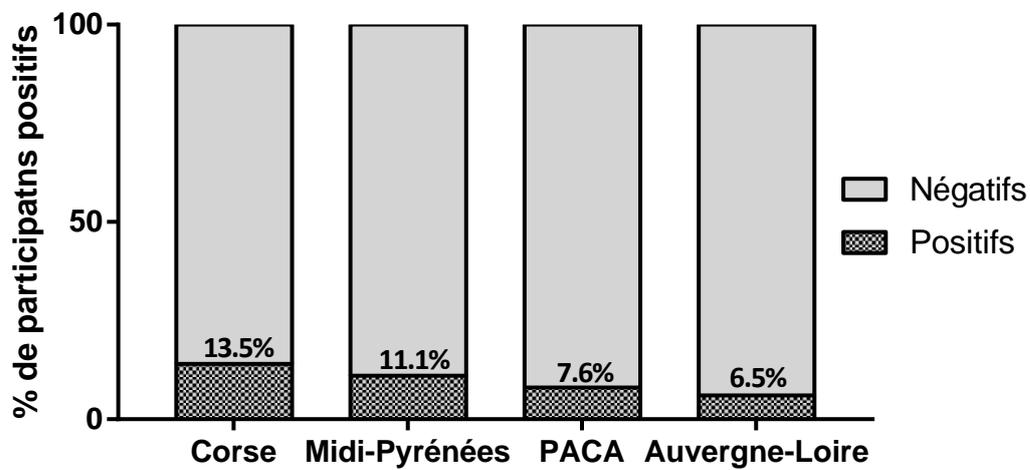


Figure 26: Titres d'anticorps (moyenne titre vaccine + Cowpox cf. classification 3) en fonction de la région de prélèvement. Test de Mann-Whitney.



	Corse	Midi-Pyrénées	PACA	Auvergne-Loire
Corse	-			
Midi-Pyrénées	0.421	-		
PACA	0.030	0.002	-	
Auvergne-Loire	0.012	0.001	0.400	-

Figure 27: Pourcentage de participants positifs (selon classification 3) en fonction de la région de prélèvement. Tableau des p-values associé (Fisher exact test).

Grâce aux codes postaux renseignés par les participants nous avons pu établir des cartes de séroprévalence départementales (pourcentage de positifs selon la classification 3). La Figure 25 présente toutes les données confondues et la Figure 26 détaille la répartition géographique de la séroprévalence par tranche d'âge. Sur les cartes « nées avant 1960 » et « nées entre 1960 et 1977 » il est visible que la séroprévalence n'est pas équivalente entre les différents départements.

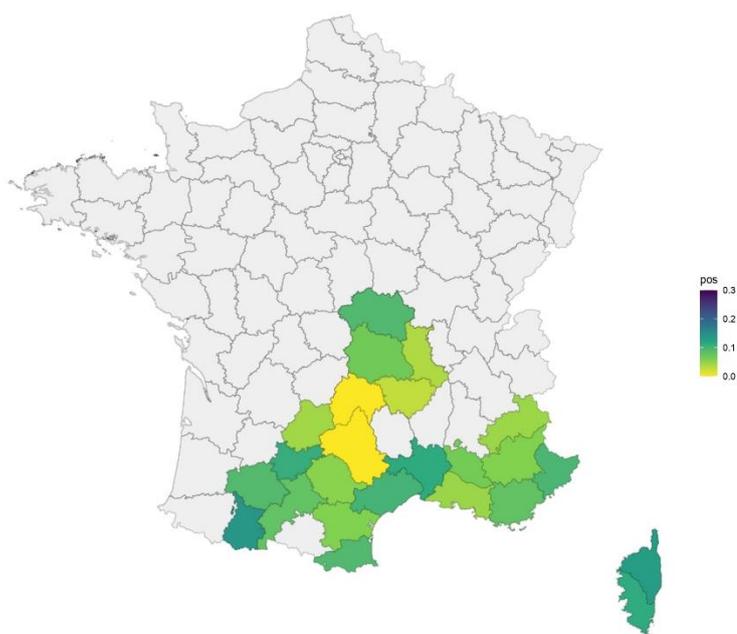


Figure 28: Répartition géographique de la séroprévalence (pourcentage de positifs selon classification 3) pour la population PRIAM, ensemble des participants.

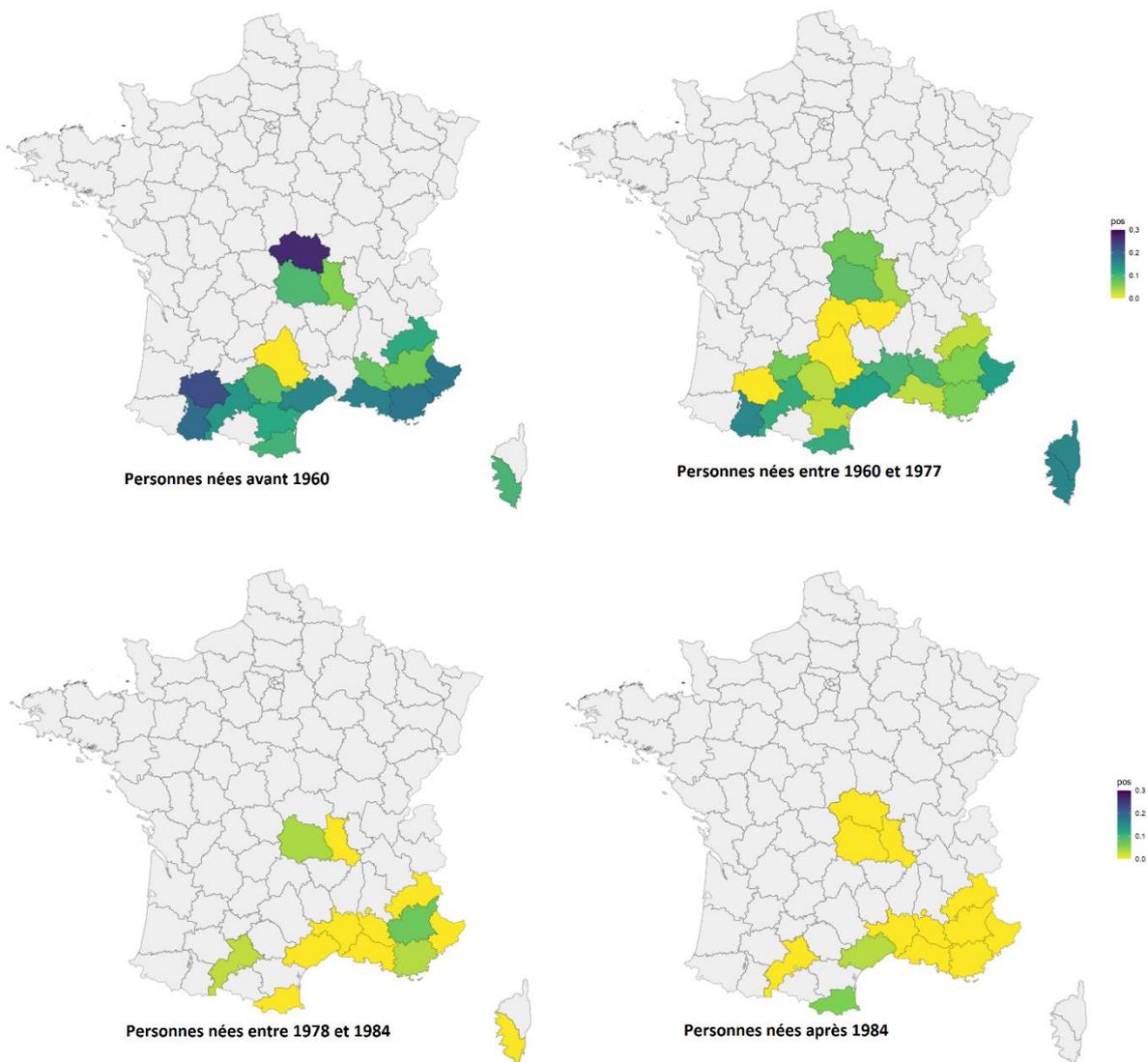


Figure 29: Répartition géographique de la séroprévalence (pourcentage de positifs selon classification 3) pour la population PRIAM par tranche d'âge.

Impact environnemental

Comme pour la population Corse, nous disposons pour PRIAM d'un questionnaire très poussé sur les lieux de vie. Ce questionnaire a été initialement conçu pour l'étude des arboviroses dans le pourtour méditerranéen (Auvergne-Loire servant de région contrôle). Pour chaque paramètre du questionnaire nous avons calculé le facteur multiplicatif de la moyenne géométrique du titre afin de déterminer si certains paramètres influençaient positivement ou négativement la séro-neutralisation anti-Orthopoxvirus. Comme pour la population Corse, une fois les données ajustées sur l'âge, nous n'avons rien trouvé de significatif. Nous avons également utilisé une base de données de l'Insee parue en 2019 qui classe les communes (code postaux) en 5 catégories selon le « degré de ruralité » (Table 9). Cette base de données est disponible à cette adresse internet : <https://www.insee.fr/fr/statistiques/3715314>

Cependant cette analyse non plus n'a rien montré de significatif.

		Densité (habitants /km²)	Part de la population régionale (en %)	Évolution de la population entre 1999 et 2014 (en %)	Éloignement au panier de vie courante (en minutes)	Part des ménages propriétaires de leur résidence principale (en %)	Part d'agriculteurs exploitants (en %)	Part de cadres, et professions intellectuelles supérieures (en %)	Part de retraités (en %)
Urbain		376	77,3	10,7	3,2	54	0,2	8,0	22
Rural		33	22,7	19,2	7,7	77	2,4	5,1	23
dont	rural « éloigné »	9	1,6	-1,9	13,3	79	8,1	2,6	33
	rural « très peu dense »	16	1,8	14,3	10,8	81	4,6	3,9	26
	rural « bourg »	26	2,4	2,3	7,4	68	2,5	3,2	30
	rural « couronne éloignée »	56	3,6	25,2	6,5	77	1,8	4,8	22
	rural « périphérique »	61	13,0	25,5	6,9	78	1,5	5,9	21
Auvergne-Rhône-Alpes		112	100,0	12,5	4,2	59	0,7	7,3	22
France métropolitaine		118	-	9,5	4,0	58	0,7	7,5	22

Sources : Insee, Recensement de la population 2014, Base permanente des équipements (BPE)

Table 10: règle de classification des commune selon l'Insee.

Discussion

Quelques études observationnelles historiques ou utilisant des modèles ont montré qu'un schéma vaccinal (2 injections à 10 ans d'écart) conférait une immunité et une protection contre les formes graves et mortelles de la variole durant des décennies.[193,194] Cependant peu d'études épidémiologiques humaines sur le taux d'anticorps anti-vaccin séro-neutralisant sont disponibles dans la littérature. La principale est une étude menée par Taub *et al.* aux Etats Unis en 2008 (pour rappel la souche vaccinale utilisée aux Etats Unis était la souche NYCOBH).[172] Comme nous, les auteurs confirment que les anticorps anti-vaccin persistent sur le très long terme. Le sujet le plus âgé de leur cohorte conservait un taux protecteur[195] 88 ans après vaccination. A noter également que leur cohorte intégrait des personnes guéries de la variole et qu'il n'y avait pas de différence significative entre les taux d'anticorps séroneutralisant anti-vaccin générés par la vaccine ou par la variole. Le recrutement des participant dans l'étude Américaine s'est fait en fonction du statut vaccinal contrairement à notre méthode où nous avons testé un panel de la population sans connaître leur statut vaccinal antivariolique. Dans l'étude de Taub *et al.* 59% des sujets vaccinés présentaient des taux d'anticorps élevés (entre 1:256 et 1:512) et seulement 1.4% ne présentaient pas de taux mesurables. Tous leurs patients non vaccinés présentaient des taux indétectable ou faible (<1:16).

Au début des années 2000 l'Israël a revacciné plus de 21 000 personnes contre la variole (médecins, infirmiers, militaires etc...) avec la souche Lister afin de créer des réserves d'immunoglobulines et de faire face à une éventuellement attaque bioterroriste. Durant une étude préliminaire on peut déduire de leurs données que 81% des participants présentaient une immunité préexistante avant re-vaccination (anticorps mesurés par technique ELISA). Le recrutement des personnes a cette fois été effectué sur « supposition de vaccination » via leur âge, leur statut militaire ou la présence de cicatrice d'inoculation.[196,197]

Enfin, une étude épidémiologique menée en Italie (souche Lister) utilisant la technique ELISA rapporte une séroprévalence augmentant avec l'âge des participants. Une cassure au moment de l'arrêt de la vaccination en Italie (1975/1980) est nettement plus visible que dans notre étude. Le pourcentage de personnes positives parmi les personnes en âge d'avoir été vaccinés oscille entre 49 et 82% selon la tranche d'âge.[168]

Les données de la littérature mettent donc en évidence une importante différence de séroprévalence entre la population vaccinée Américaine/Israélienne et Italienne et la population supposée vaccinée Française (puisque même pour les patients nés vers 1960 on atteint au mieux 30% de sujet positifs dans les populations Corse et PRIAM).

CHAPITRE IV:

DISCUSSION, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'émergence et la réémergence des pathogènes viraux sont en constante augmentation et constituent un problème majeur de santé publique. Parmi les poxviridae et plus particulièrement au sein du genre *Orthopoxvirus*, le virus de la variole présentant une spécificité d'hôte pour l'homme est hautement pathogène. Véritable fléau de l'humanité jusqu'au milieu du XX^{ème} siècle, la variole reste à ce jour la seule maladie humaine complètement éradiquée grâce à l'efficacité de la vaccination associée à l'absence de réservoir animal. Du fait de cette éradication précoce dans l'histoire de la production scientifique, la quantité de connaissances accumulées sur les poxvirus est limitée. Les médecins actuellement en activité ne connaissent cette pathologie qu'à travers la littérature. En cas d'émergence ou de réémergence d'un poxvirus « variole-like » un retard au diagnostic pourrait survenir. De plus, les personnes atteintes de la variole sont contagieuses par voie aérienne 4 à 6 jours avant l'apparition des pustules. La phase initiale étant souvent aspécifique (fièvre) et en raison de la mobilité des populations, une diffusion rapide du virus serait possible. Pour exemple rappelons qu'il y a deux ans, deux personnes ont été contaminées à quelques jours d'écart par du monkeypox virus en Afrique, ont pu entrer sur le sol anglais et que l'une d'elles a contaminé une tierce personne avant qu'un diagnostic soit posé.

Concernant les moyens de lutte dont nous disposons contre la variole et les orthopoxviroses, des progrès ont été faits depuis les années 1970. Des vaccins de 2^{ème} et 3^{ème} génération ont été développés et testés chez l'homme afin de réduire les effets indésirables graves et sécuriser la vaccination antivariolique chez les personnes fragiles. Pour le traitement curatif, le cidofovir (inhibiteur d'ADN polymérase) a une activité anti-orthopoxvirale démontrée chez l'animal [198,199]. Le cidofovir ou sa prodrogue le brincidofovir peuvent être utilisés chez l'homme dans le traitement d'infections à adénovirus[200] ou cytomégalovirus[201] notamment. Leur utilisation dans les cas d'orthopoxviroses humaines reste sporadique mais communément admise.[83,85,202,203] La molécule fait d'ailleurs partie des stocks nationaux stratégiques des grands pays développés. Enfin, en 2018 une nouvelle molécule a obtenu une autorisation de mise sur le marché aux Etats Unis : le tecovirimat. Cette molécule cible et inhibe l'activité de la protéine VP37 des orthopoxvirus (hautement conservée dans tous les membres du genre) et bloque son interaction avec la GTPase Rab9 cellulaire et TIP47 empêchant ainsi la formation de virions enveloppés nécessaires à la propagation du virus à d'autres cellules.[87,204,205]

Il existe également des immunoglobulines anti-vaccine issues de plasma hyper-immun de donneurs vaccinés ou développées par des laboratoires. Elles possèdent à ce jour une indication restreinte aux complications cutanées de la vaccination.

Les études génomiques tendent à montrer que la famille des *Poxviridae* est probablement aussi ancienne et diversifiée que le monde animal. Le risque d'émergence des poxvirus chez l'homme découle probablement en partie de la complexité de leur génome. En effet, le génome poxviral code pour plus de 250 protéines, incluant la machinerie qui permet à ces virus d'effectuer à la fois une transcription et une répllication cytoplasmiques (ARN polymérase dépendante de l'ADN, hélicase, uracile ADN glycosylase, ADN ligase etc...).[31] Bien que des facteurs nucléaires puissent être nécessaires pour la transcription intermédiaire, le cycle de vie complexe des poxvirus se déroule en grande partie dans le cytoplasme.[206] Les poxvirus ont donc évolué vers des moyens sophistiqués d'utilisation des cellules hôtes pour optimiser leur cycle de propagation et assurer une production efficace de virions infectieux. Ainsi, malgré la stabilité de leur génome à ADN et le faible risque mutagène, l'indépendance répllicative des poxvirus est un argument fort en faveur d'un risque d'émergence.[207] Parmi les poxvirus on distingue génétiquement ceux dit « à haut GC% » qui regroupent principalement les genres *Parapoxvirus* et le *Molluscipoxvirus (Molluscum contagiosum)*. Sans connaître la raison précise de cette évolution génomique différente, on observe que ces virus infectent l'homme (hôte exclusif pour le *Molluscum contagiosum* et hôte accidentel pour les *Parapoxvirus*) mais leur symptomatologie étant bénigne chez l'immunocompétent, la menace infectieuse semble réduite. Au sein de tous les autres genres, dit à « bas GC% », les *Orthopoxvirus*, par leur proximité avec la variole, ont le potentiel d'émergence le plus clairement établi. Pour les autres genres à « bas GC% », les génomes étant très diversifiés, le risque d'émergence chez l'homme est difficile à évaluer. A titre d'exemple, le Tanapox virus (genre *Yatapoxvirus* infectant les primates) a été rapporté pour la première fois lors d'une épidémie autour de la rivière Tana (Kenya) en 1957. A la suite de cette épidémie la plupart des cas rapportés sont restés cantonnés en Afrique centrale ou en Afrique de l'Est (hormis 5 cas d'importation aux Etats-Unis). Le Tanapox virus démontre que d'autres poxvirus, génétiquement éloignés des genres *Ortho-* et *Para-poxvirus* peuvent infecter l'homme.[93,94]

Depuis 1980, avec l'arrêt de la vaccination antivariolique, l'immunité globale des populations diminue. Cela s'associe à l'émergence chez l'homme de poxvirus zoonotiques avec une spécificité d'hôte élargie. C'est le cas du Monkeypox virus particulièrement inquiétant en Afrique, du Buffalopox virus et du Camelpox virus qui sévissent en Asie et du cowpox virus de répartition ubiquitaire. On sait maintenant que les changements impactant le climat et la biodiversité créent des conditions facilitant l'émergence d'agent pathogènes zoonotiques.[208–210] Parallèlement la littérature rapporte très régulièrement la découverte de nouveaux poxvirus zoonotiques encore inconnus y compris chez les

insectes. Au total, malgré une longue co-évolution des poxvirus avec leurs hôtes, le risque de (ré)émergence naturelle ou intentionnelle de ces virus est réel. Il y a nécessité à étendre nos connaissances sur les poxvirus (mieux connaître leur épidémiologie, leurs réservoirs etc...) puisque pour le moment ce risque est difficilement prévisible. Durant ce travail nous avons donc proposé de :

- De développer un outil de détection moléculaire utile pour la compréhension de l'écologie des poxvirus et leur diagnostic
- De réaliser une étude de séroprévalence pour faire un état des lieux de l'immunité de plusieurs populations

En manipulant les données génomiques disponibles nous nous sommes rendu compte de la complexité de la situation. Pour un gène d'une espèce donnée, le gène homologue chez les autres genres (ou espèces) ne porte pas la même appellation. Parfois pour certains genre le génome n'est pas cartographié et, au sein d'une même espèce comme le cowpox virus par exemple, on observe une grande variabilité génétique. Récupérer les séquences des gènes potentiellement conservés afin de réaliser des alignements a donc été un travail de recherche génomique fastidieux. Un important travail d'uniformisation et de taxonomie génomique pour la famille des *Poxviridae* mériterait d'être envisagé. Conformément à notre hypothèse de départ, une étude approfondie des génomes nous a permis de montrer qu'il existe bien une vingtaine de gènes conservés entre les *Entomopoxviridae* et les *Chordopoxviridae*. En revanche une seule de ces séquences était suffisamment conservée pour tenter la mise au point d'un système de PCR en temps réel. Malgré les difficultés techniques de développement, ce système est performant et a le potentiel de permettre la découverte de nouveaux genres de poxvirus. Il possède un avantage technique : il utilise trois amorces et quatre sondes multiplexées. Les amorces sont « pan-pox », en revanche les sondes sont spécifiques de « sous-groupes » : *Entomopoxviridae*, haut GC%, *Avipoxvirus*, et autres *Chordopoxviridae*. Ainsi en cas de positivité il est possible d'avoir une première idée du poxvirus trouvé en effectuant une seconde qPCR en séparant les quatre sondes. Cette subtilité technique peut aussi être utilisée lors de recherche ciblées. Citons par exemple le cas des *Avipoxvirus* qui est le genre le plus diversifié et pour lequel il n'existe pas de système de PCR en temps réel pan-genre. On peut donc imaginer une utilisation du système pan-pox réduit avec la sonde spécifique du genre *Avipoxvirus* en ornithologie par exemple. De plus, le séquençage de la région amplifiée permet de différencier les principaux genres (Figure 7), cela permettrait donc à des laboratoires n'ayant pas accès à des techniques de séquençage profond d'avoir une identification plus fine rapidement. Durant ce travail de thèse, l'utilisation « sans *a priori* » du système « pan-pox » sur des milliers d'échantillons humains et arthropodes nous a permis de détecter quelques poxvirus. Cela a été confirmé par des éléments cliniques ou par un système spécifique.

Cependant, le nombre limité d'échantillon testés dans ce travail ne nous a pas permis de trouver de « nouveaux » poxvirus ou réservoir. L'utilisation de ce système couplé à des plateformes automatisées de biologie moléculaire devrait permettre de tester des centaines de milliers d'échantillons. On peut imaginer pour cela des collaborations avec différents corps scientifiques (médecine vétérinaire, entomologie, sciences environnementales, écologie etc...) afin de créer un réseau de surveillance des potentiels réservoirs. Dans cette perspective le système est actuellement utilisé par un laboratoire de virologie environnementale en Finlande.

La seconde partie de ce travail est une étude de séroprévalence. Nous avons mesuré le titre d'anticorps séro-neutralisant les virus de la vaccine et du cowpox chez plusieurs populations humaines. Notre hypothèse de départ supposait que l'immunité des populations serait constituée à la fois par l'immunité vaccinale et par une immunité acquise en cas d'exposition naturelle aux orthopoxvirus. De plus, le CNR des orthopoxvirus observait de manière empirique une disparité géographique dans la provenance des cas adressés au CNR. Initialement nous supposons donc qu'il y avait un impact environnemental sur la séroprévalence. L'immunité croisée parmi les virus du genre *Orthopoxvirus* étant une idée déjà bien admise et prouvée par plusieurs publications et observations scientifiques (surtout entre vaccine/varirole et Monkeypox) l'utilisation de la Vaccine et du cowpox virus devait donc confirmer cette immunité croisée chez l'homme à grande échelle.

Nos résultats montrent qu'il y a bien une composante vaccinale puisque la séro-prévalence est plus importante chez les sujets nés avant 1980. En revanche nous n'avons trouvé quasiment aucun positif chez les personnes nées après 1980 (ou avec des titres faibles) dans les populations testées. Ceci suggère que la circulation des orthopoxvirus chez l'homme est réduite en France, ainsi que dans les autres pays testés : Laos, Bolivie et Mali. On observe des disparités géographiques de séroprévalence à l'échelle internationale (qui peuvent s'expliquer par les différentes stratégies vaccinales de l'OMS) mais également au niveau national et régional en France sans qu'aucun facteur environnemental n'ait pu être identifié dans nos études. Concernant l'immunité croisée, nous confirmons bien que les anticorps générés par la vaccination antivariolique séro-neutralisent également le cowpox virus (99% des participants présentent des titres concordants dans les deux tests). Notre étude comporte deux biais principaux. Le premier est le faible nombre de personnes testées : nous n'avons testé que 2080 personnes nées après 1980 (dont seulement 992 en France). Au vu de la rareté de ces infections des études sur des effectifs plus importants devraient être envisagées. La seconde limitation importante de notre étude est de ne pas avoir pu tester de serums issus de patients infectés par le cowpox virus. En effet les données sur la longévité de l'immunité générée par une orthopoxvirose naturelle (hors varirole) sont rares voire inexistantes. Les études sur le monkeypox virus chez l'homme se concentrent principalement sur la séroprévalence des populations et non sur la longévité. La vaccination

antivariolique tend à reproduire une infection naturelle par scarification cutanée et non par injection. On peut supposer que l'immunité générée par une orthopoxvirose naturelle ou par vaccination est équivalente. Cependant, rigoureusement, il faudrait tester des serums issus de patients ayant eu une infection par cowpox il y a plusieurs années afin d'être certain que cette orthopoxvirose ubiquitaire et à large spectre d'hôte génère des anticorps séroneutralisants sur le long terme.

Concernant nos études de séroprévalence nous avons observé une génération d'anticorps par la vaccination antivariolique à long terme puisque des personnes vaccinées dans les années 1930/1940 séro-neutralisent encore aujourd'hui. Cette immunité à très long terme a déjà été décrite dans la littérature chez l'homme et également explorée d'un point de vue immunologique par la découverte de plasmocytes « mémoire à très long terme » au niveau splénique spécifique de la vaccine. Cette capacité a donné lieu à des études de vectorisation utilisant la vaccine. En effet la souche MVA (Modified Vaccine Ankara) est une souche vaccinale de 3^{ème} génération tellement atténué qu'elle a une capacité d'infection cellulaire mais ne peut se répliquer dans la majorité des cellules de mammifères et son utilisation comme souche vaccinale chez l'homme ne génère quasiment aucun effet indésirable. Lors de son processus d'atténuation, cette souche a perdu environ 30% du génome original, ce qui laisse de la place pour l'insertion de génome étranger. Il existe beaucoup d'essais récents chez l'animal de vaccin vectorisés utilisant des souches de vaccines (MVA[211] et souche Tiantian). Ces essais rapportent des résultats prometteurs pour les virus Zika, Chikungunya[212–214], le virus de l'hépatite B[215], le virus de la fièvre de Lassa[216] etc... On peut noter que certains essais de vaccins vectorisés par la vaccine ont été réalisés chez l'homme également avec succès pour le MERS-CoV[217] et le virus Ebola[218]. Le suivi maximal pour les études animales est d'un an et demi et pour les études chez l'homme (qui sont récentes) seulement 8 mois. Nous n'avons donc pas encore de donnée sur la longévité des anticorps induits par la vaccine utilisée comme vecteur vaccinal.

Dans nos études de séroprévalence, le taux de personnes positives dans nos populations testées de donneurs de sang françaises s'est révélé surprenamment bas par rapport à ce qui a déjà été rapporté dans la littérature. Pour des raisons inconnues (différence de technique vaccinale, différence génétique des populations etc...) il est possible qu'une partie des sujets ait perdu son immunité. La différence de séroprévalence entre les personnes nées avant 1960 et les personnes nées après, laisse également supposer que la politique vaccinale française à cette époque n'était pas aussi performante qu'on le pensait, avec des disparités territoriales. En effet la variole avait disparu d'Europe depuis la première guerre mondiale et les épidémies générées par les cas importés dans les années 1950 montrent que la couverture vaccinale avait déjà commencé à s'étioler. Au vu des effets indésirables de la vaccination, de la disparition de la variole en France après 1950 et de nos données, il est probable qu'un « relâchement » progressif de la primo-vaccination et/ou des rappels ait eu lieu bien avant les années

1975. Pour confirmer ou infirmer cette hypothèse, un travail de recherche « historique » sur le nombre de doses distribuées, la couverture vaccinale par région etc... pourrait être effectué. Durant ce travail nous avons eu accès à des bulletins de l'INSERM sur la statistique vaccinale française datant de 1964. Le rapport concluait à ce moment-là que la couverture vaccinale était de 71%. A cette époque, la principale diminution de la couverture vaccinale est due à l'abstention des médecins et des patients : on préférerait ne « plus administrer un vaccin qui tue contre une maladie qui a disparue ». Plus tard en 2001, suite aux attaques bioterroristes, ces bulletins ont été repris par Santé Publique France pour réévaluer le nombre de sujets vaccinés (Table 5). Le rapport conclut à une couverture vaccinale de la population totale de 60%. Nos résultats de séro-neutralisation font cependant état d'une prévalence beaucoup plus basse. Chez les personnes nées avant 1960 on atteint au maximum 30% de positifs dans la population Corse mais dans l'étude PRIAM, plus globale, on retrouve moins de 15% de positifs. L'étude des américains Taub *et al.* [172] rapporte que 97% des sujets vaccinés conservaient un titre d'anticorps séro-neutralisant élevé durant plusieurs décennies. Leur protocole est semblable au notre et la quantité de virus utilisées pour leurs tests est même supérieure à la nôtre. Il est communément « admis » que les 4 souches homologuées par l'OMS qui ont été distribuées dans le monde présentent des performances sérologiques et cliniques similaires. Cependant cela a été principalement basé sur une étude multicentrique datant de 1977 [219] qui a évalué plusieurs techniques de vaccination et plusieurs souches (dont Lister et NYCBOH) chez les enfants de moins de 10 ans uniquement. Il n'y a donc que quelques années (voire moins) de recul sur la vaccination. De plus l'étude présente des biais méthodologiques dans la composition des groupes de comparaison. Des études immunologiques plus récentes ont révélé que la présence de lymphocytes B à mémoire à très long terme spléniques après la vaccination antivariolique expliquant la très grande longévité des anticorps anti-*Orthopoxvirus*. [165,169,173,174] Ces études arrivent à la même conclusion et pourtant proviennent à la fois d'Europe et des Etats Unis ; les personnes incluses ont donc été vaccinées par les deux type de souches. Si on ne peut pas expliquer la différence observée entre notre étude et celle de Taub *et al.* par la nature du vaccin il restes deux hypothèse principales non exclusives : (i) soit le nombre de personnes vaccinées dans la population française est effectivement plus bas que prévu. Ceci est probable mais pourrait être insuffisant pour expliquer l'ampleur de la différence observée. (ii) soit une partie de la population vaccinée a perdu ses anticorps dans une proportion supérieure à celle observée dans l'étude américaine.

Afin d'éclaircir ce point, il serait intéressant de refaire une étude de séro-neutralisation en France en incluant des personnes dont on connait le statut vaccinal et des personnes âgées (nées avant 1950/1960) avec des données sociodémographiques poussées.

En cas d'attaque bioterroriste à la variole, le très faible taux d'immunisation de la population française la rendrait globalement vulnérable. En effet selon les résultats de la population PRIAM, seulement 8% de la population des donneurs de sang présentent des anticorps séro-neutralisants, principalement les personnes nées avant 1960. Le dernier plan de réponse à une menace terroriste de variole en France émis par le ministère de la santé date de 2006 avec une révision par le Haut Conseil de Santé Publique en 2012. Dans le cadre de ce travail nous avons également récupéré d'autres données grâce aux personnes de Santé Publique France sur le plan de réponse en cas d'une attaque utilisant la variole. Il existe des stocks stratégiques de vaccins de première génération produits dans les années 1970 suffisants pour couvrir l'ensemble de la population (environ 82 millions de doses). Il est également prévu en moindre quantité des vaccins de 3^{ème} génération priorités pour les équipes nationales dédiées, les sujets jeunes nés après 1979 et les sujets avec contre-indications au vaccin de première génération. Plusieurs situations sont envisagées mais en cas d'attaque catastrophe l'ensemble de la population devrait être (re)vacciné. Il faudrait alors prendre en compte le risque d'effets indésirables graves liés à l'utilisation des vaccins de première génération. Dans un rapport de Santé Publique France de 2001 D. Lévy-Bruhl et N. Guérin estiment que la proportion d'effets indésirables graves serait de 0.07% parmi les primo-vaccinés et 0.005% parmi les revaccinés. Au total une mortalité de 0.005‰ serait à craindre sachant que ces prévisions se basent sur une couverture vaccinale théorique de 60% de la population (estimation de la couverture vaccinale globale française basée sur des rapports d'enquête départementales de l'INSERM datant des années 1960). Avec les données générées dans ce travail on sait qu'aujourd'hui la proportion de personnes ne possédant pas d'anticorps serait plutôt proche de 90%, ce qui donnerait une incidence de mortalité par vaccination d'environ 0.014‰, soit environ 1000 individus. Pour lutter contre ces effets indésirables, des immunoglobulines anti-vaccin pourraient être utilisées (efficacité dans les formes graves cutanées uniquement) et le rapport du HCSP de 2012 mentionne que l'Etat s'est doté d'un stock d'un même lot d'Immunoglobulines anti-vaccin du laboratoire Cangene qui permettrait de traiter 80 à 90 personnes. Enfin, concernant le traitement curatif, le rapport recommande avant tout un traitement symptomatique. Les molécules antivirales cidofovir et tecovirimat sont citées mais les stocks précis sont classés secret défense.

RÉFÉRENCES

1. Babkin IV, Babkina IN. Molecular Dating in the Evolution of Vertebrate Poxviruses. *Intervirology* **2011**; 54:253–260.
2. Spaulding WB. Donald R. Hopkins: Princes and Peasants: Smallpox in History. *Can Bull Med Hist* **1984**; 1:132–134.
3. Macaulay TB. *The History of England from the Accession of James II.* 1848.
4. Ruffer MA. Pathological note on the royal mummies of the Cairo Museum. *Stud. Paleopathol. Egypt.* 1921; :166–178.
5. Littman RJ, Littman ML. The Athenian Plague: Smallpox. *Trans Proc Am Philol Assoc* **1969**; 100:261.
6. Virilouvet C, Tran N, Faure P. *Rome, cité universelle de César à Caracalla 70 av J.-C.-212 apr. J.-C.* Belin. 2018.
7. Fenner F, Henderson DA, Arita I, Jezek Z, Ladnyi ID, Organization WH. *Smallpox and its eradication.* Geneva: Geneva : World Health Organization, 1988.
8. Duffy J. Smallpox and the Indians in the American colonies. *Bull Hist Med* **1951**; 25:324–341.
9. Fitz R. Review of The Effect of Smallpox on the Destiny of the Amerindian. *William Mary Q* **1946**; 3:454–456.
10. Mann CC. *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* **1984**; 3:583–592.
12. Jean-François Guégan, Marc Choisy. *Introduction a l'épidémiologie intégrative des maladies infectieuses et parasitaires.* De Boeck Supérieur. 2008.
13. J. Austruy. *Origine de la vaccine.* 1874;
14. Cartwright K. From Jenner to modern smallpox vaccines. *Occup Med* **2005**; 55:563–563.
15. Riedel S. Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. *Proc Bayl Univ Med Cent* **2005**; 18:21–25.
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 SY. Edward Jenner (1749-1823): conqueror of smallpox. *Singapore Med J* **2004**; 45:507–508.
18. Antoine G, Scheiflinger F, Dorner F, Falkner FG. The Complete Genomic Sequence of the Modified Vaccinia Ankara Strain: Comparison with Other Orthopoxviruses. *Virology* **1998**; 244:365–396.

19. Belongia EA, Naleway AL. Smallpox vaccine: the good, the bad, and the ugly. *Clin Med Res* **2003**; 1:87–92.
20. Schrick L, Tausch SH, Dabrowski PW, Damaso CR, Esparza J, Nitsche A. An Early American Smallpox Vaccine Based on Horsepox. *N Engl J Med* **2017**; 377:1491–1492.
21. Biraben J-N. La diffusion de la vaccination en France au XIXe siècle. *Ann Bretagne Pays Ouest* **1979**; 86:265–276.
22. Marenco C. ‘Majeur et vacciné’: idéologie et prévention. *Sci Soc Santé* **1984**; 2:135–165.
23. Ilic M, Ilic I. The last major outbreak of smallpox (Yugoslavia, 1972): The importance of historical reminders. *Travel Med Infect Dis* **2017**; 17:69–70.
24. Daniel TM. The history of tuberculosis. *Respir Med* **2006**; 100:1862–1870.
25. Buller RM, Fenner F. Poxviruses. **2009**; :387–408.
26. Essbauer S, Meyer H, Porsch-Özcürümez M, Pfeffer M. Long-Lasting Stability of Vaccinia Virus (Orthopoxvirus) in Food and Environmental Samples. *Zoonoses Public Health* **2007**; 54:118–124.
27. Walsh D. Poxviruses: Slipping and sliding through transcription and translation. *PLOS Pathog* **2017**; 13:e1006634.
28. Karlstam E, Tarjan M, Sundell E, Scheltdorf A. Collaborative Pathology in a Case of Human Pox Virus Dermatitis. *J Comp Pathol* **2018**; 158:137.
29. Eaglesham JB, Pan Y, Kupper TS, Kranzusch PJ. Viral and metazoan poxins are cGAMP-specific nucleases that restrict cGAS–STING signalling. *Nature* **2019**; Available at: <https://doi.org/10.1038/s41586-019-0928-6>.
30. Pauli G, Blümel J, Burger R, et al. Orthopox Viruses: Infections in Humans. *Transfus Med Hemotherapy* **2010**; 37:351–364.
31. Moss B. Poxvirus DNA Replication. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2013**; 5:a010199–a010199.
32. Zhao G, Droit L, Tesh RB, et al. The Genome of Yoka poxvirus. *J Virol* **2011**; :JVI.00637-11.
33. Theze J, Takatsuka J, Li Z, 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* **2013**; 87:7992–8003.
34. Tu S-L, Nakazawa Y, Gao J, et al. Characterization of Eptesipoxvirus, a novel poxvirus from a microchiropteran bat. *Virus Genes* **2017**; :1–12.
35. Ibrahim MS, Antwerpen M, Georgi E, Vette P, Zoeller G, Meyer H. Complete Genome Sequence of the Embu Virus Strain SPAn880. *Genome Announc* **2014**; 2:e01155-14.
36. Afonso PP, Silva PM, Schnellrath LC, et al. Biological characterization and next-generation genome sequencing of the unclassified Cotia virus SPAn232 (Poxviridae). *J Virol* **2012**; :JVI.07162-11.

37. O’Dea MA, Tu S-L, Pang S, De Ridder T, Jackson B, Upton C. Genomic characterization of a novel poxvirus from a flying fox: evidence for a new genus? *J Gen Virol* **2016**; 97:2363–2375.
38. Stephen AA, Leone AM, Toplon DE, Archer LL, Wellehan JFX. 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* **2016**; 30:378–385.
39. Lawson B, Lachish S, Colvile KM, et al. Emergence of a Novel Avian Pox Disease in British Tit Species. *PLoS ONE* **2012**; 7:e40176.
40. Tuomi PA, Murray MJ, Garner MM, 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* **2014**; 50:607–615.
41. Hora AS, Taniwaki SA, Martins NB, et al. Genomic Analysis of Novel Poxvirus Brazilian Porcupinepox Virus, Brazil, 2019. *Emerg Infect Dis* **2021**; 27:1177–1180.
42. Pandey GS, Inoue N, Ohshima K, Okada K, Chihaya Y, Fujimoto Y. Poxvirus infection in Nile crocodiles (*Crocodylus niloticus*). *Res Vet Sci* **1990**; 49:171–176.
43. Ramos M, Coutinho S, Matushima E, Sinhorini I. Poxvirus dermatitis outbreak in farmed Brazilian caimans (*Caiman crocodilus yacare*). *Aust Vet J* **2002**; 80:371–372.
44. Sarker S, Hannon C, Athukorala A, Bielefeldt-Ohmann H. Emergence of a Novel Pathogenic Poxvirus Infection in the Endangered Green Sea Turtle (*Chelonia mydas*) Highlights a Key Threatening Process. *Viruses* **2021**; 13:219.
45. Gjessing MC, Yutin N, Tengs T, et al. Salmon gill poxvirus, the deepest representative of the Chordopoxvirinae. *J Virol* **2015**; :JVI.01174-15.
46. Gjessing MC, Thoen E, Tengs T, Skotheim SA, Dale OB. Salmon gill poxvirus, a recently characterized infectious agent of multifactorial gill disease in freshwater- and seawater-reared Atlantic salmon. *J Fish Dis* **2017**; 40:1253–1265.
47. Nylund A, Watanabe K, Nylund S, et al. Morphogenesis of salmonid gill poxvirus associated with proliferative gill disease in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway. *Arch Virol* **2008**; 153:1299–1309.
48. Baxby D. Poxvirus hosts and reservoirs. *Arch Virol* **1977**; 55:169–179.
49. Meadows KP, Tying SK, Pavia AT, Rallis TM. Resolution of Recalcitrant Molluscum Contagiosum Virus Lesions in Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients Treated With Cidofovir. *Arch Dermatol* **1997**; 133:987–990.
50. 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* **2017**; 98:1073–1079.
51. Trama JP, Adelson ME, Mordechai E. Identification and genotyping of molluscum contagiosum virus from genital swab samples by real-time PCR and Pyrosequencing. *J Clin Virol* **2007**; 40:325–329.

52. Hosamani M, Mondal B, Tembhurne PA, Bandyopadhyay SK, Singh RK, Rasool TJ. Differentiation of Sheep Pox and Goat Poxviruses by Sequence Analysis and PCR-RFLP of P32 Gene. *Virus Genes* **2004**; 29:73–80.
53. Gaskell R, Gaskell C, Evans R, et al. Natural and experimental pox virus infection in the domestic cat. *Vet Rec* **1983**; 112:164–170.
54. Bennett M, Gaskell CJ, Gaskell RM, Baxby D, Gruffydd-Jones TJ. Poxvirus infection in the domestic cat: some clinical and epidemiological observations. *Vet Rec* **1986**; 118:387–390.
55. Martland M, Fowler S, Poulton G, Baxby D. Pox virus infection of a domestic cat. *Vet Rec* **1983**; 112:171–172.
56. Baxby D. Human poxvirus infection after the eradication of smallpox. *Epidemiol Amp Infect* **1988**; 100:321–334.
57. Mauldin M, Antwerpen M, Emerson G, et al. Cowpox virus: What's in a Name? *Viruses* **2017**; 9:101.
58. Oldal M, Sironen T, Henttonen H, et al. Serologic Survey of Orthopoxvirus Infection Among Rodents in Hungary. *Vector-Borne Zoonotic Dis* **2015**; 15:317–322.
59. Kurth A, Wibbelt G, Gerber H-P, Petschaelis A, Pauli G, Nitsche A. Rat-to-Elephant-to-Human Transmission of Cowpox Virus. *Emerg Infect Dis* **2008**; 14:670–671.
60. Chantrey J, Meyer H, Baxby D, et al. Cowpox: reservoir hosts and geographic range. *Epidemiol Infect* **1999**; 122:455–460.
61. Wolfs TFW, Wagenaar JA, Niesters HGM, Osterhaus ADME. Rat-to-human transmission of Cowpox infection. *Emerg Infect Dis* **2002**; 8:1495–1496.
62. Martina BEE, van Doornum G, Dorrestein GM, et al. Cowpox Virus Transmission from Rats to Monkeys, the Netherlands. *Emerg Infect Dis* **2006**; 12:1005–1007.
63. Doshi RH, Guagliardo SAJ, Doty JB, et al. Epidemiologic and Ecologic Investigations of Monkeypox, Likouala Department, Republic of the Congo, 2017. *Emerg Infect Dis* **2019**; 25:281–289.
64. Kerr PJ, Best SM. Myxoma virus in rabbits. *Rev Sci Tech Int Off Epizoot* **1998**; 17:256–268.
65. Duraffour S, Meyer H, Andrei G, Snoeck R. Camelpox virus. *Antiviral Res* **2011**; 92:167–186.
66. Prabhu M. Camelpox and Buffalopox: Two Emerging and Re-emerging Orthopox Viral Diseases of India. *Adv Anim Vet Sci* **2015**; 3:527–541.
67. Oliveira G, Rodrigues R, Lima M, Drumond B, Abrahão J. Poxvirus Host Range Genes and Virus–Host Spectrum: A Critical Review. *Viruses* **2017**; 9:331.
68. Smith GL, McFadden G. Smallpox: anything to declare? *Nat Rev Immunol* **2002**; 2:521.
69. Woolhouse MEJ, Gowtage-Sequeria S. Host Range and Emerging and Reemerging Pathogens. *Emerg Infect Dis* **2005**; 11:1842–1847.
70. Grossegeisse M, Doellinger J, Haldemann B, Schaade L, Nitsche A. A Next-Generation Sequencing Approach Uncovers Viral Transcripts Incorporated in Poxvirus Virions. *Viruses* **2017**; 9:296.

71. Haller SL, Peng C, McFadden G, Rothenburg S. Poxviruses and the evolution of host range and virulence. *Infect Genet Evol* **2014**; 21:15–40.
72. Meltzer MI. Risks and Benefits of Preexposure and Postexposure Smallpox Vaccination¹. *Emerg Infect Dis* **2003**; 9:1363–1370.
73. Berche P. The threat of smallpox and bioterrorism. *Trends Microbiol* **2001**; 9:15–18.
74. 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*. 1st ed. New York: Random House, 1999.
75. Lane HC, Montagne JL, Fauci AS. Bioterrorism: A clear and present danger. *Nat Med* **2001**; 7:nm1201-1271–1271.
76. Noyce RS, Lederman S, Evans DH. Construction of an infectious horsepox virus vaccine from chemically synthesized DNA fragments. *PLOS ONE* **2018**; 13:e0188453.
77. Kupferschmidt K. Labmade smallpox is possible, study shows. *Science* **2017**; 357:115–116.
78. Kulesh DA, Baker RO, Loveless BM, 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* **2004**; 42:601–609.
79. Wagar E. Bioterrorism and the Role of the Clinical Microbiology Laboratory. *Clin Microbiol Rev* **2016**; 29:175–189.
80. Kurth A, Achenbach J, Miller L, Mackay IM, Pauli G, Nitsche A. Orthopoxvirus Detection in Environmental Specimens during Suspected Bioterror Attacks: Inhibitory Influences of Common Household Products. *Appl Environ Microbiol* **2008**; 74:32–37.
81. Breman JG, Henderson DA. Diagnosis and Management of Smallpox. *N Engl J Med* **2002**; 346:1300–1308.
82. LeDuc JW, Becher J. Current status of smallpox vaccine. *Emerg Infect Dis* **1999**; 5:593–594.
83. Andrei G, Snoeck R. Cidofovir Activity against Poxvirus Infections. *Viruses* **2010**; 2:2803–2830.
84. Bray M, Martinez M, Smee DF, Kefauver D, Thompson E, Huggins JW. Cidofovir Protects Mice against Lethal Aerosol or Intranasal Cowpox Virus Challenge. *J Infect Dis* **2000**; 181:10–19.
85. De Clercq E. Cidofovir in the treatment of poxvirus infections. *Antiviral Res* **2002**; 55:1–13.
86. Duraffour S, Mertens B, Meyer H, et al. Emergence of Cowpox: Study of the Virulence of Clinical Strains and Evaluation of Antivirals. *PLoS ONE* **2013**; 8:e55808.
87. Grosenbach DW, Honeychurch K, Rose EA, et al. Oral Tecovirimat for the Treatment of Smallpox. *N Engl J Med* **2018**; 379:44–53.
88. Atkin JW, Radford AD, Coyne KP, 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* **2010**; 6:33.

89. Kane OJ, Uhart MM, Rago V, et al. Avian Pox in Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*). *J Wildl Dis* **2012**; 48:790–795.
90. Baxby D, Ashton DG, Jones DM, Thomsett LR. An outbreak of cowpox in captive cheetahs: virological and epidemiological studies. *Epidemiol Amp Infect* **1982**; 89:365–372.
91. Fenner F, Nakano JH. Poxviridae: The Poxviruses. In: *Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases Principles and Practice*. Springer, New York, NY, 1988: 177–210. Available at: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4612-3900-0_10. Accessed 19 October 2017.
92. Lakis NS, Li Y, Abraham JL, et al. Novel Poxvirus Infection in an Immune Suppressed Patient. *Clin Infect Dis* **2015**; 61:1543–1548.
93. Knight JC, Novembre FrancisJ, Brown DR, Goldsmith CS, Esposito JJ. Studies on tanapox virus. *Virology* **1989**; 172:116–124.
94. Tanapox - an overview | ScienceDirect Topics. Available at: <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/tanapox>. Accessed 16 September 2021.
95. Barraviera SRCS. Diseases caused by poxvirus - orf and milker's nodules: a review. *J Venom Anim Toxins Trop Dis* **2005**; 11:102–108.
96. Goldsmith CS, Metcalfe MG, Li Y, et al. Emergence of Previously Unknown Poxviruses. *Microsc Microanal* **2016**; 22:1184–1185.
97. David L, Andreani J, Secq V, et al. Nodule d'Orf : second génome viral décrit et séquencé chez l'homme. *Ann Dermatol Vénérologie* **2018**; 145:S292.
98. Andreani J, Arnault J-P, Bou Khalil JY, et al. Atypical Cowpox Virus Infection in Smallpox-Vaccinated Patient, France. *Emerg Infect Dis* **2019**; 25:212–219.
99. Ninove L, Domart Y, Vervel C, et al. Cowpox Virus Transmission from Pet Rats to Humans, France. *Emerg Infect Dis* **2009**; 15:781–784.
100. Carletti F, Bordi L, Castilletti C, et al. Cat-to-Human Orthopoxvirus Transmission, Northeastern Italy. *Emerg Infect Dis* **2009**; 15:499–500.
101. Czerny CP, Zeller-Lue C, Eis-Hübinger AM, Kaaden OR, Meyer H. Characterization of a cowpox-like orthopox virus which had caused a lethal infection in man. *Arch Virol Suppl* **1997**; 13:13–24.
102. Smithson C, Meyer H, Gigante CM, et al. Two novel poxviruses with unusual genome rearrangements: NY_014 and Murmansk. *Virus Genes* **2017**; :1–15.
103. Damaso CR, Esposito JJ, Condit RC, Moussatché N. An emergent poxvirus from humans and cattle in Rio de Janeiro State: Cantagalo virus may derive from Brazilian smallpox vaccine. *Virology* **2000**; 277:439–449.
104. Barbosa AV, Medaglia MLG, Soares HS, Quixabeira-Santos JC, Gennari SM, Damaso CR. Presence of neutralizing antibodies to Orthopoxvirus in Capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in Brazil. *J Infect Dev Ctries* **2014**; 8:1646–1649.
105. Poxvirus Dilemmas. *N Engl J Med* **1998**; 339:2027–2028.

106. Kennedy JS, Greenberg RN. IMVAMUNE®: modified vaccinia Ankara strain as an attenuated smallpox vaccine. *Expert Rev Vaccines* **2009**; 8:13–24.
107. 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* **2012**; 30:2623–2632.
108. Bhanuprakash V, Prabhu M, Venkatesan G, et al. Camelpox: epidemiology, diagnosis and control measures. *Expert Rev Anti Infect Ther* **2010**; 8:1187–1201.
109. Bera BC, Shanmugasundaram K, Barua S, et al. Zoonotic cases of camelpox infection in India. *Vet Microbiol* **2011**; 152:29–38.
110. Bray M, Babiuk S. Camelpox: Target for eradication? *Antiviral Res* **2011**; 92:164–166.
111. Kriz B. A study of camelpox in Somalia. *J Comp Pathol* **1982**; 92:1–8.
112. Baxby D. Smallpox-like viruses from camels in iran. *The Lancet* **1972**; 300:1063–1065.
113. Gubser C, Smith GL. The sequence of camelpox virus shows it is most closely related to variola virus, the cause of smallpox. *J Gen Virol* **2002**; 83:855–872.
114. Kolhapure RM, Deolankar RP, Tupe CD, et al. Investigation of buffalopox outbreaks in Maharashtra State during 1992-1996. *Indian J Med Res* **1997**; 106:441–446.
115. Venkatesan G, Balamurugan V, Prabhu M, et al. Emerging and re-emerging zoonotic buffalopox infection: a severe outbreak in Kolhapur (Maharashtra), India. *Vet Ital* **2010**; 46:10.
116. Zafar A, Swanepoel R, Hewson R, et al. Nosocomial Buffalopoxvirus Infection, Karachi, Pakistan. *Emerg Infect Dis* **2007**; 13:902–904.
117. Essbauer S, Pfeffer M, Meyer H. Zoonotic poxviruses. *Vet Microbiol* **2010**; 140:229–236.
118. Rimoin AW, Kislun N, Kebela-Ilunga B, et al. Endemic Human Monkeypox, Democratic Republic of Congo, 2001–2004. *Emerg Infect Dis* **2007**; 13:934–937.
119. Durski KN, McCollum AM, Nakazawa Y, et al. Emergence of Monkeypox — West and Central Africa, 1970–2017. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **2018**; 67:306–310.
120. Yinka-Ogunleye A, Aruna O, Ogoina D, et al. Reemergence of Human Monkeypox in Nigeria, 2017. *Emerg Infect Dis* **2018**; 24:1149–1151.
121. Vaughan A, Aarons E, Astbury J, et al. Two cases of monkeypox imported to the United Kingdom, September 2018. *Eurosurveillance* **2018**; 23. Available at: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.38.1800509>. Accessed 8 February 2019.
122. Mahalingam S, Damon IK, Lidbury BA. 25 years since the eradication of smallpox: why poxvirus research is still relevant. *Trends Immunol* **2004**; 25:636–639.
123. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Multistate outbreak of monkeypox--Illinois, Indiana, and Wisconsin, 2003. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **2003**; 52:537–540.

124. 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* **2003**; 52:589–590.
125. Lefkowitz EJ, Wang C, Upton C. Poxviruses: past, present and future. *Virus Res* **2006**; 117:105–118.
126. Upton C, Slack S, Hunter AL, Ehlers A, Roper RL. Poxvirus Orthologous Clusters: toward Defining the Minimum Essential Poxvirus Genome. *J Virol* **2003**; 77:7590–7600.
127. Hughes AL, Irausquin S, Friedman R. The evolutionary biology of poxviruses. *Infect Genet Evol* **2010**; 10:50–59.
128. Ehlers A, Osborne J, Slack S, Roper RL, Upton C. Poxvirus Orthologous Clusters (POCs). *Bioinformatics* **2002**; 18:1544–1545.
129. Offerman K, Carulei O, van der Walt AP, 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* **2014**; 15:463.
130. Gyuranecz M, Foster JT, Dan A, et al. Worldwide Phylogenetic Relationship of Avian Poxviruses. *J Virol* **2013**; 87:4938–4951.
131. Olson VA, Laue T, Laker MT, et al. Real-Time PCR System for Detection of Orthopoxviruses and Simultaneous Identification of Smallpox Virus. *J Clin Microbiol* **2004**; 42:1940–1946.
132. Mangana-Vougiouka O, Markoulatos P, Koptopoulos G, Nomikou K, Bakandritsos N, Papadopoulos O. Sheep poxvirus identification by PCR in cell cultures. *J Virol Methods* **1999**; 77:75–79.
133. Maksyutov RA, Gavrilova EV, Meyer H, Shchelkunov SN. Real-time PCR assay for specific detection of cowpox virus. *J Virol Methods* **2015**; 211:8–11.
134. McLysaght A, Baldi PF, Gaut BS. Extensive gene gain associated with adaptive evolution of poxviruses. *Proc Natl Acad Sci* **2003**; 100:15655–15660.
135. Li Y, Olson VA, Laue T, Laker MT, Damon IK. Detection of monkeypox virus with real-time PCR assays. *J Clin Virol* **2006**; 36:194–203.
136. Eshoo MW, Whitehouse CA, Nalca A, et al. Rapid and High-Throughput pan-Orthopoxvirus Detection and Identification using PCR and Mass Spectrometry. *PLOS ONE* **2009**; 4:e6342.
137. Gelaye E, Mach L, Kolodziejek J, et al. A novel HRM assay for the simultaneous detection and differentiation of eight poxviruses of medical and veterinary importance. *Sci Rep* **2017**; 7. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5316968/>. Accessed 30 October 2017.
138. Lee LH, Lee KH. Application of the polymerase chain reaction for the diagnosis of fowl poxvirus infection. *J Virol Methods* **1997**; 63:113–119.
139. 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*

- 2018**; 55. Available at: <https://slovetres.si/index.php/SVR/article/view/366>. Accessed 22 January 2019.
140. Gelaye E, Achenbach JE, Jenberie S, et al. Molecular characterization of orf virus from sheep and goats in Ethiopia, 2008–2013. *Virol J* **2016**; 13:34.
 141. 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* **2018**; 41:57–60.
 142. Li Y, Meyer H, Zhao H, Damon IK. GC content-based pan-pox universal PCR assays for poxvirus detection. *J Clin Microbiol* **2010**; 48:268–276.
 143. Afonso CL, Tulman ER, Lu Z, Oma E, Kutish GF, Rock DL. The Genome of *Melanoplus sanguinipes* Entomopoxvirus. *J Virol* **1999**; 73:533–552.
 144. Abrahão JS, Silva-Fernandes AT, Assis FL, et al. Human Vaccinia virus and Pseudocowpox virus co-infection: Clinical description and phylogenetic characterization. *J Clin Virol* **2010**; 48:69–72.
 145. Lederman ER, Tao M, Reynolds MG, et al. An Investigation of a Cluster of Parapoxvirus Cases in Missouri, Feb–May 2006: Epidemiologic, Clinical and Molecular Aspects. *Animals* **2013**; 3:142–157.
 146. Büttner M, Rziha H-J. Parapoxviruses: From the Lesion to the Viral Genome. *J Vet Med Ser B* **2002**; 49:7–16.
 147. Panchanathan V, Chaudhri G, Karupiah G. Correlates of protective immunity in poxvirus infection: where does antibody stand? *Immunol Cell Biol* **2008**; 86:80–86.
 148. Karupiah G, Buller RM, Van Rooijen N, Duarte CJ, Chen J. Different roles for CD4+ and CD8+ T lymphocytes and macrophage subsets in the control of a generalized virus infection. *J Virol* **1996**; 70:8301–8309.
 149. Chaudhri G, Panchanathan V, Buller RML, et al. Polarized type 1 cytokine response and cell-mediated immunity determine genetic resistance to mousepox. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**; 101:9057–9062.
 150. Karupiah G, Fredrickson TN, Holmes KL, Khairallah LH, Buller RM. Importance of interferons in recovery from mousepox. *J Virol* **1993**; 67:4214–4226.
 151. Panchanathan V, Chaudhri G, Karupiah G. Interferon function is not required for recovery from a secondary poxvirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**; 102:12921–12926.
 152. Ramshaw IA, Ramsay AJ, Karupiah G, Rolph MS, Mahalingam S, Ruby JC. Cytokines and immunity to viral infections. *Immunol Rev* **1997**; 159:119–135.
 153. Parker AK, Parker S, Yokoyama WM, Corbett JA, Buller RML. Induction of natural killer cell responses by ectromelia virus controls infection. *J Virol* **2007**; 81:4070–4079.
 154. Chaudhri G, Panchanathan V, Bluethmann H, Karupiah G. Obligatory requirement for antibody in recovery from a primary poxvirus infection. *J Virol* **2006**; 80:6339–6344.

155. Fang M, Sigal LJ. Antibodies and CD8+ T cells are complementary and essential for natural resistance to a highly lethal cytopathic virus. *J Immunol Baltim Md 1950* **2005**; 175:6829–6836.
156. Cameron C, Hota-Mitchell S, Chen L, et al. The Complete DNA Sequence of Myxoma Virus. *Virology* **1999**; 264:298–318.
157. Everett H, McFadden G. Viral proteins and the mitochondrial apoptotic checkpoint. *Cytokine Growth Factor Rev* **2001**; 12:181–188.
158. Guerin J-L, Gelfi J, Boullier S, et al. Myxoma Virus Leukemia-Associated Protein Is Responsible for Major Histocompatibility Complex Class I and Fas-CD95 Down-Regulation and Defines Scrapins, a New Group of Surface Cellular Receptor Abductor Proteins. *J Virol* **2002**; 76:2912–2923.
159. Afonso CL, Tulman ER, Lu Z, et al. The Genome of Swinepox Virus. *J Virol* **2002**; 76:783–790.
160. Lee H-J, Essani K, Smith GL. The Genome Sequence of Yaba-like Disease Virus, a Yatapoxvirus. *Virology* **2001**; 281:170–192.
161. Seet BT, Johnston JB, Brunetti CR, et al. Poxviruses and Immune Evasion. *Annu Rev Immunol* **2003**; 21:377–423.
162. Afonso CL, Tulman ER, Lu Z, Zsak L, Kutish GF, Rock DL. The Genome of Fowlpox Virus. *J Virol* **2000**; 74:3815–3831.
163. Senkevich TG, Koonin EV, Bugert JJ, Darai G, Moss B. The Genome of Molluscum Contagiosum Virus: Analysis and Comparison with Other Poxviruses. *Virology* **1997**; 233:19–42.
164. Amanna IJ, Slifka MK, Crotty S. Immunity and immunological memory following smallpox vaccination. *Immunol Rev* **2006**; 211:320–337.
165. El-Ad B, Roth Y, Winder A, et al. The Persistence of Neutralizing Antibodies after Revaccination against Smallpox. *J Infect Dis* **1990**; 161:446–448.
166. Demkowicz WE, Littaua RA, Wang J, Ennis FA. Human cytotoxic T-cell memory: long-lived responses to vaccinia virus. *J Virol* **1996**; 70:2627–2631.
167. Crotty S, Felgner P, Davies H, Glidewell J, Villarreal L, Ahmed R. Cutting Edge: Long-Term B Cell Memory in Humans after Smallpox Vaccination. *J Immunol* **2003**; 171:4969–4973.
168. Pütz MM, Alberini I, Midgley CM, Manini I, Montomoli E, Smith GLY 2005. Prevalence of antibodies to Vaccinia virus after smallpox vaccination in Italy. *J Gen Virol* 86:2955–2960.
169. Hammarlund E, Lewis MW, Hansen SG, et al. Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination. *Nat Med* **2003**; 9:1131–1137.
170. Crotty S, Ahmed R. Immunological memory in humans. *Semin Immunol* **2004**; 16:197–203.
171. Combadiere B, Boissonnas A, Carcelain G, et al. Distinct Time Effects of Vaccination on Long-Term Proliferative and IFN- γ -producing T Cell Memory to Smallpox in Humans. *J Exp Med* **2004**; 199:1585–1593.
172. Taub DD, Ershler WB, Janowski M, et al. Immunity from Smallpox Vaccine Persists for Decades: A Longitudinal Study. *Am J Med* **2008**; 121:1058–1064.

173. Amanna IJ, Carlson NE, Slifka MK. Duration of Humoral Immunity to Common Viral and Vaccine Antigens. *N Engl J Med* **2007**; 357:1903–1915.
174. Mamani-Matsuda M, Cosma A, Weller S, et al. The human spleen is a major reservoir for long-lived vaccinia virus-specific memory B cells. *Blood* **2008**; 111:4653–4659.
175. Payne LG. The existence of an envelope on extracellular cowpox virus and its antigenic relationship to the vaccinia envelope. *Arch Virol* **1986**; 90:125–133.
176. Munz E, Linckh S, Renner-Müller IC, Reimann M. [The effectiveness of immunization with vaccinia virus type 'MVA' against an infection with cowpox virus type 'OPV 85' in rabbits]. *Zentralblatt Vet Reihe B J Vet Med Ser B* **1993**; 40:131–140.
177. Edghill-Smith Y, Golding H, Manischewitz J, et al. Smallpox vaccine-induced antibodies are necessary and sufficient for protection against monkeypox virus. *Nat Med* **2005**; 11:740–747.
178. Gilchuk I, Gilchuk P, Sapparapu G, et al. Cross-Neutralizing and Protective Human Antibody Specificities to Poxvirus Infections. *Cell* **2016**; 167:684-694.e9.
179. MacNeil A, Abel J, Reynolds MG, et al. Serologic evidence of human orthopoxvirus infections in Sierra Leone. *BMC Res Notes* **2011**; 4:465.
180. Metzger W, Mordmueller BG. Vaccines for preventing smallpox. *Cochrane Database Syst Rev* **2007**; Available at: <https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD004913.pub2/abstract>. Accessed 20 September 2021.
181. Artenstein AW, Johnson C, Marbury TC, et al. A novel, cell culture-derived smallpox vaccine in vaccinia-naïve adults. *Vaccine* **2005**; 23:3301–3309.
182. Monath TP, Caldwell JR, Mundt W, et al. ACAM2000 clonal Vero cell culture vaccinia virus (New York City Board of Health strain) – a second-generation smallpox vaccine for biological defense. *Int J Infect Dis* **2004**; 8:31–44.
183. Sutter G, Staib C. Vaccinia Vectors as Candidate Vaccines: The Development of Modified Vaccinia Virus Ankara for Antigen Delivery. *Curr Drug Targets - Infect Disord* **2003**; 3:263–271.
184. Lévy-Bruhl D, Guérin N. Utilisation du virus de la variole comme arme biologique : place de la vaccination en France. *Eurosurveillance* **2001**; 6:171–178.
185. REED LJ, MUENCH H. A SIMPLE METHOD OF ESTIMATING FIFTY PER CENT ENDPOINTS¹². *Am J Epidemiol* **1938**; 27:493–497.
186. Nitsche A. Real-Time PCR Detection of Parapoxvirus DNA. *Clin Chem* **2005**; 52:316–319.
187. Haig DM, McInnes CJ. Immunity and counter-immunity during infection with the parapoxvirus orf virus. *Virus Res* **2002**; 88:3–16.
188. Yirrell DL, Reid HW, Norval M, Howie SEM. Immune response of lambs to experimental infection with Orf virus. *Vet Immunol Immunopathol* **1989**; 22:321–332.
189. Immunomodulatory Effects of Inactivated Parapoxvirus Ovis (Orf Virus) on Human Peripheral Immune Cells: Induction of Cytokine Secretion in Monocytes and Th1-Like Cells. Available at:

- <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/JVI.78.17.9400-9411.2004>. Accessed 7 September 2021.
190. Leparco-Goffart I, Poirier B, Garin D, Tissier M-H, Fuchs F, Crance J-M. Standardization of a neutralizing anti-vaccinia antibodies titration method: an essential step for titration of vaccinia immunoglobulins and smallpox vaccines evaluation. *J Clin Virol* **2005**; 32:47–52.
 191. Villarroel PMS, Nurtop E, Pastorino B, et al. Zika virus epidemiology in Bolivia: A seroprevalence study in volunteer blood donors. *PLoS Negl Trop Dis* **2018**; 12:e0006239.
 192. Lapidus N, Lamballerie X de, Salez N, et al. Factors Associated with Post-Seasonal Serological Titer and Risk Factors for Infection with the Pandemic A/H1N1 Virus in the French General Population. *PLOS ONE* **2013**; 8:e60127.
 193. Bray M. New Data in a 200-Year Investigation. *Clin Infect Dis* **2004**; 38:90–91.
 194. Nishiura H, Schwehm M, Eichner M. Still Protected against Smallpox?: Estimation of the Duration of Vaccine-Induced Immunity against Smallpox. *Epidemiology* **2006**; 17:576–581.
 195. Sarkar JK, Mitra AC, Mukherjee MK. The minimum protective level of antibodies in smallpox. *Bull World Health Organ* **1975**; 52:307–311.
 196. Orr N, Forman M, Marcus H, et al. Clinical and Immune Responses after Revaccination of Israeli Adults with the Lister Strain of Vaccinia Virus. *J Infect Dis* **2004**; 190:1295–1302.
 197. Anis E, Leventhal A, Slater PE, et al. Smallpox revaccination of 21000 first responders in Israel: lessons learned. *Int J Infect Dis* **2009**; 13:403–409.
 198. Khalafalla AI. Camel Pox. In: *Infectious Diseases of Dromedary Camels*. Cham: Springer International Publishing, 2021: 23–32. Available at: https://link.springer.com/10.1007/978-3-030-79389-0_2. Accessed 21 November 2021.
 199. Delaune D, Iseni F. Drug Development against Smallpox: Present and Future. *Antimicrob Agents Chemother* 64:e01683-19.
 200. Neofytos D, Ojha A, Mookerjee B, et al. Treatment of Adenovirus Disease in Stem Cell Transplant Recipients with Cidofovir. *Biol Blood Marrow Transplant* **2007**; 13:74–81.
 201. Lalezari JP. Intravenous Cidofovir for Peripheral Cytomegalovirus Retinitis in Patients with AIDS: A Randomized, Controlled Trial. *Ann Intern Med* **1997**; 126:257.
 202. Singh NP, Sharma S, Ghai G, Singh A. A Systematic Review on Epidemiology of Human Monkeypox Virus. *Ann Romanian Soc Cell Biol* **2021**; 25:602–610.
 203. Davies EG, Thrasher A, Lacey K, Harper J. Topical cidofovir for severe molluscum contagiosum. *The Lancet* **1999**; 353:2042.
 204. Tecovirimat. Available at: <https://go.drugbank.com/drugs/DB12020>. Accessed 21 November 2021.
 205. Nawadkar R, Dravid A, Paprunia U, et al. Case report of laboratory acquired vaccinia virus infection in India. *Releve Epidemiol Hebd Sect Hyg Secr Soc Nations Wkly Epidemiol Rec Health Sect Secr Leag Nations* **2021**; 96:33–39.

206. Broyles SSY 2003. Vaccinia virus transcription. *J Gen Virol* 84:2293–2303.
207. Pulliam JRC, Dushoff J. Ability to replicate in the cytoplasm predicts zoonotic transmission of livestock viruses. *J Infect Dis* **2009**; 199:565–568.
208. Keesing F, Belden LK, Daszak P, et al. Impacts of biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases. *Nature* **2010**; 468:647–652.
209. Keesing F, Ostfeld RS. Impacts of biodiversity and biodiversity loss on zoonotic diseases. *Proc Natl Acad Sci* **2021**; 118. Available at: <https://www.pnas.org/content/118/17/e2023540118>. Accessed 16 September 2021.
210. Schmeller DS, Courchamp F, Killeen G. Biodiversity loss, emerging pathogens and human health risks. *Biodivers Conserv* **2020**; 29:3095–3102.
211. Volkmann A, Williamson A-L, Weidenthaler H, et al. The Brighton Collaboration standardized template for collection of key information for risk/benefit assessment of a Modified Vaccinia Ankara (MVA) vaccine platform. *Vaccine* **2021**; 39:3067–3080.
212. Prow NA, Liu L, McCarthy MK, et al. The vaccinia virus based Sementis Copenhagen Vector vaccine against Zika and chikungunya is immunogenic in non-human primates. *Npj Vaccines* **2020**; 5:1–10.
213. Nagata LP, Irwin CR, Hu W, Evans DH. Vaccinia-based vaccines to biothreat and emerging viruses. *Biotechnol Genet Eng Rev* **2018**; 34:107–121.
214. García-Arriaza J, Esteban M, López D. Modified Vaccinia Virus Ankara as a Viral Vector for Vaccine Candidates against Chikungunya Virus. *Biomedicines* **2021**; 9:1122.
215. Deng Y, Chuai X, Chen P, et al. Recombinant vaccinia vector-based vaccine (Tiantan) boosting a novel HBV subunit vaccine induced more robust and lasting immunity in rhesus macaques. *Vaccine* **2017**; 35:3347–3353.
216. Salvato MS, Domi A, Guzmán-Cardozo C, et al. A Single Dose of Modified Vaccinia Ankara Expressing Lassa Virus-like Particles Protects Mice from Lethal Intra-cerebral Virus Challenge. *Pathogens* **2019**; 8:133.
217. Koch T, Dahlke C, Fathi A, et al. Safety and immunogenicity of a modified vaccinia virus Ankara vector vaccine candidate for Middle East respiratory syndrome: an open-label, phase 1 trial. *Lancet Infect Dis* **2020**; 20:827–838.
218. Milligan ID, Gibani MM, Sewell R, et al. Safety and Immunogenicity of Novel Adenovirus Type 26– and Modified Vaccinia Ankara–Vectored Ebola Vaccines: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* **2016**; 315:1610–1623.
219. Benenson AS, Cherry JD, McIntosh K, et al. Basic Study and Laboratory Standardization. *J Infect Dis* **1977**; 135:135–144.