



HAL
open science

Étude épidémiologique, écologique et moléculaire du monkeypoxvirus en Côte d'Ivoire

Syndou Meité

► **To cite this version:**

Syndou Meité. Étude épidémiologique, écologique et moléculaire du monkeypoxvirus en Côte d'Ivoire. Virologie. Université Félix Houphouët-Boigny (Abidjan,Côte d'Ivoire); N° ORDRE 47, 2018. Français. NNT: . tel-02884075

HAL Id: tel-02884075

<https://riip.hal.science/tel-02884075>

Submitted on 29 Jun 2020

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

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

REPUBLIQUE DE CÔTE D'IVOIRE

UNION- DISCIPLINE -TRAVAIL

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNITÉ DE FORMATION ET DE RECHERCHE



UNIVERSITÉ FELIX HOUPHOUËT-BOIGNY

Année : 2017-2018



SCIENCES MÉDICALES ABIDJAN

N° 47

THESE

Présentée pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ Félix HOUPHOUËT-BOIGNY

Spécialité : Biologie Humaine et Tropicale

Option : Bactériologie-Virologie

Etude épidémiologique, écologique et moléculaire du *monkeypoxvirus* en Côte d'Ivoire

Soutenue publiquement le : 09 Avril 2018

Par

MEITE Syndou

Composition du Jury

Monsieur DJAMAN Allico Joseph	Professeur	UFHB/ UFR	Président
Madame DOSSO-BRETIN Mireille	Professeur	UFHB/ UFR	Co-Directeur
Madame FAYE-KETTE Yaobla Hortence	Professeur	UFHB/ UFR	Co-Directeur
Monsieur AOUSSI Eba Francois	Professeur	UFHB/ UFR	Rapporteur
Monsieur OUASSA Timothée	Maître de conférences	UFHB/ UFR	Rapporteur
Monsieur KATTIE Aka Louka	Professeur	UFHB/ UFR	Examinateur

IN MEMORIAM

Feue Hadja MEITE Négnan, ma mère

Feue Hadja MEITE Nogogangbé, ma grande mère

Feu MEITE Vassouleymane, mon grand père

Recevez cette thèse comme l'un des fruits de vos efforts lors de votre passage sur terre.

Que Dieu vous accorde son Paradis !

DEDICACES

A Mon père et nos mères, pour vos prières et bénédictions qui nous accompagnent au quotidien, recevez ce travail en guise de récompense de toutes vos prières et bénédictions. Que Dieu vous garde le plus longtemps possible près de nous !

A mon épouse Assiata Sanoussi, reçois cette thèse en guise de remerciement pour tous les sacrifices consentis. Ce travail est le fruit de ta compréhension et de ton amour de tous les jours

A mes Enfants, Négnan Rayhan, Mohamed Sanoussi et Lassana El-Raouf, recevez ce travail en guise de pardon à mes nombreuses heures d'ordinateur et d'absences à la maison. Sachez qu'Allah est au début et à la fin de tout. Il vous suffit d'appliquer ses principes vis-à-vis de vous-même, de vos parents que nous sommes et des autres pour être un homme bon. Nous vous aimons !

A mon frère aîné, Lassana Méité, Ce travail est aussi le tien, ton soutien et ton appui ont été les piliers fondamentaux de mon parcours scolaire et universitaire. Merci pour l'ensemble de tes actions. Puisse DIEU te donner une longue et prospère vie !

A mes frères et soeurs

.Que DIEU bénisse tous vos projets et qu'il étende sa main protectrice sur vos familles respectives.

A toutes mes parents des grandes familles de Tiégnonogolo et de Loucronbalor, Merci pour vos prières !

A mes amis

Merci pour votre collaboration et vos conseils de tous les jours

REMERCIEMENTS

Cette thèse s'inscrit dans l'un de nos axes de recherche pensés par nos maîtres de l'UFR des Sciences Médicales et l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire sur la problématique des Zoonoses émergentes avec pour thème principal: « Orthopoxvirose».

Ce travail nous a conduit à rencontrer différentes personnes dont l'apport a impacté de façon plus ou moins importante cette thèse. Le travail de recherche présenté dans cette thèse n'aurait pu être réalisé sans les orientations, les conseils, l'aide et les soutiens amicaux, financiers et moraux dont nous avons pu bénéficier de la part de nombreuses personnes et institutions. Nous leur exprimons ici notre profonde gratitude. Aussi voudrions-nous particulièrement remercier:

Le Professeur DOSSO- BRETIN Mireille, Directeur de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire et Co-Directeur de cette thèse. En proposant ce sujet, vous m'avez montré que les obstacles sont faits pour être franchis . Nos périodes d'incertitude et de doute dans la progression de cette thèse ont été résolues par vos enseignements et vos conseils . Malgré les difficultés, vos orientations et votre appui au niveau institutionnel, nous ont permis d'aboutir à l'élaboration définitive de cette thèse. Nous tenons à vous exprimer; à travers ce travail, notre gratitude et considération les plus distinguées. Que Dieu vous accorde une longue vie afin que nous puissions toujours bénéficier de votre expertise !

Le Professeur FAYE-KETTE Hortense, Directeur scientifique de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire et Co-Directeur de cette thèse, Vous nous avez offert l'immense opportunité de travailler à vos côtés et votre contribution au quotidien à ce travail a permis la réalisation de cette thèse . Nous avons une immense fierté à faire partie des personnes que vous avez formées. Recevez toute notre reconnaissance pour l'ensemble de vos actions de formations et de conseils à notre égard. Que Dieu vous protège !

Le Professeur DJAMAN Allico Joseph, Chef de Département de Biochimie Clinique et Fondamentale à l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, Directeur du Laboratoire de Pharmacodynamie Biochimique, à l'Université Félix HOUPHOUET-BOIGNY, qui nous a

fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse . Recevez mes sincères remerciements. Hommages respectueux

Le Professeur AOUSSI Eba François, Rapporteur de ce Mémoire. Pour avoir accepté de donner de votre temps précieux afin de juger ce travail. Veuillez recevoir nos sincères remerciements.

Le Professeur OUASSA Timothée. Rapporteur de ce Mémoire. Je vous exprime ma gratitude et mes vifs remerciements pour avoir accepté promptement de participer au jury de cette thèse.

Le Professeur KATTIE Aka Louka, qui nous a fait l'honneur de juger ce travail et de participer à notre jury de thèse. Recevez nos sincères remerciements

Merci aux Professeurs KACOU N'DOUBA Adèle et M'BENGUE KOUASSI Alphonsine pour les encouragements et conseils

A l'équipe de capture des micromammifères

Notamment

- Dr KOFFI Kouadio Stephane
- Dr KOUASSI Kan Stéphane
- Mr SONAN Nestor
- Tous les chauffeurs de l'IPCI qui nous ont accompagnés dans les différentes missions

Ce travail est le résultat des nuits que nous avons passées ensemble dans les parcs et forêts loin de la chaleur familiale. Recevez nos sincères remerciements

Nos remerciements vont à l'endroit du personnel du laboratoire des Arbovirus, virus des fièvres hémorragiques, virus émergents de l' Institut Pasteur de Bangui en particulier

- Dr NAKOUNE -YANDOKO Emmanuel
- Mr SELEKON YALIBANDA Benjamin

Nos remerciements vont également à l'endroit des collègues du Département de Microbiologie de l'UFR des Sciences Médicales : Dr BONI-CISSE Cathérine, Dr KOFFI Kouadio Stéphane, Dr MLAN-BRITOH Alice, Dr BAKAYOKO Souleymane.

Un remerciement au chef du Département Technique et Tehnologique, Dr Aoussi Serge, pour ta contribution à l'amélioration de la qualité de cette thèse.

Un merci particulier à tous nos collaborateurs de la Plateforme de biologie moléculaire (PFBM) : Pr KAKOU N'Gazoa Solange, Dr COULIBALY N'Golo David, Dr KOUASSI Kan Sthéphane, Dr KOUAME Sinan Mireille, Mr YAVO Albert, Mme MAMBE Perpetue, Mme SANGARE Flany,
Merci pour vos contributions

Nos remerciements vont à l'endroit des collègues des départements ou unités (DVE, UGRA, UTEP, CeReB) collaborateurs : Dr ADJOGOUA Edgard, Dr KADJO Hervé, Dr AKRAN Agbaya, Dr COULIBALY Kalpi, Dr KOFFI Eugène , Dr SARAKA Daniel, Dr MEITE Souleymane, Dr DOUMBIA Simini, Dr MONEY Marcelle, Dr CISSE Souleymene ainsi qu'à tout le personnel de ces différents départements

Nos remerciements vont également à l'ensemble des équipes de l'unité de Bactériologie-Virologie et de l'unité de Biologie moléculaire du laboratoire central du CHU de Yopougon sans oublier les autres unités du laboratoire.

Nos remerciements vont aussi à l'endroit Dr ALLALI Bernard, Dr COULIBALY Zana, Dr AKESSE Raissa, COULIBALY Modeste, KANGA Benjamin, Votre contribution à la réalisation de ce travail ainsi que celle de vos équipes respectives ne saurait être évaluée. Nous voudrions vous exprimer par ces mots notre infinie gratitude

Nos remerciements aux services de consultation de Dermatologie du CHU de Yopougon et de Treichville en particulier aux Dr Allou, Dr Diabaté Almami et Mr Gnagne Gustave

Nos remerciements aux agents de SODEFOR , de l'OIPR et l'ensemble de la population des sites visités.

La liste des personnes et institutions ici remerciées n'est pas exhaustive et nous voudrions nous excuser auprès de celles qui auraient été omises

AVANT-PROPOS

Ce travail est une ouverture sur la famille des *Poxvirus* en particulier les *Orthopoxvirus* en Côte d'Ivoire . Dans ce contexte de bioterrorisme mondial et l'émergence du *Monkeypovirus*, la mise en route des méthodes de détection des *Orthopoxvirus* constitue un impératif pour chaque pays . La présente étude s'inscrit dans cette dynamique afin de proposer des solutions de détection biologique de ce groupe de virus en Côte d'Ivoire . Il est le résultat d'une collaboration intra-institutionnelle et inter-institutionnelle. Ainsi ce travail a pu être réalisé grâce à l'appui technique :

du laboratoire des Arbovirus, virus des fièvres hémorragiques, virus émergents de l' Institut Pasteur de Bangui ;

de la Cellule d'intervention Biologique d'Urgence de l' Institut Pasteur de Paris ;

Poxvirus and Rabies Branch du Centers for Disease Control and Prevention (CDC) d' Atlanta;

du Département des Virus Epidémiques (DVE) de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire ;

de la Plateforme de Biologie Moléculaire (PFBM) de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire ;

de l'Unité de Gestion des Ressources Animales de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire ;

du Centre des Ressources Biologiques (CeReB) de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire ;

et l'appui financier :

des Actions Concertées Interpasteuriennes (ACIP) de Réseau International des Instituts Pasteur ;

de l'Agence de Medecine Préventive (AMP) en Côte d'Ivoire .

Tous nos sincères remerciements à l'ensemble de ces institutions pour leur appui et collaboration.

Table des matières

AVANT-PROPOS	ix
INTRODUCTION.....	6
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	12
II.1. CONSIDERATIONS TAXONOMIQUES.....	32
II.2. MORPHOLOGIE ET STRUCTURE DU VIRUS.....	33
II.3. GENOME VIRAL.....	37
II.4. ANTIGENES VIRAUX	40
II.5. MULTIPLICATION CELLULAIRE	41
II.6. CARACTERES PHYSICO-CHIMIQUES.....	45
MATERIEL ET METHODES.....	65
I. MATERIEL.....	66
I.1. VOLET ANIMAL.....	66
I.2. VOLET HUMAIN	75
II.1 ETUDE ECOLOGIQUE ET RESERVOIR DU <i>MONKEYPOXVIRUS</i> EN CÔTE D'IVOIRE	77
II.2. ETUDE DE LA SEROPREVALENCE DES <i>ORTHOPOXVIRUS</i> EN CÔTE D'IVOIRE	92
II.3. <i>POXVIRUS</i> DANS LES LESIONS CUTANÉES EN CÔTE D'IVOIRE	97
RESULTATS ET DISCUSSION	106
I.1. ETUDE ECOLOGIQUE ET RESERVOIR DU <i>MONKEYPOXVIRUS</i> EN CÔTE D'IVOIRE	107
I.2. ETUDE DE LA SEROPREVALENCE DES <i>ORTHOPOXVIRUS</i> EN CÔTE D'IVOIRE	131
I.3. <i>POXVIRUS</i> DANS LES LESIONS CUTANÉES EN CÔTE D'IVOIRE	143
II.1 ETUDE ECOLOGIQUE ET RESERVOIR DU <i>MONKEYPOXVIRUS</i> EN COTE D'IVOIRE.....	160
II.2. ETUDE DE LA SEROPREVALENCE DES <i>ORTHOPOXVIRUS</i> EN COTE D'IVOIRE	164
II.3. <i>POXVIRUS</i> DANS LES LESIONS CUTANÉES EN CÔTE D'IVOIRE	170
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	175
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	178

ANNEXES.....I

LISTE DES TABLEAUX

		Pages
Tableau I	Répartition des <i>Chordopoxvirus</i> selon le réservoirs et les hotes	11
Tableau II	Répartition des <i>Orthopoxvirus</i> selon les réservoirs	12
Tableau III	Répartition géographique des <i>Orthopoxvirus</i>	16
Tableau IV	Caractéristiques du génome des <i>Orthopoxvirus</i>	35
Tableau V	Effet de la température sur une souche de <i>Poxvirus</i>	43
Tableau VI	Caractéristiques biologiques de <i>Orthopoxvirus</i> infectant l'homme	44
Tableau VII	PCR classique pour le diagnostic d' <i>Orthopoxvirus</i> et <i>Monkeypoxvirus</i>	45
Tableau VIII	PCR temps réel pour le diagnostic d' <i>Orthopoxvirus</i> et <i>Monkeypoxvirus</i>	47
Tableau IX	Souches d' <i>Orthopoxvirus</i> de l'analyses phylogénique de la figure 20	57
Tableau X	Souches de <i>Monkeypoxvirus</i> de l'Afrique centrale et occidentale de l'analyse phylogénique de la figure 21	60
Tableau XI	Programme de capture	74
Tableau XII	Pathogènes responsables d'infections cutanées en Côte d'Ivoire	102
Tableau XIII	Comparaison des rendements entre les zones de capture	106
Tableau XIV	Variation des rendements ou succès de piégeage intra site	107
Tableau XV	Répartition selon les familles de micromammifères	109
Tableau XVI	Répartition des micromammifères capturés selon les sites	113
Tableau XVII	Répartition selon les bandes suspectes positives pour l' <i>Orthopoxvirus</i>	126
Tableau XVIII	Répartition des micromammifères positifs pour la recherche d' <i>Orthopoxvirus</i> par site de capture	127
Tableau XIX	Répartition des sujets selon la tranche d'âge	130
Tableau XX	Résultats des tests de validation du conjugué	133
Tableau XXI	Répartition de la population d'étude selon la tranche d'âge et le sexe	135
Tableau XXII	Répartition de sujets à sérologie positive selon le titre d'anticorps	138
Tableau XXIII	Répartition de sujets positifs selon le titre d'anticorps et la tranche d'âge	138
Tableau XXIV	Répartition de sujets positifs selon les régions sanitaires et le titre d'anticorps	139
Tableau XXV	Répartition selon les données épidémiologiques de sujets positifs	140
Tableau XXVI	Répartition de la population d'étude selon la tranche d'âge	148
Tableau XXVII	Répartition selon la tranche d'âge et les lésions cutanées	151

LISTE DES FIGURES

		Pages
Figure 1	Genre <i>Funiciurus</i> et distribution en Afrique	14
Figure 2	Genre <i>Cricetomys</i> et distribution en Afrique	15
Figure 3	Répartition des cas de <i>Monkeypox humain</i> en Afrique	17
Figure 4	Zone probable de la circulation du virus en Afrique	18
Figure 5	Evolution des cas de Monkeypox de 1996 à 2008	19
Figure 6	Physiopathologie des infections due aux <i>Orthopoxvirus</i>	21
Figure 7a,b,c	Lésion de <i>Monkeypox</i> lors de l'épidémie en RCA	25
Figure 8	Corps d'inclusion de type B due à un <i>Orthopoxvirus</i>	26
Figure 9	Lésions histologique dues <i>Cowpoxvirus</i>	27
Figure 10	Changement morphologique des cellules infectées par un <i>Orthopoxvirus</i>	28
Figure 11	Représentation volumétrique des particules virales	31
Figure 12	Vue du virus de la vaccine cryo-electron tomographie	31
Figure 13a,b	Représentation schématique d' <i>Orthopoxvirus</i> forme extracellulaire et forme intracellulaire	32
Figure 14	Représentation schématique de l'ADN du virus de la vaccine	34
Figure 15	Structure de la partie terminale du virus de la vaccine	36
Figure 16	Cycle de multiplication des <i>Poxvirus</i>	38
Figure 17	Vue de la forme non enveloppée et enveloppée de <i>Poxvirus</i> au microscope électronique	39
Figure 18	Résultat de RFLP de différentes souches d' <i>Orthopovirus</i>	52
Figure 19	Arbre phylogéniques des <i>Poxviridae</i>	54
Figure 20	Arbre phylogéniques des <i>Orthopoxvirus</i>	58
Figure 21	Arbre phylogéniques de séquence génique de <i>Monkeypoxvirus</i>	61
Figure 22	Les différents sites de capture des réservoirs potentiels	63
Figure 23 a, b	Photographie des EPI utilisés	69
Figure 24	Photographie de pièges pour la capture des micromammifères	70
Figure 25	Photographie du matériel d'autopsie	71
Figure 26	Photographie de la bonbonne d'Azote pour le transport des échantillons	71
Figure 27a,b	Photographie des activités de piégeage	76
Figure 28	Photographie de la delimitation de la zone d'autopsie	79
Figure 29 a,b	Photographie de mensuration des micromammifères	82
Figure 30 a,b	Photographie de prétraitement des échantillons	83
Figure 31	Principe d'extraction des acides nucléiques par les billes magnétiques	85
Figure 32	Protocole d'extraction d'ADN selon le kit Qiagen	86
Figure 33	Plan de sensibilisation de la microplaque	91
Figure 34	Plan de dépôt des échantillons et des contrôles	92

Figure 35	Schéma de réalisation de la série de dilution	98
Figure 36	Nombre nuits-piège et nombre de captures par zone	106
Figure 37	Micromammifères capturés dans la zone périurbaine rurale	114
Figure 38	Répartition des micromammifères capturés sur le site de Soko	115
Figure 39	Répartition des micromammifères capturés sur le site de Gbétitapéa	115
Figure 40	Répartition des micromammifères capturés dans la zone périurbaine	116
Figure 41	Répartition des micromammifères capturés sur le site de d'Akouédo	117
Figure 42	Répartition des micromammifères capturés sur le site de Songon	118
Figure 43	Répartition des micromammifères capturés sur le site de d'Adiopodoubé	118
Figure 44	Répartition des micromammifères capturés dans les aires protégées	119
Figure 45	Répartition des micromammifères capturés sur le site d'Azagny	120
Figure 46	Répartition des micromammifères capturés sur le site du Banco	120
Figure 47	Répartition des micromammifères capturés sur le site de Lamto	121
Figure 48	Répartition des micromammifères capturés sur le site de Bossématié	121
Figure 49	Photographie de résultat de test de dilution en série de l'ADN <i>Orthopoxvirus</i> par PCR classique	123
Figure 50	Photographie de résultat de test de dilution en série de l'ADN <i>Monkeypoxvirus</i>	123
Figure 51	Courbe d'amplification de la dilution en série de l'ADN <i>Orthopoxvirus</i>	124
Figure 52	Courbe d'amplification de la dilution en série de l'ADN <i>Monkeypoxvirus</i>	124
Figure 53	Photographie de résultat d'échantillons avec bandes suspectes de présence d' <i>Orthopoxvirus</i>	126
Figure 54	Proportion d'échantillons positifs par micromammifères	127
Figure 55	Courbe d'amplification d'échantillon positif pour la recherche d' <i>Orthopoxvirus</i>	128
Figure 56	Répartition des sérums selon le sexe	130
Figure 57	Effectif des sérums selon la région sanitaire	131
Figure 58	Variation des valeurs du DO en fonction des dilutions du conjugué	133
Figure 59	Carte présentant la répartition des sérums positifs en Côte d'Ivoire	136
Figure 60	Répartition des sérums positifs selon les régions sanitaires	137

Figure 61	Photographie de résultat des tests de dilution en série de l'ADN <i>Orthopoxvirus</i>	142
Figure 62	Photographie de résultat des tests de dilution en série de l'ADN <i>Monkeypoxvirus</i>	142
Figure 63	Photographie de résultat de test de spécificité	143
Figure 64	Courbe d'amplification de la dilution en série de l'ADN <i>Orthopoxvirus</i>	145
Figure 65	Courbe de fusion de la dilution en série de l'ADN <i>Orthopoxvirus</i>	145
Figure 66	Courbe d'amplification de la dilution en série de l'ADN <i>Monkeypoxvirus</i>	146
Figure 67	Courbe de fusion de la dilution en série de l'ADN <i>Monkeypoxvirus</i>	146
Figure 68	Répartition selon les districts sanitaires	148
Figure 69	Effectif selon le sexe	150
Figure 70	Répartition selon la trache d'âge	150
Figure 71	Répartition selon les lésions cutanées	151
Figure 72	Photographie de résultat de test d'essai de detection du MCV chez les patients suspects d'infection à <i>Molluscum contagiosum</i> <i>virus</i>	153
Figure 73	Photographie de résultat d'étude de la sensibilité de la PCR classique pour la recherche <i>Molluscum contagiosum virus</i>	153
Figure 74	Photographie de résultat de test de spécificité des amorces pour la détection de <i>Molluscum contagiosum virus</i>	154
Figure 75a, b	Photographie de résultat de PCR classique des patients suspects d'infection <i>Molluscum contagiosum virus</i>	156
Figure 76	Résultats de PCR d' <i>Othopoxvirus</i> chez patients négatifs pour la détection de <i>Molluscum contagiosum virus</i>	157

LISTE DES ABREVIATIONS

ACIP	Actions Concertées Interpasteuriennes
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMP	Agence de Médecine Préventive
ARN	Acide ribonucléique
ATI	Acidophilic types inclusion
CAM	Choroallantoïde membrane
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CeReB	Centre de Ressources Biologiques
CEV	Cell-associated enveloped virus
CHU	Centre Hospitalier Universitaire de Yopougon
CMLV	<i>Camelpoxvirus</i>
CPXV	<i>Cowpoxvirus</i>
DTT	Département Technique et Technologique
DVE	Département des Virus Epidémiques
ECTV	<i>Ectromelia virus</i>
EEV (EV)	Extracellular virus wrapped
EPI	Equipement de Protection Individuelle
HA	Hémagglutinine
IEV (WV)	Intracellular virus wrapped
IMV (MV)	Virus intracellulaire mature
INHP	Institut National de l'Hygiène Publique
IPCI	Institut Pasteur de Côte d'Ivoire
ITR	Inverted terminal repetitions
IV	Virion immature
MCV	<i>Molluscum contagiosum virus</i>
MPXV	<i>Monkeypoxvirus</i>
MSHP	Ministère de la Santé et de l'Hygiène Publique
OIPR	Office Ivoirien des Parcs et Réserves
OPV	<i>Orthopoxvirus</i>
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFBM	Plateforme de Biologie Moléculaire
RCA	République Centrafricaine
RDC	République Démocratique du Congo
RLFP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SODEFOR	Société de Développement des Forêt
VACV	Virus de la vaccine
VARV	Virus de la variole
VIH	Virus de l'immunodéficience Humaine
VTM	Virus Transport Medium

INTRODUCTION

Les *Poxvirus* sont des gros virus à ADN bicaténaire, à multiplication cytoplasmique. Ils possèdent un certain nombre d'éléments autonomes permettant cette multiplication intracytoplasmique contrairement à la majorité des autres virus (**Smith, 2007**). Plusieurs genres de cette famille de virus dont les *Orthopoxvirus* (*OPV*) et le *Molluscum contagiosum virus* (*MCV*) sont impliqués dans les infections cutanées chez l'homme et d'autres vertébrés. Depuis les années 1980, le virus de la variole appartenant au groupe des *Orthopoxvirus* a été éradiqué (**WHO, 1980**). Cependant, des virus comme le *Monkeypoxvirus*, le *Cowpoxvirus* et les autres *OPV* continuent d'infecter l'homme de manière accidentelle mais avec un degré de virulence moins sévère que le virus de la variole (**Hutin 2001**). Leur éradication est problématique car ils possèdent de nombreux hôtes. L'émergence du *Monkeypoxvirus* surtout en Afrique centrale est aujourd'hui préoccupante. *Monkeypoxvirus* est un virus qui a été isolé pour la première fois en 1958 chez le singe *Macaca cynomolgus* par Von Magnus à Copenhague (**Magnus, 1959 ; Sauer, 1960 ; Prier, 1960 ; Mc Connelle, 1964**). Le premier cas humain documenté remonte à 1970 au Zaïre (République Démocratique du Congo) dans les provinces de l'équateur. Le virus circule en mode endémique dans les zones tropicales humides d'Afrique surtout les régions forestières. A ce jour, le réservoir est surtout constitué de rongeurs dont le chef de file serait *Funisciurus anerythrus* (**Khodakevich, 1987 ; Di Giulo, 2004 ; Reynolds, 2010**). D'autres rongeurs tels que *Cricetomys*, *Graphiurus*, *Heliosciurus*, *Xerus* et même *Mastomys natalensis* sont aussi impliqués d'après de nombreuses études (**Gispén, 1976 ; Reynolds, 2010 ; Hutson, 2015**). Le mode de contamination reste le contact avec ces rongeurs, soit par morsure, soit par contact avec les lésions dues au virus. La contamination à travers d'autres animaux tels que les primates (Singe, Chimpanzé, Gorille, Orangs-outans) reste possible. Les contaminations interhumaines se font par voie aérienne et par contact avec les lésions cutanées. *Monkeypoxvirus* est responsable d'une fièvre éruptive accompagnée d'une lymphadénopathie chez les différents primates. Chez l'homme, il s'agit de tableau clinique typique de la variole avec un taux d'attaque familiale et un taux de mortalité faible (**Hutin, 2001**). Par contre, chez les primates non humains comme les orangs-outans, une mortalité élevée est observée (**Magnus, 1959 ; Sauer, 1960 ; Prier, 1960 ; Mc Connelle, 1964**). Les méthodes de diagnostic direct sont basées sur l'observation au microscope électronique, l'inoculation à l'œuf de poule embryonné, la culture cellulaire et surtout les méthodes de biologie moléculaire. Le diagnostic indirect est basé sur les méthodes sérologiques telles que l'inhibition de l'hémagglutination, la

séroneutralisation, la fixation du complément et l'ELISA. Ces méthodes ont été largement utilisées au laboratoire pour la mise en évidence des anticorps anti IgG et IgM du *Monkeypoxvirus*.

Jusqu'aux années 1990, les infections à *Monkeypoxvirus* évoluaient sous un mode endémique surtout dans la région du Zaïre avec un tableau clinique typique de la variole et un taux d'attaque familiale faible. Ce virus donne une maladie à faible potentiel de transmission interhumaine confirmant ainsi sa non capacité de se maintenir dans la population humaine (**Hutin, 2001**). De plus, il n'a pas été considéré comme une menace lors de l'éradication de la variole car il existe une forte immunité croisée entre le *Monkeypoxvirus*, le virus de la variole, le *Cowpoxvirus* et le virus de la vaccine. Ce dernier a été utilisé comme vaccin pour éradiquer la variole. Les événements du Kasai oriental au Zaïre en 1996-1997, ont révélé d'autres aspects du virus. Durant cette période, des flambées de cas humains d'*Orthopoxvirus* simien ont été observées. Trois constats majeurs ont été notés (**Hutin, 2001**) :

- un nombre important de cas jamais signalés a été observé ;
- la proportion des cas âgés de plus 15 ans est passée de 7,5% à 27,2% les années précédentes ;
- une observation de la proportion plus importante de cas secondaires.

Devant ces faits majeurs, l'étude phylogénique préliminaire de l'ADN de la souche virale en cause n'a montré que des variations mineures par rapport aux souches d'*Orthopoxvirus* simiens collectées au Zaïre de 1970 à 1979 (**Hutin, 2001**). Une variation majeure de l'ADN du *Monkeypoxvirus* reste donc peu probable. Mais de telles modifications ont-elles des conséquences sur l'infection chez l'homme? Cette question est d'autant plus importante qu'il y a plus de trente ans que la vaccination contre la variole a été arrêtée et plus de la moitié de la population mondiale est sans protection. À ce jour l'existence de réserves de vaccin contre la variole qui protègent également contre le *Monkeypoxvirus* constitue une assurance pour le monde scientifique en cas de flambées plus importantes. Les régions sensibles doivent donc être des sites permanents de surveillance sentinelle environnementale et humaine afin de détecter très tôt la possibilité de survenue d'une épidémie.

L'*Orthopoxvirus* simien suscite une attention croissante qui est liée aux derniers événements dûs au virus. En effet, à côté de mini-épidémies africaines intertropicales, sont apparues des formes épidémiques aux Etats-Unis en 2003 (**Boumandouki, 2007 ; Reynolds, 2010**). Cette épidémie est survenue chez des hommes contaminés par des chiens de prairie, eux-mêmes

contaminés par des rongeurs tels que *Funisciurus anerythus* provenant du Ghana. Devant ces évènements liés au *Monkeypoxvirus*, de nombreuses études ont été réalisées essentiellement autour des axes de recherche suivants:

- l'écologie et les réservoirs du virus afin d'apporter une réponse à la circulation du virus et à son maintien dans l'environnement ;
- l'étude de la variabilité génétique du virus afin de prévenir la survenue d'épidémies liées à des souches hautement virulentes ;
- l'utilisation des *Orthopoxvirus* comme vecteur de gènes étrangers qui suscite un intérêt croissant en thérapeutique ;
- et surtout la vaccinologie.

En Côte d'Ivoire, depuis les deux cas humains signalés en 1970 et 1981, aucun cas de *Monkeypoxvirus* humain n'a été déclaré durant ces trois décennies. Cependant une étude réalisée au sud du Ghana en 2004, suite à l'épidémie due au *Monkeypoxvirus* aux USA en 2003, afin de déterminer l'origine du virus en cause, a identifié divers rongeurs comme réservoirs circulants dans les deux localités choisies comme site d'étude [Reynolds, 2010].

La Côte d'Ivoire de par sa situation géographique en Afrique tropicale et sa proximité étroite avec le Ghana pourrait être une zone de circulation du virus. Il paraît donc nécessaire de développer des travaux en vue de déterminer le niveau de circulation du virus dans le pays à travers les réservoirs classiques, et d'évaluer le risque de survenue d'une épidémie dans une population sans immunité vaccinale vis-à-vis du virus ceci dans le but de mettre en place des méthodes de diagnostic rapide pour une riposte efficace. Ces différents travaux s'articulent autour d'axes de recherche tels que l'épidémiologie, l'écologie, l'étude des réservoirs du virus et l'étude moléculaire des virus. A travers ces travaux, les questions suivantes ont été abordées dans cette thèse.

Question 1 : Depuis l'arrêt de la vaccination contre la variole en 1980, le nombre de cas de *Monkeypox* est croissant en Afrique centrale. La République Démocratique du Congo concentre 95% des cas de *Monkeypox* humain à travers le monde . En Afrique occidentale, particulièrement en Côte d'Ivoire, les derniers cas d'infection humaine par le *Monkeypoxvirus* répertoriés remontent à plus de trente ans malgré un climat favorable à la circulation du virus.

Devant ce constat, le virus serait-il absent de l'écosystème alors même que les différents rongeurs identifiés comme réservoirs dans la littérature sont présents dans le pays?

Hypothèse 1 : l'hypothèse serait donc que le *Monkeypoxvirus* circule en Côte d'Ivoire à travers les réservoirs potentiels.

Question 2 : Le vaccin contre la variole qui protégeait contre le *Monkeypoxvirus* par immunité croisée a été arrêté en 1980. Ainsi, près de quarante ans après l'arrêt de la vaccination contre la variole, plus de la moitié de la population mondiale serait sans protection contre le *Monkeypoxvirus*, ce qui a conduit à accroître le nombre de sujets exposés au risque d'infection à l'*Orthopoxvirus*. Cette accumulation constitue une situation favorable à l'émergence du *Monkeypoxvirus*. En Côte d'Ivoire, l'écosystème serait favorable à la circulation de ce virus. Par ailleurs, l'hôte et les réservoirs potentiels sont présents dans le pays. Cette cohabitation hôte, virus et réservoirs pourrait constituer un risque de passage du virus à l'homme. Dans un tel contexte, quelle serait la proportion de sujets ayant été en contact avec le virus ?

Hypothèse 2 : l'hypothèse serait que les populations non vaccinées contre la variole vivant dans les zones où circule le réservoir ont des taux d'anticorps spécifiques d'*Orthopoxvirus* très bas.

Question 3 : De nombreux virus sont impliqués dans les infections cutanées virales chez l'homme, en particulier chez l'enfant. Ainsi, la variole mineure a parfois été confondue avec la varicelle, la rougeole et même le *Molluscum contagiosum*. Malgré l'éradication de la variole et l'existence de vaccin efficace contre la rougeole, les lésions cutanées chez l'enfant sont fréquentes en Côte d'Ivoire. Le MCV est souvent impliqué dans les lésions cutanées chez l'enfant. Son diagnostic reste essentiellement clinique alors que des formes cliniques atypiques sont rencontrées avec l'infection à VIH. Dans ce contexte, quelle est la place des *Orthopoxvirus* en général et du *Monkeypoxvirus* en particulier dans les infections cutanées virales en Côte d'Ivoire ?

Hypothèse 3 : L'hypothèse à cette question serait que *Monkeypoxvirus* est impliqué dans les infections éruptives en Côte d'Ivoire.

Pour répondre à ces différentes questions de recherche, l'**objectif général** de ce travail est de confirmer la circulation des *Orthopoxvirus* en particulier le *Monkeypoxvirus* en Côte d'Ivoire. Pour atteindre cet objectif général les **objectifs spécifiques** suivants ont été fixés.

1. Rechercher le virus chez les micromammifères identifiés comme réservoir en Côte d'Ivoire
2. Déterminer la séoprévalence de l'infection à *Orthopoxvirus* chez les sujets non vaccinés contre la variole
3. Déterminer la place des *Orthopoxvirus* dans les lésions cutanées chez l'homme.

Pour atteindre les objectifs de ce travail, nous présenterons dans une première partie la revue bibliographie puis dans une deuxième partie nous aborderons le chapitre sur le matériel et méthodes et avant de conclure nous présenterons les résultats de ce travail suivis de la discussion

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. POUVOIR PATHOGENE

I.1.HABITAT OU ECOLOGIE DU VIRUS

Les *Poxvirus* se différencient en deux sous-familles selon leurs spécificités d'hôte, les *Entomopoxvirinae* ayant un tropisme vis-à-vis des insectes et les *Chordopoxvirinae* infectant les vertébrés. Les *Chordopoxvirinae* sont divisés en huit genres dont quatre incluent des espèces virales pouvant infecter l'homme (Tableau I). Le genre *Orthopoxvirus* comprend notamment le virus de la variole (VARV), le *Monkeypoxvirus* (MPXV), le *Cowpoxvirus* (CPXV), le Virus de la vaccine (VACV) et le *Camelpoxvirus* (CMLV).

Tableau I : Répartition des *Chordopoxvirus* selon les réservoirs et les hôtes (Duraffour,2008)

Genres	Especies	Réservoir	Répartition géographique	Autres hôtes infectés naturellement
<i>Orthopoxvirus</i>	Virus de la variole	Humain	Mondiale (éradiqué)	Aucun
	Virus de la vaccine	Inconnu	Mondiale	Humains, bovins, lapins
	<i>Cowpoxvirus</i>	Rongeurs	Europe, Asie	Chats, humains, bovins, animaux du zoo
	<i>Monkeypoxvirus</i>	Ecureuils (rongeurs)	Afrique centrale et Afrique de l'ouest	Primates (Humains et non humains)
	<i>Camelpoxvirus</i>	Chameaux	Afrique, Asie	Aucun
	<i>virus de l'ectromélie</i>	Rongeurs	Europe	Aucun
	<i>Raccoonpoxvirus</i>	Ratons laveurs	Etats unis (Est)	Aucun
<i>Parapoxvirus</i>	<i>Orfvirus</i>	Mouton	Mondiale	Humains et autres ruminants
	<i>Pseudocowpoxvirus</i>	Bovins	Mondiale	Humains
	<i>Virus de la stomatite papuleuse bovine</i>	Bovins	Mondiale	Humains
<i>Avipoxvirus</i>	<i>Flowlpoxvirus</i>	Oiseaux		
<i>Capripoxvirus</i>	<i>Sheeppoxvirus</i>	Chèvres		Humains et autres ruminants
<i>Leporipoxvirus</i>	<i>Myxoma virus</i>	Rongeurs		
<i>Suipoxvirus</i>	<i>Swinepoxvirus</i>	Porc		Humains
<i>Yatapoxvirus</i>	<i>Tanopoxvirus</i>	Rongeurs ? Singes ?	Afrique (Est, Centre)	Humains
<i>Molluscipoxvirus</i>	<i>Molluscum contagiosum virus</i>	Humains	Mondiale	Aucun

I .1.1 Réservoirs des *Orthopoxvirus*

Orthopoxvirus comprend plusieurs genres qui infectent divers vertébrés. Dans ce groupe de virus, seul le virus de la variole infecte spécifiquement l'homme. Ce qui a permis son éradication dans les années 1980 (**Esposito, 2001**). Certaines ont un réservoir spécifique connu mais la capacité d'infecter d'autres vertébrés n'est pas prouvée. Il s'agit du *Camelpoxvirus* qui a pour réservoir les dromadaires ou chameaux et *Ectromelia virus* retrouvé chez les rongeurs en général. Pour d'autres comme *Horsepoxvirus*, *Vaccinia virus*, *Monkeypoxvirus* qui constituent actuellement un problème majeur pour l'homme, le réservoir reste inconnu (Tableau II).

Tableau II : Répartition des *Orthopoxvirus* selon les réservoirs (**Duraffour, 2008**)

Espèce	Réservoir	Autres hôtes infectés
<i>Virus de variole</i>	Humain	Néant
<i>Camelpox virus</i>	Chameau ou Dromadaire	Néant
<i>Ectromelia virus</i>	Rongeurs	Néant
<i>Raccoonpox virus</i>	Racoons = rats laveur	Neant
<i>Cowpoxvirus</i>	Rongeurs (<i>Clethrionomys glareolus</i> , <i>Apodemus sylvaticus</i>)	Humains, bovins, lapins
<i>Monkeypoxvirus</i>	Inconnu mais rongeurs suspectés	Primates (Humains et non humains)
<i>Vaccinia virus</i>	Inconnu	Humains, bovins, lapins
<i>Horsepox virus</i>	Inconnu	horses

I.1.2 Réservoirs du *Monkeypoxvirus*

Le réservoir du *Monkeyvirus* fait l'objet de plusieurs investigations ces dernières années (**Gispén, 1976 ; Huston, 2007 ; Reynolds, 2010**). À ce jour, le réservoir est surtout constitué par les rongeurs dont le chef de file serait *Funisciurus anerythrus* (**Khodakevich, 1987 ; Reynolds 2010**). Des études portant sur la recherche des anticorps anti *Monkeypoxvirus* chez des animaux en République Démocratique du Congo (RDC) ont suggéré que les écureuils et les singes jouent un rôle dans le cycle de vie du virus (**Hutin, 2001 ; Meyer, 2002**).

D'autres rongeurs tels que *Cricetomys*, *Graphiurus*, *Heliosciurus*, *Xerus* et même *Mastomys natalensis* sont aussi impliqués d'après de nombreuses études (**Gispen, 1976 ; Hutin, 2001; Di Giulio, 2004**). *Funisciurus anerythrus* ou funisciure à dos rayé est une espèce de la famille des sciuridés. C'est une sorte d'écureuil arboricole africain qui se distingue par une raie jaune des deux côtés du dos et la queue annelée de jaune. Il vit dans la forêt tropicale humide de basse altitude. Il est présent au Bénin, au Nigéria, au Cameroun, en Guinée équatoriale, en République Centrafricaine et en République Démocratique du Congo

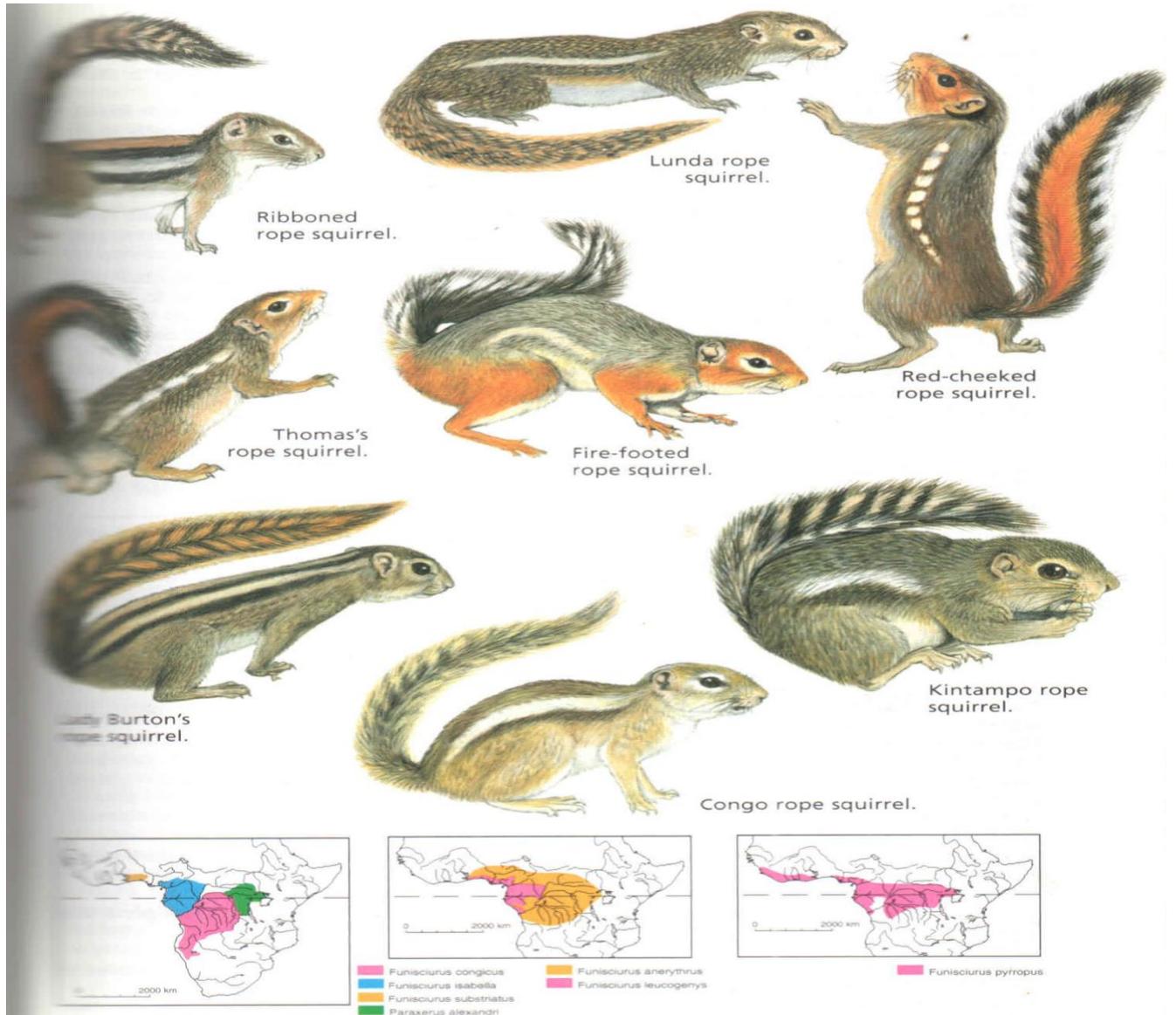


Figure 1 : Genre *Funisciurus* et distribution en Afrique (source (Kingdon, 1997))

Thomas's rope squirrel = *Funisciurus anerythrus*, Ribboned rope squirrel = *Funisciurus lemniscatus*, Lunda rope squirrel = *Funisciurus bayoni*, *Funisciurus*, Fire-footed rope squirrel = *Funisciurus pyropus*, Red-cheeked rope squirrel = *Funisciurus lucogenys*, Lady Burton's rope squirrel = *Funisciurus isabella*, Kintampo rope squirrel = *Funisciurus substriatus*, Congo rope squirrel = *Funisciurus congicus*,

Cricetomys gambianus (Giant-pouched rat) connus sous les noms impropres de rats de Gambie ou rats géants qui sont de gros rongeurs africains pesant autour de 1,4 kg et traditionnellement chassés pour l'alimentation humaine dans la majeure partie de l'Afrique sub-saharienne sont aussi suspectés (Figure 2) ainsi que les autres micro-rongeurs.

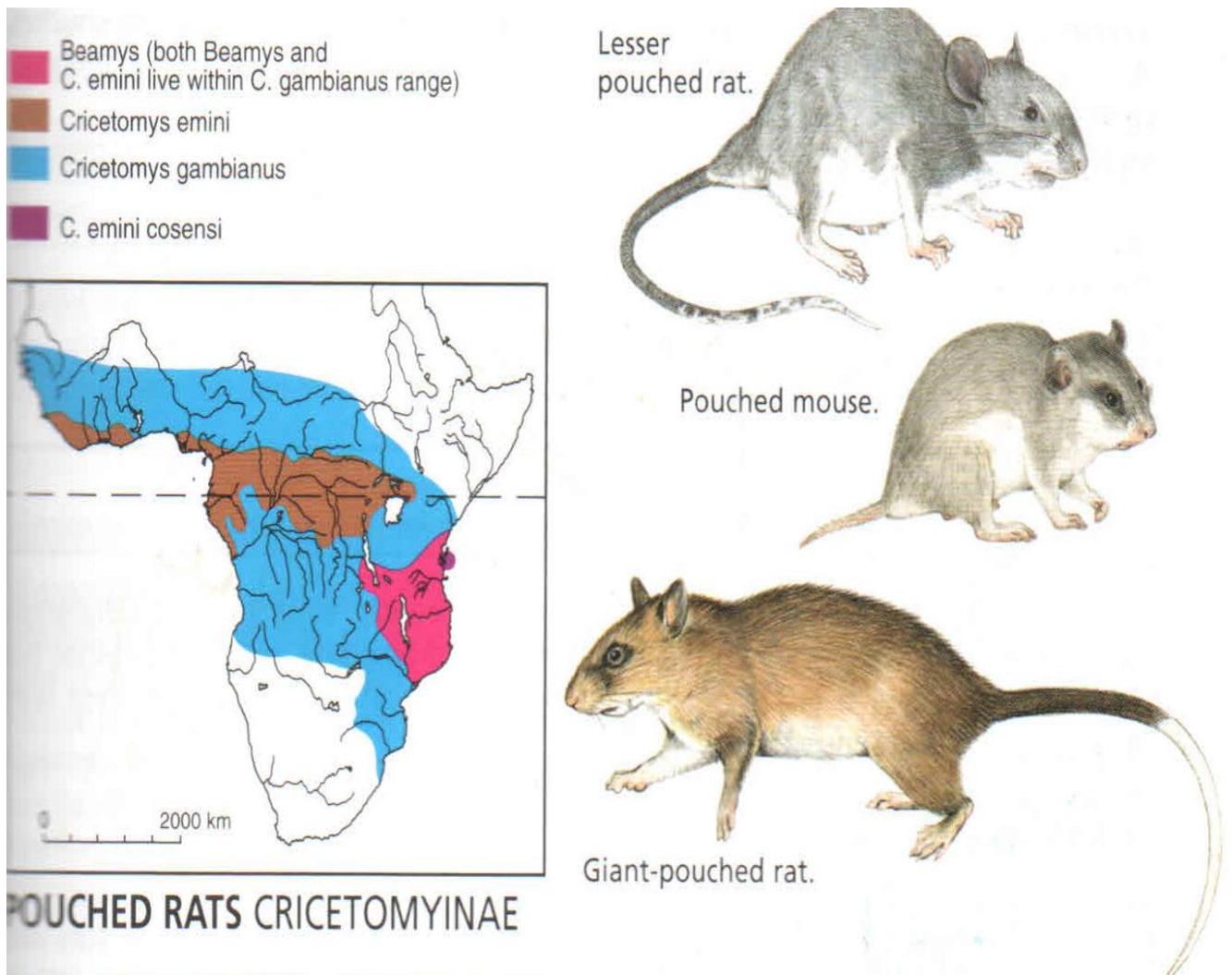


Figure 2 : Genre *Cricetomys* et distribution en Afrique (source (Kingdon 1997))

Giant pouched rats = *Cricetomys* (2 especes ; *C gambianus* et *C emini*)

Au-delà des rongeurs, *Monkeypoxvirus* infecte les primates et l'homme. Le premier cas signalé a été isolé chez le *Cynomolgus* au Danemark (**Magnus, 1959**). Ce primate a présenté des signes d'éruptions cutanées 62 jours après son retour de Singapour. Par la suite, le virus a été isolé chez d'autres primates comme les gorilles, les chimpanzés, *Cercopithecus* puis chez l'homme en 1970 au Zaïre (**Arita, 1972 ; Lourie, 1972 ; Fenner, 1989**).

I.2 EPIDEMIOLOGIE

La distribution des *Orthopoxvirus* est fonction de l'espèce virale. Chaque espèce semble localisée dans une zone géographique donnée à l'exception du virus de la variole qui avait une répartition mondiale (Tableau III).

Tableau III : Répartition géographique des *Orthopoxvirus* (**Durafour,2008**)

Espèce	Répartition géographique
Virus de variole	Eradiqué, avait une répartition mondiale
<i>Camelpox virus</i>	En Afrique et en Asie
<i>Ectromelia virus</i>	En Europe
<i>Raccoonpox virus</i>	Aux Etats-Unis surtout dans la partie Est
<i>Cowpoxvirus</i>	En Europe et Asie Ouest
<i>Monkeypoxvirus</i>	En Afrique centrale et Afrique occidentale
<i>Vaccinia virus</i>	Inconnu
<i>Horsepox virus</i>	Asie centrale

Concernant l'Afrique centrale et l'Afrique de l'ouest, le *Monkeypoxvirus* reste l'espèce la plus préoccupante parmi les *Orthopoxvirus*. Dès son apparition en 1970, il a circulé à travers divers pays comme le Zaïre, la Sierra Leone, le Nigeria, la Côte d'Ivoire (Figure 3) (**Foster, 1972 ; Jesek, 1988**).

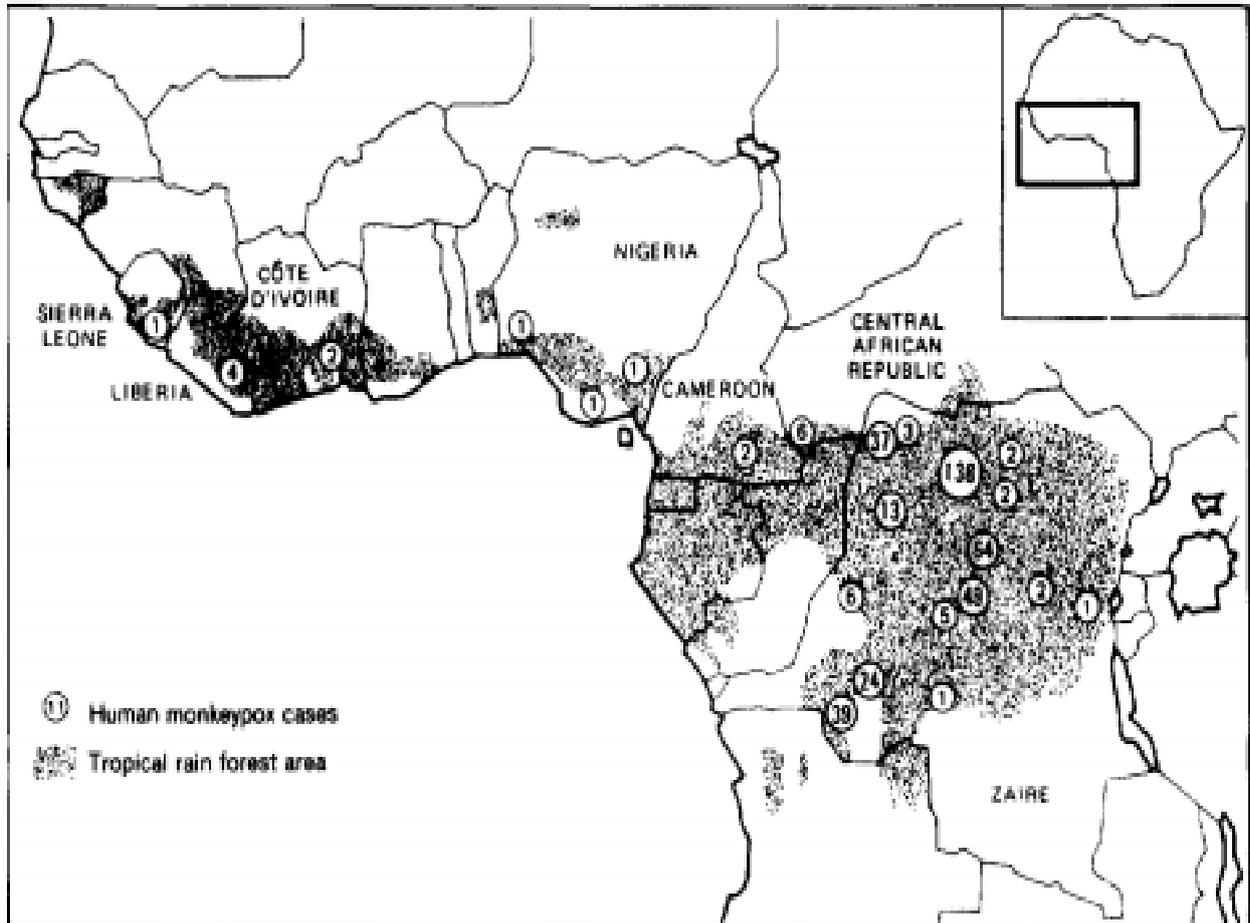


Figure 3 : Répartition de cas de *Monkeypox* humain en Afrique dans la première décennie de la découverte de virus chez l'homme (Jesek, 1988 ; Fenner, 1989).

La zone tropicale humide constitue la zone de prédilection de circulation du virus. Les études récentes de Levine basées sur la modélisation des niches écologiques du virus prédisent la circulation dans la même zone (Figure 4) (Levine, 2007 ; Levine, 2009).

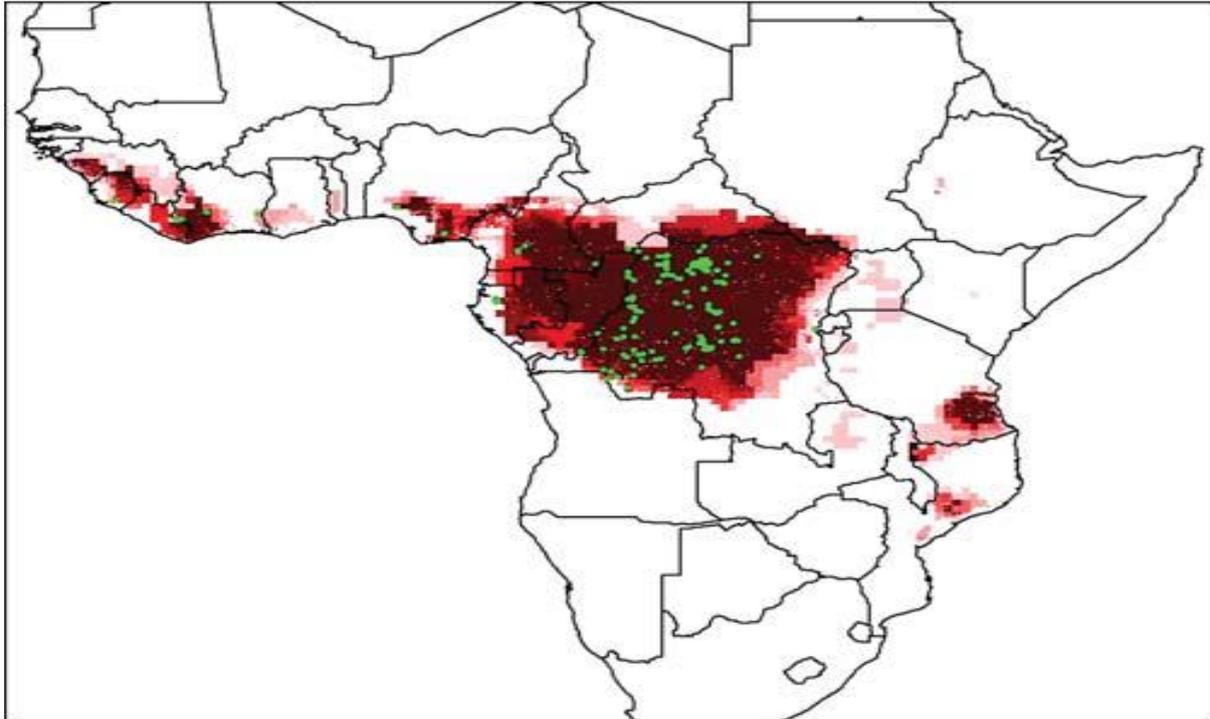


Figure 4 : Zone probable de la circulation du virus en Afrique (Levine , 2007)

L'Afrique centrale en particulier la RDC constitue la zone endémique de la circulation du virus (Jezek, 1988; Hutin, 2001 ; Rimoin, 2010 ; Reynolds, 2012). Selon les données du Bulletin mensuel de l'OMS en République Démocratique du Congo N° 15 - Juillet 2008 (OMS, 2008), le nombre de cas humains en 2005 était supérieur à 1500 cas (Figure 5).

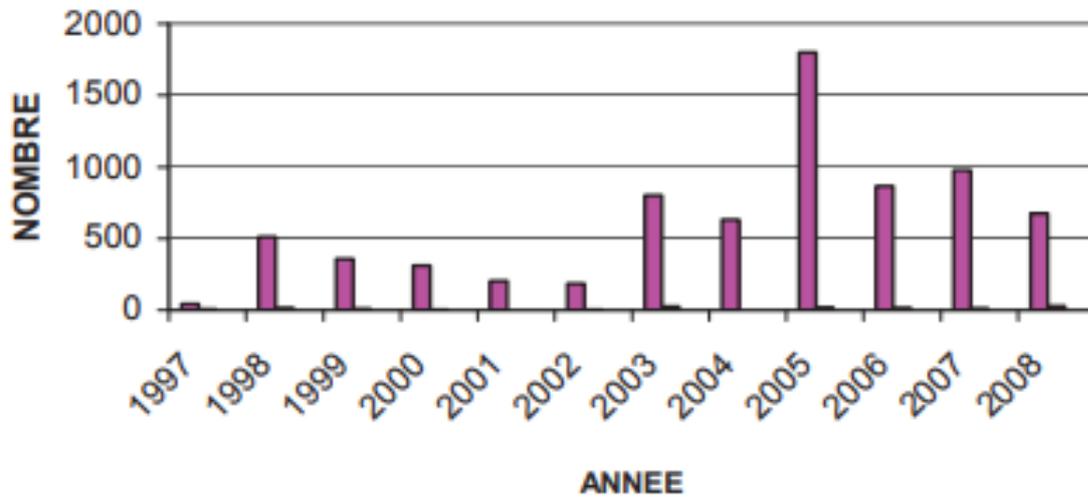


Figure 5: Evolution des cas de *Monkey Pox* de 1996 à 2008 en RDC (OMS, 2008)

Les épidémies les plus récentes concernent la République Centrafricaine et le Congo Brazzaville. Depuis les années 1980, aucun de ces virus n'a été signalé en Afrique occidentale, malgré les conditions écologiques favorables. Cependant, à travers des rongeurs de cette zone géographique, le virus a quitté sa zone géographique originelle, pour se trouver aux Etats- Unis en 2003 (**Reynolds, 2010**). Le virus a également été isolé dans l'actuel Soudan du sud en 2005 (**Formenty, 2005 ; Nakazawa, 2005**).

I.3. MODE DE TRANSMISSION

La transmission des *Orthopoxvirus* est liée généralement à un contact ou à un passage du virus par voie aérienne. Le virus de la variole infecte uniquement l'homme et il n'existe pas de réservoir animal. La contagiosité est souvent forte mais dépend de la souche virale et des conditions épidémiologiques. Un individu contagieux infecte en moyenne une à cinq personnes dans son entourage direct. Il est à noter que la transmissibilité d'homme à homme à l'origine de cas secondaires est celle observée au sein d'une population de densité moyenne totalement réceptive. En effet, la symptomatologie de la maladie étant suffisamment prononcée, les contacts avec les individus contagieux doivent être limités (hospitalisation). Dans la majorité des cas, le virus de la variole pénètre dans le corps par voie aérienne à partir d'aérosols, et la dose infectante est faible.

Il peut être également transmis indirectement via toutes surfaces contaminées, y compris par des croûtes infectées, puisque le virus est extrêmement stable dans l'environnement (**Esposito, 2001 ; Duraffour, 2008**).

À la différence du virus de la variole, le *Monkeypoxvirus* infecte plusieurs espèces animales (rongeurs, singes) et son taux de transmission interhumaine est faible (3 %). Des contacts directs avec des animaux sauvages infectés sont à l'origine de la transmission du virus à l'homme (**Essbauer, 2007 ; Duraffour, 2008**). Le *Cowpoxvirus* est, quant à lui, retrouvé chez une variété d'animaux domestiques ou de zoo infectés à partir du réservoir du virus qui sont les rongeurs péri-domestiques. Les infections par le *Cowpoxvirus* chez l'homme se font, dans la majorité des cas, à la suite de griffures, par exemple d'un chat contaminé par un rongeur (**Essbauer, 2007 ; Duraffour 2008**). Pour le *Volepoxvirus*, des vecteurs arthropodes ont été suggérés comme voie de transmission (**Regnery, 1987**).

I.4. PATHOGENIE ET MANIFESTATIONS CLINIQUES

I.4.1. Physiopathologie

L'évolution des *Orthopoxvirus* au sein de l'hôte aboutit soit à une maladie systémique avec des lésions généralisées au niveau cutané, soit à une maladie localisée avec des lésions localisées au site de pénétration du virus (**Chahroud, 2005 ; Duraffour 2008**). Le type d'infection qui en résulte dépend des espèces d'*Orthopoxvirus*, de la voie d'entrée et du genre/espèce d'animaux sensibles et de leur état immunitaire. Les rongeurs ont été largement utilisés comme modèle animal pour décrire la pathogénicité liée au virus comme l'Ectromélie, le *Monkeypoxvirus* et autres *Orthopoxvirus* (**Cho, 1973 ; Bennett, 1997 ; Becker, 2003 ; Huston, 2007**). La physiopathologie de certains *Orthopoxvirus* tels que *Ectromelia virus* chez la souris ainsi que *Vaccinia virus* et virus de la variole chez l'homme est résumée au niveau de la figure 6 ci-dessous.

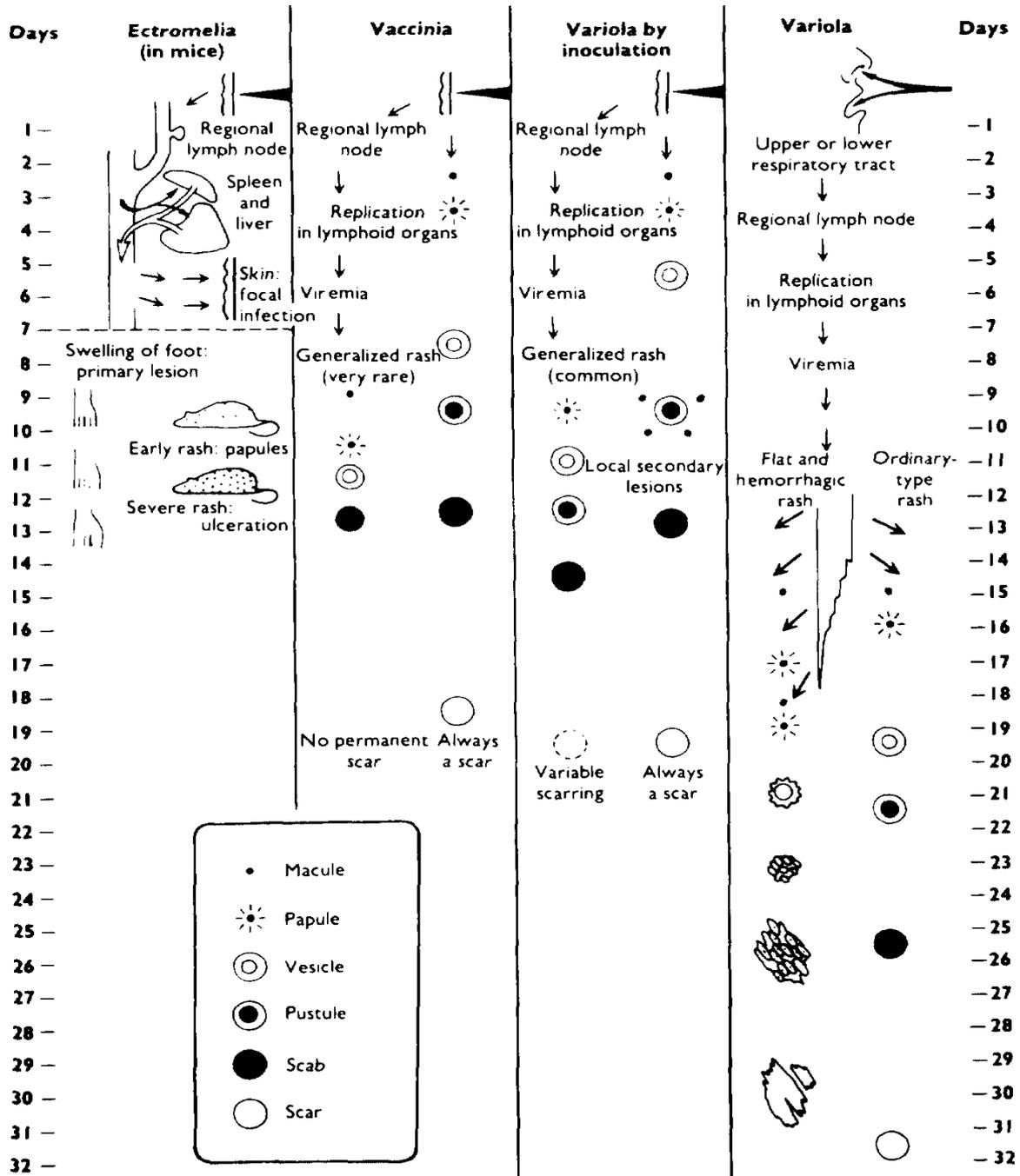


Figure 6 : Physiopathologie des *Orthopoxvirus* (Jesek, 1988 ; Fenner, 1989).

I.4.1.1. Entrée du virus

Les récepteurs cellulaires des *Poxvirus* restent encore inconnus, mais ce groupe de virus a un tropisme général pour leur entrée dans les cellules. La porte d'entrée peut varier selon le virus en cause, mais deux voies principalement connues sont la voie cutanée et la voie respiratoire.

I.4.1.2. Au niveau loco-régional

Lorsque la peau est la porte d'entrée, les études avec l'Ectromélie ont suggéré que le virus doit être introduit dans le derme afin d'aboutir à une l'infection systémique (**Roberts, 1962**). Le virus se réplique dans la couche malphigienne de l'épiderme au niveau des fibroblastes et des histiocytes. Ces derniers sont probablement responsables du mouvement ultérieur du virus vers les voies lymphatiques pour lancer les événements nécessaires à une maladie systémique. Lorsque les voies respiratoires sont utilisées comme porte d'entrée, des études expérimentales par inhalation d'aérosols ont entraîné simultanément des infections des voies respiratoires supérieures et inférieures (**Roberts, 1962**). La réplication virale se produit dans les macrophages alvéolaires et les bronchioles, puis le virus se déplace vers les ganglions lymphatiques pulmonaires régionaux. La compréhension des infections humaines naturelles avec le virus de la variole suggère que la méthode de transmission commune de tous les *Orthopoxvirus* était la voie respiratoire. On pense que l'infection primaire se produit dans les surfaces muqueuses du tractus nasopharyngé, puis celle-ci se déplace vers les lymphatiques régionaux.

I.4.1.3. Au niveau systémique

La description de la propagation des virus du genre *Orthopoxvirus* au niveau systémique après l'infection initiale et la propagation au niveau régional par voie lymphatique, résulte du modèle animal. Il s'agit d'études d'infection à Ectromélie chez la souris, chez les lapins et chez les primates non humains. L'utilisation des anticorps marqués à la fluorescéine et la quantification des titres en virus infectieux dans des organes à différents moments de la maladie, ont fourni la majorité de ces informations (**Westwood, 1966**). Le virus se déplace des lymphatiques régionaux vers le sang pour provoquer une virémie primaire, puis il se multiplie dans la rate, le foie, la moëlle osseuse et d'autres organes réticuloendothéliaux. Après cela, une seconde période de multiplication virale s'ensuit, suivie de l'ensemencement

de sites éloignés, en particulier de la peau, provoquant des éruptions cutanées caractéristiques.

Les particules virales sont principalement associées aux cellules pendant les phases virales de la maladie. Dans l'ectromélie, la réplication du virus dans les macrophages du foie se propage dans les cellules parenchymateuses du foie causant une nécrose; une réplication et un effet similaires du virus se retrouvent dans la rate et la moelle osseuse. Chez certaines espèces de souris consanguines, la maladie est si prononcée à ce stade que la mortalité survient avant le développement de l'éruption cutanée (**Buller, 1991**).

En dehors des rongeurs, les primates non humains plus proches de l'homme ont fait l'objet de recherche expérimentale sur la pathogénie des *Orthopoxvirus*. L'exposition des primates dans le zoo de Rotterdam en 1964, ainsi que l'étude de Heberling traduisent l'évolution variable du *Monkeypoxvirus* d'un primate à l'autre (**Peters, 1966 ; Gispén, 1967 ; Herberling, 1976**). Des recherches plus récentes ont également exploré cette expérience de l'infection des primates non humains par le *Monkeypoxvirus* (**Zaucha, 2001**). L'évolution de la maladie est superposable à celle de l'homme. Au cours de la première semaine d'infection, il existe une atteinte loco-régionale des ganglions lymphatiques et une réplication du virus dans les organes lymphoïdes, suivie d'une virémie. Une éruption commence à la deuxième semaine, les lésions produisant des macules, des papules, des vésicules, des pustules et des croûtes jusqu'à la formation de cicatrice dès J8 à J23 de l'infection. Des zones d'inflammation et de nécrose cellulaire ont été observées dans les amygdales, les ganglions lymphatiques, les voies digestives, les testicules, les ovaires, les reins, le foie et les poumons. La dégénérescence épithéliale, la nécrose et les corps intracytoplasmiques ont été observés dans la peau et les muqueuses.

I.4.2. Manifestations cliniques

La variole constitue le tableau clinique le plus sévère des *Orthopoxvirus*. Le monkeypox ou variole du singe présente chez l'homme, les caractéristiques d'une variole atténuée avec présence d'une lymphadenopathie non retrouvée dans la variole. Ces manifestations cliniques sont consécutives à une exposition respiratoire, percutanée ou permucosale au virus. Les descriptions classiques du programme de surveillance active au Zaïre (RDC) ont toujours fourni la plus grande partie de notre compréhension du monkeypox humain. Après une période d'incubation de 7 à 17 jours (moyenne, 12 jours), commence un prodrome de fièvre,

de céphalés, de douleur de dos et de fatigue. L'éruption cutanée évolue comme celle de la variole. Les lésions évoluent au même stade dans n'importe quelle partie du corps à partir de macules, de papules, de vésicules, de pustules, puis de croûtes et de cicatrices.

Ceci est apparemment plus fréquent chez les individus non vaccinés. Chez eux, une présentation pléiomorphe des lésions cutanées a été observée. Suite à la résolution de l'éruption cutanée, l'hypopigmentation est suivie d'une hyperpigmentation des lésions cicatrisées. La lymphadénopathie préexistante distingue cliniquement le *monkeypox* de la variole. La lymphadénopathie dans la zone du visage (au niveau cervical, postauriculaire, submandibulaire et inguinal) peut être assez prononcée.

Malgré son caractère bénin par rapport à la variole, des cas mortels sont parfois rapportés avec un taux de mortalité entre 2 et 10% (**Jezeq, 1987 ; Levine, 2007**). Les figures après sont issues de l'étude sur l'épidémie du *Monkeypoxvirus* de 2015 en République Centrafricaine (Source, Institut Pasteur de Bangui).



Figure 7a: Photographie de lésions de *monkeypox* sur tout le corps



Figure 7b: Photographie de lésions de *monkeypox* au niveau du membre supérieur



Figure 7c : Photographie de lésions de *monkeypox* au niveau du membre inférieur

I.4.3. Lésions au niveau cellulaire

Les corps d'inclusion cytoplasmique sont une caractéristique histopathologique typique des infections par *Orthopoxvirus*. Deux morphologies sont observées: les corps d'inclusion de type A, où les virions sont regroupés dans une structure intracytoplasmique ou des inclusions de type B (corps de Guarneri) qui sont périnucléaires et contiennent le viroplasma et des particules virales. Contrairement aux inclusions de type A qui sont rencontrées dans le *cowpox* (Corps de Downie), l'*Ectromelia* (corps de Marchal), les corps d'inclusion de type B sont retrouvés chez tous les *Orthopoxvirus*. La figure 8 traduit l'évolution des corps de Guarneri dans le temps.

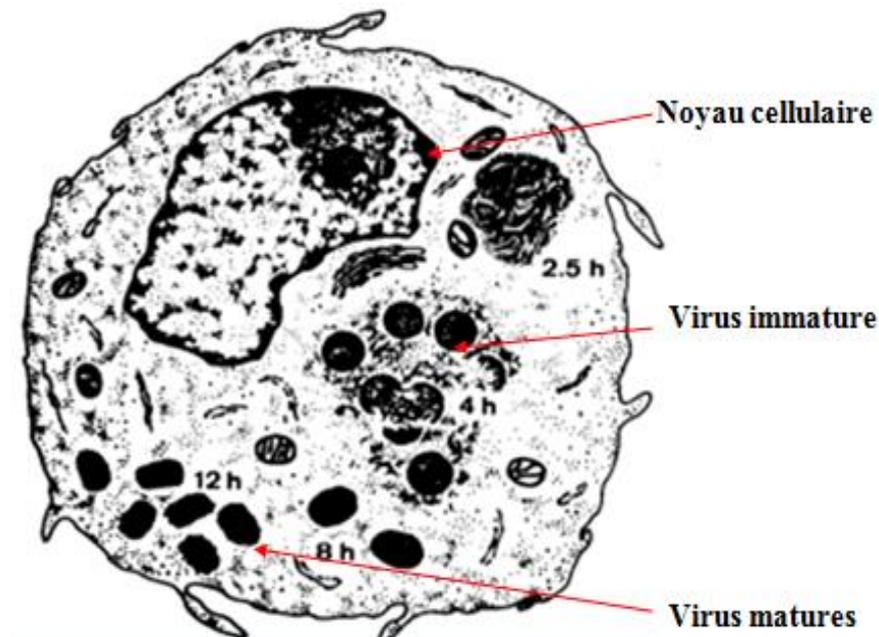


Figure 8: Corps d'inclusion de type B au niveau cellulaire : les cupules sont perçus au niveau cytoplasmique à 2,5 heure. De la 4ème heure à la 8ème heure, présence de virus immatures et après la 8ème heure, apparition des virus matures (Bennett, 1997).

Les corps d'inclusion de type B (corps de Guarneri) au niveau de la membrane chorioallantoïdienne après coloration à l'éosine-bleu de méthyle due au virus de la variole sont présentés au niveau de la photographie de la figure 9A et la lésion histologique due au *Cowpoxvirus* au niveau de la photographie de la figure 9B.

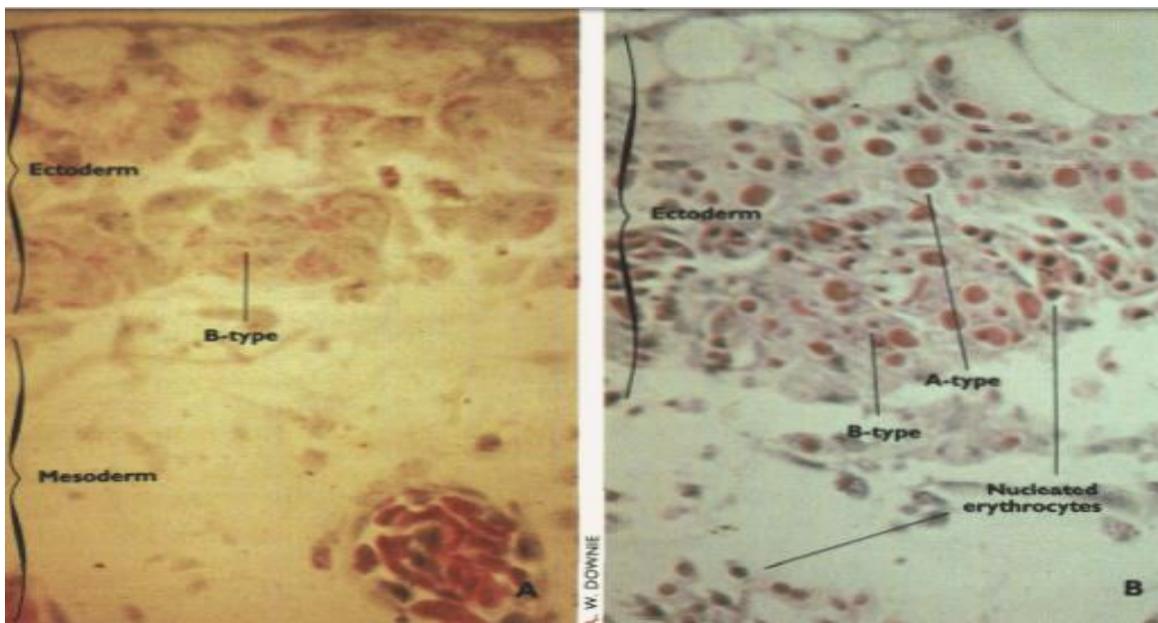


Figure 9 : lésions histologiques dues *au Cowpoxvirus* : (A) corps d'inclusion de type B (corps de Guarnieri) dans des cellules ectodermiques hyperplasiques de la membrane chorioallantoïde, dans un pock produit par le virus de la variole. Notez que la surface du pock est intacte et qu'il n'y a pas d'érythrocytes dans l'ectoderme, bien qu'ils soient présents dans un vaisseau dans le mésoderme (B) : Inclusion de type B (inclusion pâle-rouge, irrégulière) et type A (grande inclusion éosinophile), dans un pock. Il existe également un certain nombre d'érythrocytes nucléés dans l'ectoderme et libres dans le mésoderme, et la surface du pock est ulcérée. Ces modifications intracytoplasmiques entraînent des modifications de la forme des cellules infectées (voir figure 9).

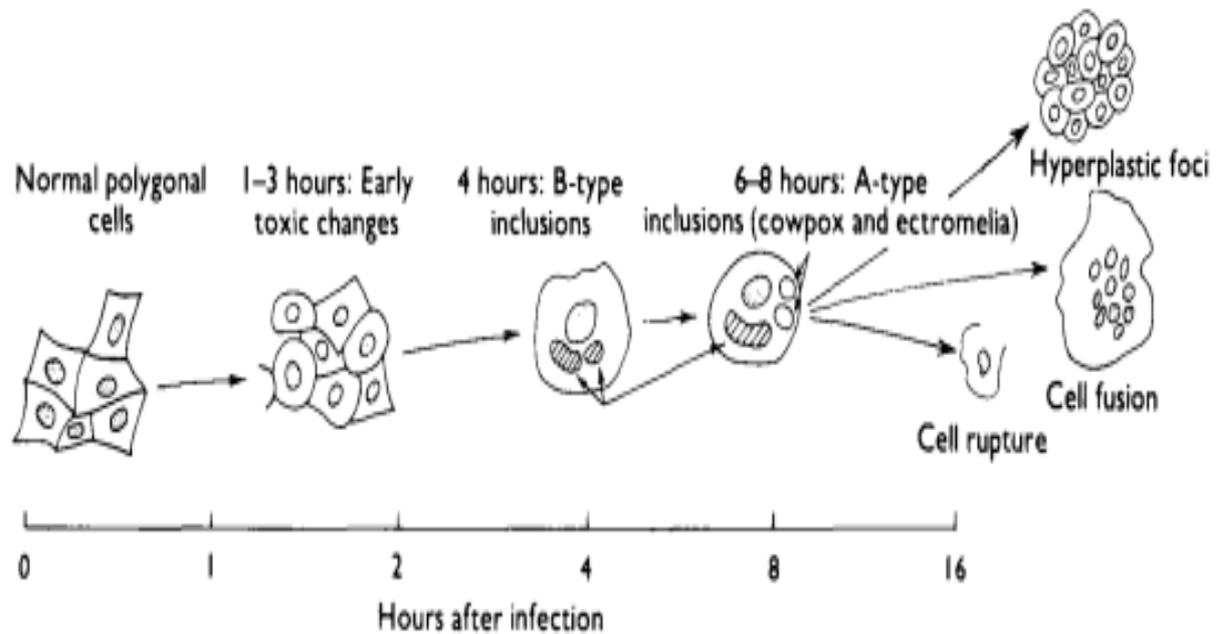


Figure 10 : Changement morphologique des cellules infectées dans le temps (Fenner, 1989)

La lésion virale se développe principalement dans l'épiderme. L'atteinte de l'épiderme est précédée de l'atteinte de la couche papillaire du derme à type de dilatation capillaire, du gonflement des cellules endothéliales et des manchettes périvasculaires avec présence des lymphocytes, des macrophages, des polynucléaires éosinophiles. Par la suite, dans l'épiderme, les cellules de la couche malpighienne gonflent et se vacuolisent pour subir une dégénérescence en ballon. Des inclusions de type B peuvent être observées dans le cytoplasme. Le cytoplasme continue d'augmenter, une perte de matière nucléaire est notée, et la coalescence des vacuoles par rupture cellulaire crée une dégénérescence réticulante des couches médianes et supérieures de la strate spinosum. Dans les étapes suivantes, la vésicule est formée. Les cellules du stratum spinosum inférieures et de la couche basale présentent une condensation et des noyaux nucléaires fragmentés. La cavité de la vésicule (plus tard la pustule) se développe ainsi jusqu'au derme, ce qui permet la sensation "profondément assise" des lésions pustulaires de la variole. La cavité retient certains restes cellulaires qui créent un aspect multiloculé, ajoutant également à la fermeté de la lésion.

II. AGENT PATHOGENE

II.1. CONSIDERATIONS TAXONOMIQUES

Actuellement, la famille des *Poxviridae* est classée en deux sous-familles dont les membres infectent soit les vertébrés (*Chordopoxvirinae*), soit les invertébrés (*Entomopoxvirinae*).

Le séquençage de l'ADN et l'analyse bioinformatique confirment la relation génétique entre les sous-familles de *Poxvirus* et suggèrent en outre que les virus de la famille des *Poxviridae* soient étroitement liés à d'autres grands virus à ADN, à savoir les membres de la famille des *Asfarviridae*, *Iridoviridae*, *Phycodnaviridae* et des *Mimivirus* nouvellement découverts (Lyer, 2001 ; Sunzan-Monti, 2006). La sous-famille des *Chordopoxvirinae* se compose de huit genres : *Orthopoxvirus*, *Parapoxvirus*, *Avipoxvirus*, *Capripoxvirus*, *Leporipoxvirus*, *Suipoxvirus*, *Molluscipoxvirus* et *Yatapovirus*. Les membres du même genre sont étroitement liés génétiquement. Le genre *Orthopoxvirus* comprend le virus de la variole, le *Cowpoxvirus*, le *Monkeypoxvirus*, le *Camelpoxvirus*, l'*Ectromelia virus*, l'*Horsepoxvirus*, le *Raccoonpoxvirus* et le virus de la vaccine qui est le prototype d'*Orthopoxvirus* qui a été propagé comme vaccin contre la variole pendant 200 ans et peut ne plus exister dans un hôte naturel (Vanregemortel, 2000), bien que les souches dérivées de vaccin circulent actuellement chez les bovins au Brésil (Leite, 2005). Il a longtemps été utilisé pour la vaccination contre la variole, causée par un autre *Poxvirus* qui eut un profond impact sur l'histoire humaine, jusqu'à l'éradication de cette maladie en 1980 (Fenner, 1988, 1992). De plus, le virus de la vaccine a été le premier virus animal observé en microscopie, cultivé sur culture de tissus, titré avec exactitude, purifié physiquement, et analysé d'un point de vue chimique (Moss 2001) .

Le séquençage de l'ADN révèle que les gènes communs au VACV, au virus de l'ectromélie (ECTV), au *Camelpoxvirus* et au CPXV sont identiques à plus de 90%, alors que les données limitées sur les *Orthopoxvirus* indigènes de l'Amérique comme le virus de la Raccoonpox et le virus de la volepox indiquent une divergence génétique accrue (Knight, 1992). CPXV contient tous les gènes présents dans d'autres *Orthopoxvirus*, ce qui suggère qu'il ressemble le plus au membre ancestral de ce genre, tandis que les autres espèces d'*Orthopoxvirus* ont perdu des gènes.

II.2. MORPHOLOGIE ET STRUCTURE DU VIRUS

Il existe toujours des points de désaccord sur la morphogenèse des *Poxvirus* ainsi que sur leur structure propre. Ceci repose sur le fait que plusieurs formes virales coexistent pour un virus donné, en plus d'intermédiaires viraux. Les *Poxvirus* sont de forme parallépipédique ovale, de 300 à 400 nm de long (**Vanregemortel, 2000**) et sont les plus gros virus animaux connus après le *Mimivirus* (> 400nm), unique membre de la famille des *Mimiviridae* (**La Scola, 2003**). Cependant, il semble que la détermination avec exactitude des dimensions du virion ne soit pas aussi aisée à définir qu'il n'y paraît (**Condit, 2006**), même si les données recueillies semblent être globalement en accord avec celles fournies lors d'études anciennes (**Dales, 1981 ; Fenner 1989**). Les valeurs de l'estimation semblent dépendre de la technique utilisée. Ainsi, les données recueillies par cryoélectromicroscopie (**Roos, 1996 ; Griffiths, 2001 ; Smith, 2003**) semblent donner 310x210x140 nm pour le VACV. Une étude utilisant la Microscopie à force atomique suggère une forme ellipsoïde aplatie ayant comme dimensions 350x300x265 nm (**Malkin, 2003**). Enfin, des données récentes semblent définir une forme en barrique, de 360x270x250 nm (**Cyrklaff, 2005**). On peut donc dire que le *Poxvirus* est de forme en ellipse ou en barrique mais que le doute subsiste quant au ratio longueur, largeur, hauteur. L'étude de **Cyrklaff (2005)** donne un aperçu du virus dans une représentation en 3D (Figure 11, 12).

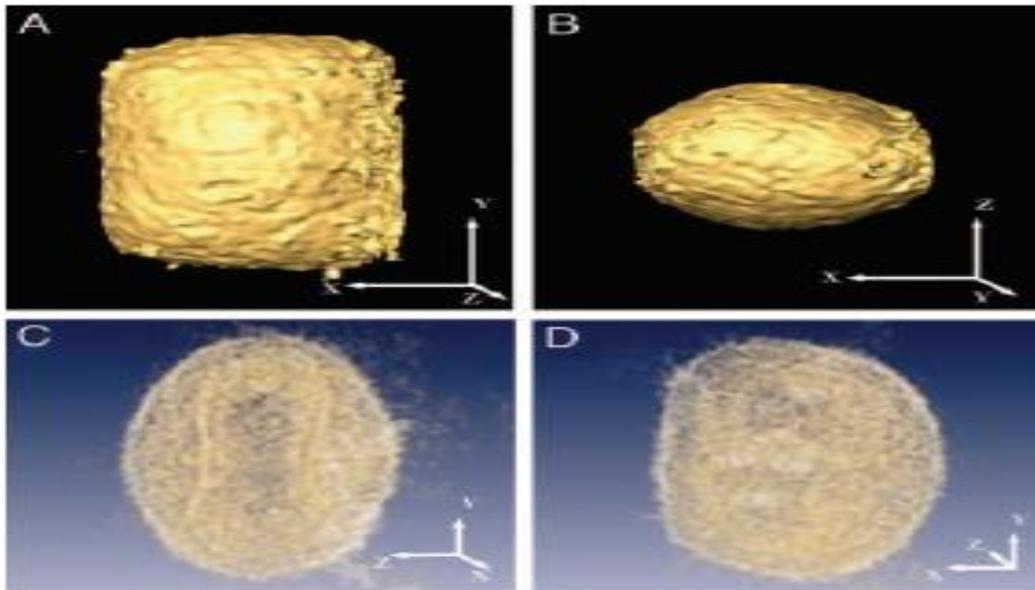


Figure 11 : Représentation volumétrique des particules virales reconstruites. (A et B) mettant en évidence la forme extérieure et la taille du virion. Deux vues orthogonales le long des axes perpendiculaires sont représentées. (C et D) Représentation translucide du virion reconstruit montrant le complexe interne Structure du noyau. (C) permettant ici d'apercevoir le noyau et (D) (Cyrklaff, 2005)

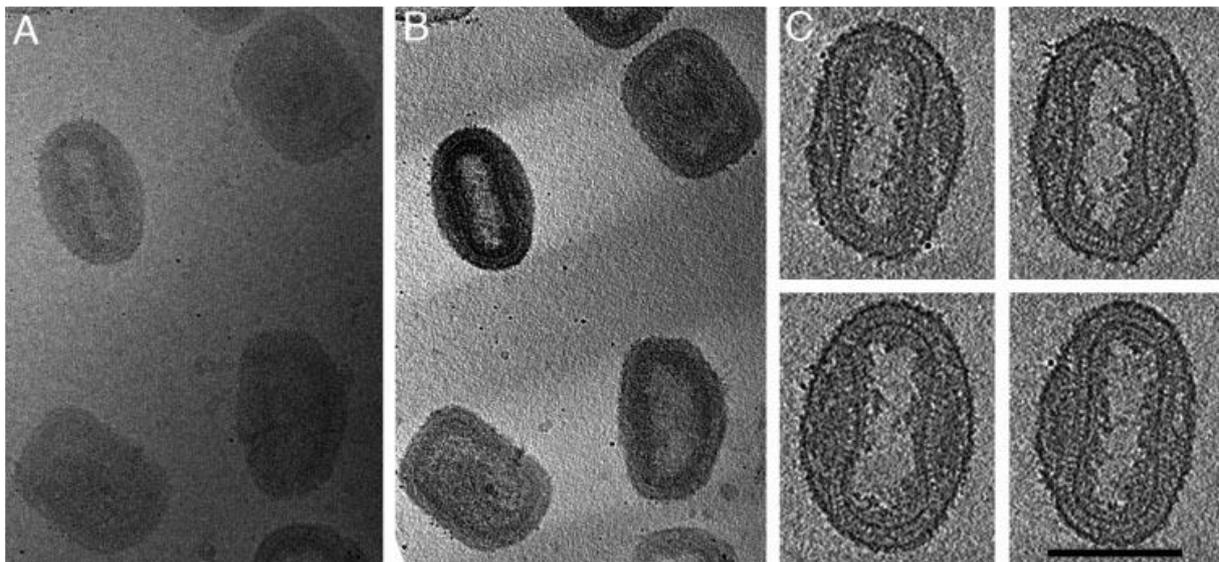


Figure 12: Vue du virus de la vaccine par Cryo-electron tomographie (Cyrklaff, 2005)

Isolated VV particles (IMV) preserved by rapid freezing and viewed by cryo-EM. (A) Cryo-electron micrograph. A typical projection image comprising several particles at different orientations is shown. (B) An x - y section through the tomographic reconstruction of the same area in A. (C) One of the particles depicted in four subsequent x - y sections; each section is 24 nm thick and 24 nm apart from each other (no denoising procedure was applied). (Scale bar: 200 nm.)

La structure du virion est complexe et comprend une enveloppe externe, un noyau en forme d'haltère et un agrégat de matériaux hétérogènes appelés corps latéraux entre les concavités et la membrane externe.

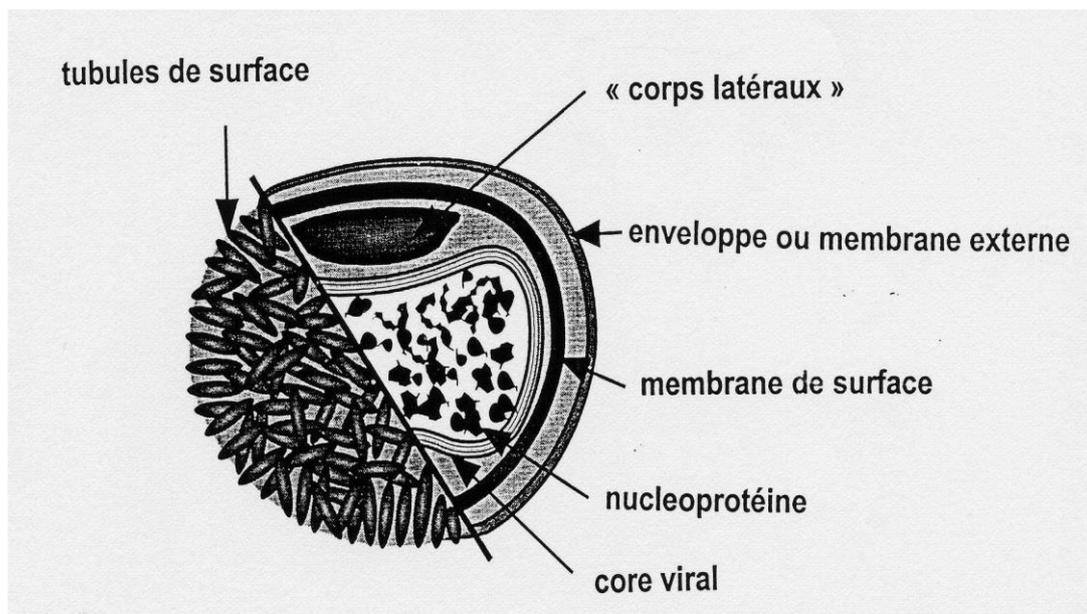


Figure 13 a: Représentation schématique d'un *Orthopoxvirus* forme extracellulaire (EEV)(droite) et intracellulaire (IMV) (gauche) (Vanregenmortel, 2000)

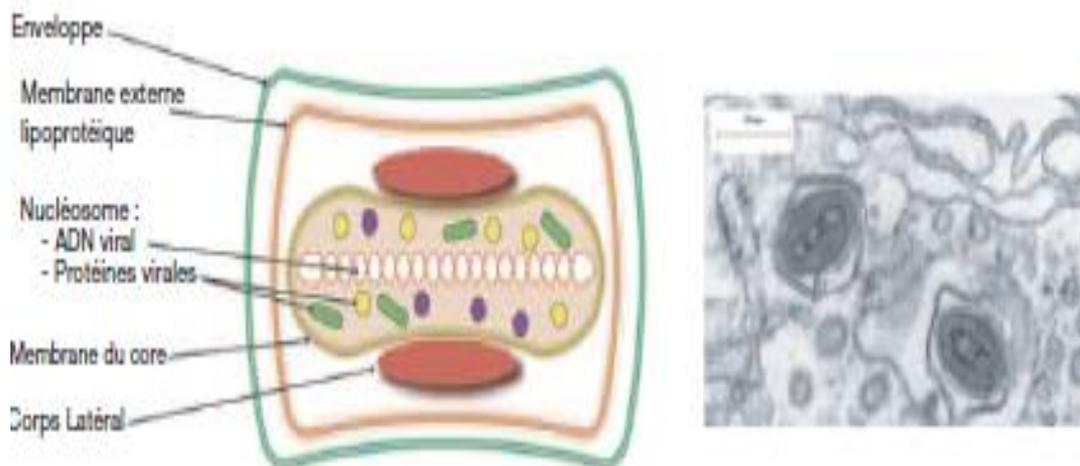


Figure 13b. Représentation schématique (à gauche) et en microscopie électronique (à droite) d'une forme virale enveloppée du virus de la vaccine (VACV) (Duraffour, 2006)

Les différentes formes du virus

Quelle que soit la forme du virus, la présence des « corps latéraux » est constante. Ils se logent dans les cavités du core du virus. Pour certains auteurs, ces corps latéraux ne seraient que des artefacts de microscopie électronique ne correspondant pas à une structure virale en tant que telle (**Dubochet, 1988, 1994**). Par contre cette affirmation est contredite par d'autres auteurs comme **Griffiths (2001)** et **Cyrklaff (2005)** dans des articles plus récents.

La nature et le nombre de membranes permettent de distinguer les *Poxvirus* selon quatre formes distinctes : les IMV (virions intracellulaires matures), les EEV (virions extracellulaires enveloppés), les CEV (virions enveloppés associés à la cellule) et les IEV (virions intracellulaires enveloppés).

Les IMV sont formés dans le cytoplasme. On leur attribue classiquement une seule membrane, ce qui a été confirmé par des observations en microscopie électronique (**Carter, 2005**). Les IMV représentent la très grande majorité de la progénie virale. Ils restent séquestrés dans le cytoplasme et sont libérés avec la lyse de la cellule hôte. Cette forme est la plus résistante et serait adaptée au passage du virus d'un hôte à l'autre (**Smith, 1993 ; Smith, 2003 ; Condit, 2006**). Une petite partie des IMV acquiert une double enveloppe supplémentaire dérivée de l'appareil de Golgi ou des endosomes et constitue les IEV. Ils migrent vers la surface cellulaire grâce aux microtubules du cytosquelette et fusionnent avec la membrane plasmique de la cellule hôte. Ils perdent ainsi leur enveloppe la plus externe et produisent la libération d'EEV par exocytose. Une partie des virions, les CEV, est retenue à la surface cellulaire. Les formes EEV et CEV, minoritaires au sein de la progénie virale (de 1 à 30 % selon les virus et les lignées cellulaires) (**Smith, 1998**), sont donc caractérisées structurellement par l'existence d'une membrane supplémentaire, l'enveloppe externe, par rapport aux IMV. Cette enveloppe leur confère des propriétés particulières en terme de reconnaissance des cellules cibles et de protection contre les effecteurs du système immunitaire (**Vanderplasschen, 1998**). Les CEV assurent l'infection des cellules de proche en proche grâce à une queue d'actine qui se forme en dessous d'eux. Les EEV constituent une forme de dissémination virale sur de plus longues distances (**Smith, 2002**) et sont résistants à la neutralisation par les anticorps et à la lyse par les compléments (**Law, 2002 ; Malkin, 2003**). Les IMV et les EEV/CEV (**Smith, 1993,1998 ; Condit 2006**) constituent les deux formes infectieuses.

II.3. GENOME VIRAL

Le génome viral est un long ADN linéaire, bicaténaire, de 130 à 300 kpb, composé d'environ 30 % de bases G+C, terminé aux deux extrémités par des boucles en épingle à cheveux, elles-mêmes précédées de séquences répétées inversées (ITRs). La structure du génome du virus de la vaccine est illustrée schématiquement dans la Figure 14 (Fenner, 1989). La plupart des différences entre les souches et les mutants du virus de la vaccine et entre les espèces d'*Orthopoxvirus* se situent dans la région terminale de la molécule d'environ 20-30 kpb. Actuellement, 100 gènes sont conservés dans tous les *Chrodopoxvirus* et environ la moitié de ceux-ci sont également présents dans les *Entomopoxvirus* (Upton, 2003)

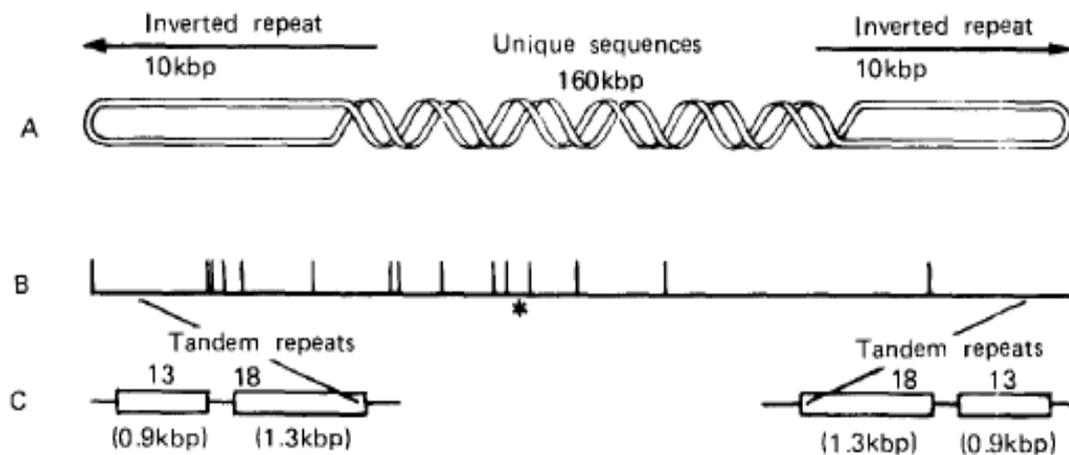


Figure 14: Représentation schématique de l'ADN du virus de la vaccine (souche WR) 5 (Fener 1989). (A) Molécule linéaire à double brin avec épingles à cheveux terminales et répétitions inversées. (B) HindIII! Sites de clivage. L'astérisque indique le fragment contenant le gène de la thymidine kinase, qui est utilisé dans des expériences avec "le virus de la vaccine comme vecteur pour les vaccins hybrides. (C) Chaque partie terminale de 10-kbp comprend deux groupes de répétitions en tandem de séquences courtes riches en AT

Le profil de restriction de cet ADN a montré que le fragment de 90 kpb, composant la région centrale, est très conservé entre les espèces et les souches, alors que les régions terminales sont variables (Gangemi, 1976 ; Esposito, 1985 ; Delange, 1990 ; Du, 1996 ; Moss, 2001). Le séquençage nucléotidique a mis en évidence que les gènes de la région centrale codent majoritairement pour des protéines de structure du virion ou des enzymes impliquées dans la réplication et la transcription virale (Goebel, 1990). Les régions terminales, quant à elles, codent pour des gènes associés à la survie du virus chez son hôte et sont plus variables.

Ce sont des gènes codant pour des protéines homologues de cytokines (virokines) ou de récepteurs de cytokines, d'interférons, d'interleukines, de chimiokines et de facteurs de croissance (virocepteurs) (Upton, 1991). Ces gènes sont probablement d'origine cellulaire et auraient été « capturés » par les *Poxvirus* au cours de leur longue co-évolution avec leurs hôtes naturels. En mimant leurs homologues cellulaires, ils sont capables de moduler les réactions inflammatoires et immunitaires de l'hôte au bénéfice du virus, y compris le phénomène d'apoptose et se comportent comme des facteurs de virulence (Gubser, 2004). A ce jour, plus de 100 séquences génomiques de *Poxvirus* ont été identifiées. Plusieurs études ont abordées le sujet ces dernières années (Upton, 2003 ; Gubser, 2004). Le tableau IV présente quelques caractéristiques du génome de certains *Orthopoxvirus*.

Tableau IV : Caractéristiques de génome des *Orthopoxvirus*

Genome	Numero GenBank	Taille (Kb)	GC%	Protein	References
<i>Vaccinia virus</i>	AY243312.1	194.71	33.3	223	Baroudy 1982
<i>Virus variole majeur (India – 1975)</i>	X69198.1	185.58	32.7	197	Shchelkunov 1996
<i>Monkeypoxvirus (Zaire)</i>	AF380138.1	196.86	33.1	191	Shchelkunov 2001
<i>Cowpoxvirus</i>	AF482758.2	224.5	33.4	233	Hu FQ 1991 et 1994
<i>Camelpoxvirus</i>	AF438165.1	205.72	33.2	211	Afonso 2002
<i>Ectromelia virus</i>	AF012825.2	209.77	33.2	173	Mossman 1995, Chen 2000

Actuellement, 100 gènes sont conservés dans tous les *Chordopoxvirus*, et environ la moitié de ceux-ci est également présente dans les *Entomopoxvirus* (Gubser, 2004).

La structure de la partie terminale du génome a une organisation particulière constituée de répétitions terminales inversées constituées essentiellement et presque exclusivement d'appariements A-T (Figure 15) (Tarbouriech, 2012)

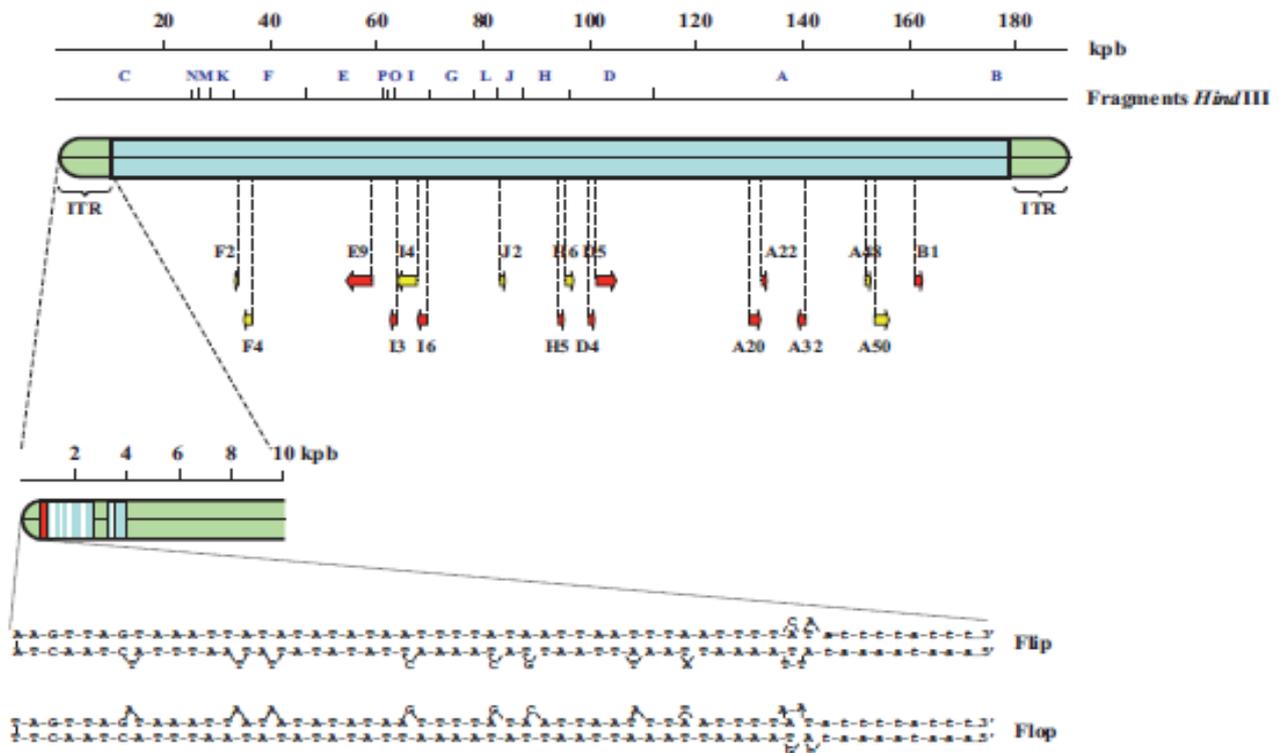


Figure 15. Structure du génome du virus de la vaccine (VACV).

. Le génome du VACV est un ADN double brin linéaire de 192 kpb. L'une des extrémités du génome est agrandie : la zone en rouge représente la région conservée de 87 pb essentielle à la réplication de l'ADN viral et à la formation des génomes matures. Les zones hachurées en bleu représentent les séquences répétées en tandem. La séquence des deux structures en épingle à cheveux (Flip et Flop) est également indiquée (en lettres majuscules)

La nomenclature qui a été retenue pour nommer les gènes des *Poxvirus* est basée sur l'utilisation des 16 fragments de restriction (classés en fonction de leur taille de A à P) obtenus après digestion du génome du VACV (souche Copenhagen) par *HindIII*. Les gènes sont identifiés d'abord par la lettre correspondant au fragment auquel ils sont associés, puis selon leur position sur ce fragment et enfin, selon leur orientation transcriptionnelle, (L)eft ou (R)ight. Ainsi, le gène *E9L* se trouve sur le fragment E. Il s'agit du neuvième gène sur ce fragment (en partant de la gauche) et il est transcrit vers la gauche. La nomenclature choisie pour nommer les protéines est la même sans indiquer l'orientation transcriptionnelle (ex : E9). La position, sur le génome, des gènes codant les protéines impliquées dans la réplication est indiquée (traits en pointillés), ainsi que l'orientation de la transcription. La taille des gènes indiqués par des flèches n'est pas à l'échelle du génome. Le nom de la protéine codée par chacun des gènes est indiqué. En rouge : protéines essentielles. En jaune : protéines non essentielles (**Tabouriech, 2012**)

II.4. ANTIGENES VIRAUX

Les principaux composants du virion des *Orthopoxvirus* (virus de la vaccine prototype de la famille) sont représentés par environ 90% de protéines, 5% de lipides et 3,2% d'ADN, le reste étant composé d'ARN. L'étude des antigènes viraux reste complexe car une centaine de protéines entrent dans la composition du virion des *Poxvirus*. Les glucides sont présents dans les formes enveloppées comme constituant des glycoprotéines (**Essani, 1979 ; Moss, 1979**). Cependant certaines protéines de membrane auraient un rôle majeur dans la production d'anticorps neutralisant. Il s'agit de la protéine B5, A33, L1, A27 (**Fogg, 2004 ; Xiao, 2007 ; Buchman, 2010**) qui sont toutes des protéines ou glycoprotéines de la membrane externe. Au delà des vaccins de troisième génération développés par passages successifs en culture cellulaire (souches LC16m8 et MVA), par délétions ciblées d'un seul gène (souche dVV-L) ou de plusieurs gènes (souches NYVAC et HR), ces protéines constituent les pistes pour les vaccins de quatrième génération développés à partir de protéines virales produites par génie génétique (**Hooper, 2003, 2004**).

II.5. MULTIPLICATION CELLULAIRE

La multiplication du virus est un caractère commun à l'ensemble de la famille des *Poxviridae*. Le cycle de réplication a lieu dans le cytoplasme de la cellule hôte. On peut distinguer plusieurs phases au cours du cycle (Figure 16) (Tabouriech, 2012).

Ces principales étapes de la multiplication virale au sein de la cellule à partir du virus de la vaccine comme modèle ont fait l'objet de travaux (Dales, 1961, 1963).

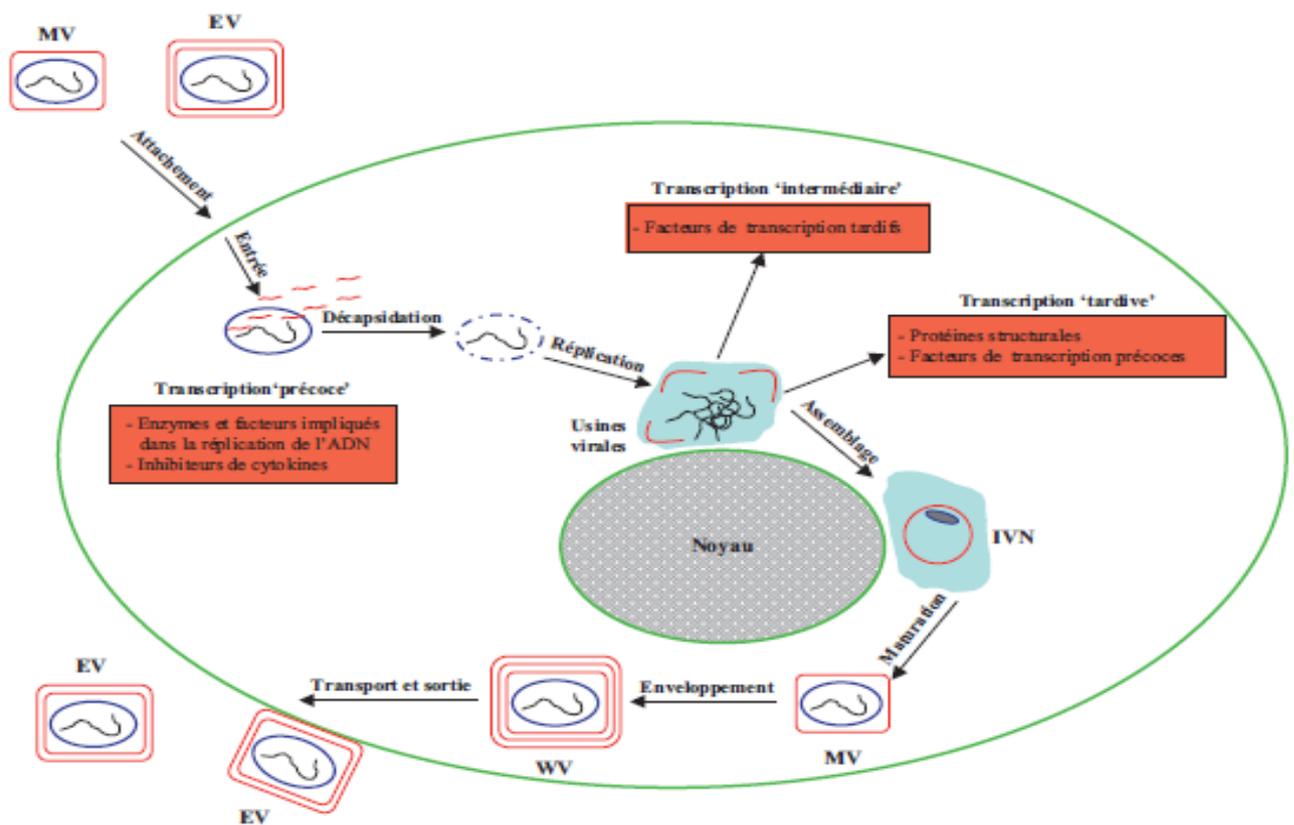


Figure 16 : Représentation schématique du cycle de réplication des *Poxvirus* (les formes MV (*mature virions*) et EV (*extracellular virions*)) (Tabouriech, 2012)

Au cours de leur cycle réplcatif, les *Orthopoxvirus* produisent deux types de particules virales infectieuses : les formes MV (*mature virions*) et EV (*extracellular virions*), ces dernières ayant une membrane lipidique supplémentaire par rapport aux formes MV. Les recherches sur le (s) mécanisme (s) utilisé (s) par les *Poxvirus* pour entrer dans les cellules ont été compliquées par l'existence de MV, qui ont une seule membrane externe, et EV, qui ont une membrane supplémentaire (Figure 17) (Moss, 2006).

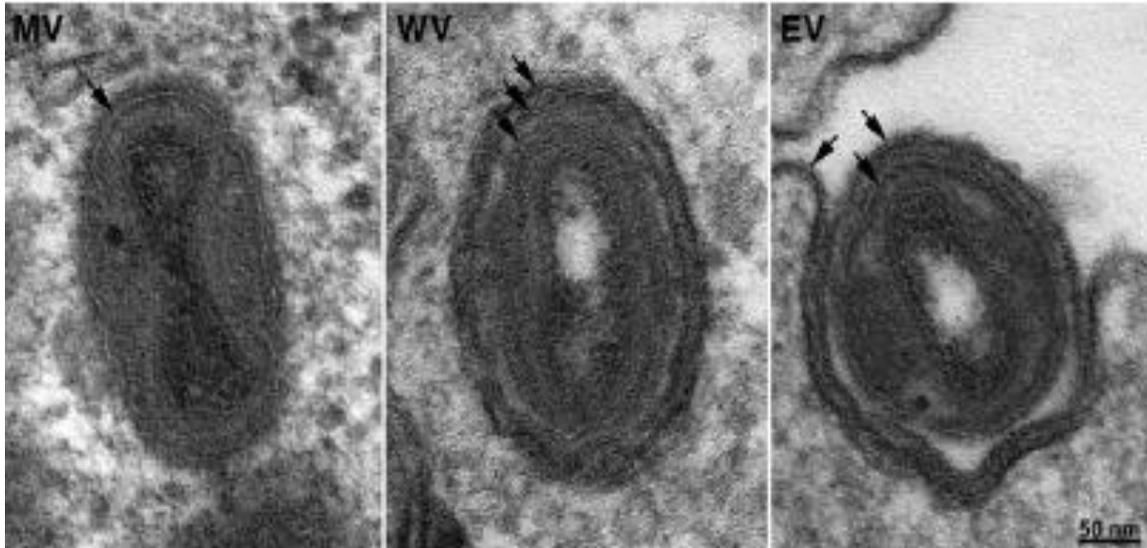


Figure 17: Vue de forme non enveloppée et enveloppée du virus: Transmission electron micrographs of the MV (left panel), WV (middle panel), and EV (right panel) forms of VACV. Left panel: arrow points to the single membrane of MV. Middle panel: one arrow points to the MV membrane and two to the outer wrapping membranes. Right panel: one arrow points to the outer wrapping membrane that has fused with the plasma membrane and the others to the MV membrane and remaining EV wrapper. Electron microscopic images were kindly provided by Andrea S. Weisberg.

Les deux formes ayant des protéines de surface différentes, deux sites de liaisons distincts ont été évoqués. L'étude de Vanderplasschen en 1997 a confirmé cette hypothèse (Vanderplasschen, 1997).

II. 5.1. Attachement et pénétration du virus

La première étape du cycle viral correspond à l'attachement des virions à la surface de la cellule. À l'heure actuelle, aucun récepteur cellulaire spécifique permettant l'entrée des *Poxvirus* n'a pu être identifié avec certitude.

II.5.1.1. Concernant l'attachement des MV à la cellule infectée

Il est prouvé que les MV contiennent des protéines qui facilitent l'attachement initial aux cellules en se liant aux glycosaminoglycanes. Les protéines de fixation D8, A27 et H3 peuvent se lier respectivement au sulfate de chondroïde pour la D8 et au sulfate d'héparine pour le A27 et H3 (Tscharke, 1999 ; Tulman, 2002 ; Hooper, 2003 ; Moss 2006). Cependant, dans l'état actuel, elles ne peuvent être considérées individuellement comme responsables de l'attachement du virus à la cellule hôte. La protéine A27 a été appelée protéine de fusion en raison de la capacité des anticorps spécifiques contre la protéine A27 soluble à bloquer l'entrée de MV et la fusion cellule-cellule (Gong, 1990 ; Hsiao, 1998 ; Vasquez, 1999).

II.5.1.2. Concernant l'attachement des EV à la cellule infectée

Les EV possèdent une membrane supplémentaire par rapport aux MV. Les anticorps dirigés contre les MV inactivés ne protégeaient pas les rongeurs contre une infection par *Orthopoxvirus* ainsi que des anticorps contre les virus vivants ou les EV (Appleyard, 1971 ; Boulter, 1973) inactivés. La membrane supplémentaire contient plusieurs protéines glycosylées uniques (A33, A34, A56, B5 et K2) et une non-glycosylée (F13). Certaines de ces protéines comme A34 ont une influence sur le degré d'infectiosité, d'autres comme le B5 sur le processus d'entrée du virus et le A56 et K2 sur la fusion cellulaire (Tuner, 1995 ; Mcintosh, 1996 ; Galmiche, 1999). Les protéines impliquées dans l'attachement restent encore à élucider.

II.5.1.3. Pénétration de la cellule

Les mécanismes d'entrée des deux formes virales restent également sujets à controverse. Selon la souche virale et la lignée cellulaire, il a été établi que les formes MV peuvent entrer dans la cellule, soit après fusion de la membrane virale avec la membrane plasmique (Armstrong, 1973 ; Doms, 1990 ; Caster 2005), soit par macropinocytose (Dales, 1963, 1964 ; Mercer 2008).

Deux modèles d'entrée sont également proposés pour les formes EV. Des données suggèrent qu'elles pourraient entrer par endocytose (Vanderplasschen, 1998) ou par un mécanisme au cours duquel la membrane externe de la particule virale « s'ouvre » au contact de la cellule

pour permettre la fusion de la membrane interne de l'EV avec la membrane cellulaire (**Law, 2006**).

II.5.1.4. Récepteurs cellulaires

Les récepteurs spécifiques qui sont nécessaires pour la pénétration du virus dans la cellule n'ont pas encore été identifiés formellement. Les propositions selon lesquelles le récepteur du facteur de croissance épidermique et les récepteurs de chimiokines servent de récepteurs pour l'entrée du virus (**Marsh, 1987 ; Lalani 1999**) ont été vite contredites par des études plus approfondies (**Hugin, 1994 ; Marters, 2001**).

L'entrée des virus dans la cellule va permettre la libération du nucléoïde viral dans le cytoplasme.

II.5.2. Autres étapes de la réplication virale

Dans les deux cas, il y a libération dans le cytoplasme, du « core » viral contenant le génome, étape que l'on nomme la décapsidation. Après la décapsidation (20 minutes postinfection), les ARNm viraux précoces codant l'ADN polymérase, l'ARN polymérase et les facteurs de transcription viraux sont transcrits et traduits dans une structure granulaire contenant des facteurs de transcription et des polyribosomes de la cellule hôte. La synthèse de ces enzymes virales permet alors la réplication de l'ADN viral et la transcription des ARNm intermédiaires codant les facteurs de virulence. Il y a ensuite transcription des ARNm tardifs codant les protéines de structure, les enzymes virales tardives et les facteurs de transcription dits précoces, qui seront « enveloppés » avec la particule virale naissante. La morphogénèse des nouveaux virions a lieu dans une région cytoplasmique dénuée de ribosomes et d'organelles, appelée le « virosome » ou « usine virale ». L'assemblage des *Poxvirus* qui débute dans les usines virales est un processus unique au cours duquel une bicouche lipidique (en forme de croissant) va être formée et va évoluer pour donner naissance à des particules virales immatures (IV) contenant un nucléoïde (**Smith, 2004 ; Laliberte, 2010**). Les virions néosynthétisés vont alors être transportés à l'extérieur des usines virales et vont adopter leur forme en brique caractéristique pour donner des formes MV (IMV) qui seront libérées après lyse cellulaire. Un certain nombre de particules va également acquérir une double membrane dérivée de l'appareil de Golgi (*wrapped virions* [WV] = IEV). Les formes WV vont être dirigées vers la membrane plasmique, grâce au réseau de microtubules et, après fusion avec

cette dernière, libérées sous formes EV (EEV) dans le milieu extracellulaire. Il faut toutefois noter qu'au cours du processus de bourgeonnement certaines particules virales peuvent rester attachées à la membrane plasmique (CEV). Les MV sont responsables de la dissémination d'un individu à un autre car ils sont très résistants dans le milieu extérieur, sont stables à température ambiante et conservent leur pouvoir infectieux même après dessiccation ou une fois enchâssés avec le fibrinogène au sein des croûtes issues de la maturation des pustules. Les EEV et les CEV sont responsables de la dissémination au sein de l'organisme infecté. Les EEV permettent une dissémination à longue portée vers les organes par leur passage dans le sang, alors que les CEV assurent une dissémination directe dans le tissu par passage de cellule hôte à cellule hôte adjacente (**Smith, 2002**).

II.6. CARACTERES PHYSICO-CHIMIQUES

II.6.1. Température

Les *Orthopoxvirus* sont inactivés par la chaleur (stérilisation en autoclave et incinération) (**Butcher, 2005**). Le pouvoir cytopathogène d'une suspension virale du *Camelpoxvirus* a été aboli après un chauffage au bain-marie à 56 °C pendant 10 minutes (**Nguyen, 1989**). La température a un impact important sur la culture de ce groupe de virus. Le tableau tiré de l'étude de Bebson montre la réduction du titre viral dans le temps d'une suspension de *Poxvirus* exposée à une température de 55°C

Tableau V: La réduction du titre (unités log₁₀) des suspensions de *Poxvirus* après chauffage à 55 ° C (**Bedson 1961**).

Virus	Strain	Period of heating		From
		20 min.	40 min.	Fenner (1958) 55° C. for 40 min.
Rabbit pox	Utrecht	—	1·5	0·9
Vaccinia	Lederle-7N	5·3	> 8·0	4·6
Vaccinia	Connaught Lab	1·2	3·1	1·2
Cowpox	Brighton	1·6	—	1·6
Cowpox	Larkin	2·3	—	—
Monkey pox	Denmark	2·4	—	—
Ectromelia	Moscow	3·2	—	—
Ectromelia	Hampstead	2·8	—	—
Variola major	Harvey	2·1	—	—
Variola major	Hinden	1·4	—	—
Variola minor	Winkel	5·2	—	—
Variola minor	Butler	5·1	—	—

v b

Cependant sous forme séchée, les *Orthopoxvirus* sont stables, à la température ambiante (**Dales, 1964**)

II.6.2. Caractéristiques chimiques

Les *Orthopoxvirus* sont sensibles à l'hypochlorite de sodium à 0,5 %, aux désinfectants ménagers à base de chloroxylène, au glutaraldéhyde, au formaldéhyde et au paraformaldéhyde (**Butcher, 2005**). Par contre, le traitement par certains solvants organiques comme l'éther à 1/20 n'avait eu aucun effet sur le titre d'une suspension virale de *Camelpoxvirus* à 10^{5.5} DICC₅₀/mI et un contact avec du chloroforme à 1/20 pendant une nuit à 4 °C a baissé ce titre à 10^{2.8} DICC₅₀/ml. Le cidofovir est considéré comme un agent thérapeutique potentiel pour les infections à *Orthopoxvirus*, car il s'est avéré actif contre de nombreux virus à ADN in vitro, y compris les *Orthopoxvirus* (**De Clercq 2002**)

III. DIAGNOSTIC BIOLOGIQUEatq

La manipulation et le stockage du *Monkeypoxvirus* en dehors de la culture doit se faire au moins dans un laboratoire de niveau de biosécurité 2. En outre, tous ceux qui entrent au laboratoire doivent avoir été vaccinés avec le vaccin smallpox. Les animaux infectés par le virus simien doivent être conservés et manipulés dans un laboratoire conçu pour la biosécurité de niveau 3. Le diagnostic est réalisé à partir des prélèvements réalisés sur le plancher des

vésicules, pustules effondrées ou de croûtes lors des lésions cutanées et sur le pharynx. Les différents essais de laboratoire de diagnostic pour le *Monkeypoxvirus* comprennent l'isolement du virus et la microscopie électronique, la PCR, la recherche d'IgM et IgG par la méthode ELISA, le test d'immunofluorescence et l'analyse histopathologique. Malheureusement, bon nombre de ces méthodes sont peu spécifiques et sont incapables de différencier une infection *Monkeypoxvirus* de l'infection à d'autres *Poxvirus*. La biologie moléculaire reste à l'heure actuelle la méthode diagnostique la plus utilisée pour la mise en évidence du virus de la variole du singe.

III.1. ISOLEMENT DU VIRUS

L'isolement viral peut être effectué par culture sur membrane chorioallantoïdienne des œufs de poule. Les seuls *Poxvirus* dont on sait qu'ils infectent l'homme et provoquent l'apparition de pustules sur la membrane chorioallantoïdienne des œufs de poule sont quatre *Orthopoxvirus* : le virus variolique, le virus de l'orthopoxvirose simienne, le *Cowpoxvirus* et le virus de la vaccine. Les pustules observées chez des embryons de 12 jours incubés à 34,5-35°C présentent des différences morphologiques qui se sont révélées utiles pour la différenciation des espèces d'*Orthopoxvirus*.

Bien que les *Orthopoxvirus* se multiplient de manière satisfaisante dans l'embryon de poulet, la culture cellulaire constitue généralement une option plus simple. Ces virus peuvent se multiplier dans diverses lignées cellulaires connues, notamment les suivantes :

- Cellule Vero (Cellules de rein de singe),
- Cellule de lapin RK 13,
- Cellules HeLa (cellules cancéreuses ovarienne humaines),
- MRC-5 (Cellules fibroblastique diploïdes humaines)
- des cellules de rein d'embryon de porc
- ou par inoculation au lapin ou à la souris. Malgré l'existence de nouvelles méthodes de diagnostic, l'isolement du virus reste la méthode idéale. De plus, la culture du virus est la seule méthode dont on dispose pour produire suffisamment de virus vivants en vue d'examen ultérieurs. Les caractéristiques biologiques des *Orthopoxvirus* qui infectent l'homme sur ces différentes cellules vivantes constituent des éléments majeurs de discrimination entre les différentes espèces (Tableau VI).

Tableau VI : Caractéristiques biologiques des *Orthopoxvirus* infectants l'homme (Moss 2001)

	<i>Monkeypoxvirus</i>	<i>Cowpoxvirus</i>	<i>Smallpoxvirus</i>	<i>Vacciniavirus</i>
Lésions sur membrane chorioallantoïdienne œuf embryonné (CAM)	Petite, opaque, hémorragique	large, hémorragique	Petite, opaque, blanchâtre	Variable : large, opaque, blanchâtre ou hémorragique
T°C de culture sur CAM (°C)	39	40	37,5 – 38,5	41
Lesion cutanée chez le lapin	Indurée et hémorragique	Large, indurée et hémorragique	Non transmissible	Indurée, nodule, parfois hémorragique
Léthalité pour la souris	Elevée	Variable	Basse	Très élevée
Léthalité pour embryon de poulet	Moyenne	Elevée	Basse	Très élevée
Présence de corps d'inclusion type A	Non	Oui	Non	Non
Présence de corps d'inclusion type B	Oui	Oui	Oui	Oui
Taille du génome (ADN) en kpb	191	220	186	192

III.2. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

La microscopie électronique a souvent joué un rôle majeur dans le diagnostic viral dans le passé. De même, le cas échéant, elle peut être une méthode de première intention pour le diagnostic de laboratoire des infections à *Poxvirus* et peut fournir l'un des premiers indices sur la cause d'une maladie éruptive inconnue. Elle va mettre en évidence un virion à la forme de brique avec corps latéraux et un noyau central.

Par exemple, lors de la récente épidémie de variole du singe américain, les lésions vues par microscopie électronique ont montré des kératinocytes avec un grand nombre de virions matures, ainsi que des virions immatures dans le processus d'assemblage (aussi connu comme "usines virales») dans le cytoplasme. Cependant, cette méthode, ne peut pas différencier les espèces d'Orthopoxvirus [Nalca, 2005]. La préparation et l'examen des échantillons demandent de la patience et de l'expérience. Même si l'on trouve rapidement des particules virales en forme de petites briques caractéristiques des *Poxvirus*, il est utile de continuer à scruter l'échantillon car d'autres virus peuvent également être présents. Selon le nombre de particules, l'examen d'un échantillon peut prendre une trentaine de minutes, de sorte qu'il

peut falloir jusqu'à deux heures après réception des échantillons pour avoir le résultat de la microscopie électronique.

III.3. METHODES MOLECULAIRES

L'évolution rapide des méthodes de diagnostic moléculaire a été une avancée considérable dans le diagnostic de microorganisme. Les techniques telles que l'amplification génique par la PCR, les micropuces sont largement utilisées dans le diagnostic des *Orthopoxvirus*.

III.3.1. Amplification génique classique ou PCR classique

Des stratégies d'essai d'acide nucléique ont été développées et publiées. Il existe pour la PCR applicable à l'identification et à la différenciation des *Orthopoxvirus*, des protocoles expérimentaux qui reposent sur les séquences des gènes codant pour l'hémagglutinine (HA) (**Ropp, 1995**), le modificateur B de la réponse cytokine (CrmB) (**Loparev, 2001**) et la protéine des corps d'inclusion type A (**Meyer, 1997**). Dans ces protocoles, la PCR est effectuée en utilisant des amorces qui sont supposées amplifier un segment d'ADN présent dans tout *Orthopoxvirus* (Tableau VII).

L'amplicon est digéré au moyen d'une endonucléase de restriction appropriée, puis séparé par électrophorèse en gel pour différencier les espèces en comparant les profils des fragments aux profils RFLP des virus de référence. Pour différencier les espèces d'*Orthopoxvirus* en une seule réaction, un test basé sur la PCR multiplex a été récemment mis au point.

Tableau VII : Amorces de PCR classique pour le diagnostic d'*Orthopoxvirus* et du *Monkeypoxvirus*

Virus	Gene cible	Séquences d'amorces	Taille (pb)	Référence
<i>Orthopoxvirus</i> (<i>Consensus</i>)	HA	EACP1: 5 'ATG ACA CGA TTG CCA ATA C 3'	942	Ropp et al., 1995
		EACP2: 5 'CTA GAC TTT GTT TTC TG 3'		
<i>Monkeypoxvirus</i>	HA	MPV1: 5 'CTG ATA ATG TAG AAG AC 3'	406	Ropp et al., 1995
		MPV2: 5 'TTG TAT TTA CGT GGG TG 3'		
<i>Monkeypoxvirus</i>	ATI	ATI-up-1: 5'- AATACAAGGAGGATCT-3	1500	Meyer et al., 1997
		ATI-bas-1: 5'- CTTAACTTTTTCTTTCTC-3 '		
<i>Monkeypoxvirus</i>	ATI	Gabon-1: 5'- GAGAGAATCTCTTGATAT-3 '	601	Neubauer et al., 1998
		Gabon-2: 5'- ATTCTAGATTGTAATC-3 '		

HA : Hemagglutine de surface ATI : Corps d'inclusion de type acidophiles

III.3.2. Amplification génique en temps réel ou PCR en temps réel

Les techniques classiques de PCR font désormais place à la PCR en temps réel. Contrairement à la PCR classique, la PCR en temps réel combine l'amplification et la détection de l'ADN cible dans un même réacteur, ce qui dispense des longues opérations à effectuer après la PCR et réduit le risque de contamination croisée. En outre, la PCR en temps réel fournit des données quantitatives. Plusieurs techniques PCR en temps réel (Ison, 2004 ; Kulesh, 2004 ; Li 2006) sont utilisées pour la détection des *Orthopoxvirus* dont le *Monkeypoxvirus* (Tableau VIII).

Tableau VIII : Amorces de PCR temps réel pour le diagnostic d'*Orthopoxvirus* et du *Monkeypoxvirus*

Virus	Gène cible	Séquences d'amorces et de sonde	Référence
<i>Orthopoxvirus</i> (<i>Consensus</i>)	E9L	E9L- sens: 5'-TCA ACT GAA GAA GCC ATC TAT GA-3 E9L inverse 5'-GAG TAT AGA GCA CTA TTT CTA AAT CCC A-3 ' Sonde E9I-NVAR: 5'TET-CCA TGC AAT ATA CGT ACA AGA TAG TAG CCA AC-3 '	Li, 2006.
<i>Monkeypoxvirus</i>	B6R	B6R sens: 5'-ATT GGT CAT TAT TTT TGT CAC AGG AAC A-3 ' B6R inverse 5'-GGC AAT GTT GAC AAT TAT GGG TG-3 ' Sonde 5'-MGB / DarkQuencher-AGA GAT TAG AAA TA-FAM3	Li, 2006
<i>Monkeypoxvirus</i>	F3L	Forward : F3L-F290: 5'-CTC ATT GAT TTT TCG CGG GAT A-3 ' Inverse : F3L-R396: 5'-GAC GAT ACT CCT CCT CGT TGG T-3 ' Sonde : F3Lp333S-MGB: 5'-6FAM-CAT CAG AAT CTG TAG GCC GT-MGBNFQ- 3 '	Kulesh, 2004
<i>Monkeypoxvirus</i>	N3R	Forward : N3R-F319: 5'-AAC AAC CGT CCT ACA ATT AAA CAA CA-3 ' Inverse : N3R-R457: 5'-CGC TAT CGA ACC ATT TTT GTA GTC T-3 ' Sonde : N3Rp352S-MGB: 5'-6FAM-TAT AAC GGC GAA GAA TAT ACT- MGBNFQ-3 '	Kulesh, 2004

III.3.3 Autres méthodes moléculaires

D'autres techniques moléculaires comme l'hybridation moléculaire sont également utilisées (Lapa, 2002).

III.4. AUTRE METHODE : IMMUNOHISTOCHIMIE

Les techniques d'immunohistochimie contribuent au diagnostic des *Orthopoxvirus* à partir de biopsie de peau infectée. Des antigènes d'*Orthopoxvirus* ont déjà été détectés dans des échantillons de biopsie de peau à l'aide d'une coloration immunohistochimique avec des anticorps polyclonaux de lapin anti-virus de la vaccine (Virostat). L'antigène était plus important dans les kératinocytes dégénérés et dans l'épithélium folliculaire mais était absent dans la peau d'apparence normale sur les bords de l'échantillon (Reed, 2004).

III.5. METHODES IMMUNOLOGIQUES

III.5.1. Test d'hémagglutination

Les *Orthopoxvirus* sont les seuls virus à produire un antigène HA détectable par des tests d'hémadsorption et d'hémagglutination à l'aide d'érythrocytes de poulet appropriés. Si le sérum d'un patient provoque l'inhibition de l'hémadsorption ou de l'hémagglutination, c'est le signe d'une infection par un *Orthopoxvirus*. Ces tests, de même que les tests de diffusion en gel et de fixation du complément, étaient des éléments classiques des méthodes de diagnostic en usage antérieurement à l'éradication (c'est-à-dire avant les années 1970). Ces méthodes ne sont plus utilisées de façon systématique à l'heure actuelle, mais elles pourraient constituer des compléments intéressants à réévaluer.

III.5.2 Test de séroneutralisation

Le test de neutralisation basé sur l'utilisation de sérums d'animaux ou de sujets humains infectés est efficace dans 50 à 95 % des cas. Des anticorps neutralisants ont pu être décelés plus de 20 ans après une vaccination à l'aide du virus de la vaccine ou une infection naturelle par un autre *Orthopoxvirus* humain (Putz, 2005).

III.5.3 Test ELISA

Parmi les méthodes sérologiques disponibles, la méthode immunoenzymatique est de plus en plus utilisée (Karem, 2005 ; Reynolds, 2010 ; Macneil 2011). En cas d'épidémie due aux

Orthopoxvirus, cette méthode permettant de mettre en évidence les IgM et les IgG est souvent associée aux méthodes moléculaires (**Karem, 2005**).

IV. EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE DES *ORTHOPOXVIRUS*

Les *Poxvirus* sont une famille d'agents pathogènes viraux connus pour infecter une variété d'organismes comprenant les mammifères, les reptiles, les oiseaux et les insectes. Cette diversité d'organismes susceptibles suggère la possibilité d'une infection d'un ancêtre commun aux vertébrés et aux invertébrés (**Moss, 2001**). La capacité d'infecter à la fois les vertébrés et les invertébrés a permis de diviser les *Poxvirus* en deux sous familles :

Les *Entomopoxvirus* qui infectent les insectes et les *Chordopoxvirus* qui infectent les vertébrés.

Chaque sous-famille comprend des genres dont la classification prend en compte, la spécificité d'hôte, la morphologie du virus, surtout la similitude génétique. Ainsi, la sous-famille des *Chordopoxvirus* comprend plusieurs genres dont les *Orthopoxvirus* comprenant des espèces comme le *Cowpoxvirus*, le virus de la variole, le *Monkeypoxvirus*, virus de la Vaccine etc. Les *Orthopoxvirus* sont les *Poxvirus* qui possèdent une variabilité entre espèces puisque leurs génomes mesurent de 185,58 kpb pour le virus de la variole à 225,50 kpb pour le *Cowpoxvirus* (**Hu, 1991, 1994 ; Shchelkunov, 1996**). *Monkeypoxvirus* a un génome de 196,84 Kpb (**Shchelkunov, 2001**). Les régions centrales sont hautement conservées codant pour les machines de réplication et d'assemblage, et les extrémités terminales plus variables qui contiennent des gènes impliqués dans la détermination de la spécificité d'hôte et la pathogenèse (**Moss, 2001**).

Bien que les *Orthopoxvirus* soient génétiquement similaires, ils ont une variété au niveau de la virulence et de la spécificité d'hôte (**Gubser, 2004 ; Chen, 2005 ; Emerson 2009**). On constate que la perte progressive de gènes, principalement aux extrémités terminales du génome, est un indicateur important de l'évolution de ces virus (**Hendrickson, 2010**). Par exemple, le *Cowpoxvirus* qui provoque seulement une infection légère chez l'homme contient le plus grand génome de tous les *Orthopoxvirus* séquencés et possède une large variété d'hôtes incluant les rongeurs, les humains et les bovins (**Hansen, 2009**). À l'inverse, le virus de la variole qui est hautement pathogène (taux de létalité \approx 30%) (**Henderson, 1999**) possède le plus petit génome.

IV.1 METHODES D'ETUDE

L'épidémiologie moléculaire des microorganismes fait appel à différentes méthodes d'études. Les techniques telles que le polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) et surtout le séquençage du génome sont largement utilisées dans la caractérisation et l'étude des liens génétiques entre les *Orthopoxvirus* (Mackett, 1979 ; Hendrickson, 2010)

IV.1.1 Polymorphisme de longueur des fragments de restriction

La technique du polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) repose sur le fait que le génome d'agents pathogènes même très étroitement apparentés est caractérisé par des variations au niveau des séquences nucléotidiques. Concrètement, la technique RFLP consiste à isoler le virus à identifier, à extraire son ADN et à effectuer sa digestion par une endonucléase de restriction. La digestion produit des fragments d'ADN que l'on sépare ensuite en fonction de leur taille par électrophorèse afin de les visualiser. Théoriquement, chaque souche donne lieu à un arrangement des bandes qui lui est propre et constitue son empreinte génétique. Pour un nouveau protocole expérimental, on peut utiliser un grand nombre d'enzymes de restriction différentes. On obtient alors plusieurs empreintes génétiques moléculaires que l'on peut analyser, ce qui permet de déterminer ainsi quelle est la meilleure combinaison d'enzymes à utiliser pour différencier des souches ou des isolements. La technique RFLP avec l'enzyme de restriction *HindIII* a été utilisée pour distinguer les différentes espèces d'*Orthopoxvirus* (figure 18) (Mackett, 1979). La technique RFLP oblige toutefois à cultiver les virus pendant une longue période afin d'obtenir suffisamment d'ADN de bonne qualité. Cette étude a contribué à la nomenclature des gènes et des protéines qui en découlent au niveau des *Orthopoxvirus*.

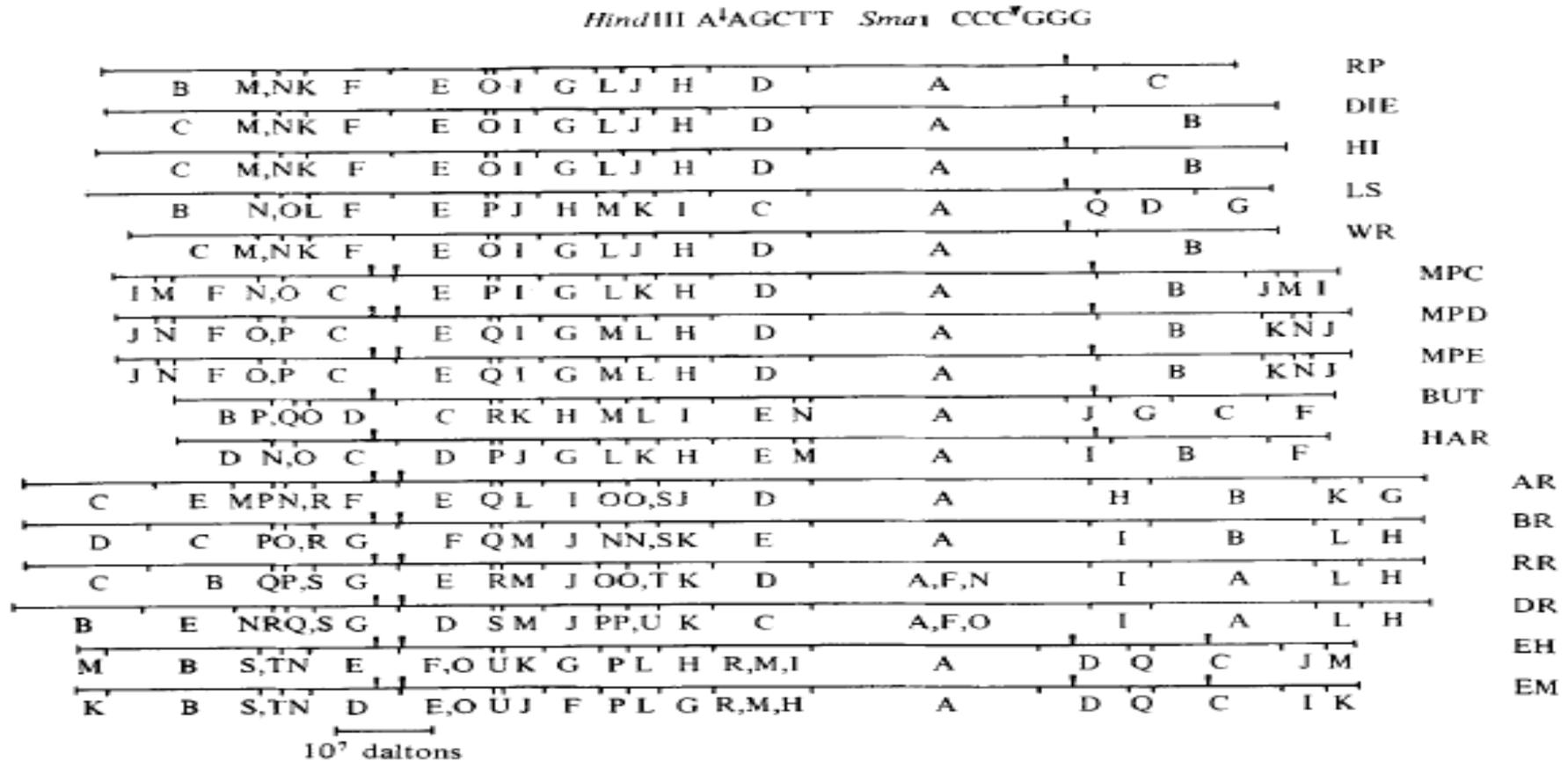


Figure 18 : Résultat de Polymorphisme de longueur des fragments de restriction avec *Hind* III et *Sma*I des différentes souches d'*Orthopoxvirus* (Mackett, 1979)

RP = Rabbipox strain Utrout, DIE = Vaccinia strain DIE, HI = Hall institute, LS = vaccinia strain Lister, WR = Western Reserve, MPC = Monkeypox strain Congo, MPC = Monkeypox strain Danemark, MPE = Monkeypox strain Espana, BUT = variole strain Butler, HAR = Variole strain Harvey, AR = Cowpoxvirus red strain Austria, BR = Cowpoxvirus Strain Brighton, RR = Cowpoxvirus strain Ruthin, DR = Cowpoxvirus strain Daisy, EH = Ectromelia strain Hampstead, EM = Ectromelia strai

IV.1.2. Amplification génique – polymorphisme de longueur des fragments de restriction

Pour avoir une connaissance générale du génome viral dans son entier sans avoir à le séquencer en totalité, une variante de la technique RFLP a été utilisée. Elle consiste à commencer par effectuer une PCR préliminaire destinée à amplifier des régions couvrant l'ensemble du génome. Les amplicons obtenus sont ensuite utilisés comme matrice ADN pour la RFLP. Cette variante de la RFLP, appelée PCR-RFLP, présente une grande sensibilité pour l'identification des agents pathogènes. Elle a été utilisée pour distinguer plusieurs espèces d'*Orthopoxvirus*, parmi lesquelles le virus variolique (Li, 2007).

IV.1.3. Séquençage

Le séquençage a contribué largement à la comparaison génomique entre les *Orthopoxvirus*. Ainsi, les séquences du gène de l'hémagglutinine de plus de 200 *Orthopoxvirus* sont disponibles et se sont révélées utiles pour les études phylogénétiques. Ces études confirment la notion actuelle d'espèce établie qui historiquement avait été proposée sur la base des différents phénotypes de chaque espèce d'*Orthopoxvirus*.

IV.2. SOUCHES VIRALES CIRCULANTES

IV.2.1 Au niveau de l'ensemble des *Poxvirus*

La taille du génome et les divergences au sein des gènes et des séquences rendent l'analyse évolutive de la famille complète de *Poxvirus* difficiles. Ces divergences sont rencontrées tant au niveau des sous-familles qu'au niveau des genres d'une même famille (Bawden, 2000). Cependant, des alignements de haute qualité à l'aide d'un ensemble de gènes bien conservés dans les différents *Poxvirus* peuvent permettre d'avoir une idée de l'évolution de ce groupe de virus (Hendrickson, 2010). Ainsi, la figure 19 présente une prévision phylogénétique de *Poxvirus* sur la base d'alignement d'acides aminés de 20 gènes conservés provenant d'un virus représentatif des différents groupes de virus qui constituent cette famille de *Poxvirus*.

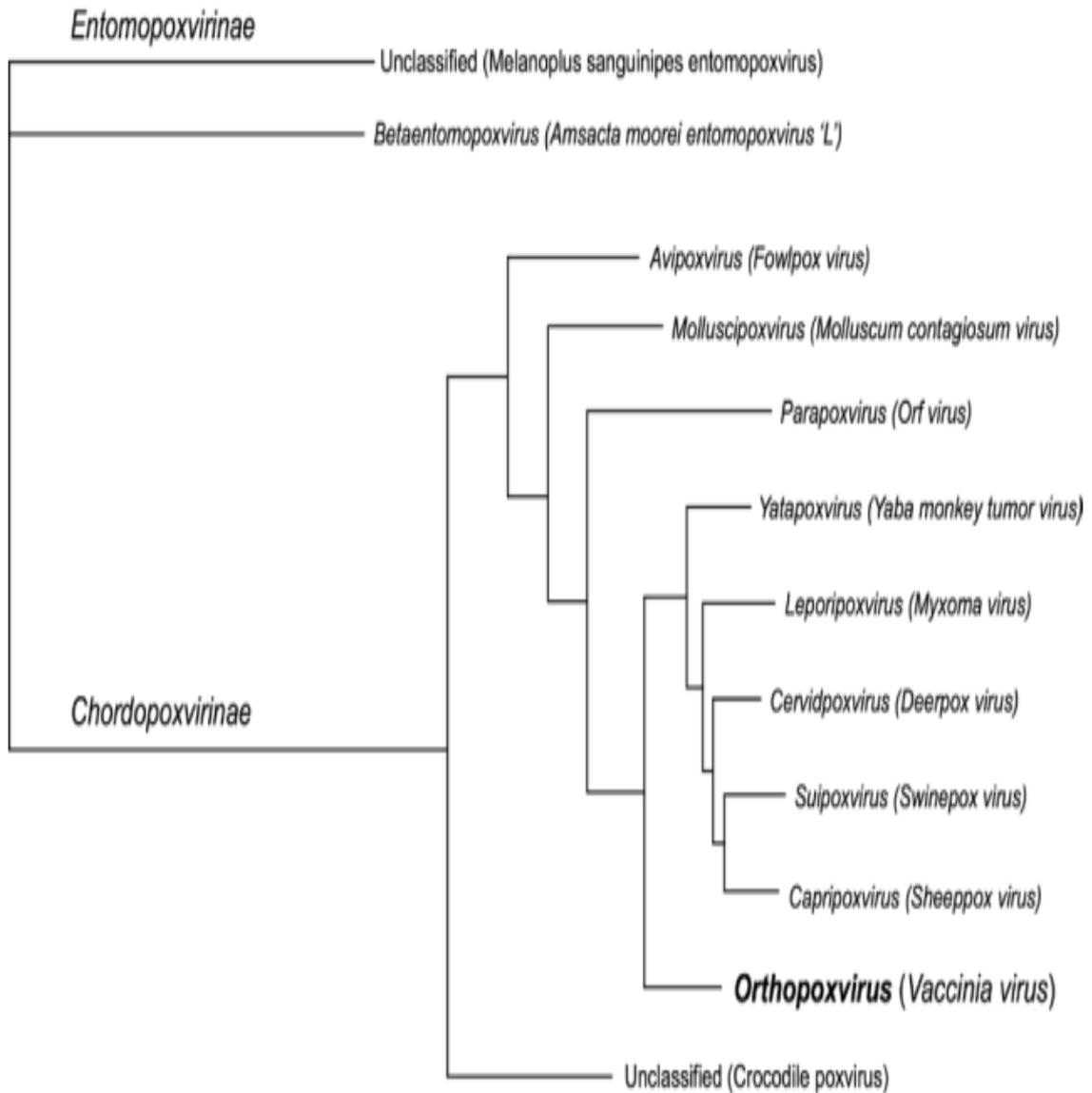


Figure 19 : Phylogénie de séquence de gènes de la famille *Poxviridae*. Chaque noeud terminal est étiqueté avec le nom du genre; et les espèces types pour chaque genre est fourni entre parenthèses (Hendrickson, 2010).

Cet arbre phylogénique délimite clairement les deux sous-familles de *Poxviridae* et montre les relations phylogénétiques qui existent entre les genres de *Chordopoxvirinae*. Cependant, elles peuvent être mieux traduites en alignant plus de gènes conservés dans les *Poxvirus*. Chez ces derniers, environ 49 gènes sont conservés dans l'ensemble des virus de la famille et entre les virus de la sous-famille des *Chordopoxvirus* environ 90 gènes sont conservés (**Upon, 2003**). Ce lien génétique important contribue fortement à l'étude épidémiologique moléculaire dans ce groupe de virus.

VI.2.2 Au niveau des *Orthopoxvirus*

Les *Orthopoxvirus* sont un groupe de virus très proches génétiquement surtout dans la partie centrale du génome. Lorsqu'ils sont comparés au niveau des séquences, deux virus de différentes espèces dans le genre *Orthopoxvirus*, partagent une identité d'au moins 96% au niveau nucléotidique sur la longueur de la région alignable de leur génome, tandis que deux souches de la même espèce présentent au moins 99% d'identité de séquence nucléotidique (**Chen, 2005**). Cet alignement comprend la région centrale du génome ainsi qu'une partie de la région variable jusqu'au point des régions ITR comprenant des délétions importantes empêchant la construction d'un alignement raisonnable (**Gubser, 2002**).

A l'heure actuelle, le *Cowpoxvirus* est supposé être plus proche de l'ancêtre des *Orthopoxvirus* car il rassemble l'ensemble des gènes retrouvés chez les autres *Orthopoxvirus* (**Upton, 2003 ; Gusber, 2004**). La perte progressive de gènes au niveau du *Cowpoxvirus* serait à l'origine des autres espèces d'*Orthopoxvirus* aboutissant à une modification de la spécificité d'hôte et de la virulence des virus concernés.

Une étude phylogénique de séquences géniques du genre *Orthopoxvirus* à partir séquences de 141 gènes de chaque *Orthopoxvirus* (Tableau IX) aboutissant à l'arbre phylogénique de la figure 20 (**Hendrickson, 2010**) donne les observations suivantes :

Bien que considéré comme proche de l'ancêtre des autres *Orthopoxvirus*, l'analyse des séquences de gènes des différentes espèces de *Cowpoxvirus* de cette étude montre clairement qu'ils sont dans des clades distincts. Ainsi *Cowpoxvirus*-GRI forme une branche qui se situe à un point près de la base de la lignée du virus de la vaccine alors que les espèces *Cowpoxvirus*-Ger et *Cowpoxvirus*-BR sont proche des espèces comme l'Ectromélie, le *Camelpoxvirus* et le virus de la variole. Le virus de la variole est très proche du *Camelpoxvirus* et du *Tateravirus*. D'autres analyses génétiques montrent également que les deux *Orthopoxvirus* les plus

proches du virus variolique, avec 98 % de nucléotides identiques sur les 110 kilobases centrales du génome, sont le *Camelpoxvirus* et celui de la variole de la gerbille (*Teratavirus*). La distance génétique entre le *Monkeypoxvirus*, le *Cowpovirus* et celui du virus de la vaccine est beaucoup plus grande (**Shchelkunov, 2001 ; Gubser, 2004 ; Meyer 2005**).

Tableau IX : *Orthopoxvirus* utilisés dans l'analyse phylogénique de la figure 20

<i>Especies d'Orthopoxvirus</i>	Nom de la souche	Abréviation	Numéro genbank
<i>Camelpox virus</i>	Camelpox virus strain M-96 from Kazakhstan	CMLV	AF438165 (NC_003391)
<i>Cowpox virus</i>	Cowpox virus strain Brighton Red	CPXV-BR	AF482758 (NC_003663)
<i>Cowpox virus</i>	Cowpox virus strain Germany 91-3	CPXV-Ger	DQ437593
<i>Cowpox virus</i>	Cowpox virus strain GRI-90	CPXV-Gri	X94355
<i>Ectromelia virus</i>	Ectromelia virus strain Moscow	ECTV	AF012825 (NC_004105)
<i>Monkeypox virus</i>	Monkeypox virus strain MPXVWRAIR7-61; Walter Reed 267	MPXV-WR	AY603973
<i>Monkeypox virus</i>	Monkeypox virus strain Zaire-96-I-16	MPXV-ZAI	AF380138 (NC_003310)
<i>Taterapox virus</i>	Taterapox virus strain Dahomey 1968	TATV	DQ437594 (NC_008291)
<i>Vaccinia virus</i>	Horsepox virus strain MNR-76	HSPV	DQ792504
<i>Vaccinia virus</i>	Rabbitpox virus	RPXV	AY484669
<i>Vaccinia virus</i>	Vaccinia virus strain Ankara	VACV-MVA	U94848
<i>Vaccinia virus</i>	Vaccinia virus strain Copenhagen	VACV-Cop	M35027
<i>Vaccinia virus</i>	Vaccinia virus strain WR (Western Reserve)	VACV-WR	AY243312 (NC_006998)
<i>Variola virus</i>	Variola virus strain Brazil 1966 (v66-39 Sao Paulo)	VACV-BRZ	DQ441419
<i>Variola virus</i>	Variola virus strain Kuwait 1967 (K1629)	VACV-KUW	DQ441433
<i>Variola virus</i>	Variola virus strain Sierra Leone 1969 (V68-258)	VACV-SLN	DQ441437
<i>Variola virus</i>	Variola virus strain South Africa 1965 (103 T'vaal, Nelspruit)	VACV_SAF	DQ441436

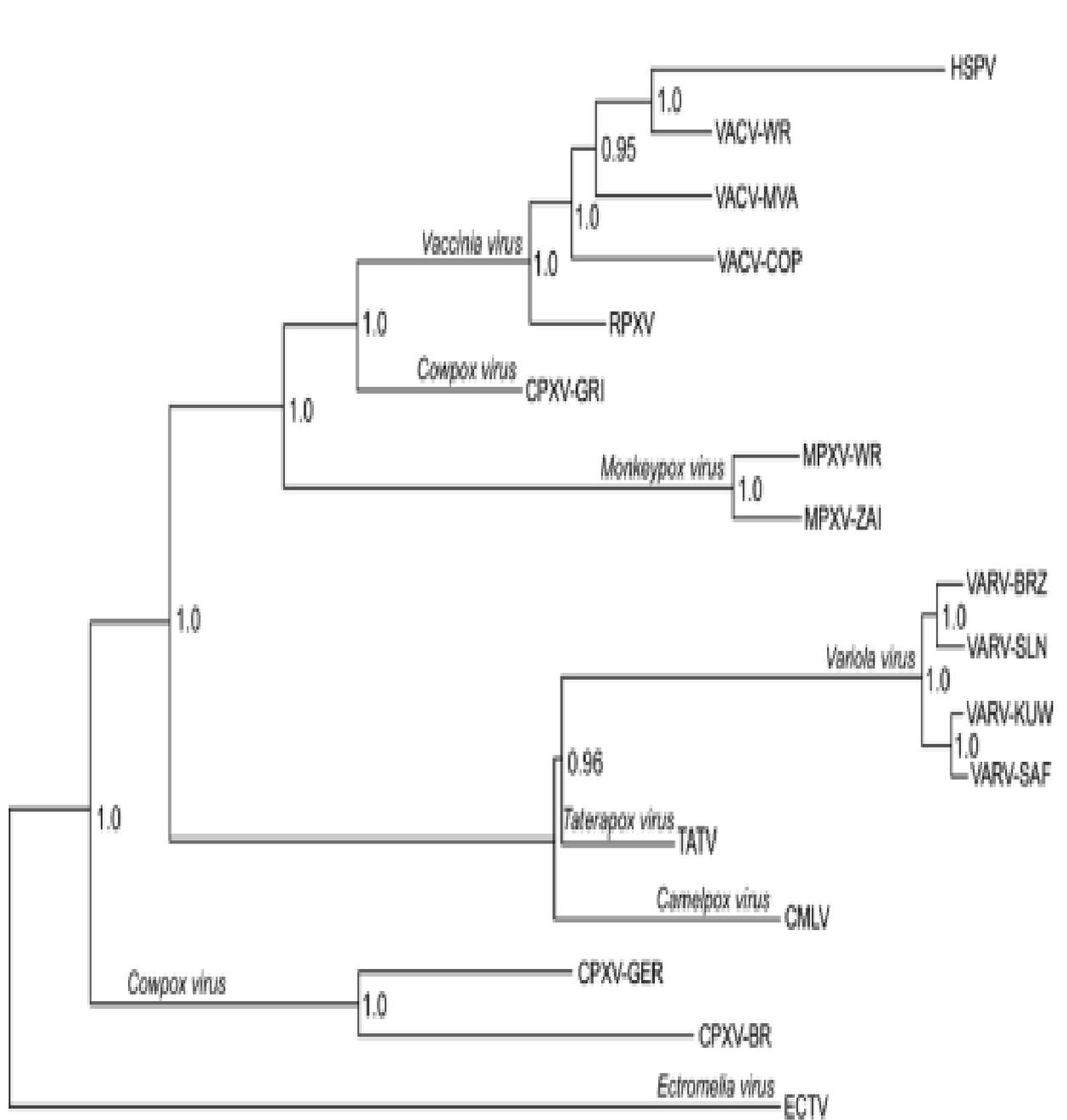


Figure 20 : Arbre phylogénique de séquence génique de virus du genre *Orthopoxvirus*(Hendrickson, 2010).

IV.2.3. Au niveau des *Monkeypoxvirus*

Le *Monkeypoxvirus* en dehors de son incursion en 2003 aux Etats-Unis, reste un virus endémique d'Afrique centrale et occidentale (**Hutin, 2001 ; Learned, 2003**). Sur la base d'analyses phylogénétiques des isolats de *Monkeypoxvirus*, deux clades distincts de ce virus sont en circulation (**Likos, 2005**). Le clade isolé en Afrique de l'Ouest et celui du bassin du Congo en Afrique centrale. Ces deux clades sont géographiquement disjoints et ont défini des différences épidémiologiques et cliniques (**Marckett, 1979**). L'analyse phylogénique portant sur 11 isolats de l'Afrique de l'ouest et 34 isolats de l'Afrique centrale recensés dans le tableau X dans une étude (**Nakazawa et al., 2015**) montrent la distinction entre les deux clades (WA = clade de l'Afrique de l'ouest et CB = clade de l'Afrique centrale dans la figure 21. Le clade CB est plus diversifié avec une répartition en 5 groupes. Une autre étude réalisée en 2014 avait retrouvé la même répartition phylogénique (**Kugelman et al., 2014**). Cependant, les souches du clade de l'Afrique de l'ouest sont moins virulentes que celles de l'Afrique centrale (**Chen, 2005**).

Tableau X : Etude phylogénique des souches virales d'Afrique centrale et occidentale (Nalkazawa et al., 2015)

Souche virale	Localisation géographique	Numéro genbank
Ikubi 1986 (IV)	Ikubi, DRC (Zaire)	KJ642612
**++ Zaire 1996 (IV)	Akungula, DRC (Zaire)	NC_003310
Yambuku DRC 1985 (III)	Yambuku, DRC (Zaire)	KP849471
**++ Mindembo 1979 (II)	Mindembo, DRC (Zaire)	HQ857562
Yandongi 1986 (II)	Yandongi, DRC	KC257460
Bokenda 1970 (II)	Bokenda, DRC (Zaire)	KJ642613
Boende 2008 (II)	Boende, DRC	KP849469
**++ Impfondo 2003 (II)	Impfondo, ROC	DQ011154
Sudan 2005 (II)	Nuria, South Sudan	KC257459
Cameroon 1989 (I)	Ekoumdouma, Cameroon	KJ642618
Gabon 1987 (I)	Gabon	KJ642619
Nigeria 1971	Ihie, Nigeria	KJ642617
Nigeria 1978	Omifunfun, Nigeria	KJ642615
++ USA/Ghana 2003_039	Ghana	DQ011157
**++ USA/Ghana 2003_044	Ghana	DQ011153
++ Copenhagen 1958	Copenhagen	AY753185
++ Walter Reed 1961	Walter Reed	AY603973
Paris 1968	Paris	KJ642616
Rotterdam 1965	Rotterdam	KJ642614
Cote d'Ivoire 1971	Cote d'Ivoire	KP849470
**++ Liberia 1970	Liberia	DQ011156
++ Sierra Leone 1970	Sierra Leone	AY741551
++ Sankuru 06-0950 (II)	Kole Health Zone, DRC	JX878407
++ Sankuru 07-0337 (II)	Kole Health Zone, DRC	JX878423
++ Sankuru 07-0338 (II)	Kole Health Zone, DRC	JX878424
++ Sankuru 07-0450 (IV)	Kole Health Zone, DRC	JX878426
++ Sankuru 06-0999 (III)	Vangakete Health Zone, DRC	JX878409
++ Sankuru 06-1075 (III)	Vangakete Health Zone, DRC	JX878411
++ Sankuru 06-1076 (III)	Vangakete Health Zone, DRC	JX878412
++ Sankuru 06-1070 (III)	Vangakete Health Zone, DRC	JX878410
++ Sankuru 07-0045 (III)	Lomela Health Zone, DRC	JX878413
++ Sankuru 07-0046 (III)	Lomela Health Zone, DRC	JX878414
++ Sankuru 07-0092 (III)	Lomela Health Zone, DRC	JX878415
++ Sankuru 07-0093 (III)	Lomela Health Zone, DRC	JX878416
++ Sankuru 07-0286 (III)	Lomela Health Zone, DRC	JX878421
++ Sankuru 07-0480 (III)	Lomela Health Zone, DRC	JX878427
++ Sankuru 07-0514 (III)	Lomela Health Zone, DRC	JX878428
++ Sankuru 07-0287 (III)	Lomela Health Zone, DRC	JX878422
++ Sankuru 07-0354 (II)	Lomela Health Zone, DRC	JX878425

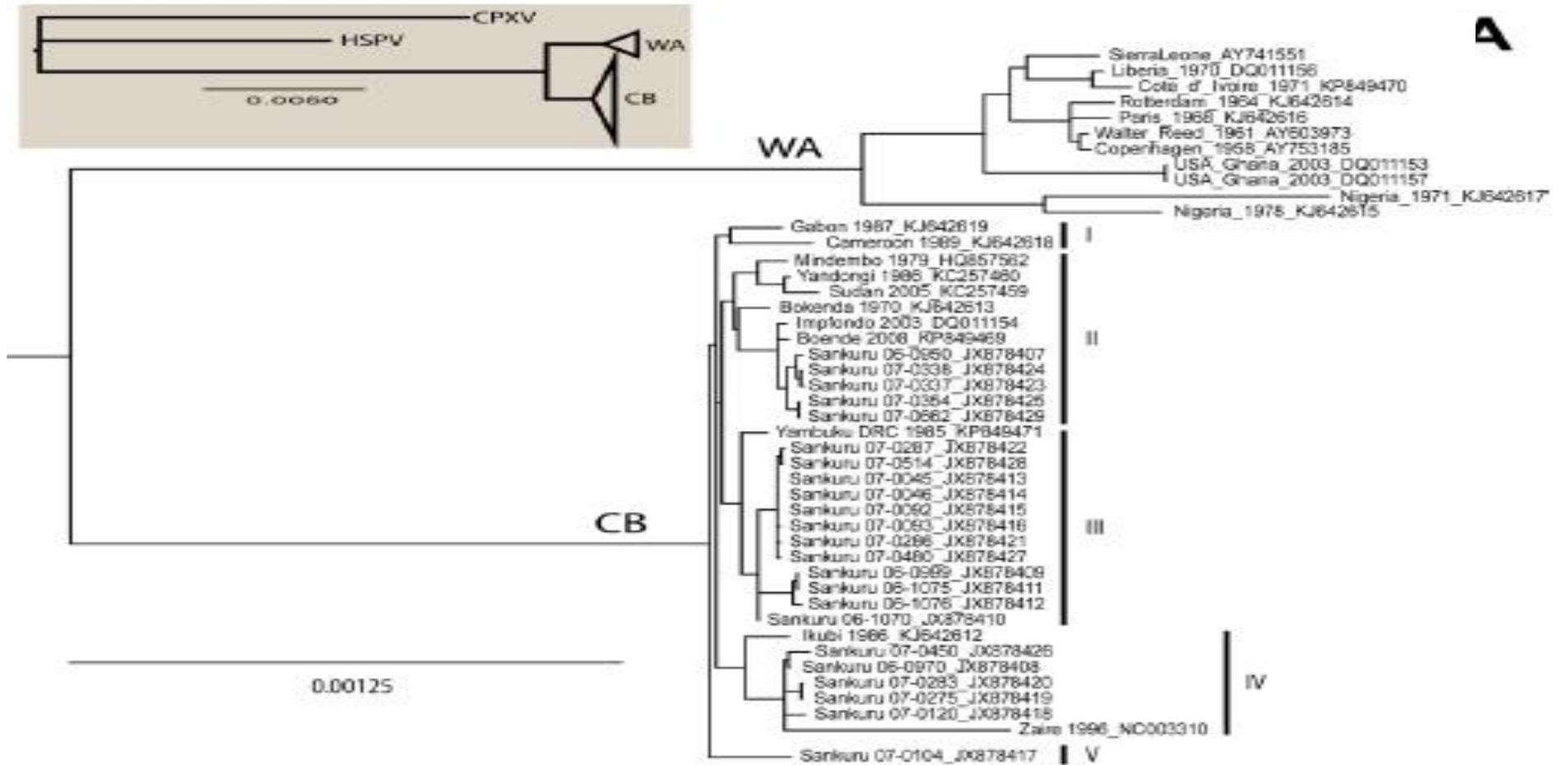


Figure 21 : Arbre phylogénique de séquence génique de *Monkeypoxvirus* (Nalkazawa et al., 2015)

MATERIEL ET METHODES

La réalisation de ce travail a rencontré des problèmes à différents niveaux :

- concernant la capture des réservoirs potentiels, le genre *Funisciurus* qui est retrouvé sur le sol et dans les arbres et des gros rongeurs comme le *Cricetomys*, la non disponibilité de piège adapté nous a amené à opter pour des pièges artisanaux dont les spécificités ont été définies par notre équipe de capture.
- au niveau du diagnostic du virus, il n'existe pas à l'heure actuelle de méthodes de détection moléculaire et sérologique ayant obtenu un consensus. L'acquisition de souche référence d'*Orthopoxvirus* étant soumise à une réglementation stricte définie de l'OMS, nous avons utilisé des ADN de *Cowpoxvirus* extrait d'antigènes *Cowpoxvirus* que nous avons reçu d'un laboratoire collaborateur pour la mise en route de la sérologie comme contrôle positif pour la détection moléculaire des *Orthopoxvirus*. Ces difficultés pourraient influencer les résultats .

I. MATERIEL

I.1. VOLET ANIMAL

I.1.1. Cadre et type d'étude

La Côte d'Ivoire, pays de l'Afrique de l'Ouest s'étend sur une superficie de 322 462 km². Ses frontières dessinent approximativement un carré s'inscrivant entre les coordonnées de 2°30' et 8°30' de longitude Ouest, 4°30' et 10°30' de latitude Nord. Sa végétation présente une grande diversité du Nord au Sud, répartie sur deux domaines, le domaine Guinéen au sud et le domaine Soudanais au nord. Le domaine Guinéen est constitué :

- de forêt ombrophile ou forêt dense humide sempervirente qui ne se défeuille jamais dans son ensemble situé au sud de l'isohyète 1600 mm,
- de forêt mésophile entre l'isohyète 1600 mm et les branches de "V baoulé " qui s'étend de Man à l'ouest à Bondoukou à l'est composé de grands arbres qui perdent leurs feuilles simultanément tandis que les espèces de plus petite taille sont sempervirentes à cause du microclimat,
- les savanes incluses composées d'arbres et arbustes dans les zones de Dabou, Bingerville, et Grand Bassam.

Le domaine Soudanais principalement dans la partie Nord du pays est séparé du domaine Guinéen par des îlots de forêts mésophiles et de savanes entrecoupées de forêt galeries.

Le domaine Guinéen de la Côte d'Ivoire a été le cadre de cette étude sur le réservoir du virus, car les conditions climatiques seraient favorables à la circulation du *Monkeypoxvirus*. L'étude a été réalisée en deux étapes de manière séquentielle.

La première a été effectuée sur les réservoirs, notamment les rongeurs. Elle s'est déroulée d'une part sur des aires protégées dont les parcs nationaux d'Azagny et du Banco, la réserve naturelle de Lamto et la forêt classée de Bossématié (Abengourou) et d'autre part dans les zones périurbaines rurales des villages de Gbétitapéa (Daloa), de Soko (Bondoukou) et des sites périphériques de la ville d'Abidjan (Akouédo, Songon et Adiopodoumé). Il s'agissait d'une étude de cohorte prospective multi-sites (Figure 22).

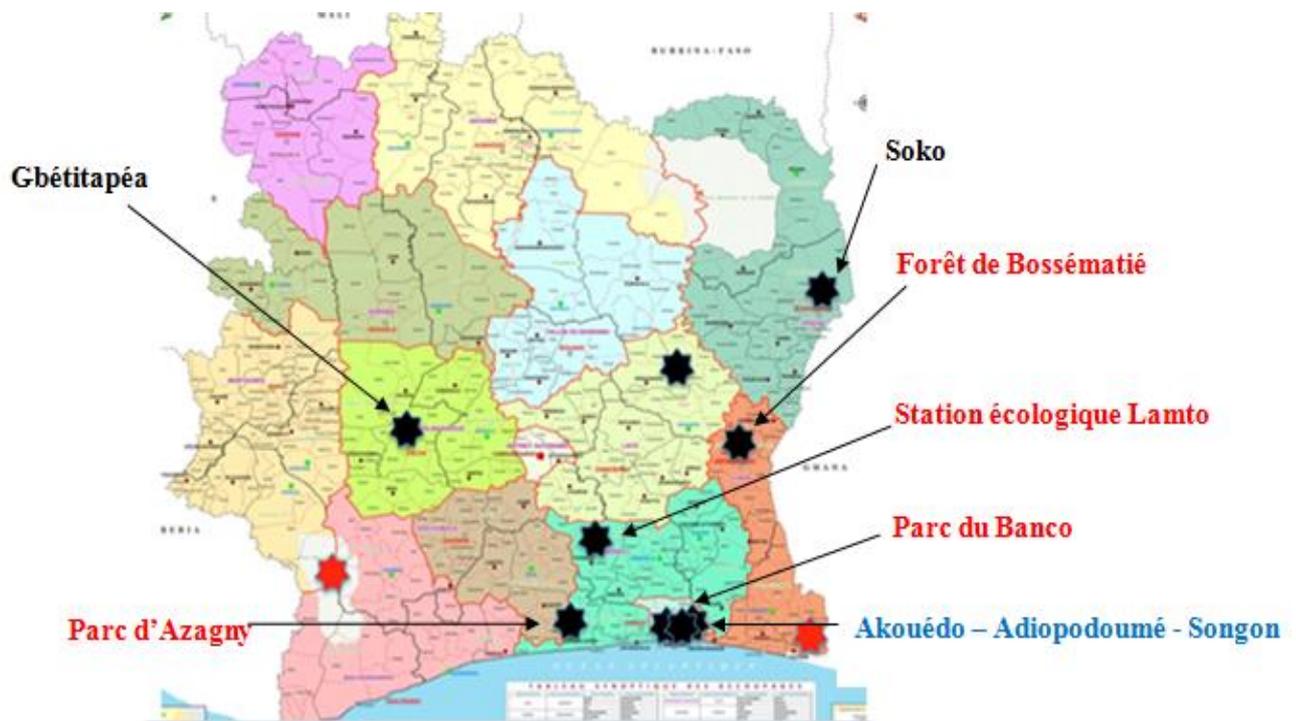


Figure 22 : les différents sites de capture des réservoirs potentiels de *Monkeypoxvirus*
Aires protégées : Forêt de Bossématié, Réserve de Lamto, Parc du Banco, Parc d'Azagny
Zoné rural : Village de Soko et Village de Gbétitapéa
Zone périurbaine : Akouédo, Adiopodoumé, Songon

I.1.2. Critères de choix des sites d'étude

Dans la présente étude, les sites ont été sélectionnés selon les données de la littérature. Il s'agit de données issues de la revue bibliographique concernant la circulation du virus en Côte d'Ivoire et les données écologiques de zones favorables à la circulation du virus (Climat, flore, faune etc.) (Levine, 2007, 2009 ; Nakzawa, 2005, 2015). Les zones géographiques, où cohabitent les hôtes du virus (Homme et autres primates) et les réservoirs (rongeurs) ont été

également, prises en compte. Ainsi, deux situations environnementales, des aires protégées et des aires non protégées ont fait l'objet d'investigation.

I.1.2.1. Choix des aires protégées

L'ensemble des aires protégées choisies se trouve dans le domaine guinéen dont les végétations et le climat sont favorables à la circulation du *Monkeypoxvirus*. Le caractère protégé de ces espaces permet le maintien de la biodiversité et la prolifération des micromammifères.

a) Parc national d'Azagny

Situé entre les 5° 9' et 5° 17' de latitude Nord et entre les 4° 47' et 4° 57' de longitude Ouest dans le Département de Grand-Lahou, sa superficie est d'environ 19000 hectares. Le Parc national d'Azagny présente un climat humide, une végétation diversifiée avec des végétations ombrophiles, littorales, marécageuses et aquatiques. Sa faune abrite des primates et des micromammifères favorables au maintien du *Monkeypoxvirus* dans l'environnement.

b) Parc national du Banco

Il est situé entre les 5° 21' et 5° 25' de latitude Nord et les 4° 1' et 4° 5' de latitude Ouest. Sa superficie est de 3474 hectares. Ce parc présente la spécificité de se trouver dans l'agglomération abidjanaise. Il s'agit d'une zone à forte pluviométrie avec une végétation faite de forêt dense. Ce parc est une zone de circulation de l'homme, d'autres primates et de micromammifères comme les écureuils du genre *Heliosciurus* et le rat d'Emin (*Cricetomys emini*). Ce parc pourrait être un site à risque d'introduction de *Monkeypoxvirus* et autres virus dans la population abidjanaise.

c) Station d'écologie de Lamto

Elle est située entre le 6° 13' de latitude Nord et le 5° 02' de longitude Ouest dans le Département de Tiassalé / Sous-préfecture de Taabo. Sa superficie est de 2500 hectares. Elle se caractérise au niveau de sa végétation par un important peuplement de palmiers rôniers. Sa végétation appartient au secteur mésophile du domaine guinéen. Sa faune est riche de petits mammifères pouvant maintenir l'*Orthopoxvirus* simien dans l'écosystème.

d) Forêt classée de Bossematié

Ce site est situé dans le département d'Abengourou au Sud Est de la Côte d'Ivoire. Sa superficie est de 38000 hectares. Le virus a été isolé pour la première fois en Côte d'Ivoire dans cette zone en 1971, chez un enfant de 10 ans. Les coordonnées géographiques du site sont : 6°22'26'' Nord et 3°32'32'' Est. Il s'agit d'une zone forestière qui abrite à la fois les primates non humains, les hommes et les rongeurs. Les captures ont été réalisées dans toutes ces aires protégées après obtention d'autorisation administrative (Annexe 1).

I.1.2.2. Choix des aires péri-domestiques (aires non protégées)

L'urbanisation intensive réduit de plus en plus la distance entre l'homme et la faune sauvage. Les micromammifères dont les rongeurs constituent le premier lien entre l'homme et cette faune sauvage. Ils sont de plus en plus rencontrés en zone péri-domestique tant en milieu rural qu'en milieu urbain. Ce piégeage, en zone péri-domestique, s'effectue dans des champs, broussailles situés non loin ou au sein des habitations.

a) Zone péri-domestique de Gbétitapéa

Le site de Gbétitapéa est situé dans le Département de Daloa dans la Centre-Ouest de la Côte d'Ivoire. Le virus a été isolé dans cette localité en 1981 chez un enfant de 5 ans. Il s'agit d'une zone tropicale humide. Cette localité abrite des « singes sacrés » qui vivent à proximité de la population.

b) Zone péri-domestique de Soko

Il s'agit d'un village dans le Département de Bondoukou au Nord-Est de la Côte d'Ivoire. C'est un village situé à la frontière Côte d'Ivoire-Ghana. Ce village a connu la présence des « singes sacrés » qui sont de plus en plus rares dans le village. Suite à une épidémie à *Monkeypoxvirus* aux USA en 2003, une étude réalisée en 2010 au Ghana dont la frontière est à 7 Km de Soko (**Renold 2010**), a confirmé la circulation du virus à travers les rongeurs.

c) Zone périurbaine d'Abidjan

Dans cette zone, trois zones péri-domestiques ont été explorées. Il s'agit des sites d'Adiopodoumé, d'Akouédo et de Songon qui sont des sites périphériques d'Abidjan à proximité des végétations où sont très présents les rongeurs. Avec l'urbanisation accélérée de la ville d'Abidjan, le paysage forestier entre la ville d'Abidjan et ces trois villages a presque disparu réduisant ainsi la distance entre l'homme et la faune sauvage.

I.1.3. Population d'étude

La population d'étude est constituée de rongeurs qui sont des réservoirs potentiels selon les données de la littérature (**Khodakevich, 1987 ; Reynold, 2010 ; Hutson, 2015**). Il s'agit de *Funisciurus anerythrus*, *Heliosciurus gambianus*, *Xerus erythropus*, le genre *Graphiurus*, le genre *Cricetomys*, le genre *Mastomys natalensis*. Ainsi que tout autre micromammifère capturé pendant la période d'étude.

I.1.4. Echantillons biologiques

Concernant les échantillons animaux, les prélèvements de foie, de poumon et de rein ont été analysés. Pour la validation des différents tests utilisés dans cette étude, des souches de *Cowpoxvirus* et l'ADN de contrôle (ADN du *Cowpoxvirus* et ADN du *Monkeypoxvirus*) ont été utilisés comme contrôle positif.

I.1.5. Matériel de capture, de collecte et de conservation des échantillons

I.1.5.1. Matériel de biosécurité

Les micromammifères sont des réservoirs potentiels de nombreux microorganismes pathogènes pour l'homme (**Meerburg, 2009 ; Luis, 2013 ; Kouadio, 2013**). Leur manipulation nécessite l'utilisation d'équipements de protection individuelle (EPI). Dans la présente étude, des blouses, des combinaisons à manches longue avec capuche, des gants épais manche longue, des lunettes de sécurité, un casque visière facial de type 3, des tabliers, des masques à usage unique de type P2, des chaussures de protection ont été utilisés (Figure 23a et 23b).

I.1.5.2. Matériel de capture

Il était constitué de différents pièges tels que les pièges de type Sherman, de type Chauvancy, de type artisanal « piège en grillage » et de ligne de trous (piège Pitfalls) pour la capture des rongeurs (Figure 24 et Annexe 2) et de fiche de relevé de piégeage pour le recueil des données de capture (Annexe 3) .

I.1.5.3. Matériel de prélèvement

Un équipement d'autopsie et de dissection composé d'une table de dissection, des équipements de mensuration, le petit matériel de chirurgie, des seringues et des produits anesthésiques de type isoflurane ont été utilisés lors de l'autopsie et de la dissection des

micromammifères (Figure 25). Des feuilles d'autopsie et de prélèvement ont été utilisées pour le recueil des données (Annexe 4).

I.1.5.4. Transport et de conservation des échantillons

Les échantillons collectés ont été transportés dans de l'azote liquide (- 196°C) après obtention d'une autorisation de transport d'azote liquide (Annexe 1) des sites de capture vers l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire (Figure 26). Un congélateur - 80°C a servi à la conservation des échantillons au laboratoire.

I.1.6 . Matériel d'analyse des échantillons

Concernant la PCR à point final, l'amplification a été réalisée à l'aide d'un thermocycler de type GeneAmp PCR System 9700 Applied Biosystem, un bac d'électrophorèse a été utilisé pour la migration et le Gel Doc system de Biorad a été utilisé pour la révélation. Les PCR temps réel de confirmation ont été effectuées à l'aide d'un 7500 Fast ou le Step One plus de l'Applied Biosystem (Annexe 5).

I.1.7. Accord du comité bioéthique

L'ensemble des activités sur ce volet animal a eu l'approbation du comité éthique à travers l'autorisation numéro 024/MSLS/CNER-dkn de 2015 .



Photo 23a : Photographie de port de EPI avant une séance de vérification des pièges



Photo 23b : Photographie de personne en EPI lors d'une séance de mensuration d'un spécimen



Figure 24a : Photographie de piège de type Sherman en position armée



Figure 24b : Photographie de piège artisanal en grillage contenant un *Cricetomys* capturé



Figure 25 : Photographie du matériel d'autopsie et de dissection



Figure 26 : Photographie de mise des échantillons dans la bonbonne d'Azote liquide utilisée pour le transport des échantillons biologiques du site de capture au laboratoire .

I.2. VOLET HUMAIN

I.2.1. Cadre et type d' étude

La deuxième partie a porté sur des études chez l'homme. Il s'est agi dans un premier temps, d'une étude descriptive de séroprévalence à partir de sérums issus d'une surveillance nationale chez des personnes non vaccinées contre la variole afin de connaître le niveau d'exposition de la population au virus. Cette étude a porté sur une biocollection de sérum du Centre des Ressources Biologiques (CeReB) conservée de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire (IPCI) collectée dans le cadre d'une surveillance nationale de fièvres hémorragiques de 2013 à 2015. L'analyse des échantillons a été effectuée au Département des Virus Epidémiques (DVE) dans l'Unité des fièvres hémorragiques. Dans un deuxième temps, une étude d'investigation clinique chez des patients présentant des éruptions fébriles. Ce volet d'investigation clinique a porté d'une part, sur une biocollection de sérum dans le cadre de la surveillance nationale de rougeole du CeReB et, d'autre part, chez des patients suspects de *Molluscum contagiosum* dans les services de Dermatologie clinique d'Abidjan. L'analyse des échantillons a été effectuée au Département Technique et Technologique (DTT) dans l'Unité de la Plateforme de Biologie Moléculaire (PFBM) de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire.

I.2.2. Population d' étude

Les études ont concerné trois groupes de populations selon le type d'étude :

- population de patients ayant bénéficié de prélèvement de sérum lors de la surveillance nationale de fièvres hémorragiques pour l'étude de la séroprévalence d'Orthopoxvirose ;
- population de patients ayant bénéficié de prélèvement de flux oraux et de sérum dans le cadre de surveillance nationale de rougeole pour l'étude d'investigation clinique de Monkeypoxvirose,
- populations de patients ayant consultés pour des lésions cutanées en rapport avec une infection à *Poxvirus* dans les services de consultation du CHU de Yopougon et du CHU de Treichville pour l'étude d'investigation clinique de *Monkeypoxvirose* .

I.2.3. Echantillons biologiques

Chez l'homme, les échantillons de sérum, de lésions cutanées et de flux oraux ont été analysés. Pour la validation des différents tests utilisés dans cette étude, des souches de *Cowpoxvirus*, des serums de contrôle positif pour les anticorps IgG *Orthopoxvirus* et l'ADN de contrôle (ADN du *Cowpoxvirus* et ADN du *Monkeypoxvirus*) ont été utilisés comme contrôle positif.

I.2.4. Matériel de collecte des échantillons

Les échantillons biologiques ont été collectés à l'aide de tubes de 2 ml pour les sérums, et d'écouvillons pour le recueil des flux oraux et des lésions cutanées.

I.2.5 . Matériel d'analyse des échantillons

Pour l'analyse sérologique, l'incubation a été faite à l'aide d' incubateur de microplaque de type Thermoshaker PST 60HL-4 (Biosan) et la lecture a été faite à l'aide d'un spectromètre Multiskan Ex 355 (Thermoscientific) . En ce qui concerne l'analyse moléculaire, pour la PCR à point final, l'amplification a été réalisée à l'aide d'un thermocycleur de type GeneAmp PCR System 9700 d'Applied Biosystem , un bac d'électrophorèse a été utilisé pour la migration et le Gel Doc system de Biorad a été utilisé pour la révélation. Les PCR temps réel de confirmation ont été effectuées à l'aide d'un 7500 Fast ou le Step One plus d'Applied Biosystem (Annexe 5).

I.2.6. Matériel de collecte des données

Les données cliniques et épidémiologiques ont été recueillies sur de fiches épidémiologiques et des fiches d'enquête (Annexe 6). Les données techniques biologiques ont été enregistrées sur un fichier Excel et des fiches techniques.

II. METHODES

II.1 ETUDE ECOLOGIQUE ET RESERVOIR DU *MONKEYPOXVIRUS* EN CÔTE D'IVOIRE

II.1.1. Méthodes d'estimation de la population d'étude

La population d'étude est constituée de réservoirs potentiels du virus selon les données de la littérature qui sont les micromammifères principalement les rongeurs (**Reynolds, 2010 ; Hutson, 2015**). L'échantillon d'étude est composé de micromammifères capturés de 2014 à 2016.

II.1.2. Activités de capture

II.1.2.1. Programmation des captures

Un planing de capture prenant en compte l'ensemble des 9 sites d'Avril 2016 à Mars 2017 a été mise en place. Deux sites étaient visités par mois à raison de trois nuits de capture par site. Trois missions de capture étaient prévues par site et par année (Tableau XI). Le site du Banco a été visité à la même période que les sites de Songon et d'Azagny .

Avant chaque mission, une demande d'autorisation de capture sur les différents sites était adressée à l'OIPR et à la SODEFOR. Après obtention de l'autorisation de capture et l'accord de la direction de l'IPCI, une équipe constituée de trois biologistes et d'un technicien vétérinaire étaient chargés pour la mission. Dans chaque zone de capture, une visite d'explication était rendue aux responsables départementaux de la SODEFOR et de la santé des sites visités. Au niveau des villages, avec l'appui de l'agent de santé, une explication du projet de capture était faite au responsable du village afin d'obtenir leur autorisation .

Tableau XI : Programme de capture des micromammifères

SITES	Avril	Mai	Juin	Juillet	Août	Septembre	Octobre	Novembre	Décembre	Janvier	Février	Mars
ADIOPODOUME ET AKOUEDO	■				■				■			
SONGON ET AZAGNY			■				■				■	
LAMTO ET GBETITAPIA				■				■				■
BOSSEMATIE ET SOKO		■				■				■		

II.1.2.2. Méthode de capture

Différents pièges ont servi à capturer en vie les micromammifères. Des granulés, des graines de palme et des poissons fumés ont servi d'appât. Les pièges ont été posés à raison d'un piège tous les 5 mètres en lignes composées chacune de 20 pièges. Quatre à cinq lignes étaient disposées par site de capture soit 80 à 100 pièges. Après une inspection du terrain dans la matinée afin de localiser les matrices paysagères favorables, les pièges sont posés. Ils restent ainsi pendant trois nuits consécutives. Les pièges sont appâtés au coucher du soleil lors de la pose chaque jour dans le but d'éviter l'envahissement par des prédateurs. Ils sont relevés le lendemain du piégeage selon le protocole de biosécurité de *Mills et al.* (1995). Au moment de la relève, tout piège contenant un rongeur est collecté. Chaque piège plein a été remplacé par un piège vide pour conserver le même effort de piégeage et ce pendant trois jours (Figure 27a et b). Toutes les captures ont été réunies sur le site d'autopsie afin de renseigner les fiches de relevé de piégeage.



Figure 27a : Photographie de la mise en place de piège de type Pitfalls dans la forêt de Bossematié



Figure 27b : Photographie de la visite de pièges dans la forêt de Bossematié

II.1.3. Méthodes de calcul des données de capture

II.1.3.1. Rendements ou succès de piégeage

Le rendement pour 100 pièges a été obtenu à partir du nombre de captures divisé par le nombre de nuit-pièges, multiplié par cent.

Le nombre de nuit-pièges est le nombre de pièges posés par jour multiplié par effort de piégeage.

II.1.3.2. Richesse spécifique ou nombre d'espèces capturées

C'est une mesure insuffisamment précise de la composition quantitative d'un peuplement. A densité et richesse spécifique égales, deux peuplements peuvent présenter des structures très différentes. Le concept de diversité spécifique prend en compte l'abondance relative d'espèces en plus de leur nombre.

II.1.3.3. Indices de diversité

L'indice H' de Shannon a été utilisé pour mesurer la diversité des peuplements qui varie de 0 (une seule espèce) à $\log S$ (lorsque toutes les espèces ont une même abondance) avec

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \log_{\text{népérien}} p_i$$

p_i = Proportion d'une espèce i par rapport au nombre total d'espèces (S) dans le milieu d'étude (ou richesse spécifique du milieu), qui se calcule de la façon suivante :

$p_i = n_i/N$, n_i est le nombre d'individus pour l'espèce i et N est l'effectif total (individus de toutes les espèces).

II.1.3.4. Equitabilité

Les valeurs que prennent les indices de diversité dépendent à la fois de la richesse spécifique S et de la répartition des effectifs entre les diverses espèces.

L'équitabilité rapporte la diversité observée à la diversité théorique maximale (correspond à l'équirépartition des effectifs entre les S espèces présentes).

$$E = H'/\log_{\text{népérien}} S$$

L'équitabilité varie de 0 à 1 : elle tend vers 0 quand la quasi-totalité des effectifs est concentrée sur une espèce ; elle est de 1 lorsque toutes les espèces ont la même abondance.

II.1.4. Méthodes de prélèvements et conservation des organes

II.1.4.1. Organisation du site d'autopsie et mesures de biosécurité

Un site d'autopsie a été délimité par un ruban et comportait en son sein une table d'autopsie, un poste de sacrifice des rongeurs, un poste de lavage des pièges et une fosse pour incinérer tous les déchets infectieux et matériel contaminés engendrés par l'autopsie (Figure 28) .

Cette zone était strictement interdite à toute personne étrangère à l'équipe d'investigation afin d'éviter le contact avec l'animal vivant et ses déjections. Les mesures de sécurité suivantes ont été observées pour le personnel réalisant l'autopsie : port d' une blouse à manche longue à usage unique, des gants, des lunettes de protection et un masque de protection de type P2 pour les 2 personnes assistantes. La personne qui réalisait l'autopsie avait une combinaison à manches longues et à usage unique, un masque de protection de type P2, une paire de gants épais manche longue surmontée d'une autre paire de gants fins renouvelables pour chaque animal. Un casque visière de type P3 en remplacement des lunettes de protection pour la personne chargée de réaliser l'autopsie était utilisé (Figure 23b) . Un assistant était chargé de prendre les renseignements, d'identifier les tubes et les flacons, de désinfecter les tubes tachés de sang, de confectionner les étiquettes et d'identifier les cryotubes.



Photo 28 : Photographie d'une zone délimitée par le ruban rouge lors d'une autopsie

II.1.4.2. Réalisation de l'autopsie

Une autopsie est réalisée par specimen capturé . Un coton hydrophile imbibé de la solution d'anesthésie (Isofluran ou 1-chloro-2,2,2- trifluoroethyl-difluoromethylether dont le nom commercial est le forène) est introduit dans le piège contenant l'animal tenu dans la main gauche, puis l'ensemble est emballé de façon hermétique dans un sachet en plastique pendant 5mn. Après avoir constaté la mort de l'animal, celui-ci est transféré sur la table d'autopsie. L'autopsie a concerné la dissection et les prélèvements d'organes et de sang. L'abdomen du rongeur est désinfecté à l'alcool à 70°, puis la dissection est réalisée en ouvrant la cage thoracique de l'animal. Après avoir dégagé prudemment le cœur à l'aide de ciseaux à dissection et d'une pince, un prélèvement de 0,5 à 1 ml de sang est réalisé. Les instruments de dissection sont désinfectés à l'alcool et à la flamme de la lampe chaque fois qu'un organe est prélevé. Le poumon, le foie et le rein sont aussi récoltés. Chaque prélèvement est mis dans un cryotube et identifié par un numéro en rapport avec la procédure de numérotation de l'Unité de Gestion des Ressources animales (UGRA) de l'IPCI. Les instruments de dissection sont désinfectés entre les prélèvements des différents organes d'un même animal. Les instruments de dissection sont ensuite trempés dans un bac contenant un désinfectant (Incidine à 1%) au terme de la dissection de chaque animal. La cavité abdominale de l'animal est vidée après le prélèvement des organes cibles puis nettoyée. La carcasse est étiquetée puis transférée dans du formol tamponné à 10% pour une conservation de longue durée.

II.1.4. 3. Transport et conservation des échantillons

Les échantillons sont stockés dans l'azote liquide (- 196°C) pendant la durée de la mission sur le terrain puis conservés – 80°C au Centre des Ressources Biologiques (CeReB) de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire jusqu'à l'analyse des échantillons au laboratoire.

II.1.4.4. Méthode de traitement des carcasses

Après le prélèvement des différents organes cibles, la cavité abdominale de chaque animal est vidée puis nettoyée. La carcasse est étiquetée puis transférée dans du formol tamponnée à 10%. Ce fixateur formolés neutre permet à la fois une morphologie et des affinités tinctoriales optimales et une bonne conservation de éléments cellulaires [AFAQAP, 2000]

II.1.4.5. Elimination des déchets

Les viscères , les autres déchets biologiques et les petits matériels contaminés sont éliminés dans la fosse puis incinérés.

II.1.5. Identification des rongeurs

L'identification des rongeurs repose sur des caractères morphologiques. Ils permettent une identification du genre, et parfois de l'espèce. Elle consiste à la détermination des éléments suivants: longueur générale, Pourcentage corps/ queue, longueur tête – corps, longueur de la queue, longueur de la patte postérieure (Sol plantaire), taille des oreilles et également le pelage dorsal et abdominal + limite dorso – abdominale, poids. Les mensurations ont été déterminées par la méthode de **Herbreteau et al., (2011)** (Figure 29a). Les mensurations ont été précédées d'une inspection de l'animal. Cette inspection a permis d'enregistrer les caractéristiques du pelage et les lésions macroscopiques de l'animal. La figure 29b présente une séance de prise de poids d'un spécimen autopsié lors de prise de mensuration.

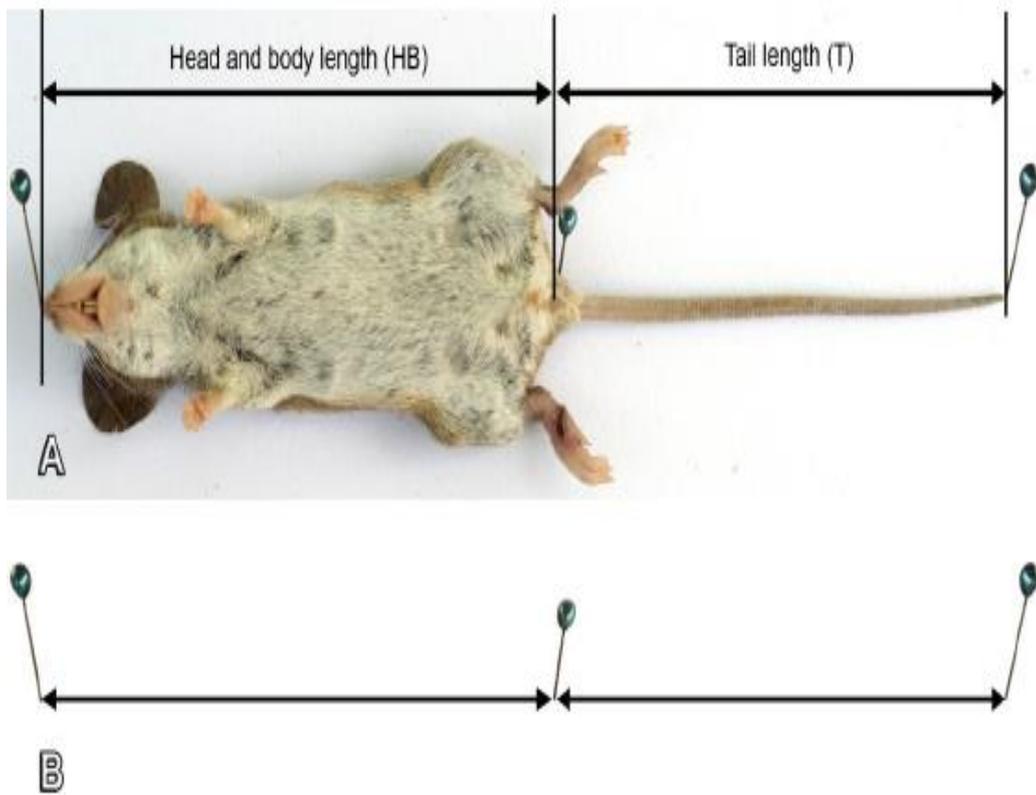


Figure 29a : Mensuration d'un rongeur (Herbreteau, 2011)



Figure 30b : Photographie une séance de prise de poids d'un spécimen autopsié .

II.1.6. Méthodes de détection des *Orthopoxvirus*

Il s'agit essentiellement d'une détection moléculaire par PCR classique et PCR en temps réel.

II.1.6.1. Prétraitement des échantillons

Environ 25g de fragment d'organe de rein, de foie ou de poumon préalablement conservés à -80°C , ont été broyés dans un mortier stérile à l'aide d'un pilon stérile (Figure 30a et 30b). Le broyat obtenu a été dissous dans 1 ml de PBS 1X. Ce broyard obtenu a été utilisé pour l'extraction de l'ADN .

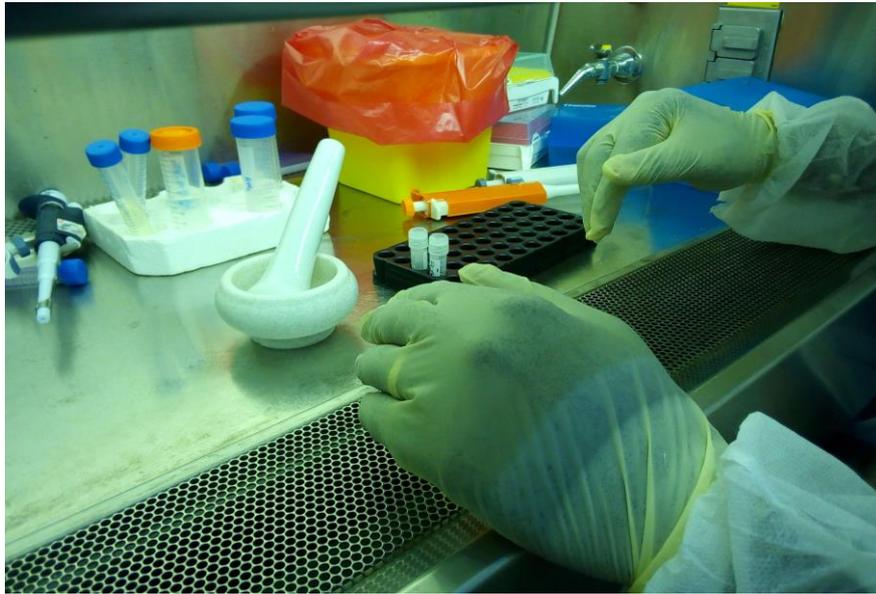


Figure 30a : Photographie de matériels de broyage des tissus d'organe



Figure 30b : Photographie de séance de broyage des tissus d'organe

II.1.6.2. Extraction des ADN

L'ADN à partir des broyat a été extrait en utilisant :

- soit le protocole d'extraction magnétique Nuclisens de Biomérieux. Le principe de l'extraction par cette méthode est résumé à la figure 31.

A 400 μ L du bouillon ont été ajoutés 800 μ L de tampon de lyse, vortexés pendant 20 sec et incubé pendant 10 mn. Puis 40 μ L de silice ont été ajoutés et le tout mis en incubation pendant 10 mn à la température du laboratoire. Le produit de lyse et la silice ont été centrifugés pendant 30s à 13000 rpm. Le surnageant du culot de silice a été retiré par aspiration sous vide en changeant le cône relié à la pompe d'aspiration pour éviter la contamination. Une série de lavages avec le Minimag de Biomérieux a été effectuée sur le complexe silice-ADN. Le tube contenant le culot a été placé sur le MiniMag, 500 μ L de solution de lavage I ont été ajoutés puis le MiniMag a été mis en marche pour le premier lavage pendant 30 sec. Ensuite le tube a été mis sur un portoir magnétique et le liquide de lavage I a été aspiré. Puis le lavage a été répété en utilisant la solution de lavage II puis celle du lavage III. Concernant l'élution de l'ADN, 50 μ L de solution d'élution ont été ajoutés au culot de silice après aspiration complète du liquide de lavage III. Le tube contenant le complexe silice-ADN et la solution élution ont été placés sur l'agitateur magnétique à 60°C , 1400 tr/mn pendant 5mn. Puis le tube a été placé sur un portoir magnétique et l'éluat contenant l'ADN a été récupéré et conservé à - 20°C.

- soit le protocole d'extraction du Kit Qiagen qui consiste à ajouter 200 μ l du bouillon à 180 μ l du tampon ATL puis 20 μ L de protéinase K. L'ensemble est incubé à 56°C dans un thermomixer pendant 1 heure, puis 200 μ l de tampon AL et 200 μ l d'éthanol absolu sont ajoutés pour la précipitation de l'ADN. L'ADN est recueilli sur une colonne puis lavé à l'aide de solution AW1 et AW2. Un volume de 200 μ l de tampon d'éluat AE est utilisé pour recueillir l'ADN (Figure 32).

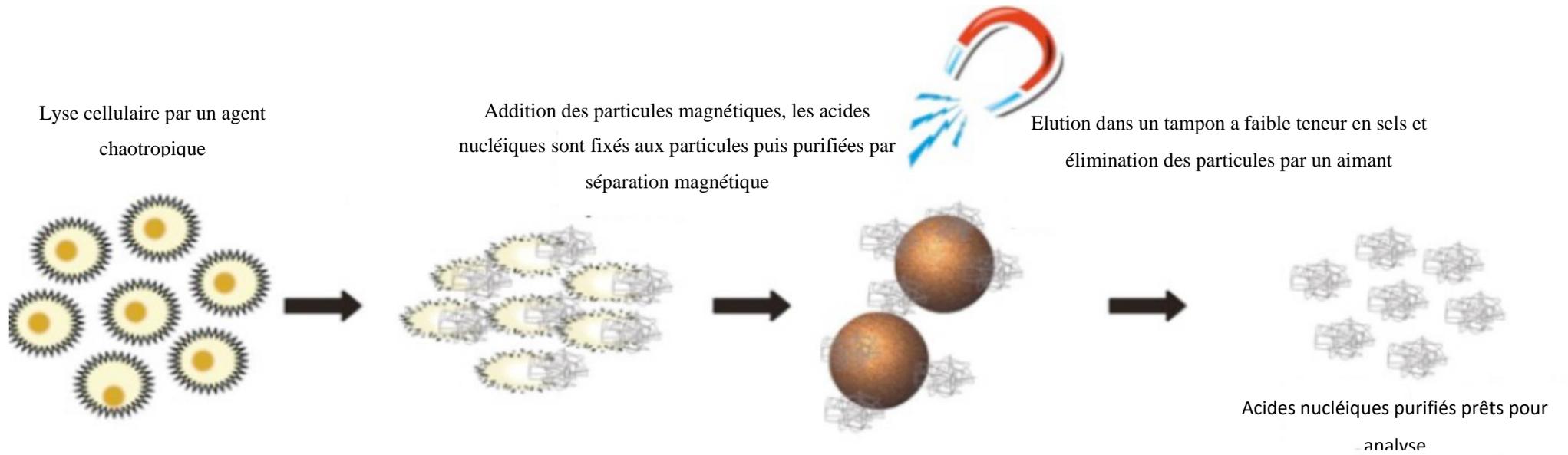


Figure 31: Principe d'extraction des acides nucléiques par des billes magnétiques

Tissus animaux

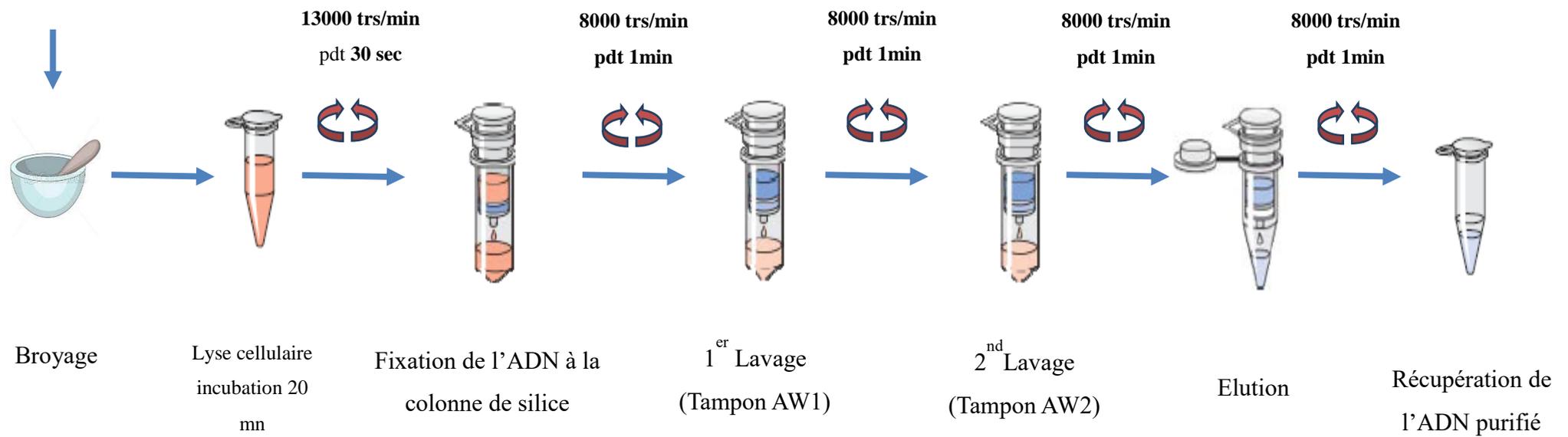


Figure 32 : Protocole d'extraction d'ADN selon le kit Qiagen

II.1.6.3. Amplification par PCR classique et révélation

L'amplification du gène recherché pour la détection du virus a été faite en utilisant des amorces choisies selon l'étude de Ropp (Ropp, 1995). Les amorces consensus des *Orthopoxvirus* issues de gène de hémagglutinine (HA) de membrane de cellule infectée ont été utilisées. C'est un antigène de membrane de cellules infectées qui distingue *Orthopoxvirus* des autres genres de *Poxvirus*. (Forward: EACP1: 5' ATG ACA CGA TTG CCA ATA C 3', Reverse: EACP2: 5' CTA GAC TTT GTT TTC TG 3', la taille de la bande recherchée étant de 942 bp *Conditions d'amplification* : 94°C, 5 min (1 cycle), (94°C, 30 sec, 48°C, 1 min, 72°C, 1 min) (36cycles), 72°C, 8 min (1 cycle). Le Kit GoTaq G2 Flexi DNA polymerase (Promega corporation, USA) a été utilisé pour l'amplification. Le mélange réactionnel est constitué de 0,2µM de chaque amorce, 1,5 µM, MgCl, 0,1µM de dNTPs, 1 unité de Taq polymerase et 1X de tampon pour un volume final de 50µl dont 5µl d'ADN. La révélation est faite après migration sur gel d'agarose à 1,5% sur Gel-Doc. 10 µl d'amplicon ont été déposés dans des puits du gel de migration, lequel baignant dans la cuve de migration contenant une solution tampon de TBE. Le marqueur de poids moléculaire et les témoins positifs et négatifs ont été aussi déposés. Un marqueur de poids moléculaire a été déposé dans le premier puits pour la mesure de la taille de la bande, des amplicons de témoin positif et témoin négatif pour la validation du test et les échantillons ont été déposés dans les autres puits pour migration. La cuve de migration refermée est mise sous tension de 135 Volts pendant environ 15 à 30 min. La lecture des bandes a été faite sous Gel-Doc de Biorad.

En cas de recherche positive pour *Orthopoxvirus*, le *Monkeypoxvirus* a été recherché en utilisant les amorces Forward: MPV1: 5' CTG ATA ATG TAG AAG AC 3' et Reverse: MPV2: 5' TTG TAT TTA CGT GGG TG 3' issues de gène de hémagglutinine (HA) de membrane de cellule infectée avec une taille de bande de 406 bp avec le même mélange réactionnel que l'*Orthopoxvirus* et les mêmes conditions d'amplification.

II.1.6.4. Amplification par PCR temps réel

Concernant la détection en temps réel du virus, la méthode mise en place par Yu Li et collaborateurs modifiée a été utilisée (Li, 2006)

Pour la détection du genre *Orthopoxvirus*, les amorces E9L forward primer (5'-TCA-ACT-GAA-AAG-GCC-ATC-TAT-GA-3'), Reverse primer (5'-GAG-TAT-AGA-GCA-CTA-TTT-CTA-AAT-CCC-A-3') issues du gène E9L codant l'ADN polymérase viral ont été utilisées. En cas de test positif, le *Monkeypoxvirus* a été recherché en utilisant les amorces B6R forward primer (5'-ATT-GGT-CAT-TAT-TTT-TGT-CAC-AGG-AAC-A-3') and B6R reverse primer (5'-AAT-GGC-GTT-GAC-AAT-TAT-GGG-TG-3') issues de gène B6R codant pour une protéine d'enveloppe du *Monkeypoxvirus*.

Conditions d'amplification : 95°C 10 min (1 cycle), (95°C 3 sec, 60°C 30s, 72°C 30s) (45cycles). La méthode du SYBER green I a été utilisée pour cette PCR en temps réel.

II.1.7. Mode de recueil des données

II.1.7.1. Données de capture, d'autopsie et de prélèvement

Les données liées aux rongeurs ont été recueillies sur des fiches techniques de piégeage, d'autopsie et de prélèvement (Annexe 4). Ces données ont été archivées dans un classeur au niveau de l'Unité de Gestion des Ressources Animales de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire. La feuille d'autopsie a permis de collecter les données de mensuration des rongeurs et les informations permettant l'identification phénotypique de l'animal et celle de prélèvement à renseigner les organes collectés, le nombre d'aliquotes réalisées et les conditions de conservation sur site de capture.

II.1.7.2. Données de conservation des échantillons biologiques

Les données liées à la conservation ont été enregistrées dans un registre de réception des échantillons animaux et dans un fichier excel au niveau du Centre des Ressources Biologique de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire. Ces données concernaient les informations liées aux organes collectés, le nombre d'aliquotes conservés, les différentes températures de conservation, la date de conservation, l'équipe projet responsable des échantillons biologiques.

II.1.7.3. Données techniques de laboratoire

Les données techniques de laboratoire liées à la recherche du virus ont été enregistrées dans un fichier Excel. Elles concernaient les données liées aux extraits d'ADN et les résultats des différentes amplifications géniques.

II.1.7.4. Données des résultats positifs

L'Orthopoxvirose est une maladie à déclaration obligatoire. De ce fait, tout résultat positif sera consigné sur une note technique et transmis à l'Institut National d'Hygiène Publique (INHP) pour la mise à la disposition de Ministère de la Santé et de l'Hygiène Publique (MSHP).

II.1.8. Analyse statistique

Elle a été faite à l'aide du logiciel Epi info 0.6 et de la méthode du Khi 2 a été utilisée pour effectuer les comparaisons des données pour un seuil significatif fixé à 5% pour un ddl de 1.

II.2. ETUDE DE LA SEROPREVALENCE DES *ORTHOPOXVIRUS* EN CÔTE D'IVOIRE

II.2.1 Cadre d'étude et type d'étude

La présente étude porte sur des sérums de biocollection du CeReb de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire. Cette collection de sérum est issue d'une surveillance nationale de fièvres hémorragiques de 2013 à 2015. Elle a été retenue du fait de son caractère représentatif au plan national. Elle n'était pas orientée vers une étude en rapport avec les *Orthopoxvirus* lors de la collecte. L'étude réalisée n'établit aucun lien avec les fièvres hémorragiques. La biocollection a été obtenue après introduction d'une demande de mise à disposition des échantillons au près du Centre des Ressources Biologiques. Après un avis favorable, une fiche de mise à disposition des échantillons a été renseignée avant obtention de la biocollection (Annexe 7). L'analyse des échantillons a été effectuée au Département des Virus Epidémiques dans l'unité des fièvres hémorragiques. Il s'agit d'une étude transversale à visée descriptive et analytique.

II.2.2. Population d'étude

Dans cette étude de séroprévalence, du fait de la réaction croisée entre l'ensemble des espèces des *Orthopoxvirus*, la distinction entre les anticorps résultant de la vaccination contre la variole, et ceux issus d'une exposition à l'une des espèces des *Orthopoxvirus* est pour l'heure difficile. Afin de mettre en évidence une exposition réelle au virus, le sérum des

sujets nés après l'éradication de la variole et n'ayant pas été vaccinés pouvait être l'objet d'analyse.

Critères d'inclusion de la population

Tout sujet de moins de 30 ans non vacciné contre la variole dont le sérum a été collecté dans le cadre de la surveillance des fièvres hémorragiques dans l'un des Districts sanitaires de Côte d'Ivoire et renseigné dans la biocollection de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire a été inclus dans cette étude .

Critères de non-inclusion

Tout sujet de moins de 30 ans ayant un sérum non renseigné ou prélevé en dehors de la surveillance nationale de fièvre hémorragique n'a pas été inclus de l'étude

II.2.3. Echantillonnage

Les sérums collectés pendant la période d'étude chez les sujets de moins de 30 ans, sont retenus selon la formule de SCHWAZT : $N = (Z_{\alpha/2})^2 p_0 q_0 / i^2$ ($p_0 = 0,5$ (Condition de puissance maximale à défaut de prévalence en Afrique de l'Ouest), $q_0 = 1 - p_0$, pour $\alpha = 0,05 \rightarrow Z_{\alpha/2} = 1,96$, Pour une précision i estimé à 0,05). Ils ont été ensuite tirés au hasard dans la population d'étude. Tous les sérums qui avaient un volume de sérum insuffisant (inférieur à 500 μ l) pour la technique sérologique utilisée ont été exclus dans cette étude.

II. 2.4. Collecte des données

Les données épidémiologiques comprenant l'âge, le sexe, la situation géographique et les données cliniques ont été recueillies à l'aide de la fiche épidémiologique de surveillance des fièvres hémorragiques (Annexe 6).

II.2.5. Analyses sérologiques

II.2.5.1. Principe

Il s'agit de détecter par une technique ELISA, les anticorps de type IgG dirigés contre les *Orthopoxvirus*. En effet, les anticorps anti *Orthopoxvirus* contenus dans le sérum des patients, reconnaissent des antigènes viraux (lysate cellulaire) d'*Orthopoxvirus* fixés sur la phase solide d'une plaque de microtitration. La révélation du complexe antigène-anticorps se fait par un anticorps secondaire couplé à la peroxydase. En présence de cette enzyme, un substrat incolore contenant de l'eau oxygénée changera de couleur et deviendra vert.

II.2.5.2. Méthode d'analyse des sérums

Etape 1 : Préparation des réactifs

Des aliquotes de 50 µl/tube de sérum contenant des anticorps anti-*Orthopoxvirus* de type IgG destinés au contrôle positif et des Anticorps anti-IgG humain à raison de 50 µl / tube utilisés comme conjugué ont été conservés à – 20°C. Le PBS1X a été obtenu en mettant 1 sachet de PBS dans 1 000 ml d'eau bidistillée. Cette solution de PBS1X a été utilisée pour la préparation du tampon de lavage et du tampon de dilution. Le tampon de dilution a été obtenu à l'aide de mélange de PBS1X et de Tween-20 0,1% puis conservé au plus une semaine à + 4°C et le tampon de dilution à l'aide de mélange de PBS 1X, Tween-20 0,1%, lait 5% conservé au plus une semaine à + 4°C (2,5 g de lait qsp 50 mL de tampon de lavage).

Etales 2 : Sensibilisation des plaques

Les plaques ont été sensibilisées par des antigènes *Cowpoxvirus* cultivés sur cellule Vero . Pour la préparation de l'antigène, après l'observation d'un bon effet cytopatique, la suspension virale est récoltée et inactivée au Merthiolate et formaldéhyde (**Goldstein, 1970**).

Puis elle est précipitée au NaCl et Polyéthylène glycol pendant 4 h à froid sous agitation lente. La suspension est centrifugée, le surnageant est jeté et le culot est récupéré et mélangé au tampon Sorensen à un pH compris entre 9 à 9,2.

La plaque de microtitration a été divisée en deux parties pour la sensibilisation. Les puits des lignes A à D de la plaque ont été sensibilisés à l'aide d'antigènes dilués au 1/100^e dérivés de souche de *Cowpoxvirus* cultivée sur Cellule Véro E6. Ils servent à mettre en évidence les vraies réactions Antigènes *Cowpoxvirus* – Anticorps anti *Cowpoxvirus*. Par contre, les puits des lignes E à H qui contenaient des cultures de cellules Véro E6 sans antigène du *Cowpoxvirus* servaient à mettre en évidence des fausses réactions positives liées à la présence d'éléments présentant des similitudes antigéniques avec les antigènes des *Orthopoxvirus* (Figure 33).

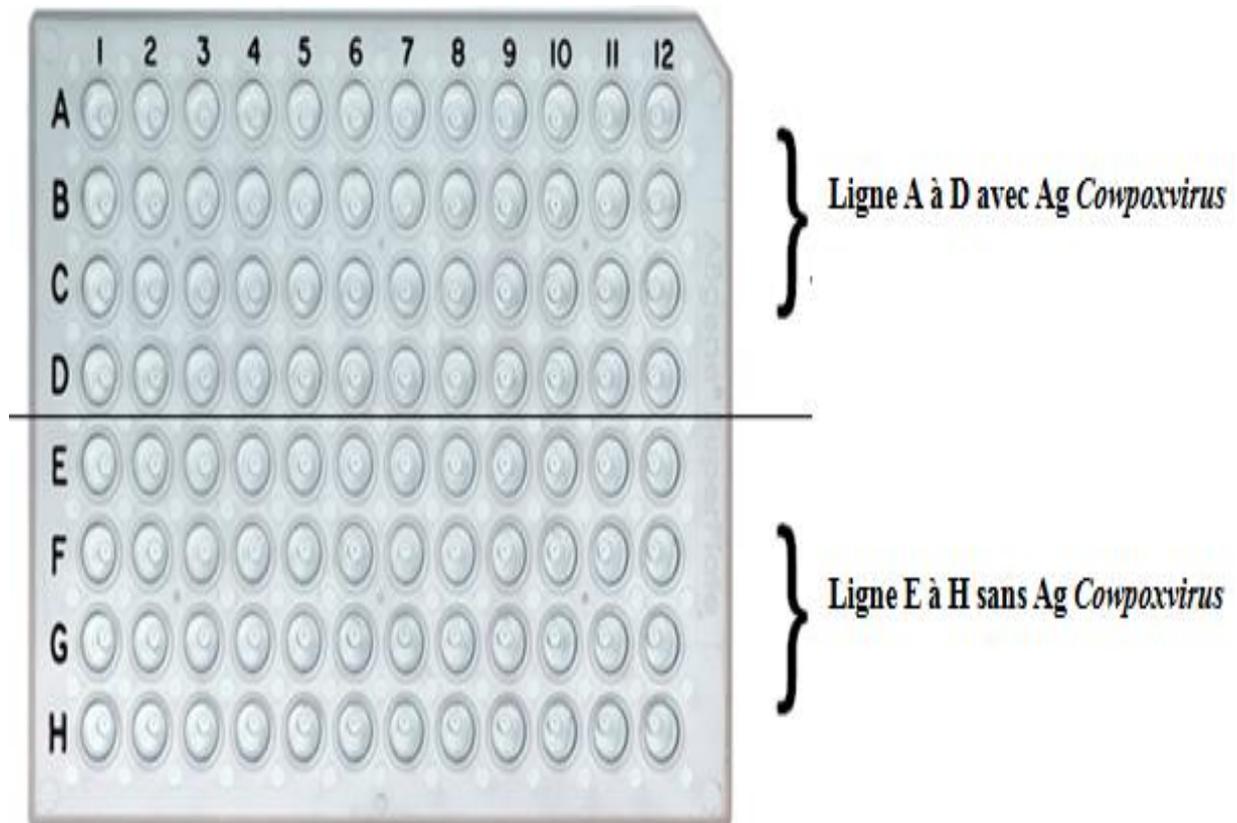


Figure 33 : Plan de sensibilisation de la plaque

Les plaques ont été enveloppées dans du papier aluminium et incubées pendant une nuit à + 4°C

Etape 3 : Préparation des sérums et réalisation des tests

Les sérums testés, les sérums contrôles positifs et négatifs ont été dilués 1/100^e (10µl + 990 µl de tampon de dilution) à l'aide du tampon de dilution.

Réalisation du test

Après sensibilisation de la plaque pendant une nuit, une série de quatre lavages avec du tampon de lavage a été effectuée puis les traces de liquide ont été éliminées en frappant la plaque retournée contre du papier absorbant. Ensuite, 100 µl de sérums à tester et des contrôles positifs dilués ont été déposés dans les puits selon la méthode suivante : pour chaque sérum ou contrôle dilué, 100 µl ont été déposés à la fois dans le puits sensibilisé au *Cowpoxvirus* et son correspondant non sensibilisé à l'Ag *Cowpoxvirus* selon le schéma ci-dessous (Figure 34).

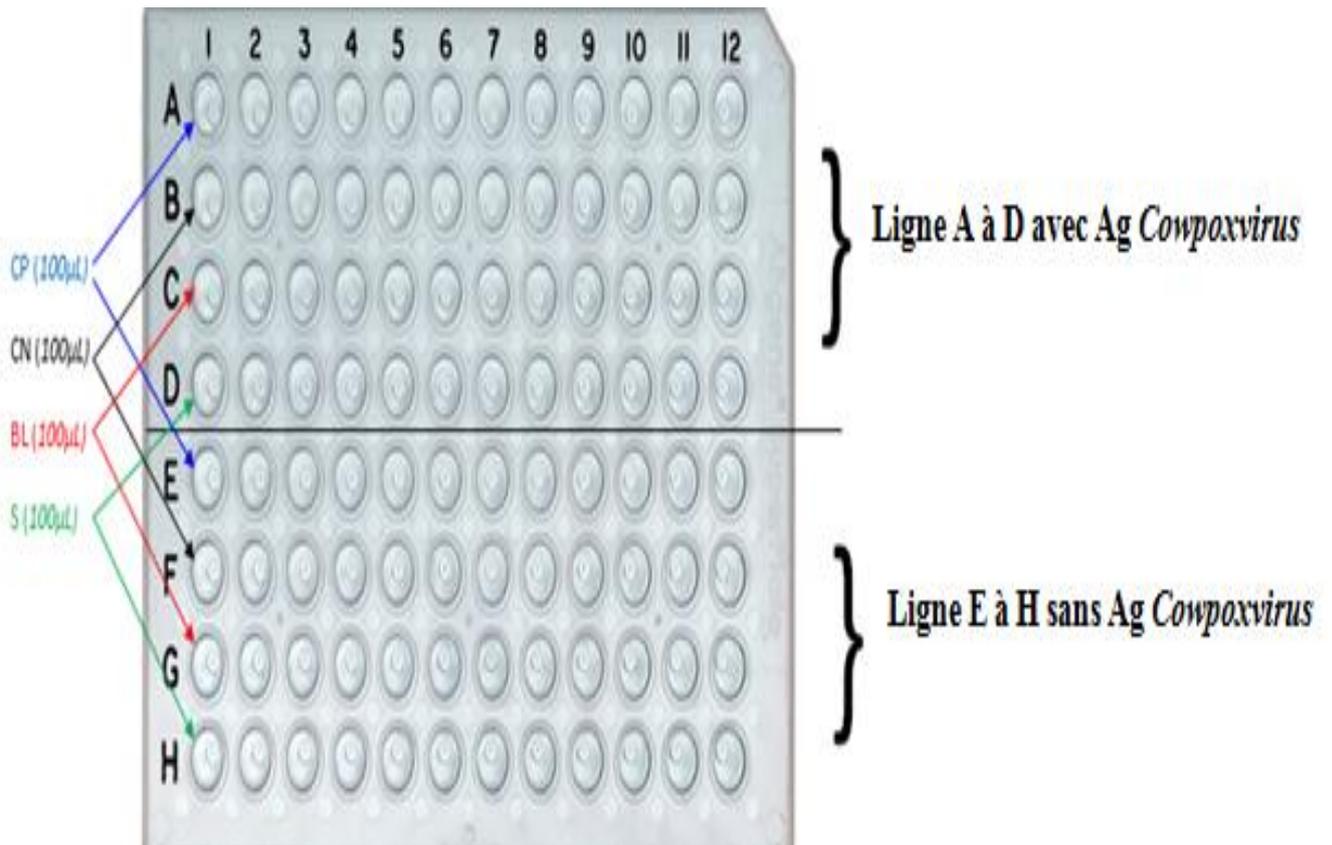


Figure 34: Plan de dépôt des échantillons et des contrôles

CP = Sérum contrôle positif, CN = Sérum contrôle négatif, BL = Blanc (tampon de dilution seul) , S = Sérum à tester

Pour chaque plaque, deux sérums contrôles positifs, trois sérums contrôles négatifs et deux blancs (tampon de dilution) ont été utilisés. La plaque a été incubée pendant une heure à 37°C en chambre humide puis lavée selon la même méthode qu'après la sensibilisation de la plaque avant la phase de révélation.

Etape 4 : Révélation

La révélation du complexe (Ag-IgG) a été faite à l'aide d'anticorps secondaire couplé à la peroxydase (Fab anti IgG fragment (H+L) humain marqué à la peroxydase) en présence du substrat (Tétraméthylbenzidine). Il a été déposé 100 µl / puits du conjugué anti-humain à la dilution de 1/1000^e dans tous les puits de la plaque. La plaque a été couverte d'une feuille d'aluminium et incubée à 37°C (en chambre humide) pendant 1 heure. Après une série de lavages, 100 µl de substrat ABTS ont été distribués dans chaque puits et le tout a été incubé pendant 30 min à l'obscurité à température ambiante. la réaction a été arrêtée avec 100 µl de

SDS à 1 %. La lecture de la densité optique (DO) a été faite à une longueur d'onde de 450 nm. La différence de DO (Δ DO) entre un puits sensibilisé par l'antigène du *Cowpoxvirus* et un puits sans antigène contenant chacun le même sérum a été calculé. Les sérums avec une Δ DO était supérieure à 0,2 ont été quantifiés à partir d'une série de dilutions du 1/100^e au 1/6400^e

II.2.5.3. Résultats et interprétation

a) Pour le test qualitatif,

Les puits du blanc ont été validés quand les DO étaient inférieures à 0,1. Concernant la validité des témoins négatifs, Δ DO = DO cupule antigène avec virus – DO cupule antigène sans virus a été calculée pour les trois témoins négatifs et la moyenne des Δ DO des 3 témoins négatifs + 3 Ecart-types devrait être inférieure à 0,2. Pour la validité des témoins positifs : Δ DO > 0,2. Après la validation du test, tout prélèvement dont la Δ DO était supérieure ou égale à 0,2 a été quantifié.

b) Pour le test quantitatif

Les mêmes conditions de validation du test qualitatif ont été respectées et le titre était l'inverse de la dernière dilution ayant donné Δ DO > 0,2.

II.2.6. Analyses des données

La base de données liée à cette biocollection a été réalisée en utilisant le logiciel Epi Info (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgie). L'analyse des données a été effectuée à l'aide du logiciel R 3.2.0 (Core Team 2015).

II .2.7. Accord du comité de bioéthique

L'utilisation de cette biocollection de sérums issus de la surveillance nationale des fièvres hémorragiques a eu l'approbation du comité éthique national à travers l'autorisation numéro 023/MSLS/CNER-dkn de 2015 .

II.3. POXVIRUS DANS LES LÉSIONS CUTANÉES EN CÔTE D'IVOIRE

De nombreux virus sont impliqués dans les infections cutanées virales chez l'homme en particulier chez l'enfant. Ainsi la variole mineure a parfois été confondue avec la varicelle et la rougeole. Malgré l'éradication de la variole et l'existence de vaccin efficace contre la rougeole, les lésions cutanées chez l'enfant sont fréquentes en Côte d'Ivoire. Quelle est la place des *Orthopoxvirus* en général et du *Monkeypoxvirus* en particulier dans les infections

cutanées d'origine virale en Côte d'Ivoire ? Pour répondre à cette question, des méthodes moléculaires de détection de *Poxvirus* chez l'homme ciblant l'*Orthopoxvirus* ont été développées, validées puis appliquées et au diagnostic de l'infection à *Molluscum contagiosum virus*. Si l'infection à *Monkeypoxvirus* reste la plus préoccupante des *poxviroses*, l'infection à *Molluscum contagiosum* reste la plus fréquente et la plus pathognomonique. L'apparition des formes cliniques atypiques nécessite sa prise en compte dans la surveillance de l'émergence des *Orthopoxviroses* en Côte d'Ivoire

II.3.1. Développement, validation et mise en place de la méthodes de détection d'*Orthopoxvirus* chez l'enfant suspect de rougeole .

II.3.1.1. Cadre et période d'étude

Il s'agit d'échantillons collectés dans le cadre de la surveillance de rougeole en Côte d'Ivoire de Janvier 2015 à Juillet 2017 reçus au Département des Virus Epidémiques de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire. La biocollection a été obtenue selon la procédure de mise à disposition des échantillons du CeReB (Annexe7). Les prélèvements collectés ont été analysés à la Plateforme de Biologie Moléculaire de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire.

II.3.1.2. Type et population d'étude

Il s'agit d'une étude transversale à visée descriptive et analytique menée sur des prélèvements oraux et sérums conservés à l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire et collectés entre 2015 et 2017, dans le cadre d'une surveillance nationale de la rougeole.

La population d'étude est constituée de sujets « tout venant » dont l'échantillon de flux oraux et de sérum ont été collectés dans le cadre de la surveillance de la rougeole. Des prélèvements de flux oraux et de sérums, ont été analysés. Ces produits biologiques ont été analysés compte tenu de la physiopathologie du virus.

- *Critères d'inclusion*

Tous les échantillons collectés dans le cadre de la surveillance de la rougeole ayant été négatifs pour la recherche des anticorps du virus de la rougeole et du virus de la rubéole et ayant bénéficié d'un prélèvement de flux oral.

- *Critères de non inclusion*

Tous les échantillons positifs pour la recherche d'anticorps du virus de la rougeole et de rubéole ont été exclus ainsi que tous les prélèvements négatifs sans prélèvements de flux oral associé.

II.3.1.3. Logique du choix du flux oral

Le diagnostic à partir d'un prélèvement de salive est l'approche alternative recommandée dans le cadre du plan d'élimination de la rougeole dans certains pays. Ce prélèvement permet en phase d'invasion et lors de la phase d'état de la rougeole de détecter l'ARN du virus et IgM trois jours après le début de la phase éruptive (**Hutse 2010**). Comme le virus de la rougeole, l'ADN des *Orthopoxvirus* peut être retrouvé dans des sécrétions orales, pharyngées, sang et autres. En effet, bien que la localisation finale du virus soit la peau, les *Orthopoxvirus* se multiplient au niveau oropharyngé puis progressent dans l'organisme aboutissant à une virémie primaire puis secondaire. Dans cette étude, les patients étudiés n'ont pas bénéficié de prélèvement cutané.

II.3.1.4. Collecte des données

Les données épidémiologiques comprenant l'âge, le sexe, la situation géographique et les données cliniques ont été recueillies à l'aide de la fiche épidémiologique de surveillance des fièvres hémorragiques et rougeole (Annexe 6a).

II.3.1.5. Prélèvement et conservation

Le matériel de prélèvement OraCol a été spécialement développé pour collecter les fluides salivaires de la bouche. Le matériel de prélèvement OraCol dans son emballage d'origine est stérile et peut être conservé à température ambiante.

L'écouvillon en éponge a été conçu pour être utilisé comme une brosse à dent. Celui-ci a été frotté le long de la gencive jusqu'à ce qu'il soit humide pendant 1 minute. L'écouvillon en éponge humide a été placé dans le tube en plastique fermé. Les informations relatives au prélèvement (nom du patient et date de prélèvement) ont été enregistrées sur l'étiquette du tube en plastique (Annexe 8). L'écouvillon a été transporté dans une glacière avec accumulateur de froid puis conservé - 20°C.

II.3.1.6. Traitement des flux oraux

Un millilitre de milieu de transport de virus (VTM) a été ajouté au tube contenant l'écouvillon et homogénéisé par vortex pendant 20 secondes. L'écouvillon en éponge a été retiré en effectuant une torsion afin d'extraire le maximum de liquide puis replacé en sens inverse dans le tube et l'ensemble a été centrifugé à 2.000 tr/mn pendant 5 minutes. L'écouvillon a été retiré à l'aide d'une pince et les fluides salivaires extraits ont été récupérés dans le tube en utilisant une pipette Pasteur et conservés à -20°C ou -80°C pour une conservation de longue durée moyenne.

II.3.1.7. Extraction de l'acide nucléique

L'extraction d'ADN a été faite à l'aide du Kit Qiagen. Un volume de 200 µl du bouillon a été ajouté à 180 µl du tampon ATL puis à 20 µl de protéinase K. L'ensemble a été incubé à 56°C dans un thermomixer pendant 1 heure, puis 200 µl de tampon AL et 200 µl d'éthanol absolu pour la précipitation de l'ADN ont été ajoutés. L'ADN est recueilli sur une colonne puis lavé à l'aide de solutions AW1 et AW2. Le tampon d'éluat AE a été utilisé pour recueillir l'ADN.

II . 3.1.8. Accord du comité bioéthique

L'utilisation de cette biocollection de sérums issus de la surveillance nationale a eu l'approbation du comité éthique national à travers l'autorisation numéro 023/MSLS/CNER-dkn de 2015 .

II.3.1.9. Mise en place de la détection moléculaire des *Orthopoxvirus*

a) Produits biologiques

Des ADN extraits des souches de *Cowpoxvirus* provenant de culture sur cellule Vero et des ADN de *Monkeypoxvirus* fournis par l'Institut Pasteur de Bangui ont été utilisés pour la mise au point technique de la détection des *Orthopoxvirus*. Les ADN de *Molluscum contagiosum virus* (MCV) et autres microorganismes (*Herpes simplex virus*, virus de la varicelle et du zona, virus de rougeole) ont été utilisés pour la spécificité des amorces d'*Orthopoxvirus* utilisées dans la présente étude.

b) Tests de détection des *Orthopoxvirus*

Deux méthodes moléculaires (PCR classique et PCR en temps réel) ayant des cibles différentes ont été implémentées et utilisées pour l'analyse des échantillons.

Pour la PCR classique, la détection du virus a été faite en utilisant des amorces choisies selon l'étude de Ropp (**Ropp, 1995**). Les amorces consensus des *Orthopoxvirus* issues du gène de hémagglutinine (HA) de membrane de cellule infectée ont été utilisées. (Forward: EACP1: 5' ATG ACA CGA TTG CCA ATA C 3', Reverse: EACP2: 5' CTA GAC TTT GTT TTC TG 3', la taille de la bande recherchée étant de 942 bp). *Conditions d'amplification* : 94°C, 5 min (1 cycle), (94°C, 30 sec, 48°C, 1 min, 72°C, 1 min) (36cycles), 72°C, 8 min (1 cycle). Le Kit GoTaq G2 Flexi DNA polymerase (Promega corporation ; USA) a été utilisé pour l'amplification. Le mélange réactionnel est constitué de 0,2µM de chaque amorce, 1,5 µM, MgCl, 0,1µM de dNTPs, 1 unité de Taqpolymerase et 1X de tampon pour un volume final de 50µl dont 5µl d'ADN. La révélation a été faite après migration sur gel d'agarose à 1,5% sur Gel-Doc et le *Monkeypoxvirus* a été recherché en utilisant les amorces Forward: MPV1: 5' CTG ATA ATG TAG AAG AC 3' et Reverse: MPV2: 5' TTG TAT TTA CGT GGG TG 3' issus de gène de hémagglutinine (HA) de membrane de cellule infectée avec une taille de bande de 406 bp avec le même mélange réactionnel que l'*Orthopoxvirus* et les mêmes conditions d'amplification.

Concernant la détection en temps réel du virus, la méthode de Yu Li et collaborateurs modifiée a été utilisée (**Li Yu et al., 2006**)

Pour la détection du genre *Orthopoxvirus*, les amorces E9L forward primer (5'-TCA-ACT-GAA-AAG-GCC-ATC-TAT-GA-3'), Reverse primer (5'-GAG-TAT-AGA-GCA-CTA-TTT-CTA-AAT-CCC-A-3') issues du gène E9L codant l'ADN polymérase viral ont été utilisées. En cas de test positif, le *Monkeypoxvirus* a été recherché en utilisant les amorces B6R forward primer (5'-ATT-GGT-CAT-TAT-TTT-TGT-CAC-AGG-AAC-A-3') and B6R reverse primer (5'-AAT-GGC-GTT-GAC-AAT-TAT-GGG-TG-3') issues de gène B6R codant pour une protéine d'enveloppe du *Monkeypoxvirus*.

Conditions d'amplification : 95°C 10 min (1 cycle), (95°C 3 sec, 60°C 30s, 72°C 30s) (45cycles). La méthode du SYBER green I a été utilisée pour cette PCR en temps réel.

c) Etude de la sensibilité

Une série de dilution d'extrait d'ADN *Cowpoxvirus* de 10⁻¹ à 10⁻⁹ a été utilisée afin de déterminer le niveau de sensibilité de la méthode moléculaire. 1 microlitre d'ADN a été dilué dans neuf (9) microlitres d'eau physiologique stérile (ppi) selon le schéma ci dessous

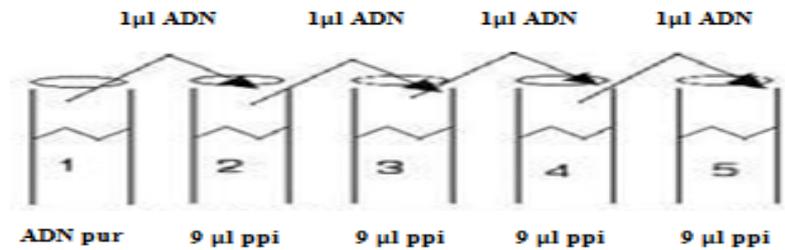


Figure 35: Réalisation de la série de dilution au 10^{ème}

Chaque dilution a été testée afin de déterminer le niveau de détection de la PCR classique des *Orthopoxvirus*.

d) Etude de la spécificité

Les amorces spécifiques d'*Orthopoxvirus* ont été amplifiées en présence d'ADN de *Staphylococcus aureus*, d'Herpes simplex virus, de virus de la varicelle et du zona, du virus de la rougeole, de *Mycobacterium ulcerans* des pathogènes impliqués dans les infections cutanées en Côte d'Ivoire pour révéler une amplification non spécifique.

II.3.1.9. Analyses des données

La base de données liées à cette sérothèque a été réalisée en utilisant le logiciel Epi Info (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgie). L'analyse des données a été effectuée à l'aide du logiciel R 3.2.0 (Core Team, 2015).

II.3.2. Application de la méthode de PCR développée et validée au diagnostic étiologique des éruptions cutanées à *Molluscum contagiosum virus* en Côte d'Ivoire

MCV est le seul virus de la famille des *Poxviridae* qui infecte strictement l'homme après l'éradication du virus de la variole. Il est souvent impliqué dans les lésions cutanées chez l'enfant et est de plus en plus rencontré avec l'infection à VIH. Les lésions sont caractérisées par des papules arrondies ombiliquées de quelques millimètres de diamètre (le plus souvent de 1 à 4 mm, parfois jusqu'à 8 mm), généralement non prurigineuses. Elles sont dites pathognomoniques de la maladie. Le diagnostic de ce virus reste essentiellement clinique à cause du caractère typique des lésions.

L'étude de Saral en 2006 en Turquie, sur 61 lésions suspectes de MCV, 100% de concordance a été constaté entre la clinique et les résultats de la PCR (Saral 2006). La présence du virus dans 100% des lésions cliniquement compatibles avec le *Molluscum*

contagiosum font de ces lésions un modèle de réservoir du virus idéal pour la confirmation de la méthode de détection de *Poxvirus* à mettre en place. La détection des formes cliniques atypiques contribuerait à la surveillance de l'émergence des Orthopoxviroses.

II.3.2.1. Cadre et type d'étude

Il s'agit d'une étude expérimentale de mise en place d'une détection moléculaire de *Poxvirus* qui a eu lieu au sein de la Plateforme de Biologie Moléculaire de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire. La détection moléculaire de MCV a porté sur des échantillons cutanés provenant des Services de Dermatologie des Centres Hospitaliers Universitaires de Treichville et de Yopougon.

II.3.2.2. Population d'étude

L'étude a concerné des patients tout-venant présentant des éruptions cutanées à type de lésions de *Molluscum contagiosum* et consultant au service de Dermatologie du Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) de Yopougon ou du CHU de Treichville pendant la période d'étude. Les données relatives aux patients ont été recueillies à partir d'une fiche d'enquête (Annexe 6b) comprenant des données épidémiologiques relatives aux patients et des données cliniques, après consentement éclairé des patients.

II.3.2.3. Recueil, méthode de choix et conservation des échantillons

Après le diagnostic clinique de la lésion et l'obtention du consentement éclairé du patient, un prélèvement par biopsie ou par curetage d'une à deux lésions cutanées a été effectué. Au total 45 échantillons ont été recensés. Parmi eux, 3 échantillons obtenus par tirage aléatoire sans remise ont été utilisés pour la validation de la méthode de détection moléculaire. Les prélèvements ont été déchargés dans 1 ml de PBS 1X et conservés à -20°C .

II.3.2.4. Préparation des échantillons

Après décongélation du tube contenant l'échantillon cutané dans 1ml de PBS, ce dernier a été centrifugé à 13000 trs /mn pendant 10 mn. Le surnageant a été éliminé et le culot contenant le prélèvement cutané a été broyé à l'aide de mortier puis remis en suspension dans 1 ml de PBS 1X. Le broyat obtenu a été utilisé pour l'extraction de l'ADN.

II.3.2.5. Extraction de l'acide nucléique

L'extraction d'ADN a été faite à l'aide du Kit Qiagen. Un volume de 200 µl du bouillon a été ajouté à 180 µl du tampon ATL puis à 20 µl de protéinase K, le tout incubé à 56°C dans un thermomixer jusqu'à la lyse complète (1 heure). Ensuite, le mélange a été homogénéisé à l'aide d'un vortex pendant 15 secondes puis 200 µl de tampon AL y ont été ajoutés. Le tout a été homogénéisé à l'aide d'un vortex puis incubé à 56°C dans un thermomixer pendant 10 mn. Ensuite 200 µl d'éthanol absolu ont été ajoutés pour la précipitation de l'ADN. L'ensemble a été homogénéisé à l'aide d'un vortex. L'ADN est recueilli sur une colonne placée dans un tube de 2 ml puis le dispositif a été centrifugé à 8000 tr / min pendant 1 minute. Le tube d'écoulement et de collecte a été jeté et la colonne a été placée dans un nouveau tube de 2 ml. Le lavage de l'ADN a été effectué à l'aide de solutions AW1 et AW2. Puis 500 µl d'AW1 ont été ajoutés sur la colonne placée dans le nouveau tube et centrifugés pendant 1 mn à 8000 tr / min. Le tube d'écoulement et de collecte a été rejeté et la colonne a été placée dans un second tube neuf de 2 ml. Puis 500 µl d'AW2 ont été ajoutés sur la colonne placée dans ce nouveau tube et centrifugé pendant 1 min à 14000 tr / min. Le tube d'écoulement et de collecte a été de nouveau jeté et la colonne a été placée dans un troisième tube neuf de 1,5 ml ou de 2 ml. L'ADN a été élué en ajoutant 200 µl de tampon AE au centre de la membrane de la colonne suivi d'une incubation d'une minute à température ambiante. L'ADN a été recueilli dans la solution d'éluion après centrifugation pendant 1 min à 8000 tr / min et la colonne a été jetté. L'ADN a été conservé à – 20°C.

II.3.2.6. Détection moléculaire

a) Tests de détection du *Molluscum contagiosum Virus*

La recherche d'ADN de *Molluscum contagiosum Virus* a été faite par PCR à point final ou PCR classique. Les amorces issues du gène du fragment K de l'ADN du virus décrites par Thompson et collaborateurs (**Thompson, 1997**) ont été utilisés. Il s'agit des amorces (MCV Primer 1: 5' CCGATCTTTGCGAGCGTTCTTAA3', MCV Primer 2: 5'TCCCATACAGCGAGGACAGCATA. La taille de la bande recherchée était de 167 bp. Les conditions d'amplification étaient 94°C pendant 5 minutes pendant un cycle, cette étape était suivie de 36 cycles de 94°C pendant 30 secondes, de 65°C pendant 1 minute et de 72°C pendant une minute. La dernière étape était constituée d'un cycle de 8 min à 72°C. Le Kit

GoTaq G2 Flexi DNA polymerase (Promega corporation ; USA) a été utilisé pour l'amplification.

Le mélange réactionnel était constitué de 0,2µM de chaque amorce, 1,5 µM, MgCl, 0,1µM de dNTPs, 1 unité de Taqpolymerase et 1X de tampon pour un volume final de 50µl dont 5µl d'ADN. La révélation a été faite après migration sur gel d'agarose à 1,5% soumis à une tension de 135 volts pendant 15 à 30 min. Cette révélation s'est faite à l'aide du Gel Doc de Biorad.

b) Etude de la sensibilité

Une série de dilution d'échantillon testé positif de 10^{-1} à 10^{-9} a été utilisée afin de déterminer le niveau de sensibilité de la méthode moléculaire. Un microlitre d'ADN a été dilué dans neuf microlitres d'eau physiologique stérile (ppi) selon le schéma de la figure 28 .

Chaque dilution a été testée afin de déterminer le niveau de détection de la PCR classique du MCV

c) Etude de la spécificité

L'ADN des pathogènes impliqués dans les infections cutanées en Côte d'Ivoire listées dans le tableau ci-dessous a été testé en présence des amorces de détection du MCV afin de rechercher des amplifications non spécifiques avec d'autres microorganismes.

Tableau XII : Pathogènes responsables d'infections cutanées en Côte d'Ivoire utilisées pour l'étude de la spécificité des amorces

Identifiant	Microorganismes	Produit biologique	Unité fournisseur
Souche KN	<i>S aureus</i>	Bouillon de culture bactérienne	UBY
017 HSV	<i>Herpex simplex virus</i>	LCR	DVE
014 VZV	<i>Virus de la varicelle</i>	LCR	DVE
258 G	<i>Virus de la rougeole</i>	Sécrétion oropharyngée	DVE

DVE : Département des virus épidémiques de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, UBY : Unité de bactériologie du laboratoire central CHU de Yopougon

RESULTATS ET DISCUSSION

I. RESULTATS

I.1. ETUDE ECOLOGIQUE ET RESERVOIR DU *MONKEYPOXVIRUS* EN CÔTE D'IVOIRE

I.1.1. Activités de captures

I.1.1.1 Résultats globaux

Concernant les activités de capture des micromammifères, 9 sites répartis sur le territoire ivoirien ont été visités. Quatre sites sur neuf étaient des aires protégées soit 44,4% des sites. Trois sites non protégés étaient dans la zone périphérique de la ville d'Abidjan, Ce qui constituait 1/3 des sites de capture. A l'intérieur du pays en zone rurale, deux sites présentant des aspects environnementaux identiques (cohabitation entre primates non humains et l'homme) ont été visités soit 22,2% des sites.

Au total, le nombre de nuit-piège était de 4930 pour un total de capture de 256 spécimens avec un succès de piégeage ou rendement de 5,19 %. Le succès du piégeage variait de 1,35% à 8,75% selon les sites. Il était globalement de 2,9% (66/2270) dans les aires protégées, de 4,5% (36/800) dans les sites des zones péri-domestiques rurales et de 8,2% (154/1860) dans les sites périphériques d'Abidjan (Figure 36). Les rendements les plus élevés ont été rencontrés sur les sites en périphérie d'Abidjan avec 8,75% à Akouédo, 8,33% à Adiopodoumé et 7% à Songon. Par contre, les rendements les plus faibles étaient observés dans les aires protégées à l'exception du site de Lamto avec 5,8%. La différence de rendement entre les aires protégées et les sites péri-domestiques ruraux n'était pas statistiquement significative ($X^2 = 4,18$, 1ddl, $P = 0,4$). La différence de rendement entre les sites de la périphérie d'Abidjan et les aires protégées était statistiquement significative ($X^2 = 57,44$ 1ddl, $P < 0,0001$) de même que celle entre les sites de la périphérie d'Abidjan et ceux de l'intérieur du pays ($X^2 = 11,48$, 1ddl, $P = 0,0007$) (Tableau XIII).

A l'intérieur de chaque zone, le rendement variait d'un site à l'autre. Dans la zone des aires protégées, le rendement variait de 1,32% à Azagny à 5,8% à Lamto. Les différences observées entre le rendement des différents sites n'étaient pas statistiquement significatives à l'exception de la différence observée entre le site d'Azagny et celui de Lamto. Cette différence était significative ($X^2 = 11,57$, 1ddl, $P = 0,0006$). Au niveau rural, la différence observée entre le rendement du site de Soko (5%) et celui de Gbétitapéa (3,6%) n'était pas significative. Dans la zone périurbaine d'Abidjan, la différence de rendement entre les trois sites n'était également pas significative au plan statistique (Tableau XIV).

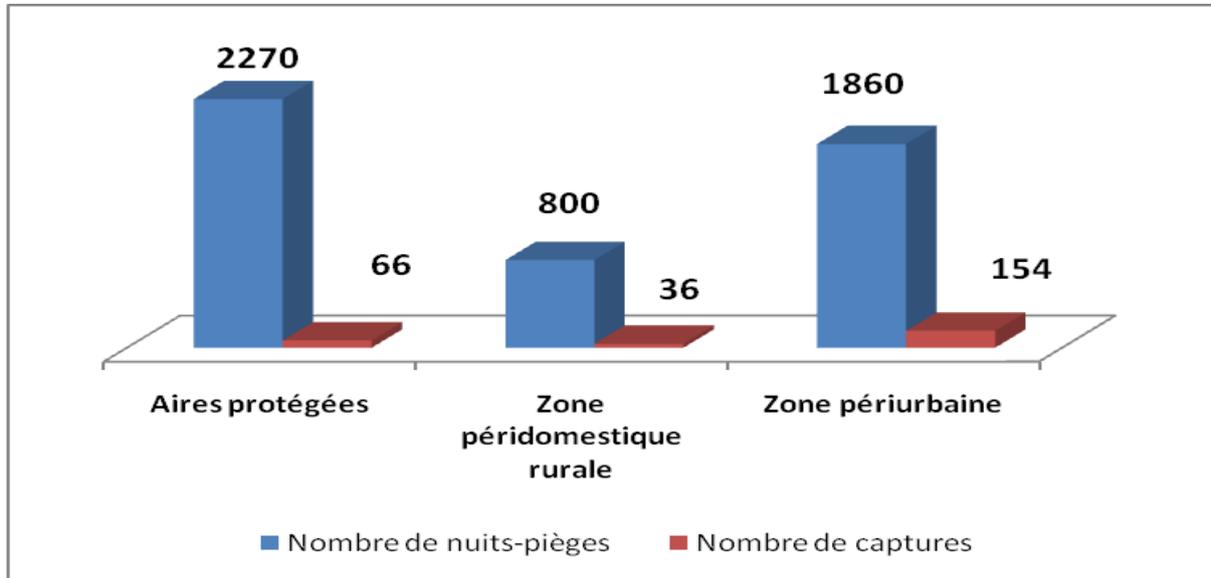


Figure 36 : Nombre de nuits de piégeage et nombre de captures par zone

Tableau XIII : Comparaison des rendements des trois zones de capture

	Aires protégées	Zone péri-domestique rurale	Zone periurbaine
Nombre de nuits-pièges n = 4930	2270	800	1860
Nombre de captures specimens n= 256	66	36	154
Succes de piégeage (Rendement) (%) R = 5,19	2,9	4,5	8,2

Tableau XIV : Variation de rendement ou succès de piégeage au niveau des sites de chaque zone de capture

Site de capture	Nombre de nuit piège N = 4930	Nombre de captures specimen N = 256	Succes de piégeage (Rendement) (%) R = 5,19
Aires protégées			
Azagny	590	8	1,32*
Banco	840	27	3,2
Bossématié	600	17	2,83
Lamto	240	14	5,8*
Zone péridomestique rurale			
Soko	500	25	5
Gbetitapea	300	11	3,6
Zone periurbaine			
Adiopodoumé	840	70	8,33
Akouédo	720	63	8,75
Songon	300	21	7

* Différence = était statistiquement significative

Au total 256 micromammifères ont été capturés dont 195 rongeurs (76,2%) et 61 insectivores (23,8%). Les insectivores étaient constitués essentiellement du genre *Crocidura* (98,3%) avec des espèces comme *Crocidura olivieri* (90,2%), *Crocidura occidentalis* (1,6%), et *Crocidura obscurior* (3,3%) et *Crocidura sp* (3,3%). Chez les rongeurs, la diversité était plus importante. En effet, quatre familles ont été mises en évidence. Ce sont les *Sciuridae*, les *Gerbillidae*, les *Cricetomyidae* et les *Muridae* (Tableau XV). Les rongeurs étaient composés de 94,44% de *Muridae* et cette famille constituait 73,04% de l'ensemble des micromammifères capturés. La famille des *Sciuridae* était composée essentiellement de *Funisciurus*, celle des *Gerbillidae* de *Tatera* et celle *Cricetomyidae* de *Cricetomys*. La famille de *Muridae* était représentée par plusieurs genres dont les plus importants étaient *Rattus* (71/195), *Lophuromys* (28 /195), *Praomys* (25/195), *Mus* et *Mastomys* (20/195 chacun). D'autres genres comme *Myomys*, *Hylomyscus*, *Hybomys*, *Malacomys*, *lemniscomys*, *Uranomys* et *Nanomys* de la famille des *Muridae* ont également été capturés (Tableau XV). Les images de quelque spécimen capturé dans cette étude sont en annexe 9.

Tableau XV : Répartition selon les familles et les genres de micromammifères

Ordres	Familles	Genres	Nombre N = 256	Pourcentage (%)	
Insectivores N = 61	<i>Soricidae</i>	<i>Crocidura</i>	60	98,4	
	<i>Erinaceidae</i>	<i>Altelerix</i>	1	1,6	
Rongeurs N = 195	<i>Scuiridae</i>	<i>Funisciurus</i>	5	2,6	
	<i>Gerbillidae</i>	<i>Tatera</i>	3	1,5	
	<i>Cricetomyidae</i>	<i>Cricetomys</i>	3	1,5	
	<i>Muridae</i>	<i>Rattus</i>		70	35,9
		<i>Lophuromys</i>		28	14,4
		<i>Praomys</i>		25	12,8
		<i>Mus</i>		20	10,3
		<i>Mastomys</i>		20	10,3
		<i>Lemniscomys</i>		5	2,6
		<i>Uranomys</i>		4	2,0
		<i>Myomys</i>		3	1,5
		<i>Hylomuscus</i>		2	1
		<i>Hybomys</i>		1	0,5
	<i>Nanomys</i>		1	0,5	
<i>Malacomys</i>		1	0,5		
	<i>Non identifié</i>		3	1,5	

I.1.1.2 Analyse des captures par zone d'activité

Une diversité de micromammifères capturés a été observée dans chaque zone avec une prédominance de quelques espèces dans certaines zones. Dans la zone périurbaine d'Abidjan, 61 *Rattus* sur 71 ont été capturés soit 86% , ainsi que 43 *Crocidura* sur 60 soit 71,66% et 17 sur 20 *Mus musculus* soit 85%. Par contre, plus de 50% des *Mastomys* ont été capturés dans la zone rurale et dans les aires protégées ainsi que 80% des *Praomys*. *Crocidura*, *Lophuromys* et *Praomys* étaient présents sur l'ensemble des zones de capture (Tableau XVI).

a) Zone péridomestique en milieu rural

En milieu rural, dans la zone péridomestique, l'abondance était de 36 avec une richesse d'espèces (richesse spécifique) de 11 pour *Crocidura occidentalis*, *Crocidura olivieri*, *Altelerix albiventrix*, *Tatera sp*, *Mastomys natalensis*, *Mastomys erythrolocus*, *Mus musculus*, *Myomys daltoni*, *Praomys sp*, *Lophuromys sp* et *Rattus rattus*. Les micromammifères capturés dans cette zone étaient très variés malgré le faible effectif (Figure 37).

- Site de Soko

Ce site est situé à 7km du Ghana dans le nord est de la Côte d'Ivoire. Il avait une végétation faite de savane et alternée de forêt claire. Les singes dits sacrés présents à la périphérie du village font souvent des incursions dans le village. Ainsi les activités de capture ont été réalisées à la périphérie du village constituée de plantations et de broussaille et dans les habitations. Pour une abondance de 25, la richesse en espèce était de 8 et était composée de *Crocidura occidentalis*, *Crocidura obscurior*, *Altelerix albiventrix*, *Mastomys natalensis*, *Mastomys erythrolocus*, *Mus musculus*, *Myomys daltoni*, et *Praomys sp*, (Figure 38). *Mastomys*, *Mus musculus* et *Myomys daltoni* ont été capturés dans les habitations par contre *Crocidura*, *Lophuromys* et *Altelerix* l'ont été dans les broussailles. L'abondance dans les habitations était de 16 avec un rendement de 10% contre 9 avec un rendement de 2,6% dans les champs. Cette différence était significative au plan statistique ($X^2 = 10,88$, $P = 0,0009$).

- Site de Gbétitapéa

Le village situé au Centre-ouest de la Côte d'Ivoire avec une végétation de forêt mésophile. Des singes sont présents à la périphérie et dans le village. Les captures ont été réalisées dans les habitations et à la périphérie du village constitué de plantations et de broussailles. L'abondance était de 11 et la richesse était de 5 dont *Crocidura olivieri*, *Mastomys natalensis*, *Lophuromys*, *Rattus rattus* et *Tatera*. (Figure 39). *Rattus rattus* et *Mastomys natalensis* ont été capturés dans les habitations. Les espèces comme *Lophuromys sp*,

Crocidura olivieri et *Tatera* ont été capturées dans les broussailles et les champs. L'abondance dans les habitations était de 4 avec un rendement de 6,6% contre 7 avec un rendement de 2,9% dans les champs. La différence observée n'était pas significative statistiquement ($X^2 = 0,99$, $P = 0,31$).

b) Zone périurbaine d'Abidjan

Dans cette zone, l'abondance était de 154 avec une richesse d'espèce égale à 11 composée de *Rattus rattus*, *Rattus norvegicus*, *Crocidura olivieri*, *Mastomys erythroleuccus*, *Mastomys sp*, *Mus musculus*, *Lophuromys sp*, *Lemniscomys sp*, *Nanomys sp*, *Praomys* et *Funiscuirus carruthesi* (Figure 40).

- Site d'Akouédo

C'est la décharge principale d'ordure de la ville d'Abidjan. C'est une zone de forte activité humaine avec une présence importante de micromammifères. Le piégeage a concerné la décharge, les habitations au sein de la décharge et les petits champs à proximité de la décharge. La richesse en espèce à Akouédo était de 4 faite de *Crocidura olivieri*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus* et de *Rattus rattus* avec une abondance de 63. Ce site malgré son abondance était la moins riche en espèces de la zone périurbaine (Figure 41). Au niveau de la décharge et des habitations étaient retrouvés essentiellement le genre *Rattus* et *Mus musculus* par contre *Crocidura* était capturé dans les champs à proximité de la décharge.

- Site de Songon

A Songon, la richesse en espèce était de 5 faite de *Crocidura olivieri*, *Mastomys sp*, *Nanomys sp*, *Praomys* et de *Rattus norvegicus* (Figure 42). Sur ce site, les captures ont eu lieu exclusivement dans les broussailles et les champs. Certaines espèces comme *Lophuromys sp* et *Praomys sp* ont été capturées à la lisière aquatique des broussailles et des champs.

- Site d'Adiopodoumbé

Au niveau de ce site, les captures ont concerné d'une part une zone de stockage des aliments (magasins) au sein d'un marché et d'autre part les champs et les broussailles. L'abondance était de 70 avec une richesse de 7 espèces composées de *Rattus norvegicus*, *Crocidura olivieri*, *Mastomys erythroleucus*, *Mus musculus*, *Lophuromys sp*, *Lemniscomys sp* et *Funiscuirus carruthesi* (Figure 43).

Les espèces trouvées dans les magasins étaient composées essentiellement de *Rattus* et de *Mus musculus* alors que les espèces capturées dans les champs et broussailles étaient plus variées et constituées de *Crocidura olivieri*, *Mastomys erythrolocus*, *Lophuromys*, *Lemniscomys*

sp et de Funisciurus carruthesis. Dans les habitations, l'abondance était de 33 avec un rendement de 9,1%. Hors des habitations, il était de 7,7%. La différence observée n'était pas significative au plan statistique ($X^2 = 0,39$, $P = 0,52$)

c) Aires protégées

Dans les aires protégées, sur une abondance de 66, la richesse était de 14 espèces composée de *Crocidura olivieri*, *Crocidura obscurior*, *Crocidura sp*, *Praomys sp*, *Hylomyscus sp*, *Cricetomys sp*, *Mastomys erythroleucus*, *Lophuromys sicapusi*, *Lophuromys sp*, *Malacomys longipes*, *Hybomys sp*, *Uranomys ruddi*, *Rattus rattus*, et *Rattus norvegicus*. (Figure 44).

- Site d'Azagny

Au niveau du Parc d'Azagny, l'abondance était de 8 et la richesse d'espèces était de 5 composée de *Crocidura sp*, *Praomys sp*, *Hylomyscus sp*, *Cricetomys sp*, *Lophuromys* (Figure 45). Il s'agit de captures effectuées exclusivement dans les champs et les broussailles.

- Site du Banco

Concernant le Parc du Banco, de par sa spécificité, des piégeages ont été effectués à proximité des habitations des agents des Eaux et forêts et aux abords des pistes présentes à l'intérieur de la forêt. L'abondance était de 27 avec une richesse en espèce de 5 dont *Crocidura sp*, *Praomys sp*, *Lophuromys sp*, *Rattus sp* et *Hybomys sp* (Figure 46). Le genre *Rattus* a été capturé à proximité des habitations.

- Site de Lamto

Au niveau de la Station d'écologie de Lamto, une abondance de 14 et une richesse en espèce de 5 faite de *Crocidura olivieri*, *Mastomys erythroleucus*, *Lophuromys sicapusi*, *Lemniscomys sp* et *Uranomys ruddi* ont été observées (Figure 47). Il s'agit de capture effectuées exclusivement dans les champ et broussailles.

- Site de Bossematié

Dans la forêt classée de Bossematié, avec une abondance de 17, la richesse d'espèce était de 4 dont *Crocidura obscurior*, *Praomys sp*, *Lophuromys* et *Malacomys longipes*(Figure 48). Il s'agit également de piégeage dans les champs et les broussailles.

Etude épidémiologique, écologique et moléculaire du *Monkeypoxvirus* en Côte d'Ivoire

Tableau XVI : Répartition des micromammifères capturés selon les sites

	ZONE RURALE Abondance = 36 Richesse = 11			ZONE PROTEGEES Abondance = 66 Richesse = 14			ZONE URBAINES Abondance = 154 Richesse = 11		
	SOKO	GBETITAPEA	AZAGNY	LAMTO	BOSSEMATIE	BANCO	ADIOPODOUBE	SONGON	AKOUEDO
<i>Crocidura olivieri</i> (55)	2	3		2		5	23	7	13
<i>Crocidura occidentalis</i> (1)	1								
<i>Crocidura obscurior</i> (2)					2				
<i>Crocidura sp</i> (2)			1		1				
<i>Altelerix albiventrix</i>	1								
<i>Mastomys natalensis</i> (15)	9	3						3	
<i>Mastomys erythrolocus</i> (5)	2			2			1		
<i>Mastomys sp</i>									
<i>Mus mucuslus</i> (20)	3						16		1
<i>Myomys daltoni</i> (3)	3								
<i>Praomys sp</i> (25)	4		3		12	5		1	
<i>Hylomyscus sp</i> (2)			2						
<i>Cricetomys sp</i> (3)			1	2					
<i>Lophuromys sp</i> (27)		1	1		1	7	10	7	
<i>Lophuromys sicapuisis</i> (1)				1					
<i>Rattus rattus</i>		1				5	3		7
<i>Rattus norvegicus</i>						4	10	2	8
<i>Rattus sp</i>									31
<i>Hybomys sp</i>						1			
<i>Malacomys longipes</i>					1				
<i>Tatera sp</i> (3)		3							
<i>Lemniscomys sp</i> (5)				3			2		
<i>Uranomys ruddi</i> (4)				4					
<i>Funisciurus carruthesis</i> (5)							5		
<i>Nanomys sp</i>								1	
Non identifié (3)									3
Abondance	25	11	8	14	17	27	70	21	63
Richesse d'espèce	8	5	5	5	4	5	7	5	4

Les figures 37 à 39 représentent la répartition des micromammifères capturés dans la zone péri-domestique rurale. La figure 37 étant la répartition générale au niveau de la zone et les figures 38 et 39 sont les répartitions au niveau de chaque site de cette zone péri-domestique

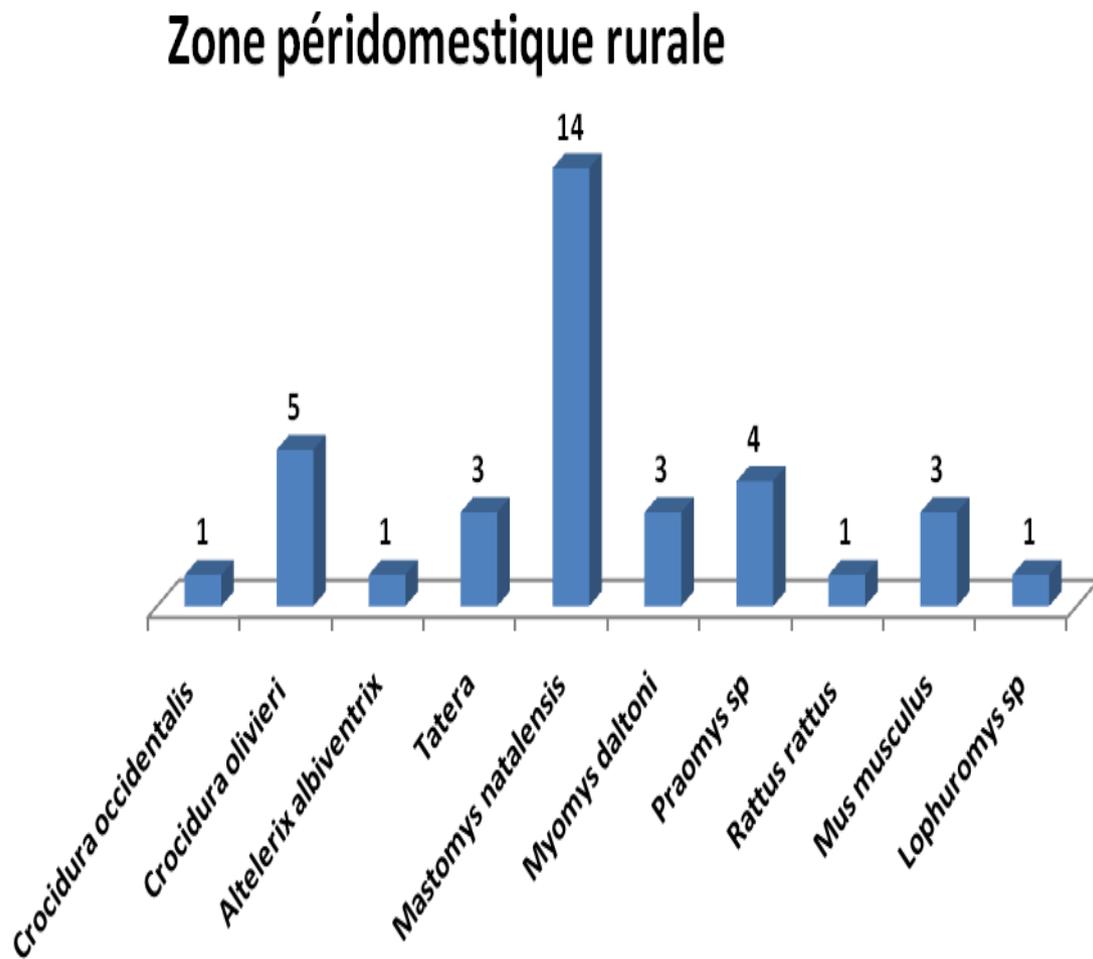


Figure 37: Micromammifères capturés dans la zone péri-domestique rurale

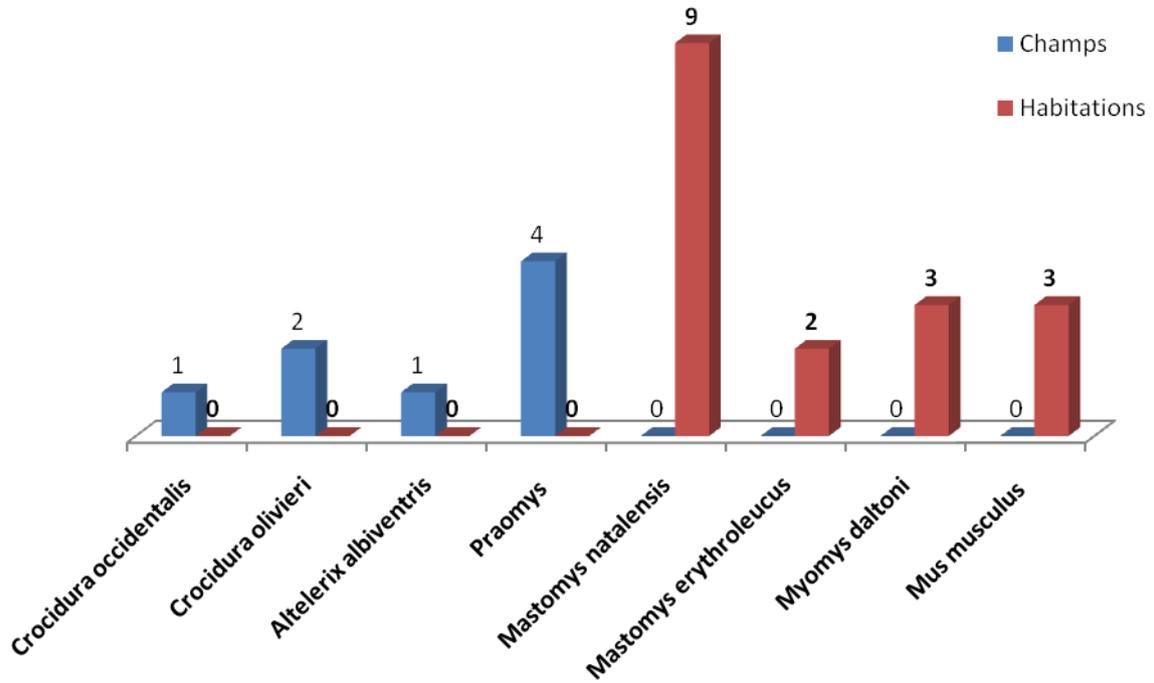


Figure 38: Répartition des micromammifères capturés sur le site de Soko

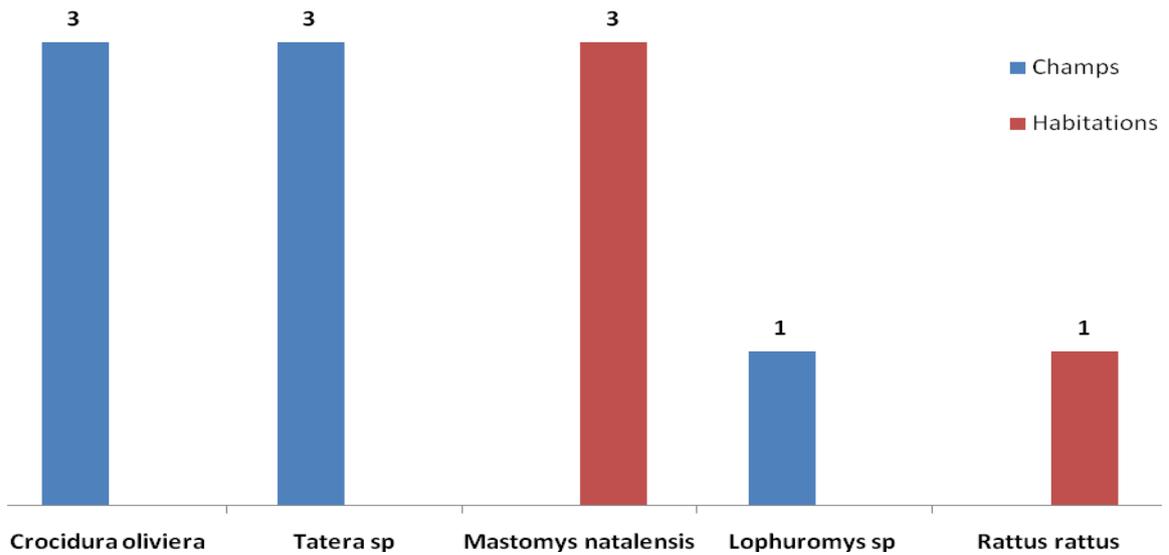


Figure 39: Répartition des micromammifères capturés sur le site de Gbétitapéa

Les figures 40 à 43 représentent la répartition des micromammifères capturés dans la zone périurbaine. La figure 40 étant la répartition générale au niveau de la zone et les figures 41 et 43 sont les répartitions au niveau de chaque site de cette zone périurbaine

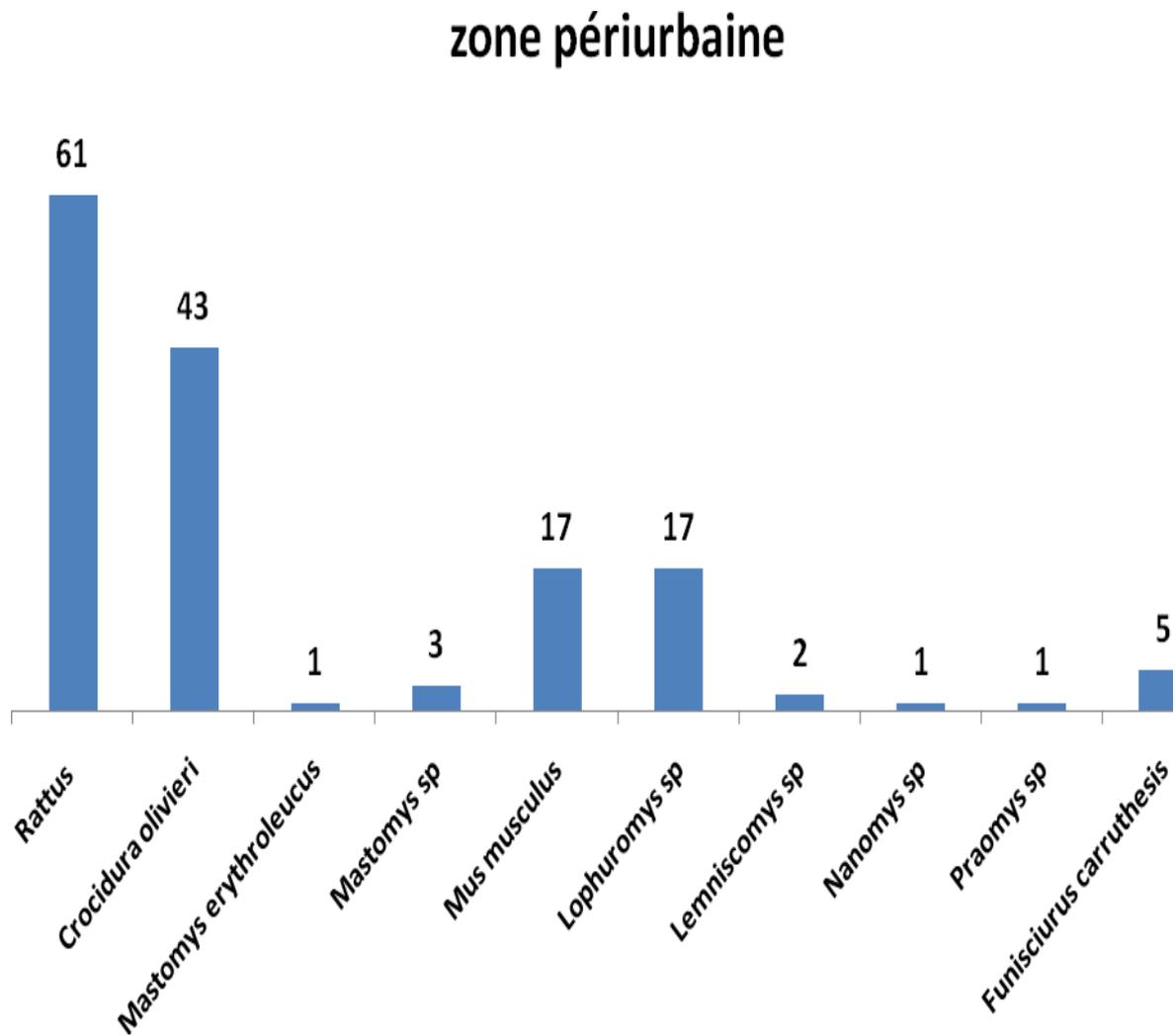


Figure 40: Répartition des micromammifères capturés dans la zone périurbaine d'Abidjan

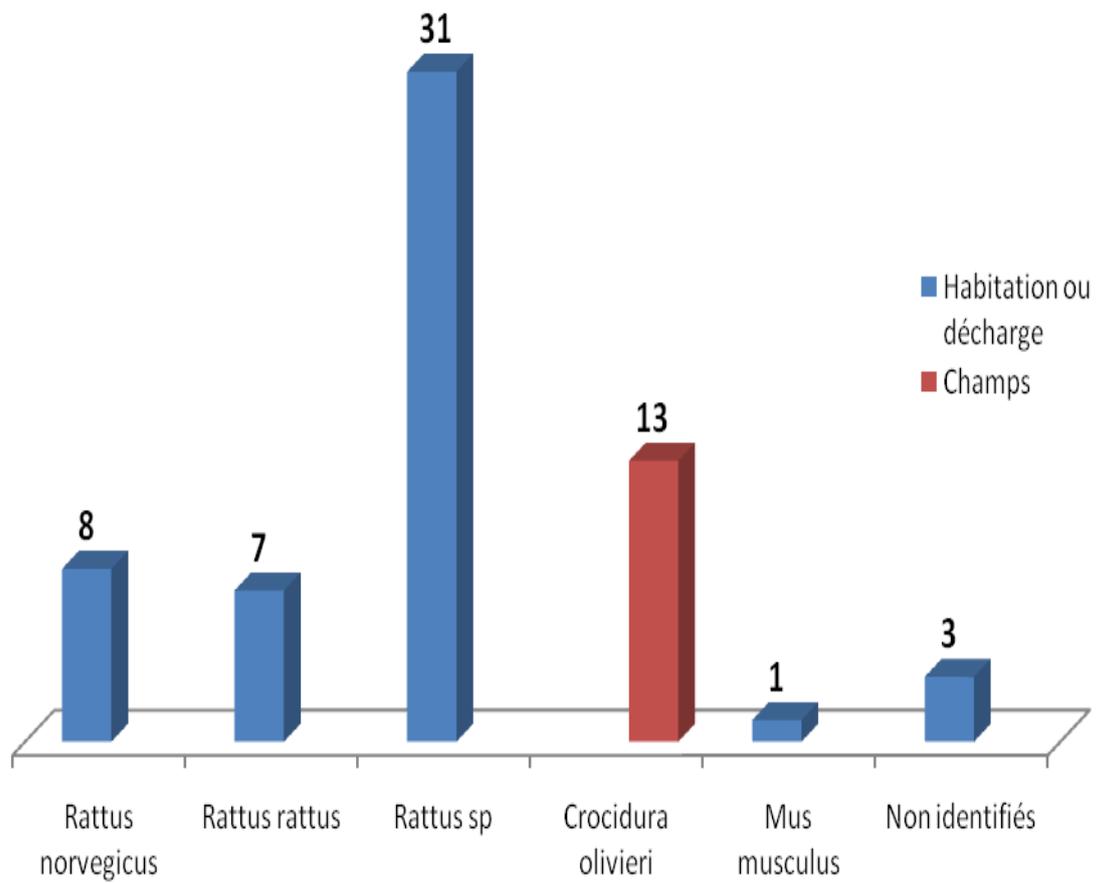


Figure 41: Répartition des micromammifères capturés sur le site d'Akouédo

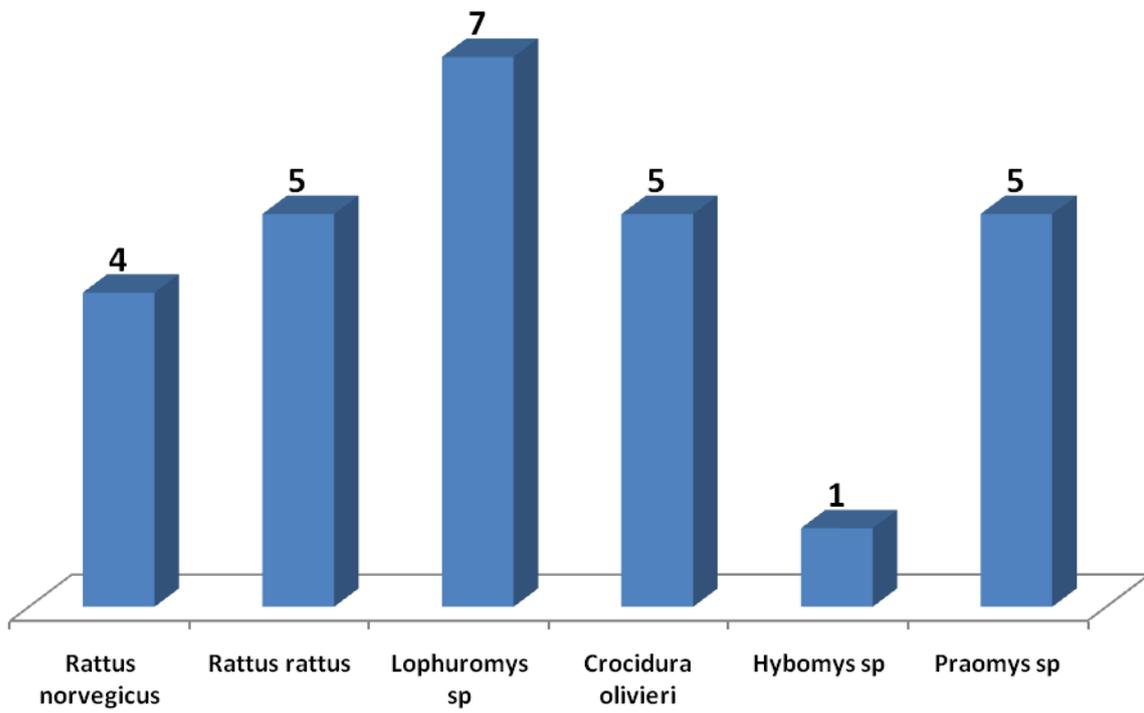


Figure 42: Répartition des micromammifères capturés sur le site de Songon

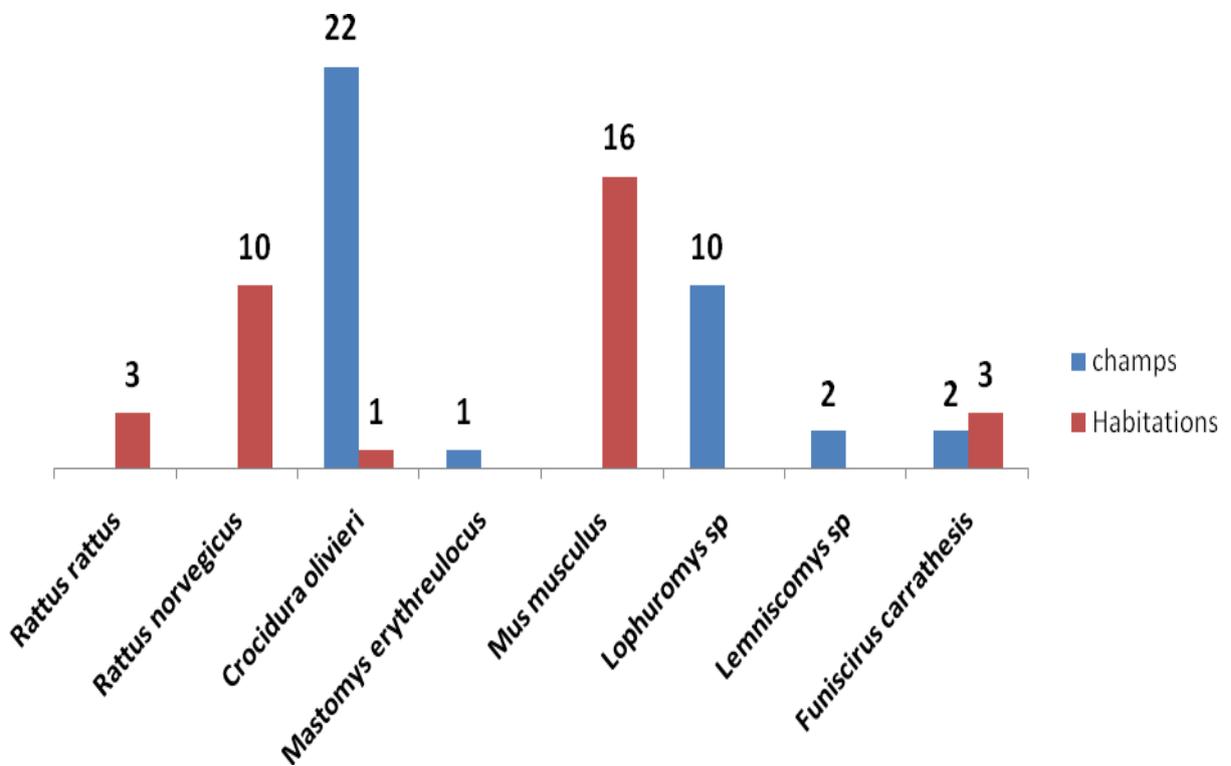


Figure 43: Répartition des micromammifères capturés sur le site d'Adiopodoumbé

Les figures 44 à 48 représentent la répartition des micromammifères capturés dans les aires protégées. La figure 44 étant la répartition générale au niveau de la zone et les figures 45 et 48 sont les répartitions au niveau de chaque site de cette zone périurbaine

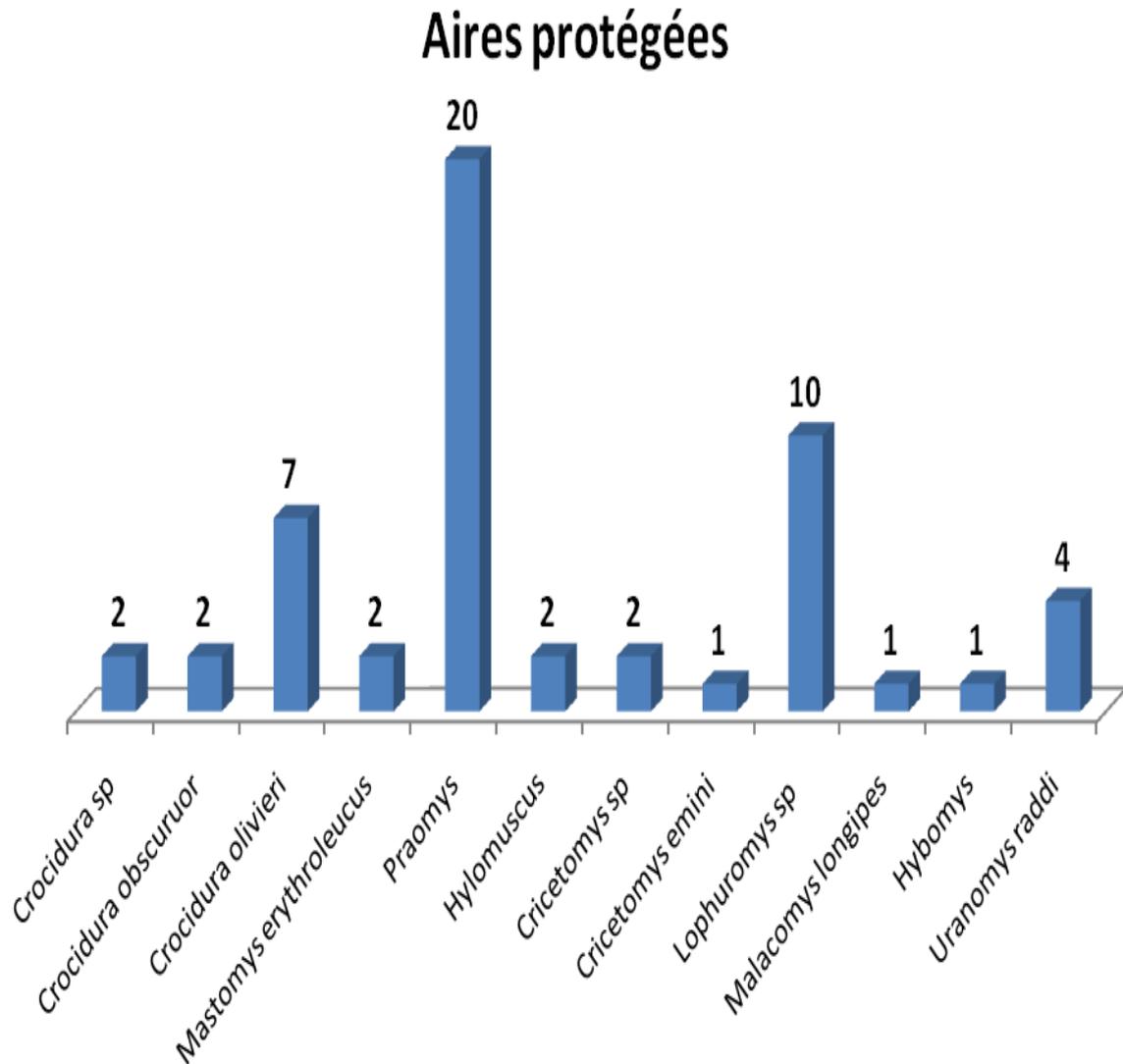


Figure 44: Répartition des micromammifères capturés dans la zone des aires protégées

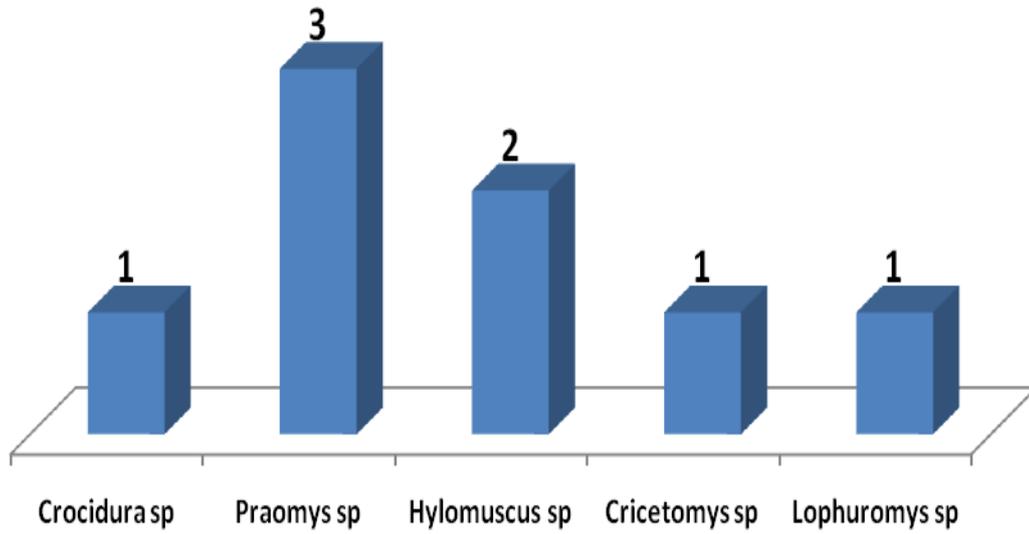


Figure 45: Répartition des micromammifères capturés sur le site d'Azagny

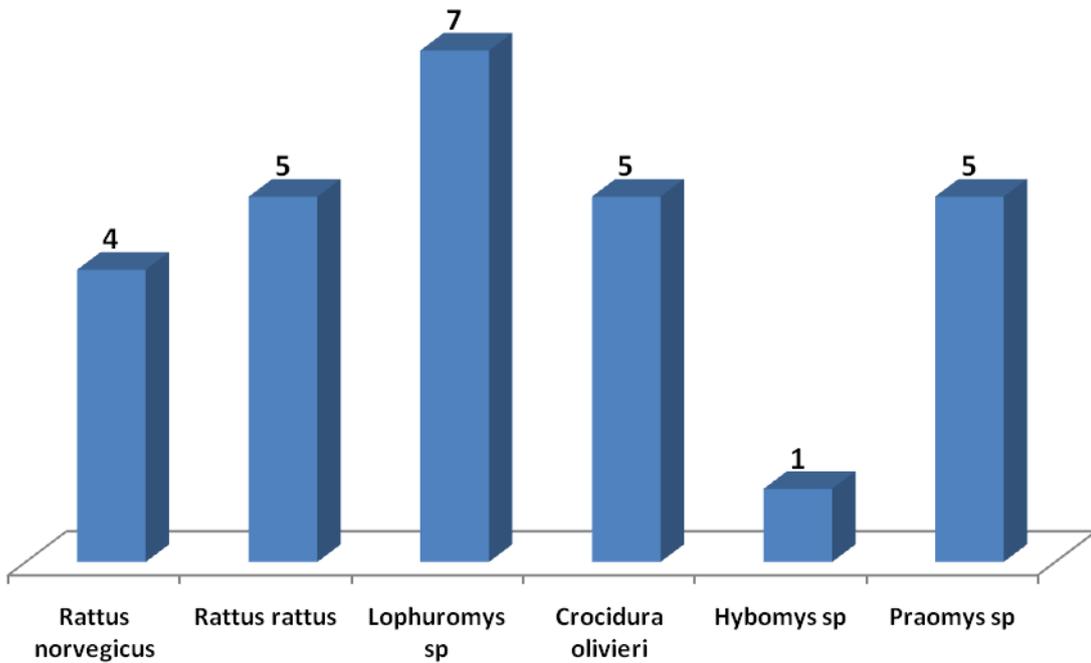


Figure 46: Répartition des micromammifères capturés sur le site du Banco

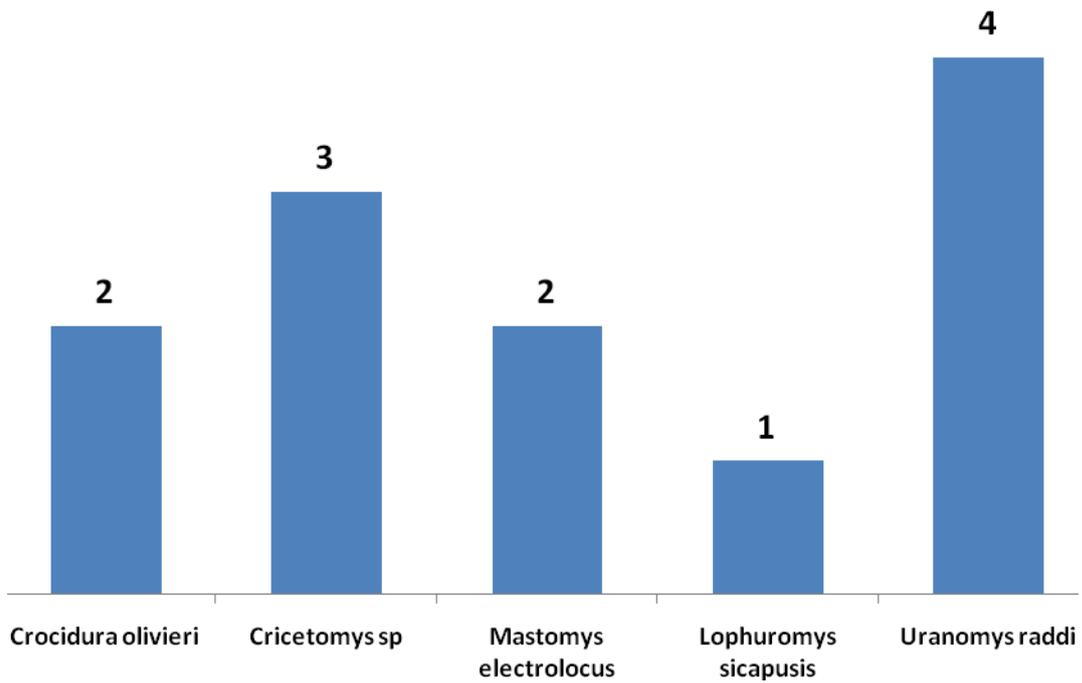


Figure 47: Répartition des micromammifères capturés sur le site de Lamto

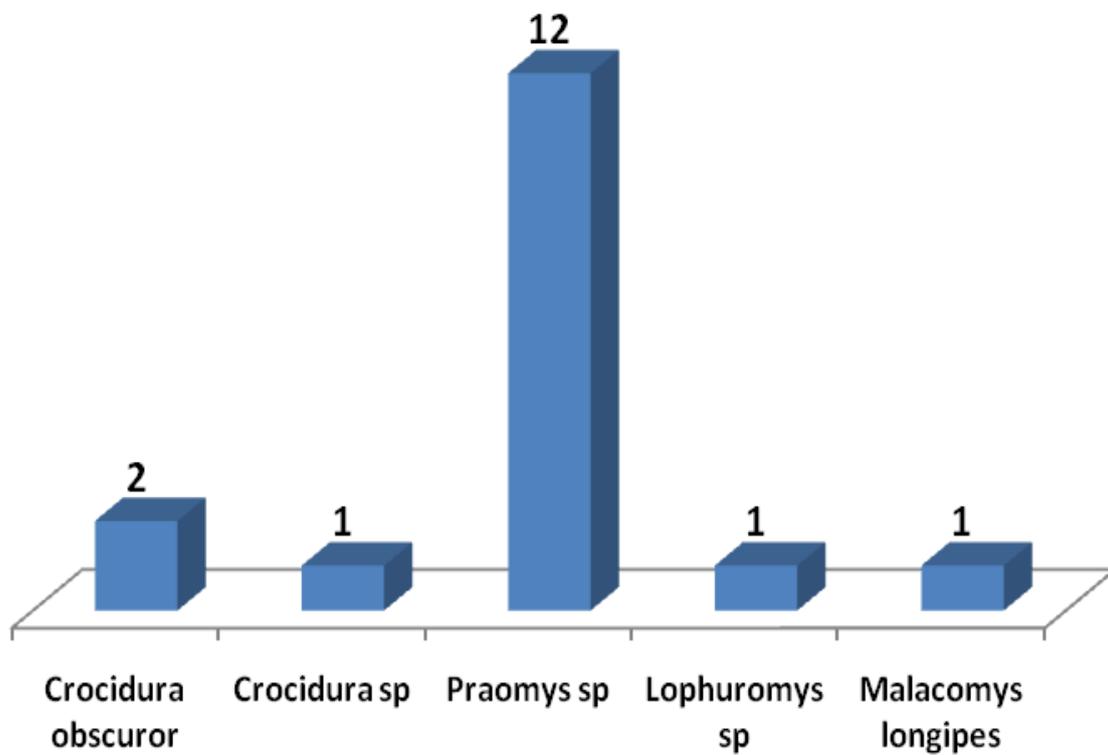


Figure 48: Répartition des micromammifères capturés sur le site de Bossematié

I.1.2. Résultats des analyses moléculaires des tissus des micromammifères

A partir des micromammifères autopsiés, 759 organes ont été prélevés dont 255 tissus de foie, 253 tissus de poumon et 251 tissus de rein. Les ADN de l'ensemble des tissus ont été extraits et 67,45% des ADN ont été analysés par la méthode moléculaire. Les tissus analysés étaient composés de 91% d'ADN de tissus de foie collectés, de 81% d'ADN de tissus du poumon collectés et 30% d'ADN de tissus de rein collectés. Ces ADN ont été analysés en vue de détecter *Orthopoxvirus* par PCR à point final et PCR en temps réel. L'analyse des ADN des échantillons de tissus a été précédée de la réalisation des tests de validation des méthodes moléculaires utilisées.

a) Tests de validation de la méthode de détection des *Orthopoxvirus*

- Détection et étude de la sensibilité

A partir des ADN extraits de culture de *Cowpoxvirus* sur cellule vero et d'ADN de *Monkeypoxvirus* fournis par l'Institut Pasteur de Bangui, une série de dilution des ADN a été analysée par PCR classique et PCR en temps réel. Concernant la PCR classique, *Orthopoxvirus* a été détecté jusqu'à une dilution de 10^{-7} (Figure 49) et le *Monkeypoxvirus* à une dilution de 10^{-4} (Figure 50). Avec la méthode PCR en temps réel, des courbes d'amplification étaient détectées au delà de la dilution 10^{-7} pour la détection de l'*Orthopoxvirus* et du *Monkeypoxvirus* (Figures 51 et 52) traduisant une plus grande sensibilité de la PCR temps réel par rapport à la PCR à point final.

b) Etude de la spécificité

Les amorces pour la détection des *Orthopoxvirus* ont été amplifiées en présence des ADN de pathogènes impliqués dans les éruptions cutanées fébriles et aucune amplification non spécifique n'a été observée. Il s'agit d'ADN de *Herpes simplex virus*, de virus de la varicelle et du zona, du virus de rougeole, de *Staphylococcus aureus* et *Mycobacterium ulcerans*.

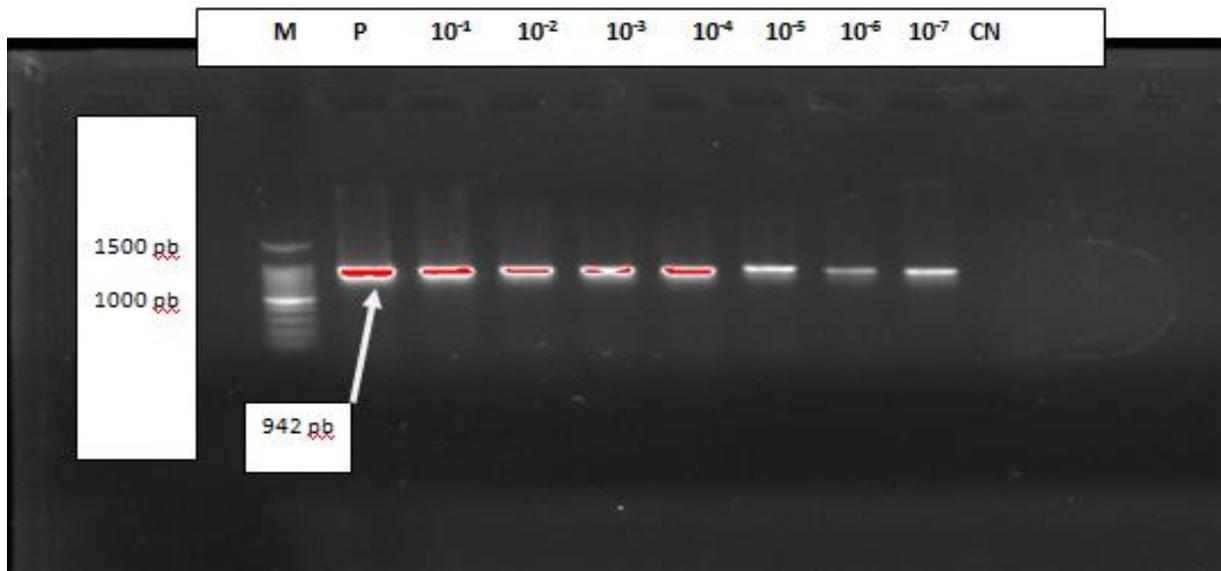


Figure 49: Photographie de résultat de test de dilution en série de l'ADN *Orthopoxvirus*

Le seuil des bandes positives est à une dilution 10^{-7} M = Marqueur de poids moléculaire, P = ADN non dilué
CN = contrôle négatif

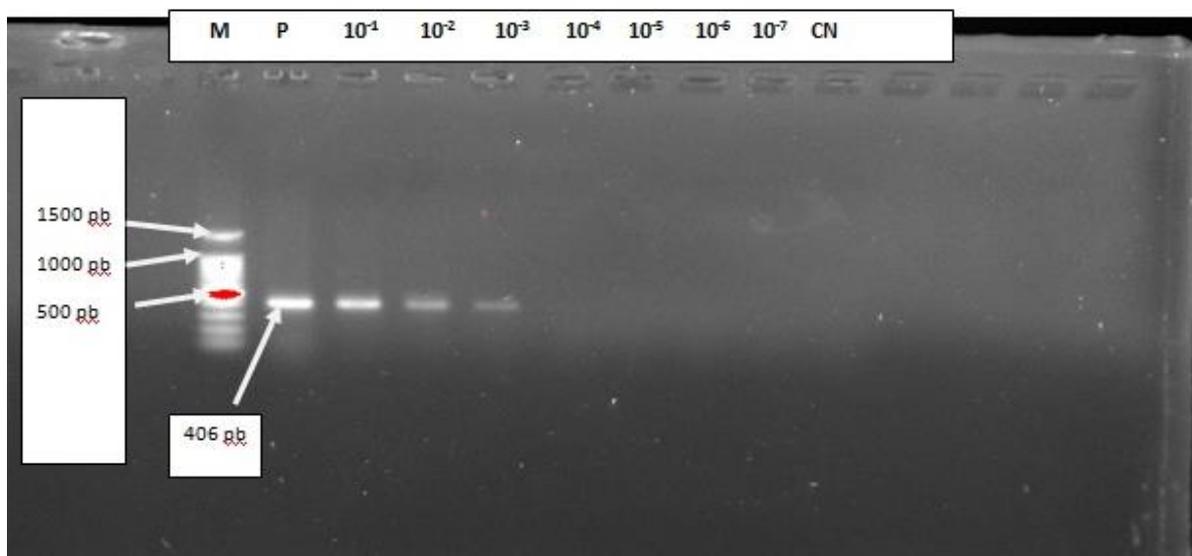


Figure 50 : Photographie de résultat de test de dilution en série de l'ADN *Monkeypoxvirus*

Le seuil des bandes positives est à une dilution 10^{-3} M = Marqueur de poids moléculaire, P = ADN non dilué
CN = contrôle négatif

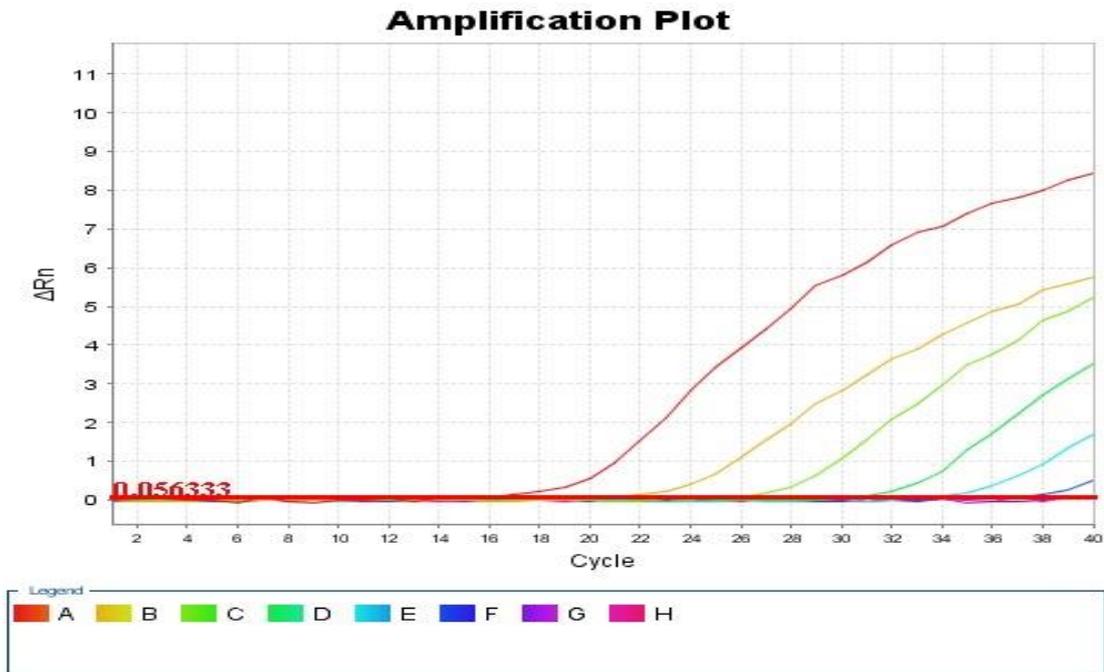


Figure 51: Courbe d'amplification de dilution en série de l'ADN *Orthopoxvirus* par PCR temps réel
 A = Courbe d'ADN non dilué, B = Courbe d'ADN dilué à 10^{-1} , C = Courbe d'ADN dilué à 10^{-2} , D = Courbe d'ADN dilué à 10^{-3} , E = Courbe d'ADN dilué à 10^{-4} , F = Courbe d'ADN dilué à 10^{-5} , G = Courbe d'ADN dilué à 10^{-6} , H = Courbe d'ADN dilué à 10^{-7}

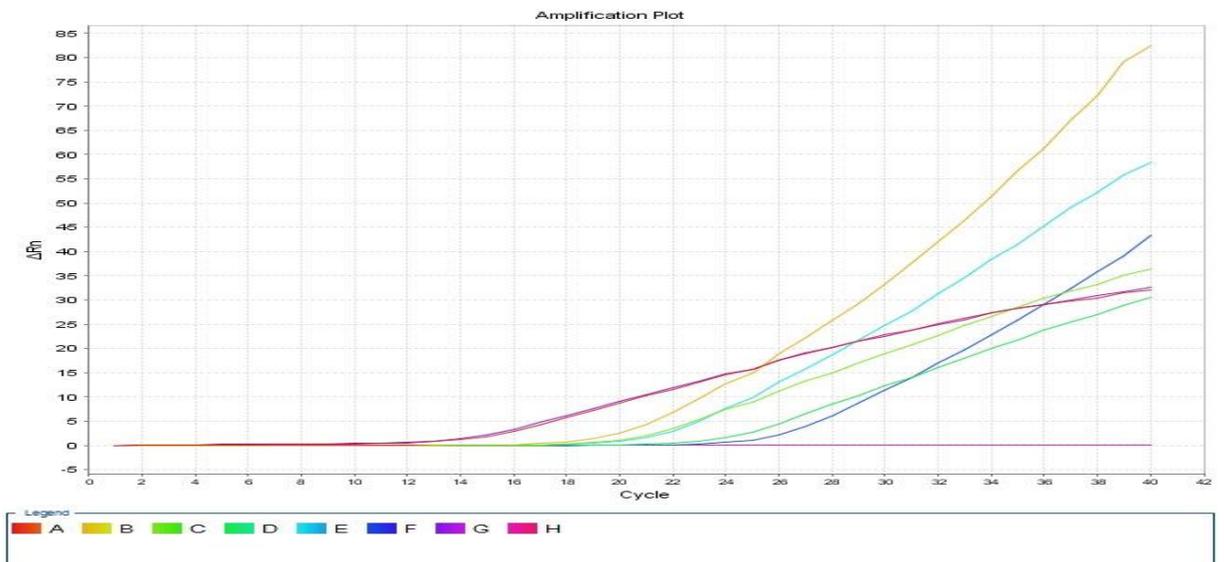


Figure 52 : Courbe d'amplification de dilution en serie de l'ADN *Monkeypoxvirus* par PCR temps réel
 A = Courbe d'ADN non dilué, B = Courbe d'ADN dilué à 10^{-1} , C = Courbe d'ADN dilué à 10^{-2} , D = Courbe d'ADN dilué à 10^{-3} , E = Courbe d'ADN dilué à 10^{-4} , F = Courbe d'ADN dilué à 10^{-5} , G = Courbe d'ADN dilué à 10^{-6} , H = Courbe d'ADN dilué à 10^{-7}

c) Analyse des échantillons

Sur les 512 extraits d'ADN analysés par PCR à point final, 1,9% présentaient des bandes de 942 pb pour *Orthopoxvirus* dont 2,1% des ADN de foie de micromammifères du genre *Funisciurus*, *Crocidura olivieri* et *Mastomys*, 1,9% des ADN de poumon de micromammifères du genre *Crocidura olivieri*, *Praomys*, *Lemniscomys* et *Mastomys*, et 1,3% des ADN de rein de micromammifères du genre *Funisciurus* (Tableau XVII et figure 53). Les sites concernés étaient Adiopodoumé, Gbétitapéa, Lamto, Soko, Bossématié et Akouédo (Tableau XVIII et Figure 54). Cependant, aucun échantillon n'a présenté de bande spécifique de *Monkeypoxvirus*.

L'analyse par PCR en temps réel ciblant d'autres gènes de l'ensemble des échantillons a confirmé la présence d'un seul échantillon positif pour la détection des *Orthopoxvirus* soit 0,19% des échantillons (Figure 55). Il s'agissait d'un échantillon de foie de *Crocidura olivieri* capturé sur le site d'Adiopodoumé, site périurbain. Cet échantillon était négatif pour la recherche de *Monkeypovirus*.

Tableau XVII: Répartition selon les bandes suspectes positives pour les *Orthopoxvirus*

ADN	Effectif analysé	Présence de bande suspecte	Pourcentage de suspect (%)
Foie	231	5	2,1
Poumon	205	4	1,9
Rein	76	1	1,3
Total	512	10	1,9

Le pourcentage d'échantillon de rongeurs générant des bandes positives chez les rongeurs était de 1,9%

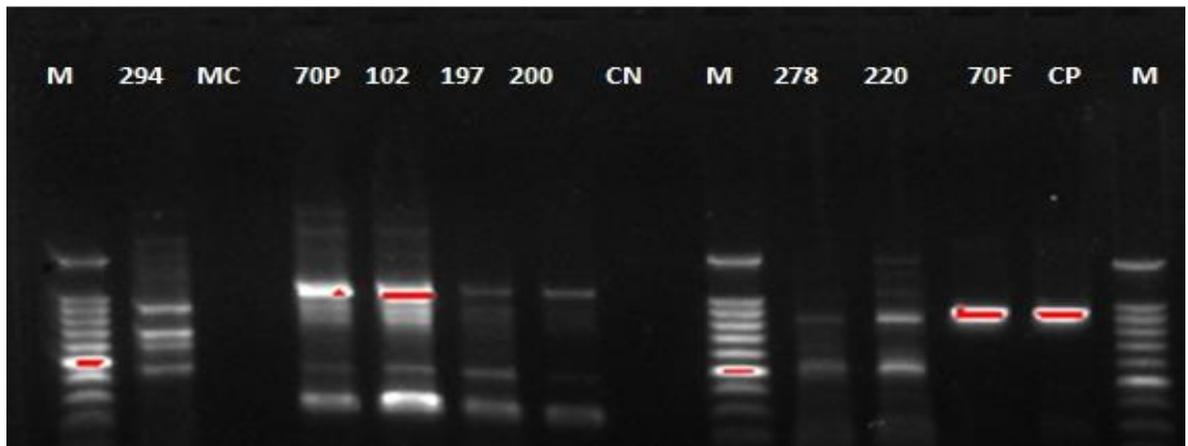


Figure 53 : Photographie d'échantillons avec bandes suspectes d'*Orthopoxvirus* M = Marqueur, MC = Molluscum C virus, CN = Contrôle négatif, 70, 102, 197, 200, 220, 278 sont des échantillons avec des bandes faisant évoquer la présence d'*Orthopoxvirus*

Tableau XVIII: Répartition des micromammifères positifs pour la recherche d'*Orthopoxvirus* par site de capture par la méthode de PCR classique

Sites	Espèces	Organes	Taux de positivité par site (%)
Adiopodoumé	<i>Funisciurus carruthesi</i>	Foie /Rein	2/70 soit 2,8%
	<i>Crocidura olivieri</i>	Foie	
Gbétitapéa	<i>Mastomys natalensis</i>	Foie	2/11 soit 18,18%
	<i>Crocidura olivieri</i>	Poumon	
Lamto	<i>Lemniscomys sp</i>	Poumon	1/14 soit 7,14%
Soko	<i>Mastomys natalensis</i>	Poumon	1/25 soit 4%
Bossématié	<i>Praomys sp</i>	Poumon	1/17 soit 5,9%
Akouédo	<i>Crocidura olivieri</i>	Foie	2/63 soit 3,2%
	<i>Crocidura olivieri</i>	Foie	

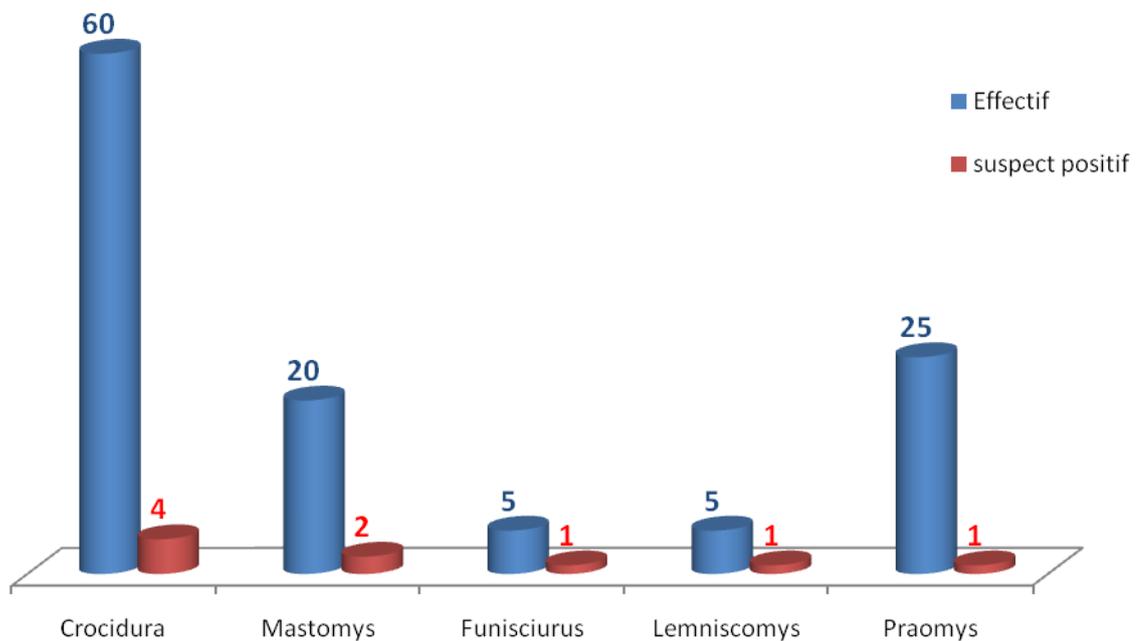


Figure 54: Proportion d'échantillons positifs par espèce de micromammifères pour la recherche d'*Orthopoxvirus* par PCR classique

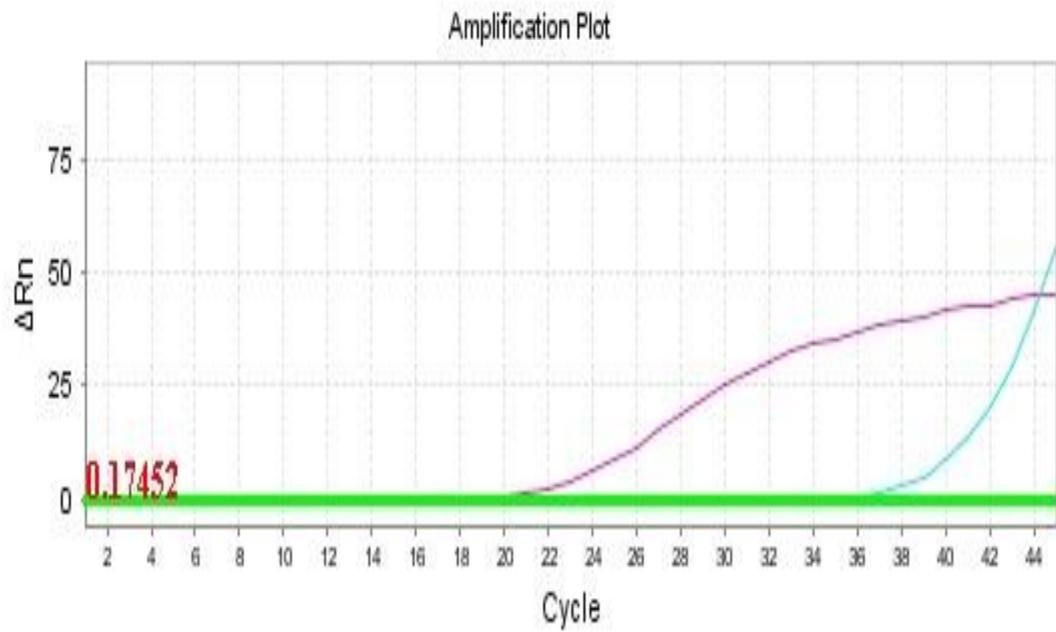


Figure 55 : Courbe d'amplification de l'échantillon positif pour la recherche d'*Orthopoxvirus*
Courbe violette = Contrôle positif Courbe bleue = Courbe d'échantillon positif

I.2. ETUDE DE LA SEROPREVALENCE DES ORTHOPOXVIRUS EN CÔTE D'IVOIRE

Cette étude a porté sur une sérothèque collectée dans le cadre d'une surveillance nationale des fièvres hémorragiques de 2013 à 2015. Sur 1354 sérums collectés chez les sujets de moins de 30 ans, 400 ont été retenus pour analyse sérologique soit 29,54%. Sur cet ensemble, 385 sérums ont été effectivement analysés soit 28,54% de l'effectif total.

I.2.1 Au plan épidémiologique

Le sexe prédominant était le sexe masculin, qui représentait 2/3 des effectifs étudiés avec un sex-ratio de 1,93 (Figure 56). L'âge moyen des sujets était de 8,95 ans avec des extrêmes de 1 an à 30 ans. La tranche d'âge de 0 à 10 ans constituait plus de 50% des sujets et 21,5% avaient un âge compris entre 21 et 30 ans (Tableau XVIV). Concernant la répartition des sérums selon les régions sanitaires, les effectifs ont été fixés selon la proportion d'échantillons provenant de chaque région sanitaire pendant la période d'étude chez les sujets de moins de 30 ans. Nous avons gardé la nomenclature administrative des régions qui était en vigueur lors des prélèvements. Les sérums de la Région des Lagunes 2, de la Région du Moyen Cavally et de la Région des Montagnes représentaient respectivement 10,12% (39/385), 9,87% (38/385) et 9,1% (35/385) des sérums analysés (Figure 57). La moyenne globale d'échantillons de sérum par région était de 20 et la Région de Lagune 2 avait le plus grand nombre d'échantillons avec 39 échantillons.

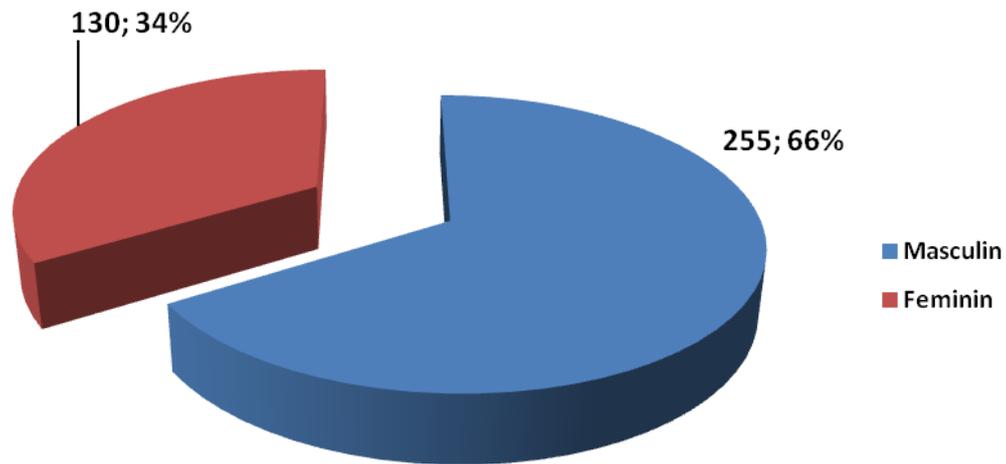


Figure 56: Répartition des sérums selon le sexe

Tableau XVIV: Répartition des sujets selon les tranches d'âge et le sexe

Tranche d'âge	Masculin	Féminin	Sex-ratio
	n = 255 (66,23%)	n = 130 (33,76)	1,96
0 – 10 ans (n = 197)	136 (35,32%)	61 (15,84%)	2,23
11 – 20 ans (n = 105)	62 (16,10%)	43 (11,16%)	1,44
21 - 30 ans (n = 83)	57 (14,80%)	26 (6,75%)	2,19

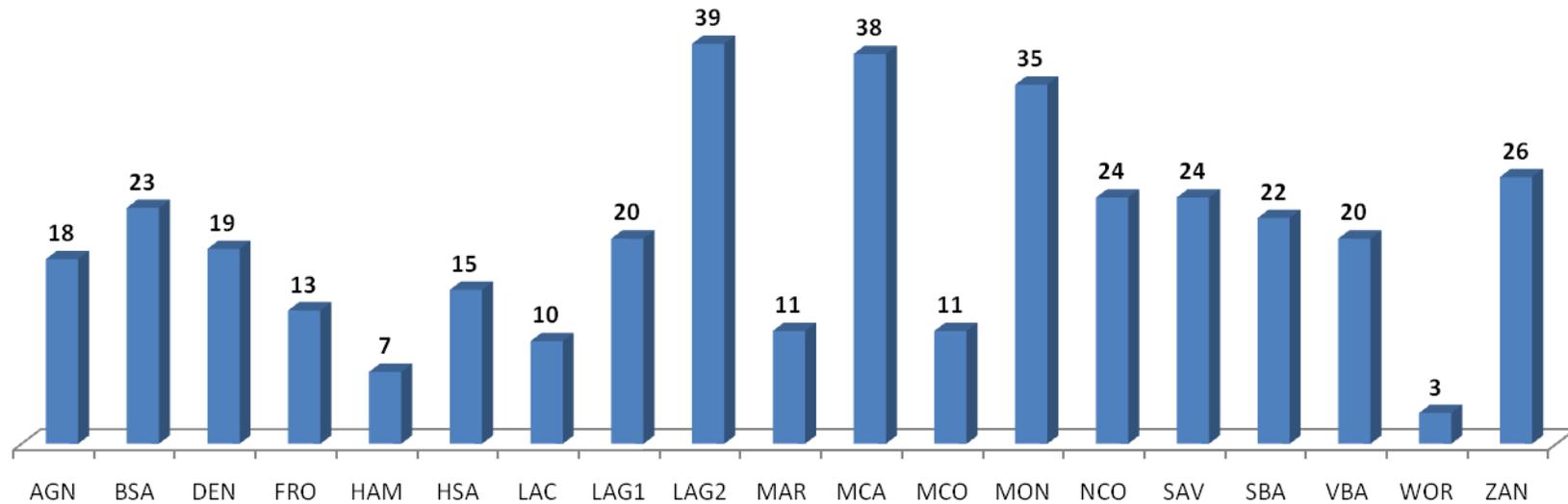


Figure 57 : Effectif des sérums selon es régions sanitaires

AGN = Agneby (Adzopé, Agboville, Alepe, Sikensi, Tiassalé), BSA = Bas-sassandra (Gueyo, Soubré, Sanpedro, Sassandra, Tabou), DEN = Denguelé (Odienné, Touba, Minignan), FRO = Fromagé (Gagnoa, Oumé), HAM = Hambol (Katiola, Niankara, Dabakala), HSA= Haut- sassandra(Daloa, Issia, Vavoua), LAC (Didieville, Yamoussoukro, Tiebissou, Toumodi), LAG1 = Lagune 1 (Dabou, Grand-lahou, Jacqueline, Yopougon est et sud, Adjamé-plateau, LAG2 = Lagune 2 (Abobo est et ouest, Anyama, Cocody –Bingerville, Koumassi , Treichville-Marcory), MAR = Marahouet (Bouaflé , Sinfra, Zenoula), MCA = Moyen cavally (Bangolo, Bolequin , Duekoué, Guiglo, Touleple), MCO) = Moyen comoé (Abengourou, Betié, Agnybilikro), MON = Montagne (Man, Biankouma, Danané, Zohouin, Kouibly), NCO = N’zi comoé (Bocanda, Mbaiakoro, Bonkouanon, Daoukro, Dimbokro, Prikro), SAV = Savane (Korhogo, Ferké , Boundiali, Tengrela, Ouangolo) , SBA = Sud-Bandaman (Divo, Fresco, Lakota), SCO = Sud-comoé (Aboisso, Grand-Bassam , Adiaké), VBA= Vallée du Bandama (Béoumi, Bouaké , Sakassou,), WOR = Worodougou (Mankono, Seguela), ZAN = Zanzan (Bondoukou , Nassian, Tanda, Bouna)

I.2.2 Données Immunologiques

La technique ELISA qui permet de détecter les IgG dirigées contre *Orthopoxvirus* a été utilisée .

I.2.2.1. Validation du conjugué

Pour la validation du conjugué, une série de dilution au 1/50^e , 1/100^e , 1/500^e , 1/1000^e , 1/2500^e , 1/5000^e et 1/10000^e du conjugué à partir d'une solution de dilution PBS 1X a été évaluée. La valeur de ΔDO variait entre 1,147 et 0,014 pour une série de dilution au 1/50^e au 1/10000^e . La plus grande dilution du conjugué qui donne un $\Delta DO > 0,2$, seuil significatif de présence d'IgG *Orthopoxvirus* est 1/1000^e (Tableau XX et Figure 58). Ce seuil a été retenu pour les différents tests sérologiques réalisés.

Tableau XX : Résultats des tests de validation du conjugué

		Série de dilution du conjugué						
		1	2	3	4	5	6	7
		1/50	1/100	1/500	1/1000	1/2500	1/5000	1/10000
A	Puits avec Ag CPV dilué avec du PBS (dilué au 1/100)	DO = 1,201	0,7	0,435	0,327	0,164	0,101	0,085
E	Puits sans Ag CPV dilué avec du PBS (dilué au 1/100)	DO = 0,054	0,08	0,03	0,083	0,076	0,06	0,07
Valeur Δ DO		1,147	0,62	0,405	0,244	0,088	0,041	0,015
Résultat		> 0,2	> 0,2	> 0,2	> 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2

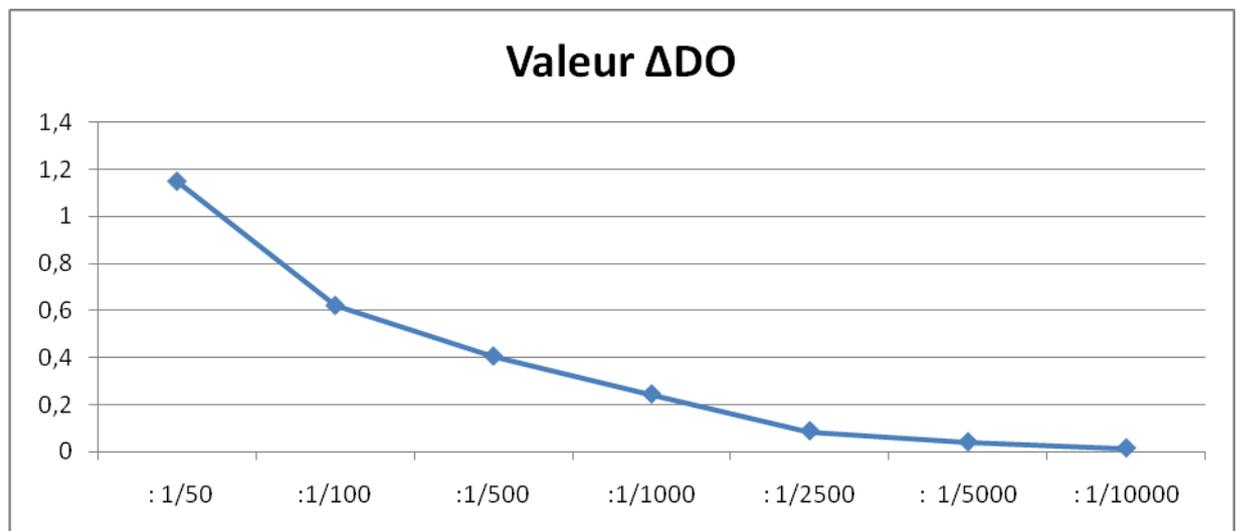


Figure 58: Variation des valeurs Δ DO en fonction des dilutions de tests de validation du conjugué

I.2.2.2. Résultats immunologiques des patients

Les anticorps de type IgG anti-*Orthopoxvirus* ont été détectés dans 19 sérums sur les 385 testés, soit une prévalence de 4,93%. Ce pourcentage variait de 2,0% à 8,4% selon les tranches d'âge (Tableau XXI). Un fort taux de positivité a été rencontré dans la tranche d'âge de 26 à 30 ans avec 8,4% de positif. Le taux le plus bas se situait dans la tranche d'âge de moins de 10 ans (2%). La différence était significative entre ces deux tranches d'âge ($X^2 = 8,08$, $p = 0,0044$). Chez les sujets de sexe masculin, le taux de positivité était de 4,7% contre 5,3% chez ceux de sexe féminin (Tableau XXI). Cette différence n'était pas significative au plan statistique ($X^2 = 0,0003$, $p = 0,98$). Concernant la répartition géographique des cas positifs, plus de 80% des sérums contenant des IgG anti-*Orthopoxvirus* provenaient de sujets vivants dans la moitié sud de la Côte d'Ivoire (Figure 59). Des sérums provenant de deux régions sanitaires du Nord de la Côte d'Ivoire, le Denguelé et le Zanzan contenaient également des IgG anti-*Orthopoxvirus*. La proportion des sujets positifs pour la recherche des IgG anti-*Orthopoxvirus* variait d'une région sanitaire à l'autre. Les proportions les plus importantes ont été retrouvées dans les régions sanitaires des Lacs, des Lagunes 1, du Sud Bandama, de l'Agnéby, du Sud Comoé et du Denguelé avec respectivement 20%, 15%, 13,63%, 11,1%, 10,52% et 10,52% (Figure 60). Au plan quantitatif, il s'agissait généralement de titres d'anticorps en IgG anti-*Orthopoxvirus* faibles. Ainsi plus de 60% des sujets avaient un titre de 100, 15,31% des titres en anticorps supérieurs ou égaux à 400 et 5,2% des titres à 800 (Tableau XXII). En ce qui concerne l'âge, le titre en IgG anti-*Orthopoxvirus* était faible dans la tranche d'âge inférieure à 10 ans alors que pour celle allant de 10 ans à 25 ans, 71% avaient des titres en IgG anti-*Orthopoxvirus* supérieurs à 100 et 28,4% des titres à 400. Après 25 ans, 33,33% des sujets positifs avaient des titres supérieurs à 100 et un sujet positif avait un titre à 800 soit 16,6% (Tableau XXIII et Figure 61). Les titres supérieurs ou égaux à 400 ont été retrouvés dans les Districts sanitaires de Divo, Bondoukou et Daloa avec des titres en IgG anti-*Orthopoxvirus* respectivement de 400, 400 et 800 (Tableau XXIV et XXV).

Tableau XXI : Répartition des sujets positifs selon les tranches d'âge et le sexe

Tranche d'âge		
Tranche d'âge	Sujets testés (%) n = 385	Sujets testés positifs n = 19 (4,95%)
0 – 10 ans	197 (51,2%)	04 (2,0%)
11 – 20 ans	105 (27,3%)	08 (7,6%)
21 - 30 ans	83 (21,5%)	07 (8,4%)
Sexe		
Masculin	255	12 (4,7%)
Féminin	130	7 (5,4%)

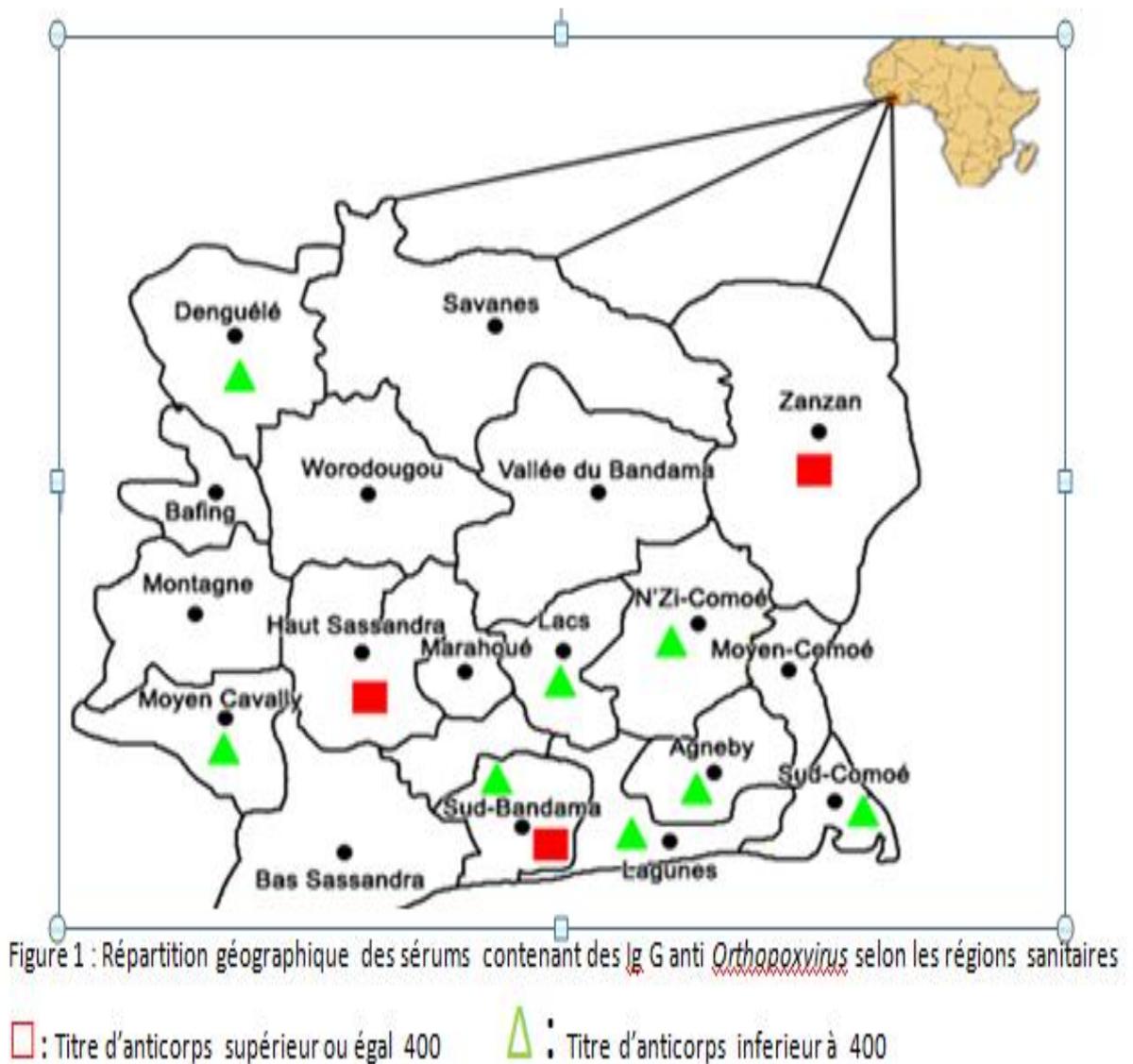


Figure 59 : Carte présentant les zones de positivité en anticorps anti-Orthopoxvirus en Côte d'Ivoire

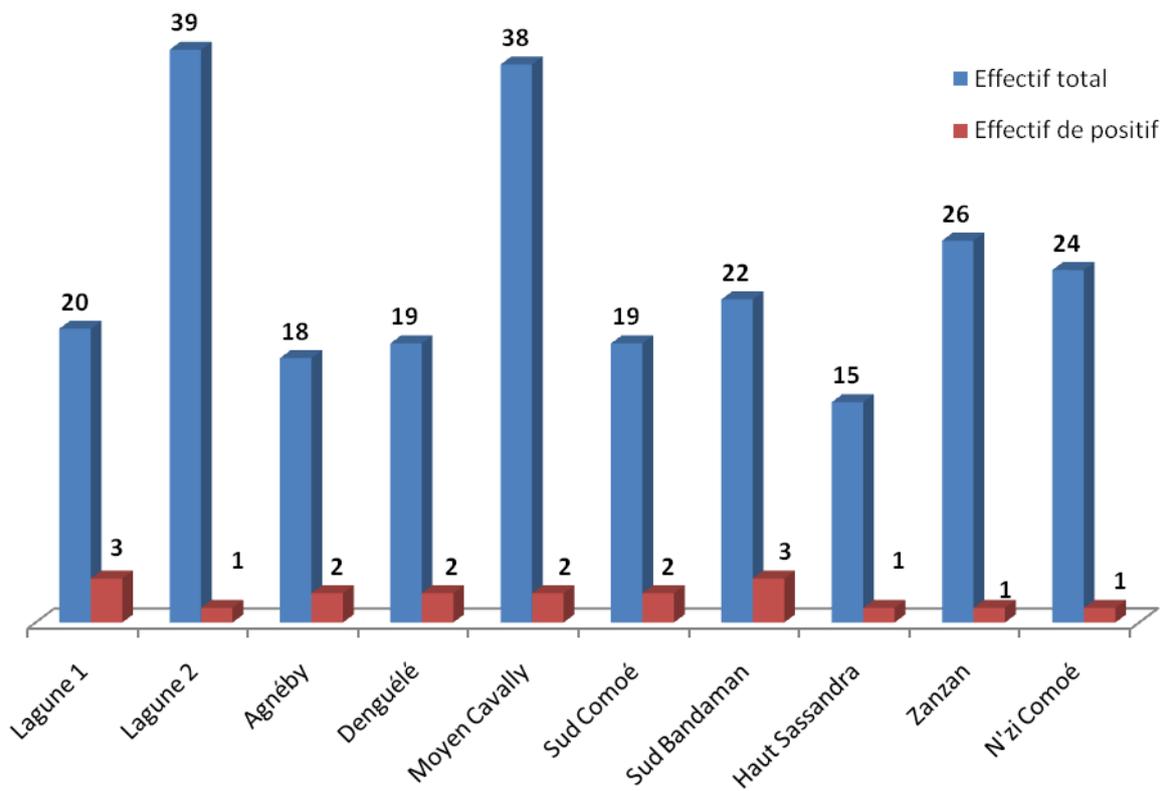


Figure 60 : Répartition des sujets positifs selon la région sanitaire

Tableau XXII : Sujets positifs selon le titre d'anticorps

Taux d'Ac anti-IgG <i>Orthopoxvirus</i>	Effectif n = 19	Pourcentage (%)
] 0, 100]	12	63,15
]100, 200]	4	21,05
] 200, 400]	2	10,52
] 400, 800]	1	5,26

Tableau XXIII : Sujets positifs selon le titre d'anticorps et les tranches d'âge

Taux d'Ac anti-IgG <i>Orthopoxvirus</i>	Tranche d'âge 0 à 10 ans n=5 (26,31%)	Tranche d'âge 11 à 20 ans n=8 (50%)	Tranche d'âge 21 à 30 ans n=6 (31,58%)
] 0, 100] n=12	5 (26,31%)	3 (15,80%)	4(21,05%)
]100, 200] n=4	0 (0%)	3 (15,80%)	1(05,26%)
] 200, 400] n=2	0 (0%)	2 (10,53%)	0(0%)
] 400, 800] n= 1	0 (0%)	0 (0%)	1(05,26%)

Tableau XXIV : Sujets positifs selon les régions sanitaires et les titres d'anticorps

Titre d'anticorps] 0, 100] n=12]100, 200] n=4] 200, 400] n=2] 400, 800] n= 1
Lagune 1 n=3	3	0	0	0
Lagune 2 n=1	0	1	0	0
Agnéby N=2	2	0	0	0
Denguélé n=2	1	1	0	0
Moyen Cavally n=2	1	1	0	0
Sud Comoé n=1	1	0	0	0
Sud Bandama n=3	1	1	1	0
Lac n=2	2	0	0	0
Haut Sassandra n=1	0	0	0	1
Zanzan n=1	0	0	1	0
N'zi-Comoé n=1	1	0	0	0

Tableau XXV: Répartition selon les données épidémiologiques de sujets positifs

Région sanitaire	District sanitaire	Age (Ans)	Sexe	Titre d'IgG <i>Anti-Orthopoxvirus</i>
Lagune 1	Bingerville	24	M	100
	Bingerville	28	M	100
	Jacqueville	14	F	100
Lagune 2	Abobo ouest	17	F	200
Agnéby	Akoupé	15	F	100
	Adzopé	27	M	100
Denguélé	Touba	20	M	200
	Odienné	26	M	100
Moyen Cavally	Bloléquin	16	M	200
	Bloléquin	5	F	100
Sud Comoé	Aboisso	9	M	100
Sud Bandama	Fresco	3	M	100
	Divo	27	M	200
	Divo	15	M	400
Lac	Tiébissou	3	M	100
	Didiévi	7	F	100
Haut Sassandra	Daloa	26	M	800
Zanzan	Bondoukou	12	F	400
N'zi-Comoé	Daoukro	15	F	100

I.3. POXVIRUS DANS LES LÉSIONS CUTANÉES EN CÔTE D'IVOIRE

I.3.1. Développement, validation et mise en place d'une méthode de détection d'*Orthopoxvirus* chez l'homme en Côte d'Ivoire

I.3.1.1. Mise en place de la détection des *Orthopoxvirus*

Les ADN de culture de *Cowpoxvirus* sur cellule vero et les ADN de *Monkeypoxvirus* isolés chez des patients lors de l'épidémie de monkeypox en 2016 en République de Centrafrique ont été utilisés pour la mise au point de la détection de l'*Orthopoxvirus* et du *Monkeypoxvirus*. Une détection des ADN a été faite par PCR à point final. Cette dernière PCR a été par la suite confirmée par une PCR temps réel.

a) Détection par PCR à point final

Une série de dilutions de l'ADN du *Cowpoxvirus* a été amplifiée en présence d'amorces consensus pour *Orthopoxvirus* et une série de dilution de l'ADN du *Monkeypoxvirus* a été amplifiée en présence d'amorces spécifiques pour *Monkeypoxvirus*. Le gène consensus pour l'*Orthopoxvirus* avait une taille de 942 pb et celui du *Monkeypoxvirus* était de 406 pb. Les tests étaient positifs pour la recherche d'*Orthopoxvirus* avec un seuil des bandes positives à une dilution 10^{-7} (Figure 61) et pour la recherche de *Monkeypoxvirus* avec un seuil des bandes positives à une dilution 10^{-3} (Figure 62). Les tests de spécificité n'ont pas mis en évidence d'amplifications non spécifique avec les ADN des autres germes impliqués dans les éruptions cutanées fébriles (Figure 63).

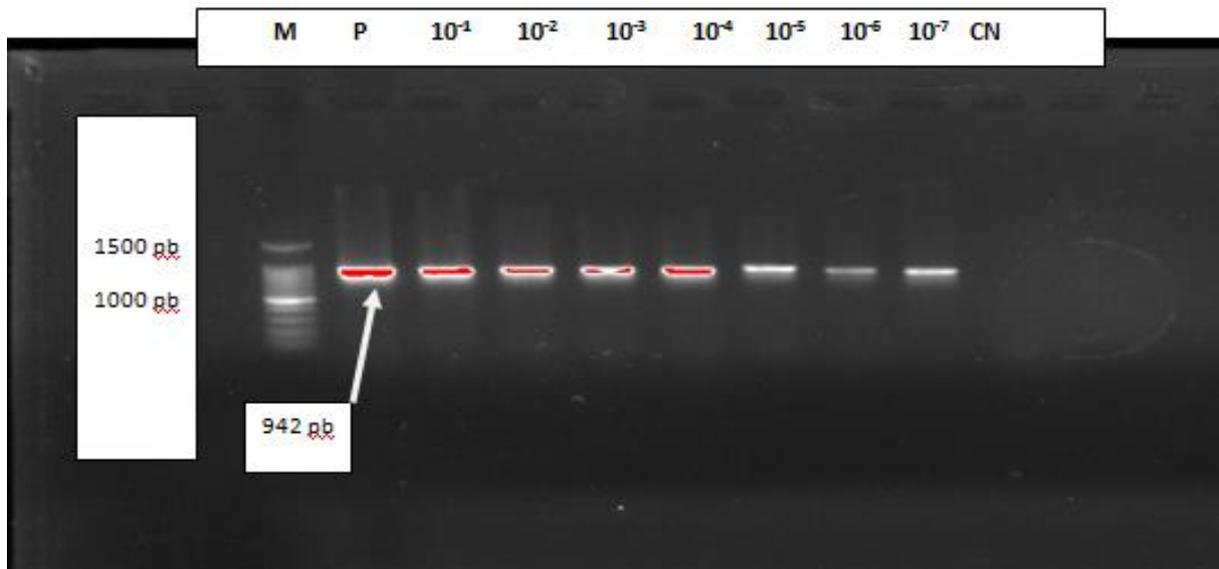


Figure 61 : Photographie de résultat de test de dilution en série de l'ADN *Orthopoxvirus*
Le seuil des bandes positives était à une dilution 10⁻⁷

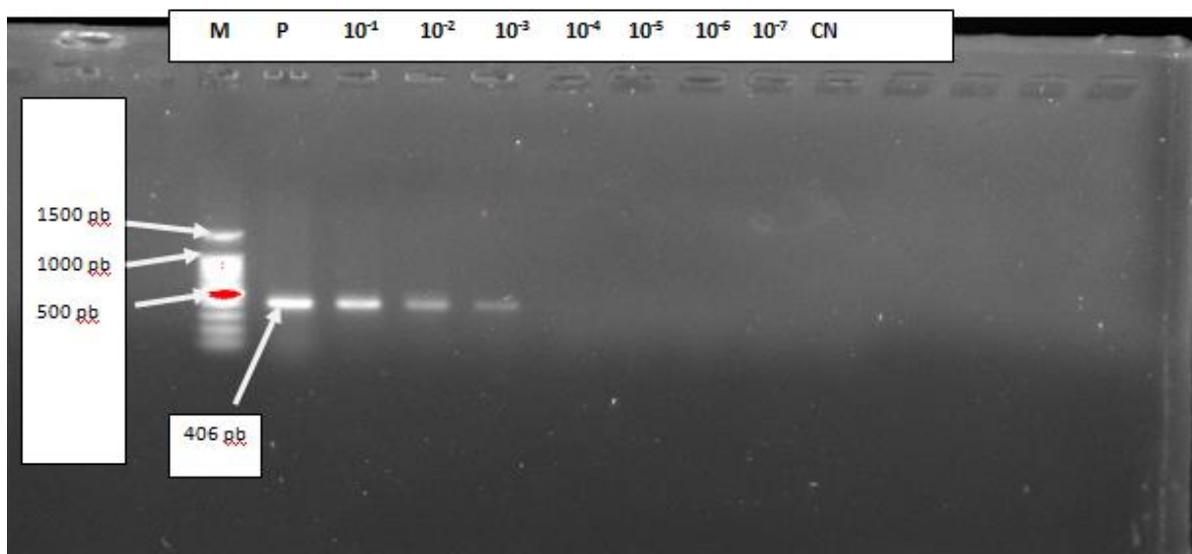


Figure 62 : Photographie de résultat de test de dilution en série de l'ADN *Monkeypoxvirus*
Le seuil des bandes positives était à une dilution 10⁻³

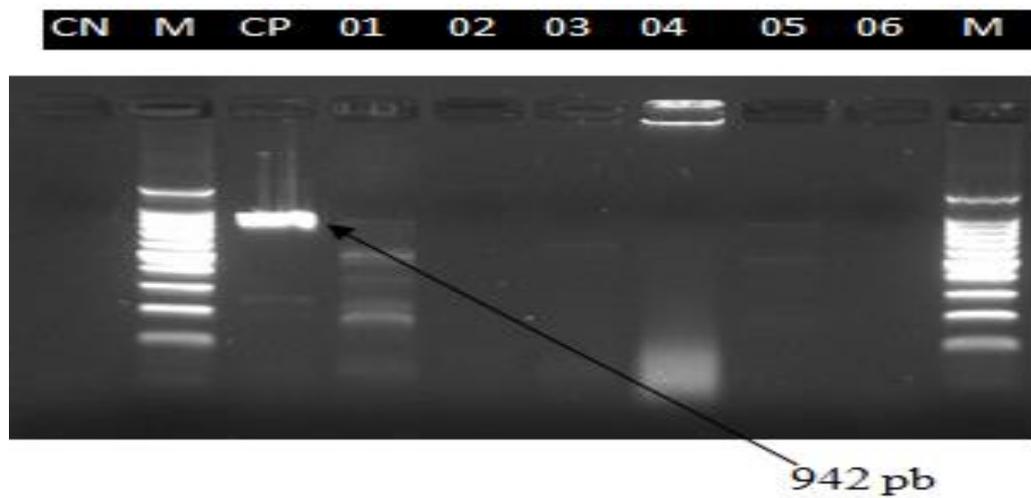


Figure 63 : Photographie de résultat de test de spécificité

CP = *Cowpoxvirus* (942 pb) , 01 = MCV , 02 = 845 G (Virus de la rougeole , 03 = 258ub (*M ulcerans*) , 04 = *S aureus* , 05 = 014 VZV (Virus de la varicelle) , 06 = 017 HSV (Herpex simplex virus)

b) Tests de confirmation par PCR en temps réel

Il ont permis de confirmer la détection des *Orthopoxvirus* et du *Monkeypoxvirus* par PCR à point final. Cependant la confirmation s'est avérée plus sensible car l'ADN du *Monkeypoxvirus* était détectable jusqu'à la dilution 10^{-6} alors qu'elle n'était que de 10^{-3} pour la détection par PCR classique. La température de fusion était de $75,3^{\circ}\text{C}$ pour *l'Orthopoxvirus* et de $71,3^{\circ}\text{C}$ pour le *Monkeypoxvirus* (Figures 64,65,66, 67).

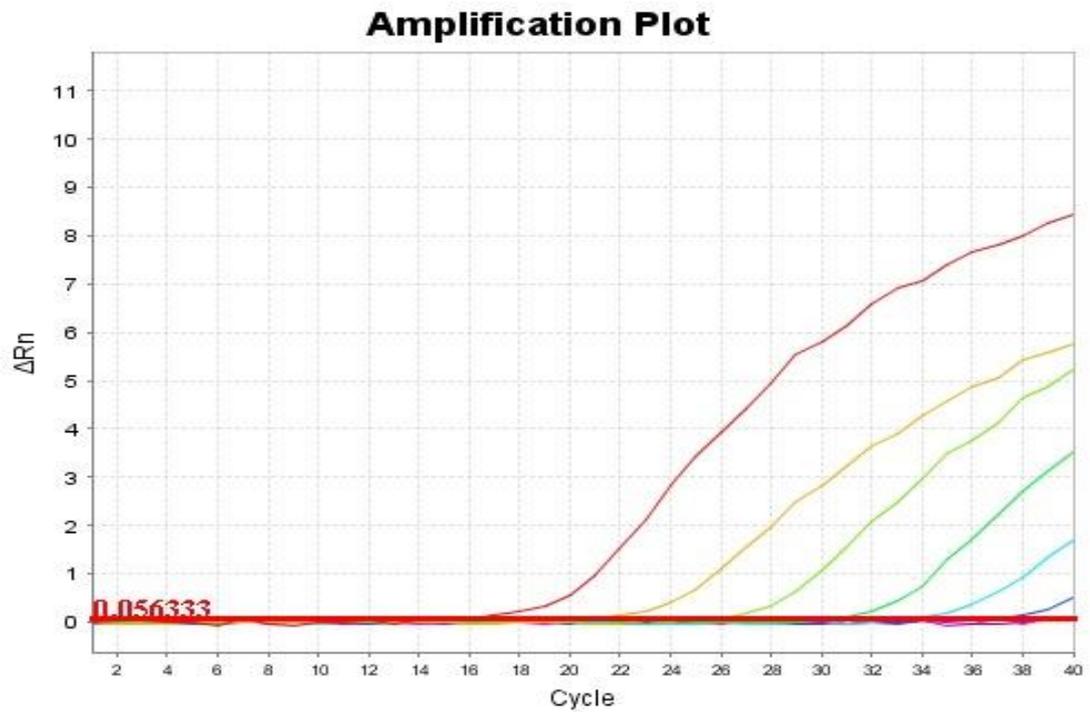


Figure 64: Courbe d'amplification de dilution en série de l'ADN *Orthopoxvirus* par PCR temps réel

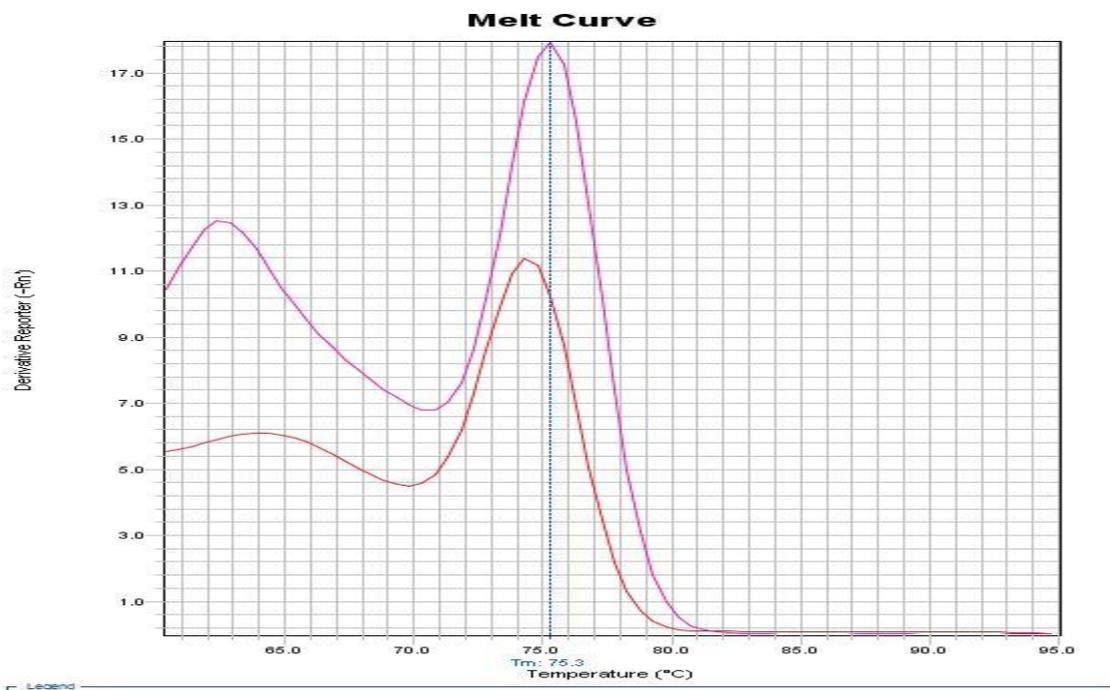


Figure 65: Courbe de fusion de dilution en série de l'ADN *Orthopoxvirus* par PCR temps réel

Température de fusion = 75,3°C

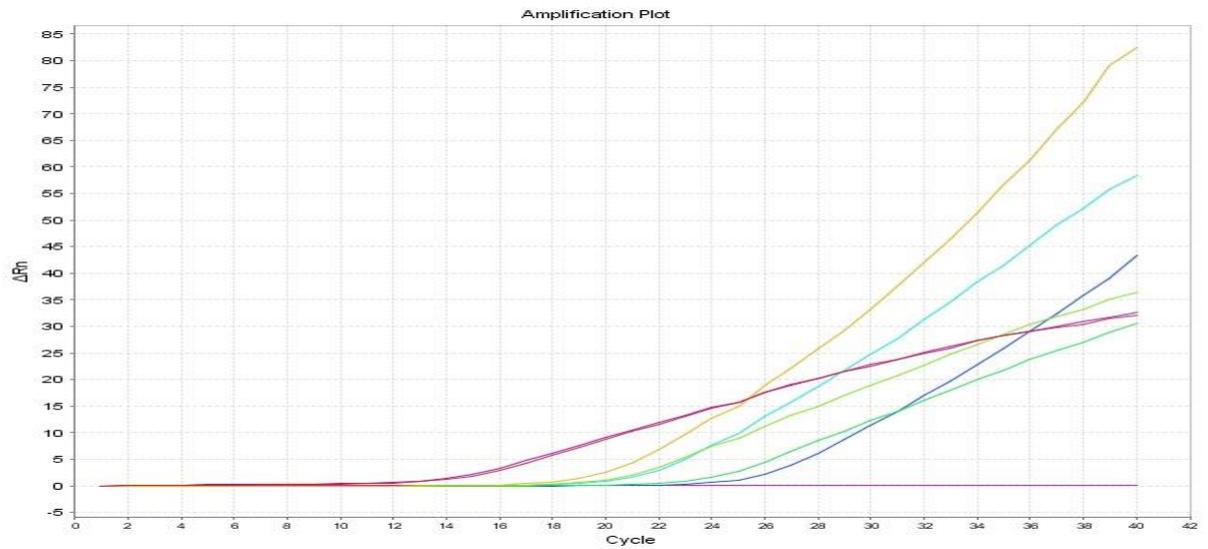


Figure 66: Courbe d'amplification de dilution en série de l'ADN *Monkeypoxvirus* par PCR temps réel

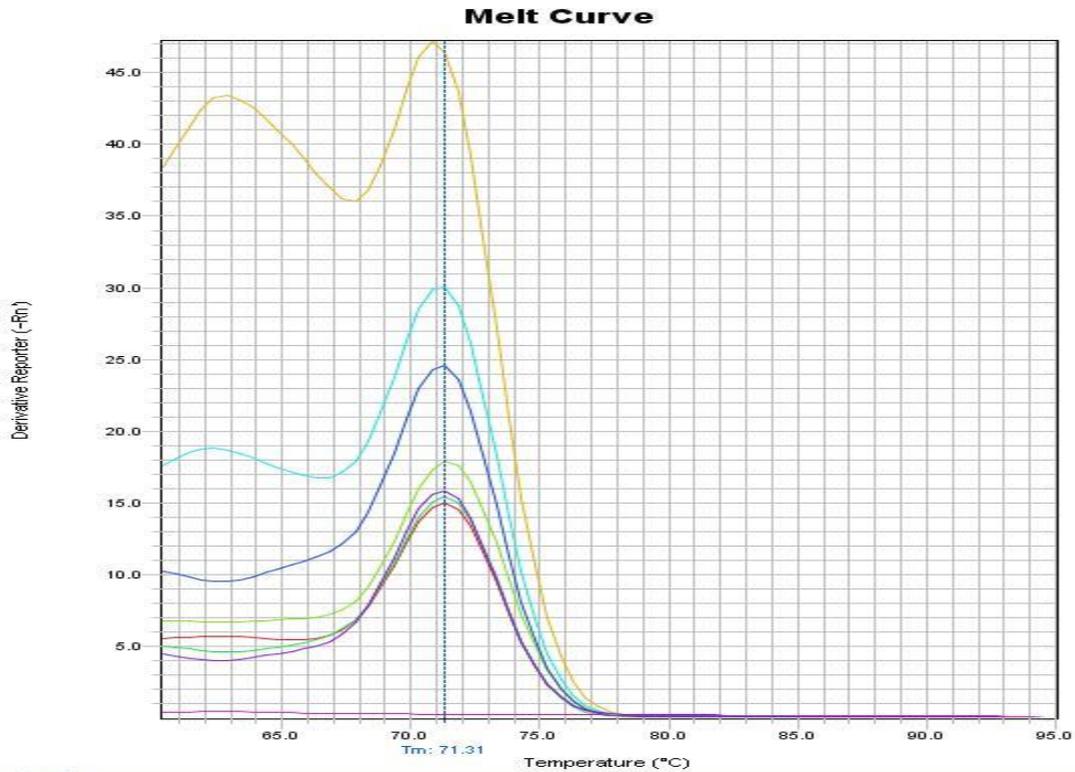


Figure 67: Courbe de fusion de dilution en série de l'ADN *Monkeypoxvirus* par PCR temps réel
Température de fusion = 71,3°C

I.3.1.2. Application à la recherche du *Monkeypoxvirus* chez les enfants suspects de rougeole en Côte d'Ivoire

a) Données épidémiologiques

Dans cette étude, 102 flux oraux et 89 sérums prélevés d'enfants suspects de rougeole et ou de rubéole mais dont les sérums étaient négatifs pour les deux virus ont été analysés. Le sex-ratio était de 1 et la moyenne d'âge était de 5,5 ans (Tableau XXVI). Ces prélèvements provenaient de 10 Districts sanitaires de Côte d'Ivoire avec plus de 50% dans le district d'Abobo (Figure 68) . Le délai entre le début de la maladie et le prélèvement était inférieur à 7 jours pour 86,27% des patients, de 7 à 15 jours pour 11,76% des patients et supérieur à 15 jours pour 2,94% des patients .

Tableau XXVI: Répartition de la population d'étude selon les tranches d'âge

Tranche d'âge	Effectifs N = 102	Pourcentage (%)
0 – 05ans	57	55,88
06 – 10 ans	34	33,33
11 - 15 ans	08	07,8
Plus de 15 ans	01	0,9

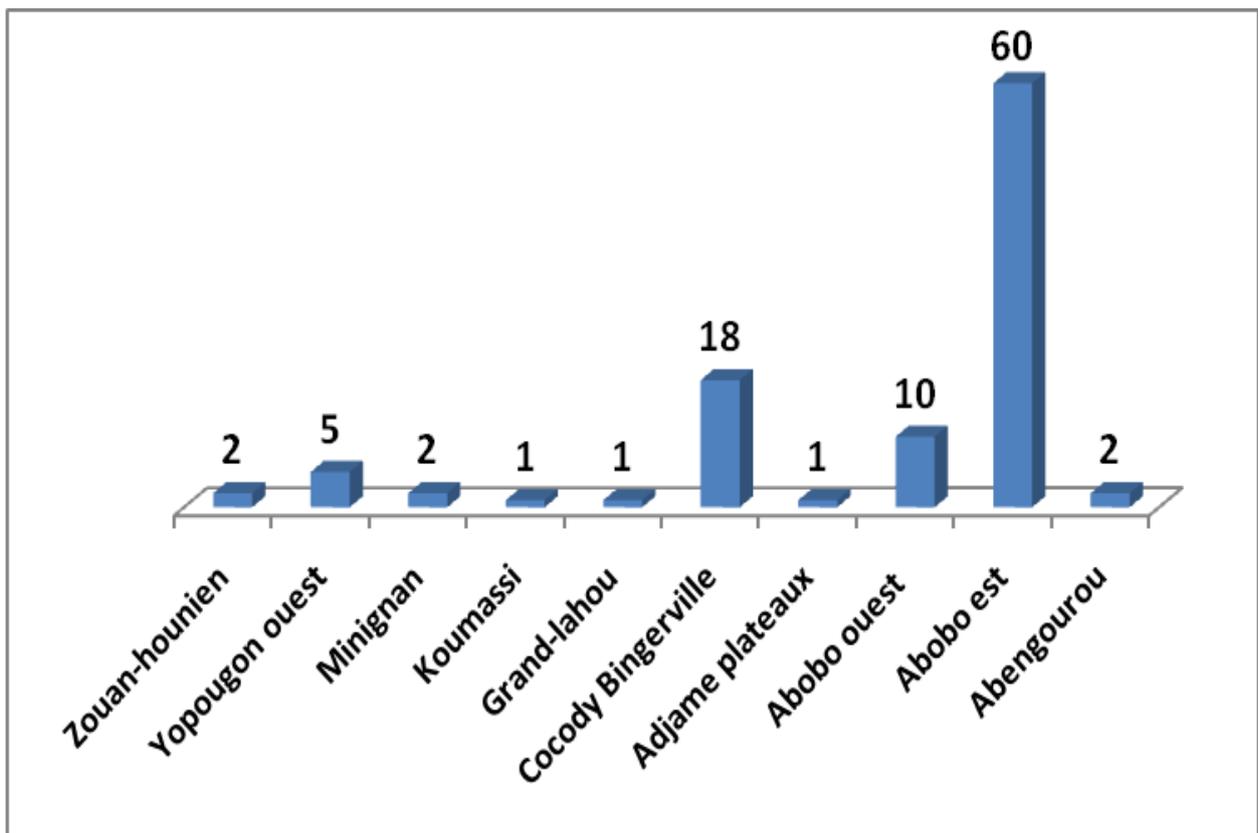


Figure 68: Répartition selon les districts sanitaires

b) Résultats de l'analyse moléculaire

La recherche de *l'Orthopoxvirus* et du *Monkeypoxvirus* par PCR à point final et PCR en temps réel s'est révélée négative pour l'ensemble des patients.

I.3.2. Application de la méthode PCR développée et validée au diagnostic étiologique des éruptions cutanées à *Molluscum contagiosum virus* en Côte d'Ivoire

Le *Molluscum contagiosum* est l'infection la plus fréquente chez l'homme parmi les poxviroses. C'est une infection bénigne rencontrée le plus souvent chez l'enfant. La présence du virus dans 100% des lésions cliniquement compatible avec le *Molluscum contagiosum* font de ces lésions des modèles de réservoir du virus idéals pour la confirmation de la méthode de détection de *Poxvirus* à mettre en place. La détection des formes cliniques atypiques contribuerait à la surveillance de l'émergence des Orthopoxviroses. Dans cette optique, une quarantaine de prélèvements de peau avec des lésions suspectes de *Molluscum contagiosum* est passée par PCR classique, puis suivie d'une confirmation par PCR en temps réel par un laboratoire collaborateur.

I.3.2.1. Données épidémiologiques et cliniques

Les prélèvements de lésions cutanées de 45 patients ont été analysés lors de l'application de cette méthode PCR. Les patients de sexe masculin représentaient 44% de l'effectif avec un sex-ratio de 0,80 (Figure 69). La moyenne d'âge était de 8,95 ans avec des extrêmes de 9 mois à 39 ans. Près de 85% des patients avaient un âge inférieur à 15 ans (Figure 70 et Tableau XXVII). Les patients provenaient d'Abidjan (Abobo, Cocody, Port Bouët, Treichville et Yopougon) et de Divo. Plus de 65% des patients résidaient dans la commune de Yopougon. Au plan clinique, les papules étaient les lésions les plus rencontrées chez les patients dans 33% des cas, suivies des vésicules dans 27% des cas (Figure 71 et Tableau XXVII). Le diagnostic clinique de *Molluscum contagiosum* a été posé chez plus de 95% des patients.

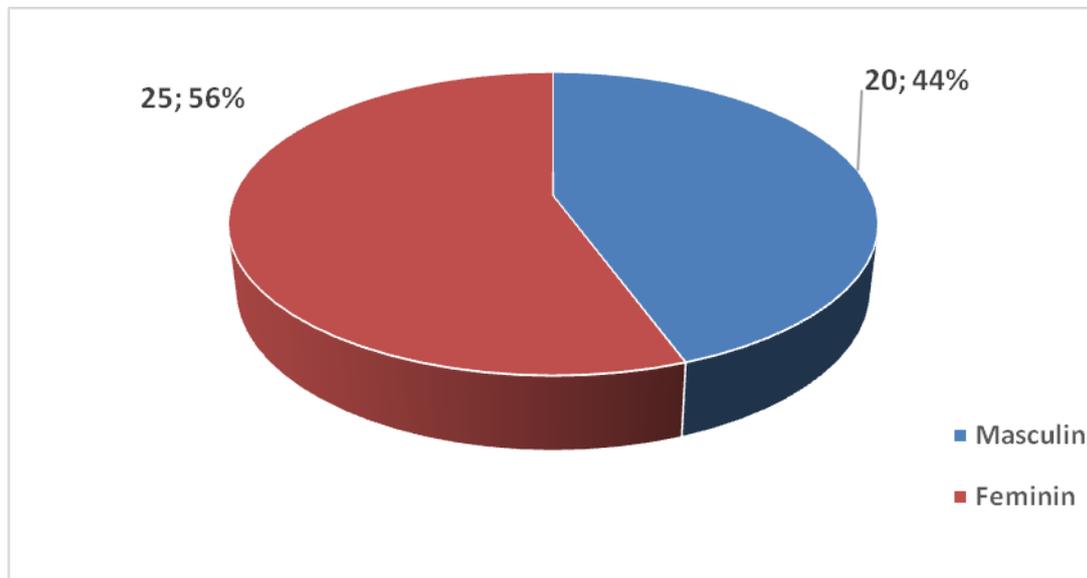


Figure 69 : Effectifs selon le sexe

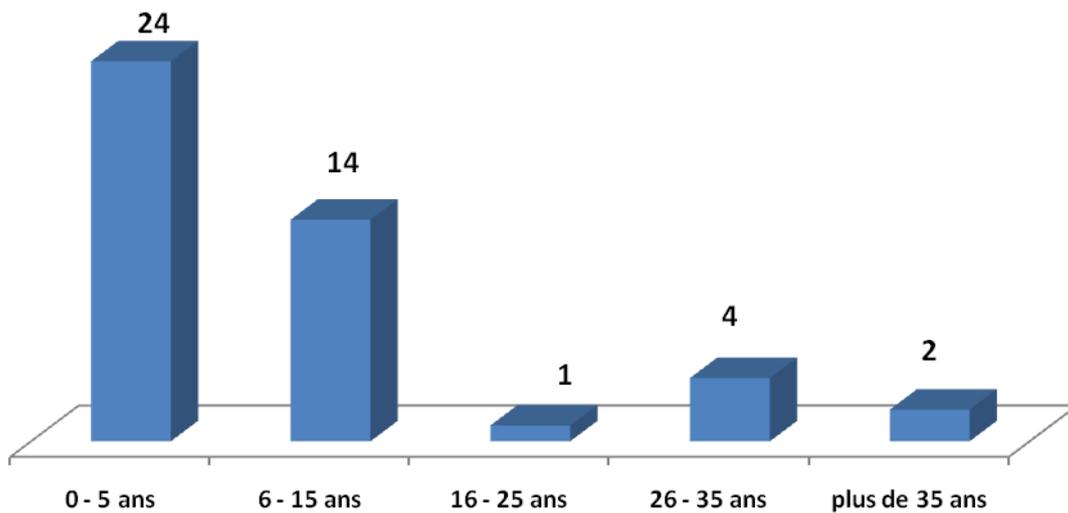


Figure 70 : Répartition par tranche d'âge

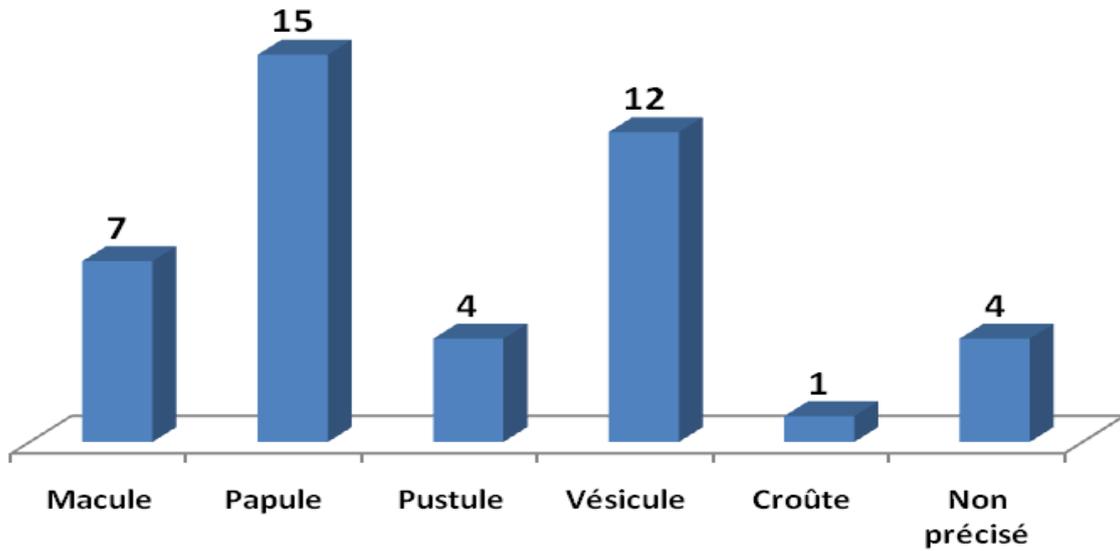


Figure 71: Répartition des lésions cliniques chez les patients

Tableau XXVII: Répartition selon la tranche d'âge et les lésions cliniques

	Lésions cliniques					
	Macule	Papule	Pustule	Vésicule	Croûte	Non précisé
	N = 7	N = 15	N = 4	N = 12	N = 1	N = 4
0 – 05 ans N = 24	5	5	3	6	1	4
06 – 15 ans N = 14	2	5		6		1
16 - 25 ans N = 1		1				
25 - 30 ans N = 3		2				1
31 – 40 ans N = 3		2	1			

I.3.2.2. Tests de détection par PCR classique

Les ADN des trois échantillons tests analysés en double (sans dilution et dilué au 1/10^e afin de réduire les risques d'inhibition de la PCR) ont donné 100% de résultats positifs (Figure 72). En ce qui concerne le niveau de sensibilité du test, l'ADN était détectable jusqu'à la dilution 10⁻⁶ (Figure 73). Le test de spécificité n'a pas révélé d'amplification non spécifique en présence d'ADN d' *Herpes simplex virus* (HSV), de *Staphylococcus aureus* (S a), du virus de la rubéole (V Ro), du Virus de la varicelle et du Zona (Figure 74).

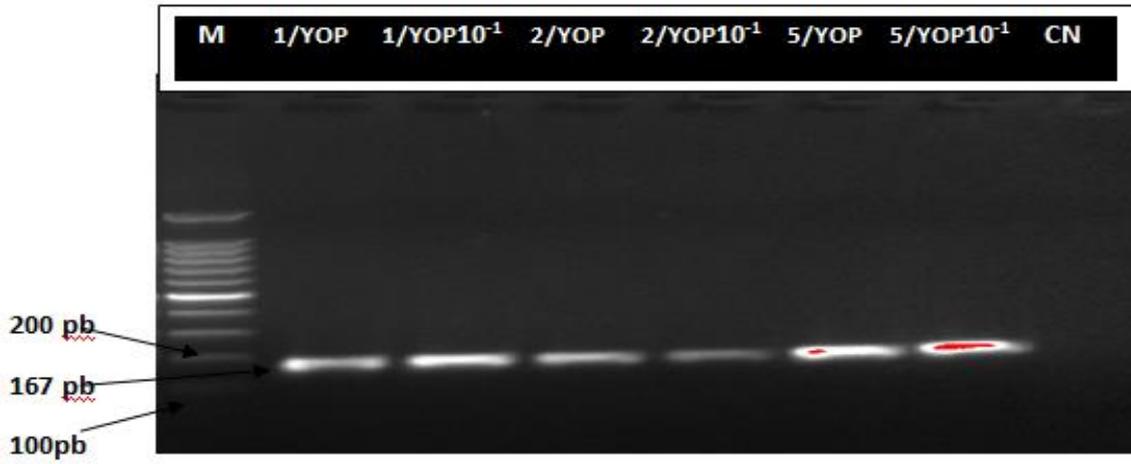


Figure 72 : Photographie de PCR d'essai avec ADN de sujets suspects d'infection à MCV
Echantillons 1/YOP, 2/YOP et 5/YOP, CN = Contrôle négatif, Taille de bande positive = 167 pb

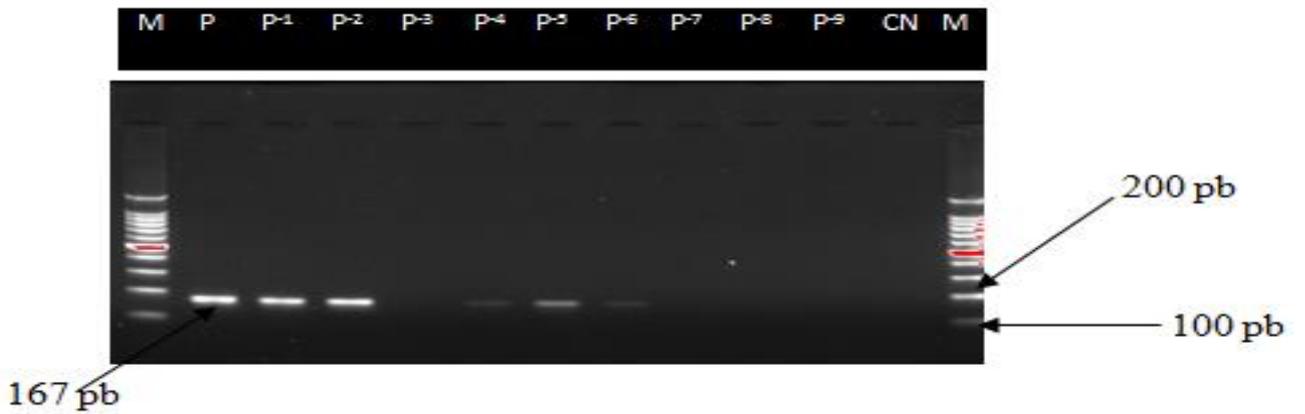


Fig 73: Photographie de résultat d'étude de la sensibilité PCR classique pour la recherche du MCV
Série de dilution de l'ADN du MCV (P = ADN de MCV non dilué, P-1 à P-9 = série de dilution, CN : Contrôle négatif M : Marqueur de poids moléculaire (1500 pb à 100 pb) . La bande positive est de 167pb

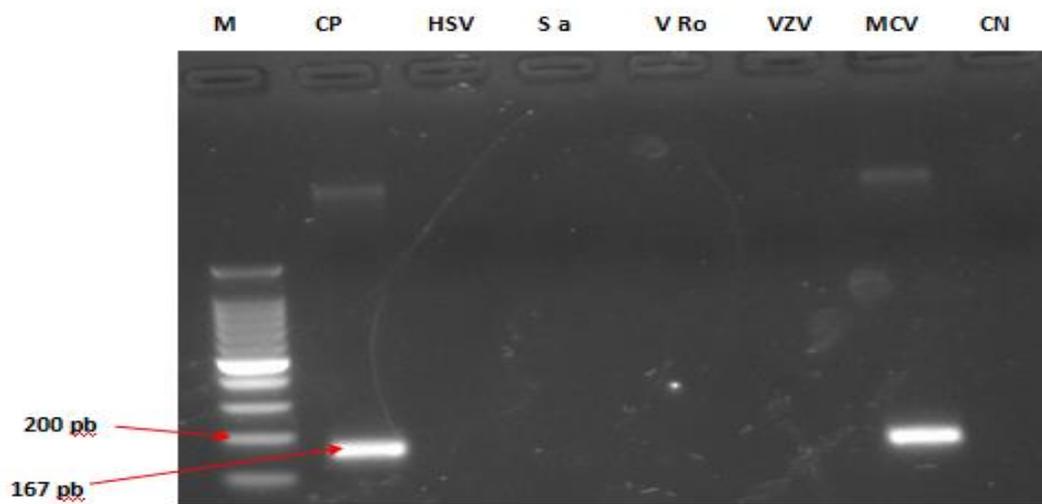


Figure 74 : Photographie de résultat de test de spécificité des amorces de MCV . M = Marqueur de poids moléculaire, CP = Contrôle positif, HSV = *Herpes simplex virus* , Sa = *Staphylococcus aureus*, V Ro = Virus de la rougeole, VZV = virus de la varicelle et du zona , MCV = *Molluscum contagiosum virus*, CN = Contrôle

I.3.2.3. Comparaison des tests de détection du MCV

Sur les 45 patients dont 44 étaient suspects d'infection à *Molluscum contagiosum virus*, la recherche de MCV par PCR à point final était positive chez 93,33% d'entre eux (Figure 75a et b). Cependant, deux des résultats négatifs pour la recherche du MCV donnaient avec les amorces ciblant l'*Orthopoxvirus* (Figure 76) des bandes de taille de 942pb. Les tests de confirmation par PCR en temps réel a permis de confirmer l'infection à MCV chez 100% des patients. La différence observée entre les résultats de la PCR classique et la PCR temps réel n'était pas significative au plan statistique ($P = 0,24$). La valeur du seuil critique ou Critical threshold value (Ct) était inférieure à 20 dans plus de 75% des échantillons faisant évoquer des lésions chargées en virus. Dans les trois cas de discordance entre la PCR classique et la PCR temps réel, les Ct étaient situés entre 12 et 15.

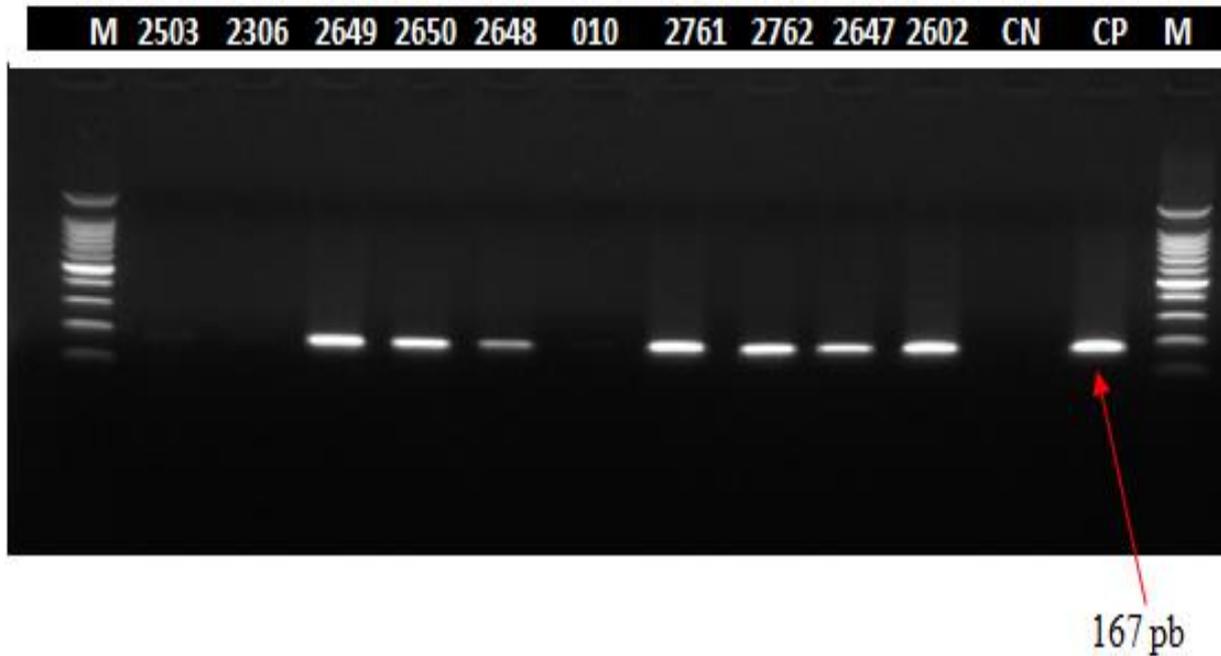


Figure 75a : Photographie de résultats de PCR Classique des patients suspects d'infection à *Molluscum contagiosum virus*. 2503, 2306 and 010 = 10/YOP sont des résultats négatifs, CN: Negative control CP: Positive control, M: Marker (1500 bp à 100 bp)

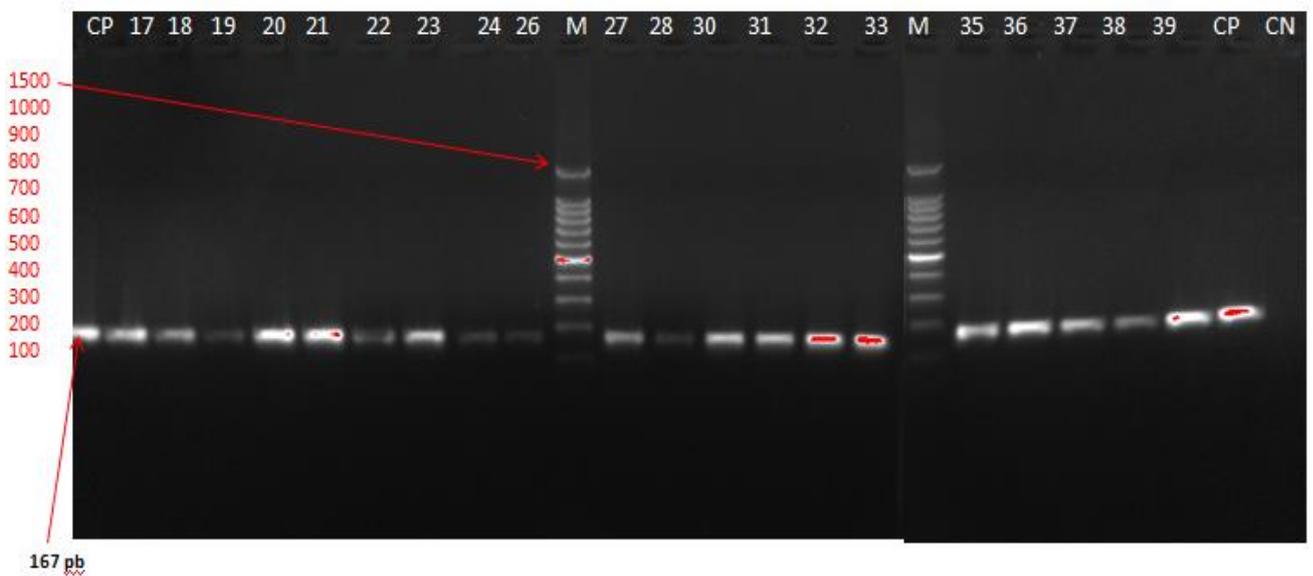


Figure 75b: Photographie de résultats de PCR classique des patients suspects d'infection à *Molluscum contagiosum virus*



Figure 76 : Photographie de résultat de Patients négatifs au *Molluscum contagiosum virus* testés pour la recherche d'*Orthopoxvirus*. 10H, 2503 et 2306 sont des échantillons humains négatifs pour la recherche de MCV, 10H et 2503 ont donné des bandes

II. DISCUSSION

II.1 ETUDE ECOLOGIQUE ET RESERVOIR DU *MONKEYPOXVIRUS* EN COTE D'IVOIRE

L'implication des micromammifères dans la transmission humaine d'infection virale est avérée (**Meerburg, 2009 ; Luis, 2013**). Des virus comme le virus de la fièvre de la vallée du Rift, le virus Lassa, le virus de la fièvre du Crimée-Congo et plusieurs espèces d'*Orthopoxvirus* dont le *Monkeypoxvirus* sont véhiculés par des micromammifères (**Mims, 1956 ; Pretorius, 1997 ; Zeller, 1997 ; Fischer-Hoch, 2000 ; Gratz, 1997 ; Kouadio, 2013 ; Saluzzo, 1986 ; Chastel, 2009**). L'investigation et l'identification des réservoirs du *Monkeypoxvirus* restent essentielles pour la surveillance et le contrôle de l'émergence de ce virus.

II.1.1. Activité de capture

Au cours de la présente étude, plus de 200 rongeurs ont été capturés sur différents sites du sud, du centre, du centre ouest et de l'est de la Côte d'Ivoire avec des rendements ou des taux de succès de piégeage généralement compris entre 1,32% et 8,75%. Les rendements se situaient entre 6,6% et 10% dans les habitations et entre 1,32% et 7% dans les champs ou les broussailles. Ces rendements relativement bas, sont superposables à ceux de **Duplantier(2001)** lors de l'investigation d'une épidémie de peste à Madagascar. Les taux de capture étaient de 6 à 9% dans les maisons, de 2,1% à 2,6% dans les cultures et de 0,2% dans les forêts. Ces taux de succès considérés comme faibles seraient liés à une très forte mortalité murine dans les semaines précédant l'épidémie humaine de peste. Par contre, au cours de l'étude de **Le Quilliecet al. (2006)** portant sur un modèle amélioré du piège boîte-dortoir dans le but de maintenir en vie le plus longtemps possible dans le piège l'animal capturé, le taux de succès était inférieur à 1%. Ce taux très bas serait lié à la faible densité des micromammifères dans la zone de capture. Le rendement lors des activités de capture des micromammifères serait influencé par la densité des micromammifères de la zone d'investigation et par le matériel de capture utilisé. Les habitations et les magasins de stockage des aliments constituent généralement des zones de forte densité en micromammifères. Cette situation expliquerait le rendement de capture élevé dans les habitations. L'utilisation de plusieurs types de piège dans notre étude pourrait expliquer le taux de succès de capture supérieur à celui de **Le Quilliecet al. (2006)** qui ont utilisé un seul type de piège.

II.1.2. Epidémiologie des rongeurs capturés

Plusieurs genres de micromammifères appartenant à six (6) familles différentes ont été capturés. Ainsi, les genres *Crocidura*, *Rattus*, *Mastomys*, *Mus*, *Myomys*, *Praomys*, *Hylomyscus*, *Hybomys*, *Lophuromys*, *Malacomys*, *Terara*, *Lemniscomys*, *Uranomys*, *Nannomys*, *Altelerix*, *Funisciurus* et *Cricetomys* ont fait l'objet d'analyse dans ce travail. Cette diversité d'espèces a été déjà retrouvée dans des travaux antérieurs en Côte d'Ivoire. En effet, **Hunkeler (1973)** a, au cours d'une étude portant sur les rongeurs et les insectivores parasités par les cestodes, identifié des rongeurs *Murinae* sur la base des caractères morphologiques. Il avait trouvé des micromammifères comme *Tatera*, *Arvicanthis niloticus*, *Dephomys defua*, *Dasymys incommutus rufulus*, *Hybomys trivirgatus trivirgatus*, *Hylomyscus* spp., *Lemniscomys griselda linulus*, *Lemniscomys* sp., *Lophuromys sikapusi sikapusi*, *Malacomys edwardsi*, *Mastomys erythroleucus* et *Mastomys* sp, *Mus setulosus*, *Mus minutoides*, *Myomys lowei*, *Praomys (Myomys) daltoni inglidbyi*, *Oenomys hypoxanthus*, *Praomys tullbergi*, *Thamnomys rutilans*, *Uranomys ruddi*, *Rattus rattus*. D'autres auteurs comme **Koyaté et Dosso (1981)** ont mené des études sur le peuplement des champs de riz pluvial dans la région de Taï (Côte d'Ivoire). Ils ont capturé dix (10) espèces de rongeurs muridés : *M. minutoides musculoïdes*, *Mastomys erythroleucus*, *Hylomyscus simus*, *Praomys tullbergi*, *Malacomys edwardsi*, *Lophuromys sikapusi*, *Hybomys planifrons*, *Rattus rattus*, *Dephomys dephua*, *Malacomys longipes*. L'étude de **Bellier (1969)** effectuée dans une zone de savane incluse dans le bloc forestier du Bas-Cavally, a permis de capturer *Lemniscomys*, *Praomys*, *Lophuromys*, *Crocidura* ainsi que d'autres genres comme *Dephomys* et *Leggada* non capturés au cours de la présente étude. Plusieurs autres travaux (**Gautun, 1969 et 1972 ; Tranier, 1979**) retrouvent également cette importante diversité. En dehors de la Côte d'Ivoire, une diversité similaire de micromammifères a aussi été constatée en Guinée et au Mali lors d'une investigation portant sur le réservoir de *Lassavirus*. Il s'agissait de *Cricetomys gambianus*, plusieurs espèces de *Crocidura* dont *Crocidura olivieri*, *Lemniscomys*, *Lophuromys sikapusi*, *Mus musculus*, *Praomys*, *Mastomys ectroloccus* (**Fichet-Calvet, 2014**). En Zambie également, les micromammifères analysés dans le cadre d'une investigation d'*Orthopoxvirus* étaient sensiblement les mêmes que ceux rencontrés dans la nôtre (**Orba, 2015**). En termes de proportion, les rongeurs constituaient plus de 75% des micromammifères capturés dont plus de 35% pour le genre *Rattus*. Cette forte proportion est en rapport avec leur importance dans le règne animal.

En effet, les rongeurs représentent l'ordre le plus abondant et le plus diversifié des mammifères et comporte environ 43% du nombre total d'espèces de mammifères vivant dans le monde (Huchon, 2002; Wilson, 2005). Le genre *Rattus* est le plus important avec plus de 60 espèces inventoriées [Aplin, 2003]. *Rattus norvegicus* (rats bruns) et *Rattus rattus* (rats noirs) sont parmi les deux espèces les plus répandues et sont communément appelées rongeurs de l'Ancien Monde (Wilson, 2005), *R. norvegicus* étant plus présent en milieu urbain que *R. rattus* rencontré plutôt en milieu rural. Dans la présente étude, ces deux espèces sont présentes en milieu urbain mais *R. rattus* a également été trouvé en milieu rural. Cette diversité d'espèces de rongeurs est-elle un facteur important de circulation de l'*Orthopoxvirus* en Côte d'Ivoire ?

II.1.3. Rongeurs capturés et *Orthopoxvirus*

A ce jour, toutes les techniques de diagnostic applicables aux *Poxvirus* sont issues de la recherche. Aucun des tests (Immunologie, Biologie moléculaire ou autres) n'a encore suivi la procédure d'homologation. Pour le diagnostic des *Poxvirus*, parfois plusieurs méthodes différentes sont utilisées et les méthodes moléculaires sont largement présentes. Cependant, les amorces cibles varient d'une étude à l'autre (Li Yu, 2006 et 2007 ; Olson, 2004 ; Loperev, 2001) mais la plupart est destinée à la recherche. Au vu de ce constat, la recherche des *Orthopoxvirus* chez les rongeurs telle que menée dans notre étude, présente un certain biais pouvant expliquer en partie les résultats obtenus. Il s'agit du nombre limité de méthodes diagnostiques utilisées, du nombre de couple d'amorces testées et du nombre de tests réalisés par échantillon. Seules les méthodes moléculaires ciblant deux cibles différentes pour la détection des *Orthopoxvirus* et des *Monkeypoxvirus* ont été utilisées. Plusieurs méthodes moléculaires ciblant d'autres cibles existent. Cependant, aucune méthode moléculaire n'a été identifiée comme méthode de référence à ce jour. La culture étant réservée aux laboratoires de niveau 4, l'association de la biologie moléculaire à des méthodes sérologiques pourrait contribuer à la confirmation de la circulation du virus chez les rongeurs. Les études sérologiques de Salzer (2013) en Uganda et de Diagne(2017) au Sénégal ont déjà permis de retrouver la présence d'anticorps anti-*Orthopoxvirus* chez des rongeurs comme *Rattus* et autres. En Zambie, l'étude de Orba (2015) révélait 14,4% de positivité pour la recherche d'anticorps IgG anti-*Orthopoxvirus* chez les rongeurs alors que l'ensemble des tests moléculaires réalisés était négatif. La recherche d'*Orthopoxvirus* effectuée par nos soins a porté principalement sur le foie et le poumon de plus de 200 micromammifères. Ces organes

en plus de la rate ont été les cibles de recherche du virus dans l'étude de **Reynolds (2010)** alors qu'**Orba (2015)** a recherché le virus uniquement dans la rate. En plus de ces organes, **Huston (2007)** a recherché le virus au niveau du cœur, de la peau, des reins, des ganglions, des gonades, des urines et des fèces.

Dans notre étude, l'*Orthopoxvirus* a été isolé dans le foie d'un *Crocidura olivieri* et le *Monkeypoxvirus* n'a pas été retrouvé, soit un taux de positivité de 0,04% pour la recherche d'*Orthopoxvirus*. Ce taux est inférieur à celui de **Huston (2007)** aux Etats-Unis lors de l'investigation de l'épidémie de 2003. Les tests moléculaires réalisés sur des rongeurs issus de la zone d'épidémie dont l'Illinois, le Texas, le New Jersey, le Wisconsin et l'Indiana ont révélé un taux de positivité de 10% au *Monkeypoxvirus*. Les rongeurs concernés étaient *Graphiurus*, *Cricetomys*, *Funisciurus*, *Cynomys* et *Didelphis*. Les USA ne sont pas des zones habituelles de circulation du *Monkeypoxvirus* mais ce taux était lié au contexte d'épidémie suite à la contamination de ces rongeurs par ceux venant de l'Afrique de l'ouest. Une investigation au Ghana en 2010 dans le même contexte a également permis de retrouver l'*Orthopoxvirus* chez les genres *Graphiurus*, *Cricetomys* et *Xerus* (**Reynolds, 2010**). Les virus ont été retrouvés principalement dans la rate et le foie. La non-prise en compte de la rate dans notre étude pourrait être une des raisons du faible taux de positivité. Cependant, nos résultats sont superposables à ceux d'**Orba (2015)** en Zambie. En effet, sur une centaine de rongeurs, les tests moléculaires étaient négatifs mais des anticorps IgG anti-orthopoxvirus ont été retrouvés chez *Crocidura olivieri*. Une étude plus récente réalisée par (**Doty, 2017**) dans la Province de Tshuapa en RDC et portant sur 354 micromammifères a montré que tous les tests moléculaires étaient négatifs. Par contre, 2% des rongeurs avaient des anticorps anti-*Orthopoxvirus*. Ces tests sérologiques étaient positifs chez *Graphiurus*, *Cricetomys*, *Funisciurus*, *Heliosciurus* et d'autres types de micromammifères comme la musaraigne à trompe. *Graphiurus*, *Cricetomys*, *Funisciurus*, *Heliosciurus* et *Xerus* restent généralement les micromammifères chez qui le *Monkeypoxvirus* sont le plus souvent isolés (**Gispen, 1976 ; Hutin, 2001 ; Di Giulio, 2004 ; Huston, 2007 ; Reynolds, 2010 ; Doty, 2017**).

La présence de l'*Orthopoxvirus* dans notre étude chez *Crocidura olivieri* d'une part et la mise en évidence des anticorps anti-Orthopoxvirus dans les études menées par **Orba (2015)** et **Doty (2017)** respectivement chez la musaraigne commune *Crocidura olivieri* et chez la musaraigne à trompe d'autre part constituent un argument de surveillance de ce genre de micromammifère, très présent dans notre environnement immédiat. En effet, des musaraignes ont été retrouvées dans les habitations des personnes ayant contracté le Monkeypox en RDC

[Doty, 2017]. Dans la présente étude, la plupart des musaraignes ont été capturées dans les broussailles des sites périurbains. Au vu de ces résultats, la surveillance des micromammifères reste un point essentiel de la prévention de l'infection à *Monkeypoxvirus* chez l'homme. La présence du virus chez les micromammifères de l'environnement immédiat de l'homme constitue un facteur prédictif de survenue d'une épidémie chez l'homme. Dans le but d'optimiser cette surveillance, des sites sentinelles doivent être mis en place et soutenus par différentes méthodes de diagnostic biologique sur les organes cibles comme la rate, le foie et le poumon de ces micromammifères.

Conclusion partielle

La présence de l'*Orthopoxvirus* reste faible chez les réservoirs potentiels avec une proportion de 1,9% dans cette étude. L'espèce *Monkeypoxvirus* n'a pas été retrouvée. Cette faible proportion du virus chez les micromammifères peut-elle expliquer le faible risque d'exposition de l'homme au virus?

II.2. ETUDE DE LA SEROPREVALENCE DES ORTHOPOXVIRUS EN COTE D'IVOIRE

L'Afrique de l'ouest reste une zone probable de circulation des *Orthopoxvirus* en général et du *Monkeypoxvirus* en particulier (Levine, 2007 ; Reynolds, 2010 ; MacNeil, 2011). L'épidémie à *Monkeypoxvirus* aux USA en 2003 avait son origine au Ghana, pays voisin de la Côte d'Ivoire (Reynolds, 2010). Une circulation de ce virus est donc possible vers notre pays. Une surveillance sérologique post-éradication de la variole, initiée par l'Organisation Mondiale de la Santé, avait montré la présence d'anticorps anti-*Poxvirus* (dont les *Orthopoxvirus*) chez des sujets non vaccinés contre la variole (OMS, 1982). Des études réalisées récemment en Sierra Leone et au Ghana (Reynolds, 2010 ; MacNeil, 2011) ont corroboré l'hypothèse de la circulation des *Orthopoxvirus* dans la zone ouest de l'Afrique.

II.2.1. Au plan épidémiologique

La présente étude a porté sur des sujets de moins de trente ans afin d'éviter toute confusion avec une immunisation liée à la vaccination contre la variole avant son éradication. Plus de 50% des sujets dont les sérums ont été analysés avaient moins de 10 ans. Cette forte proportion est probablement liée aux critères d'inclusion dans l'étude car seuls les sujets de moins de 30 ans étaient concernés. Cependant, les enfants restent liés à l'histoire du *Monkeypoxvirus* en général. Le premier cas humain de Monkeypoxvirose a été posé chez un enfant de 9 mois au Zaïre en 1970 (Jesek, 1988 ; Fenner, 1989). En Côte d'Ivoire, les cas

isolés ont été retrouvés chez des enfants de 10 ans et 9 ans respectivement à Abengourou et à Daloa. Devant cette vulnérabilité des enfants au virus, Ils sont l'objet d'étude et de surveillance dans les zones endémiques d'infections à *Monkeypoxvirus* (Talani 1990 ; WHO, 1999). En cas d'épidémie, l'incidence est souvent élevée chez les enfants (CDC, 1997).

Dans cette étude, le sexe masculin représentait 2/3 des effectifs. Cette différence n'avait pas de signification épidémiologique car ni l'investigation à l'origine de la sérothèque, ni les *Orthopoxvirus* ne sont influencés par le facteur sexe. Au plan géographique, les sérums des patients provenant de toutes les régions sanitaires de la Côte d'Ivoire ont été pris en compte. Il existe des zones de prédilection de circulation du *Monkeypoxvirus*. Ce sont les zones tropicales humides surtout les zones de forêt. En Côte d'Ivoire, le sud du pays répond à cette caractéristique. De ce fait, une étude ciblant les sérums provenant de cette zone serait un choix raisonné pour la mise en évidence de la circulation du virus. Cependant, les dernières évolutions du virus ont montré un franchissement de cette barrière écologique. Le virus a été isolé aux USA en 2003 et également au Soudan en 2005 (Formenty, 2005 ; Nakazawa, 2005). Devant ces phénomènes nouveaux, il nous est apparu nécessaire d'élargir cette étude à l'ensemble des régions sanitaires du pays.

II.2.2. Au plan immunologique

La réactivité croisée antigénique qui est étendue parmi les *Orthopoxvirus* constitue un défi pour le diagnostic sérologique. A ce jour, la plupart des diagnostics sérologiques sont limités à la recherche d'anticorps anti-*Orthopoxvirus*. Le diagnostic d'espèce est freiné par la réaction croisée entre les différentes espèces d'*Orthopoxvirus*. De ce fait, plusieurs travaux sont restés au stade du diagnostic du genre *Orthopoxvirus* (Talani, 1990 ; Orba, 2010 ; Salser, 2013 ; Diagne, 2017). Il s'agit généralement de la mise en évidence d'anticorps IgG anti-*Orthopoxvirus*. Suite à l'épidémie de *Monkeypoxvirus* aux USA, un test utilisant l'immunoglobuline M anti-orthopoxvirus a été développée par Karen et al.(2005). Cette technique a l'avantage de mettre en évidence des infections récentes et sa spécificité et sa sensibilité sont de l'ordre de 95% entre le 4^e et le 56^e jour suivant l'apparition de l'éruption. Afin de franchir les difficultés des réactions croisées, des tests spécifiques d'antigènes peptidiques de *Monkeypoxvirus* sont en phase d'expérimentation (Dubois, 2012). La résolution du problème de réaction croisée a été abordée par d'autres chercheurs avec des approches différentes. Ainsi, des approches combinant la radioimmunoassay et la

séroneutralisation ont été utilisées (**Baxby, 1982 ; Jeseck, 1987**). Des techniques de western blot ont également été implémentées (**Dubois 2008**).

a) Validation du conjugué utilisé

Dans cette étude, une technique d'ELISA dont le principe est de détecter les IgG dirigées contre les *Orthopoxvirus* validée par l'Institut Pasteur de Bangui a été utilisée. Il s'agissait d'une technique qui s'appuyait sur celle mise en place par **Mcintoshet al. (1982)** pour la détection des virus respiratoire syncytial. Une optimisation de la méthode a été faite au sein de notre laboratoire par la détermination de la dilution optimale du conjugué comme recommandé par la technique. L'essai d'une série de dilution du conjugué a permis de fixer la dilution au 1/1000e pour la technique utilisée dans cette étude. Malgré cette optimisation du conjugué, notre étude présente tout de même des limites. D'autres paramètres intervenant dans l'analyse sérologique n'ont pu faire l'objet d'optimisation. Les titres des sérums contrôles positifs étaient inconnus. Pour une optimisation de l'épreuve, il convient souvent de sélectionner quatre à cinq échantillons allant des titres les plus élevés d'anticorps vis-à-vis de l'agent infectieux concerné aux titres les plus faibles, ainsi qu'un échantillon exempt de tout anticorps. Ces échantillons permettent d'optimiser les réactifs et le protocole de l'épreuve. Ils serviront ensuite de sérums de contrôle lors de la réalisation de l'épreuve en routine (**Jacobson, 1998**). Des contraintes liées à la disponibilité d'une quantité suffisante de sérums contrôles positifs d'*Orthopoxvirus* n'ont pas permis cette optimisation. Les antigènes *Cowpoxvirus* utilisés pour la sensibilisation des plaques ont été fournis par un laboratoire collaborateur. Tous les événements survenus dans son élaboration pouvant influencer nos résultats constituent des limites de cette étude.

b) Séroprévalence en anticorps Ig G anti-Orthopoxvirus

Les anticorps IgG anti-Orthopoxvirus ont été recherchés et 4,93% des personnes testées avaient des IgG anti *Orthopoxvirus*. Ce taux est inférieur aux 15,4% retrouvés par **Talani (1990)** qui a utilisé la technique ELISA en 1981 au Congo Brazzaville, zone endémique de circulation des *Poxvirus*, et particulièrement de *Monkeypoxvirus*. Nous avons trouvé un titre d'IgG relativement bas (≤ 100) dans plus de la moitié des sérums positifs. Cette immunité résiduelle qui reste durable (**Hammarlund, 2003**) pourrait signifier une exposition probable de notre population d'étude aux *Orthopoxvirus*. Cependant, une absence d'exposition aux *Orthopoxvirus* n'est pas à écarter dans notre pays à cause des réactions croisées avec d'autres

Poxvirus. Une étude plus récente réalisée en Sierra Leone en 2011 avait montré une séroprévalence inférieure à la nôtre. Sur 1596 personnes testées, la séroprévalence était de 1,3% (**Mac Neil, 2011**). En 1982 déjà, à partir des données extraites du compte-rendu de recherche des résultats globaux d'enquêtes adressés par l'Unité d'éradication de la variole de la Direction de la Médecine préventive en post éradication de l'OMS, des prévalences de 0,04% et 1,% pour la recherche d'anticorps spécifiques du *Monkeypoxvirus* étaient trouvées respectivement en Côte d'Ivoire et en Sierra Leone (**Talani, 1990**). Au Brésil, dans la zone amazonienne, une prévalence en IgG anti-orthopoxvirus de 23,38% a été rapportée chez des sujets non vaccinés contre la variole (**Motta, 2010**). Si en Afrique de l'ouest la présence d'anticorps IgG anti-orthopoxvirus fait penser à une circulation du *Monkeypoxvirus*, au Brésil cette prévalence serait liée à la circulation du virus de la vaccine qui infecte souvent les animaux comme les bœufs de cette région et transmis accidentellement à l'homme .

c) Séroprévalence, âge et sexe

La séroprévalence variait selon la tranche d'âge. Le plus fort de taux de prévalence (8,4%) était retrouvé dans la tranche d'âge de 26 à 30. En Sierra Leone la tranche d'âge de 11 à 20 ans qui concentrait 6 des 11 personnes qui avaient des IgG dirigées contre l'*Orthopoxvirus* (**Mac Neil, 2011**). La prévalence élevée dans la tranche d'âge des plus de 20 ans pourrait être liée à un effet cumulatif des cas de sujets à immunité résiduelle durable des *Orthopoxvirus*. En effet, des anticorps anti-*Orthopoxvirus* peuvent persister chez l'homme plus de 20 ans après le début de l'immunisation (**Hammarlund, 2003**). A travers les données colligées dans la littérature, il apparaît que les anticorps anti-*Orthopoxvirus* sont plus fréquemment détectés chez les enfants (**Hutin, 2001 ; MacNeil, 2009**). En Afrique, les enfants participent autant que les adultes aux activités agricoles et forestières, ce qui favoriserait leur exposition au virus à travers les réservoirs. La chasse des micromammifères fait aussi partie des activités très pratiquées par les enfants surtout en milieu rural.

Concernant le sexe, 80% des sujets avec des anticorps étaient des femmes en Sierra Leone contre 36,84% dans notre étude. Cependant, la différence entre les deux paramètres dans les différentes études n'était pas liée au sexe.

d) Au plan géographique

La zone d'exposition aux *Orthopoxvirus* se situait principalement dans la moitié sud de la Côte d'Ivoire. Cela correspond globalement aux zones favorables à la circulation de ce groupe

de virus selon les données de la littérature (**Boumandouki, 2007 ; Levine 2007**). La zone tropicale humide constitue la zone de prédilection de circulation du virus. Rappelons que c'est dans la région du Haut-Sassandra, précisément à dans le village de Gbétitapéa qui héberge des singes sacrés que l'un des deux cas humains d'infection à *Monkeypoxvirus* confirmés en Côte d'Ivoire a été détecté. Les proportions de taux de positivité étaient plus importantes dans les régions sanitaires des Lacs avec 20%, des Lagunes 1 avec 15%, du Sud-Bandama avec 13,63%, de l'Agnéby avec 11,10%, du Sud-Comoé 10,52% et du Denguelé 10,52%. Il s'agit généralement de régions du domaine Guinéen dont le climat et la végétation sont propices à la circulation du *Monkeypoxvirus*.

Cependant, des anticorps ont été révélés dans les sérums de patients dans certaines régions du nord telles que les régions sanitaires du Zanzan dans le District sanitaire de Bondoukou et du Denguelé dans le District sanitaire d'Odienné et de Touba. La circulation de la population étant plus aisée, un déplacement des personnes à sérologie positive des zones probables de circulation du virus vers ces zones est possible. Cependant, nous ne pouvons pas écarter la possible circulation des *Orthopoxvirus* dans ces zones, du fait de la présence malgré le climat de type soudanais qui les caractérise en majorité, de zones de forêt avec une très importante pluviométrie à un moment de l'année, suffisante pour maintenir la circulation du virus. Il est à souligner également que le village de Soko dans la région du Zanzan qui héberge aussi des singes sacrés, se trouve à la frontière avec le Ghana, origine de l'épidémie de 2003 aux USA (**Reynolds, 2010**).

e) Relation entre le titre d'anticorps IgG anti orthopoxvirus et données épidémiologiques

Plus de 50% des sérums des patients testés avaient des titres faibles à 100 faisant évoquer, soit une immunité résiduelle, soit une immunité croisée avec d'autres *Poxvirus*.

Dans la famille des *Poxvirus*, les réactions croisées sont fréquentes entre les différents genres du virus. Cette immunité croisée est à la base de l'éradication du virus de la variole. Ainsi, le *Cowpoxvirus* puis le virus de la vaccine ont servi de vaccin pour éradiquer le virus de la variole (**Fenner, 1988 ; Henderson, 2009**). Cette vaccination intense avait permis également de freiner l'éclosion du *Monkeypoxvirus* dans les années 1980 avant d'émerger dans les années 1990 suite à l'arrêt de la vaccination contre la variole en 1980. Entre 1996 et 1997, plus de 500 cas suspects de monkeypox ont été rapportés dans la Province du Kasai-Oriental en RDC (**Heymann, 1998 ; Hutin 2001**). Les titres supérieurs à 100 ont été retrouvés dans

les sérums de sujets de 10 à 25 ans dont plus de 25% avaient des titres à 400. Cette tranche d'âge constitue une main d'œuvre importante pour les activités agropastorales et de chasse dans le monde rural en Afrique plus particulièrement en Côte d'Ivoire. L'initiation aux travaux champêtres se situe généralement vers l'âge de 10 ans et les activités de capture de micromammifères comme source de protéines animales sont très fréquentes pendant cette période de l'adolescence. Cette source animale constitue un risque majeur de transmission du virus à l'homme. Afin de déterminer si le *Monkeypoxvirus* (MPXV) avait le potentiel pour émerger en l'Afrique centrale et occuper le créneau laissé vacant par la variole, l'Organisation Mondiale de la Santé a mené un programme de surveillance active de 1981 à 1986 en RDC.

Il a été enregistré 338 des 404 cas reconnus en Afrique entre 1970 et 1986. Une source animale de l'infection était suspectée dans 245 des 338 cas, et la transmission secondaire d'une source humaine présumée dans les 93 cas restants (**Jesek, 1988**).

Un titre de 800 avait été retrouvé chez un sujet de 26 ans faisant évoquer une rencontre récente dans le District sanitaire de Daloa où le deuxième cas humain avait été isolé en 1981. La cohabitation entre un certain nombre de primates non humains et les hommes est observée dans cette région dans un village de Gbétitapéa. Un titre de 400 a également été retrouvé dans la zone sanitaire de Bondoukou, où cette cohabitation entre l'homme et les singes est retrouvée dans le village de Soko. Dans d'autres districts sanitaires comme Divo, des titres à 400 ont également été retrouvés dans le sérum. Ces différents titres seraient en faveur d'une circulation d'*Orthopoxvirus* probablement le *Monkeypoxvirus* en Côte d'Ivoire. L'un des facteurs de cette circulation semble être le(s) contact(s) entre les primates non humains, les micromammifères et l'homme. Les écosystèmes réunissant cette mise en contact des hôtes (Homme - Singe - Micromammifères) sont retrouvés dans diverses régions sanitaires de la Côte d'Ivoire dont les régions sanitaires du Haut-Sassandra, du Zanzan et des Montagnes. La mise en place de mesures de surveillance du *Monkeypoxvirus* pourrait contribuer à la détection précoce de survenue d'une épidémie liée à ce virus.

Conclusion partielle

L'immunité des populations non vaccinées contre la variole reste faible vis-à-vis des *Orthopoxvirus*. Néanmoins la présence d'anticorps de type anti *Orthopoxvirus* IgG chez certains sujets de la population d'étude montre la possibilité de cas cliniques d'*Orthopoxvirose* en Côte d'Ivoire

II.3. POXVIRUS DANS LES LÉSIONS CUTANÉES EN CÔTE D'IVOIRE

Plusieurs genres de *Poxvirus* dont les *Orthopoxvirus* (*OPV*) et le *Molluscum contagiosum virus* (*MCV*) sont impliqués dans les infections cutanées chez l'Homme et d'autres vertébrés. Au plan clinique, la confusion a déjà été faite entre certaines infections à *Orthopoxvirus* et la varicelle selon la littérature (**Jezek, 1988 ; MacNeil, 2009**). Malgré ce fait, les méthodes de diagnostic des *OPV* en général et du *Monkeypoxvirus* en particulier sont inexistantes. Concernant le *MCV*, il est de plus en plus rencontré avec l'infection à VIH. Il est souvent impliqué dans les lésions cutanées chez l'enfant. A ce jour en Côte d'Ivoire, le diagnostic de ce virus reste essentiellement clinique alors que des formes cliniques atypiques sont rencontrées avec l'infection à VIH (**Medical Imagery, 2015 ; Vora, 2015**). Dans notre étude, la mise en place de leur diagnostic constitue une préoccupation majeure dans un contexte d'émergence du *Monkeypoxvirus*

II.3.1. Développement, validation et mise en place d'une méthode de détection d'*Orthopoxvirus* chez l'homme en Côte d'Ivoire.

II.3.1.1. Mise en place de la détection des *Orthopoxvirus*

Dans ce contexte de bioterrorisme et d'émergence du *Monkeypoxvirus*, la détection rapide et fiable des *Orthopoxvirus* font l'objet de plusieurs travaux (**Abrahao 2009, Yu Li 2006, Kulesh 2004, Inosshima 2000, Ropp 1995**). La Côte d'Ivoire de par sa situation dans la zone probable de circulation du virus, la mise à disposition des méthodes diagnostiques des *Orthopoxvirus* et *Monkeypoxvirus* en particulier sont nécessaires. Nos méthodes de diagnostics sont ceux qui ont été mis en œuvre par Ropp et collaborateurs pour la PCR classique (**Ropp 1995**) et Yu Li et collaborateurs pour la PCR en temps réel (**Yu Li 2006**). Les ADN de souches de *Cowpoxvirus* sur des cellules Vero utilisées comme contrôle positif pour le diagnostic des *Orthopoxvirus* et des *Monkeypoxvirus* issus de l'épidémie de Centrafrique utilisés comme contrôle positifs pour le diagnostic de *Monkeypoxvirus* ont permis de valider nos méthodes moléculaires. Concernant la PCR classique, le test était positif pour la recherche d'*Orthopoxvirus* avec un seuil des bandes positives à une dilution 10^{-7} et pour la recherche de *Monkeypoxvirus* avec un seuil des bandes positives à une dilution 10^{-3} . Les tests de spécificité n'ont pas mis en évidence d'amplifications non spécifiques avec les ADN des autres germes impliqués dans les éruptions cutanées fébriles. En ce qui concerne la PCR temps réel, elle a permis de confirmer la détection des *Orthopoxvirus* et du *Monkeypoxvirus* détecté par PCR à point final. Cependant, elle s'est avérée plus

sensible car l'ADN du *Monkeypoxvirus* était détectable jusqu'à la dilution 10^{-6} alors qu'elle de 10^{-3} pour la détection par PCR classique. Cette sensibilité de la PCR en temps réel et sa rapidité de diagnostic en moins de deux heures, justifient l'intérêt accordé à cette méthode dans le diagnostic des *Orthopoxvirus* (Li Yu 2006, Kulesh 2004). Elle a l'avantage d'une part de poser un diagnostic rapide et précis et d'autre part d'éviter les contraintes de biosécurité et de biosûreté liés à la culture des *Poxvirus*. Elle permettra également une riposte biologique adaptée en cas de bioterrorisme ou d'émergence de *Monkeypoxvirus*. Cette mise au point de la détection moléculaire des *Poxvirus* dans notre laboratoire s'inscrit dans cet objectif. Elle constitue une des premières études dans la mise en place du diagnostic moléculaire des *Poxvirus* en médecine humaine en Côte d'Ivoire malgré le fait que cette étude pourrait présenter des biais.

II.3.1.2. Application à la recherche du *Monkeypoxvirus* chez l'enfant suspects de rougeole en Côte d'Ivoire

De nombreux virus sont impliqués dans les infections cutanées virales chez l'homme en particulier chez l'enfant. Des confusions ont parfois été notées entre la variole mineure, la varicelle et la rougeole (Jezek, 1988 ; MacNeil, 2009 ; Larcher, 2009 ; Biswas, 2011). Malgré l'éradication de la variole et l'existence d'un vaccin efficace contre la rougeole, les lésions cutanées chez l'enfant sont fréquentes en Côte d'Ivoire. Les prélèvements de flux oraux et de sérums provenant d'enfants suspects de rougeole dont l'analyse sérologique (recherche d'IgM en rougeole et en rubéole) était négative n'ont pas bénéficié de prélèvement cutané qui constitue le prélèvement idéal pour la recherche des *Orthopoxvirus* en phase éruptive. La recherche d'*Orthopoxvirus* a été négative pour l'ensemble des échantillons. L'évolution de la maladie était inférieure à 7 jours chez plus de 86% des patients. Ce délai correspond à la phase pré-éruptive ou phase de début d'éruption en cas d'*Orthopoxvirose*. Les prélèvements oro-pharyngés et sanguins peuvent constituer des alternatives de prélèvement pour la recherche d'*Orthopoxvirus* pendant cette période. Cependant, la charge virale reste faible dans ces différents prélèvements par rapport aux prélèvements de lésions cutanées. Le prélèvement de 15% des patients correspondait à la phase éruptive en cas d'*Orthopoxvirus* et ces prélèvements analysés dans cette étude ne sont pas indiqués pour la recherche des *Orthopoxvirus*. Ceci pourrait expliquer les résultats négatifs des tests. La rougeole contrairement aux autres agents d'éruption fébrile ne bénéficie pas très souvent de prélèvement cutané mais il a l'avantage de bénéficier d'une surveillance nationale bien

organisée. Dans le but d'une surveillance efficace des *Orthopoxvirus* et surtout du *Monkeypoxvirus*, tous les résultats négatifs pour la recherche du virus de la rougeole, du virus de la rubéole et du virus de la varicelle, doivent faire l'objet de recherche d'*Orthopoxvirus*. Des prélèvements cutanés doivent donc être associés aux prélèvements de flux oraux et sanguins si les caractéristiques des lésions cutanées permettent un prélèvement.

II.3.2. Application de la méthode PCR développée et validée au diagnostic étiologique des éruption cutanées à *Molluscum contagiosum virus* en Côte d'Ivoire

Le *Molluscum contagiosum* est l'infection la plus fréquente chez l'homme parmi les *poxviroses*. C'est une infection bénigne rencontrée le plus souvent chez l'enfant. La présence du virus dans 100% des lésions cliniquement compatibles avec le *Molluscum contagiosum* (Saral, 2006) font de ces échantillons de lésions cutanées de MCV, des prélèvements idéals pour la confirmation de méthode de détection de *Poxvirus* à mettre en place. La détection des formes cliniques atypiques contribuerait à la surveillance de l'émergence des Orthopoxviroses. Dans cette optique, une quarantaine de prélèvements de lésions suspectes de *Molluscum contagiosum* ont été analysées par PCR classique suivie d'une confirmation par PCR temps réel.

II.3.2.1. Au plan épidémiologique

Sur l'ensemble des patients qui ont présenté des lésions suspectes de *Molluscum contagiosum*, 85% avaient moins de 15 ans. Cette proportion importante chez les enfants est caractéristique de l'épidémiologie de l'infection à *Molluscum contagiosum virus*. Il s'agit de lésion de survenue fréquente dans l'enfance. Dans une étude réalisée en Italie chez des enfants adoptés à l'étranger, le *Molluscum contagiosum* était la première infection cutanée chez ces enfants (Sollai, 2017). Il s'agissait d'infection transmise par contact physique avec une survenue le plus souvent au moment de l'âge scolaire (Dohil, 2006). L'infection a une fréquence plus élevée dans les zones tropicales avec une incidence pouvant aller jusqu'à 20% (Becker, 1986) et l'âge de prédilection est généralement inférieur à 10 ans (Oren, 1991 ; Reynold, 2009). Avec l'infection à VIH, cette infection n'est pas un phénomène rare chez l'adulte. Elle est souvent rencontrée chez les patients immunodéprimés avec des formes atypiques (Becker, 1986 ; Vora, 2015). Dans notre étude, 17% des patients avaient un âge supérieur à 25 ans. Il pourrait s'agir de sujets à immunité défavorable mais leur statut sérologique VIH et autres états d'immuno-dépression n'ont pas été recherchés dans cette étude. Chez l'adulte, la

transmission est généralement sexuelle et des cas de transmission mère-enfant ont été rapportés (Connell, 2008 ; Zichichi, 2012 ; Stock, 2013 ; Berbegal-DeGracia, 2015). Bien que l'aspect clinique de la lésion soit suffisant pour le diagnostic de *Molluscum contagiosum*, des formes atypiques de plus en plus observées parfois chez le sujet immuno-compétent nécessitent l'apport du diagnostic biologique (Vora, 2015 ; Husein-El Ahmded, 2016).

Certaines formes ont été cliniquement confondues avec un carcinome chez un patient de 78 ans présentant un nodule sur son sourcil droit évoluant depuis 5 ans (Husein-ElAhmded, 2016).

II.3.2.1. Au plan diagnostique

Sur 45 patients, le diagnostic clinique de *Molluscom contagiosum* a été posé pour 95% d'entre eux, confirmé à hauteur de 93% par la PCR classique et à 100% par la PCR en temps réel. Ces résultats traduisent le caractère pathognomonique des lésions dues au *Molluscum contagiosum virus*. Nos résultats sont superposables à ceux de Saral (2006) qui avait trouvé 100% de positivité par biologie moléculaire en analyse des lésions cutanées suspectes de *Molluscum contagiosum*. Cette affection étant généralement bénigne mais très fréquente chez les enfants à cause de sa contagiosité, la clinique demeure la méthode de choix pour le diagnostic. Cependant, les formes atypiques faisant évoquer une affection maligne par exemple (Husein-EIAhmded, 2016) où une prise en charge non spécifique pourrait être un facteur aggravant de l'état clinique peuvent faire l'objet d'une analyse moléculaire.

II.3.2.2. Comparaison des résultats des méthodes moléculaires

Les résultats de la PCR à point final et la PCR en temps réel pour la détection du MCV sont superposables mais la PCR en temps réel reste la méthode de choix. Elle a abouti à une concordance clinico-biologique dans 100% des cas d'une part et a permis de poser le diagnostic chez le patient où le diagnostic clinique n'a pu être posé. Une discordance entre le diagnostic clinique de l'infection à MCV et les résultats de PCR classique chez trois patients a été observée dans cette étude. Deux des résultats ont fait évoquer des lésions dues aux *Orthopoxvirus* non confirmés par la PCR en temps réel. Ce manque de spécificité pour certains échantillons nécessite une confirmation par le PCR en temps réel en cas de discordance entre la clinique et la PCR à point final. Cependant, des confusions cliniques liées à la similarité entre les lésions peuvent être observées entre les *Poxvirus*. Des co-circulations ont été également rapportées (Inosshima, 2000 et 2002 ; Abrahao, 2009)

Conclusion partielle

A travers cette étude chez les sujets présentant des éruption fébriles, aucun *Orthpoxvirus* n'a été isolés dans les produits biologiques de ces patients.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Conclusion générale

Après l'éradication du virus de la variole, le *Monkeypoxvirus* constitue la première menace pour l'homme au sein de la famille des *Poxviridae*. Son émergence en Afrique centrale est une préoccupation mondiale.

Au cours de cette étude portant sur l'épidémiologie, l'écologie et l'étude moléculaire du *Monkeypoxvirus* en Côte d'Ivoire dont l'objectif est de prouver la circulation du virus dans le pays, deux approches ont été utilisées. La première approche, était une investigation du réservoir animal afin d'identifier les micromammifères réservoirs du virus en Côte d'Ivoire. La deuxième approche était des investigations chez l'homme dans le but d'évaluer le niveau d'exposition au virus d'une part et d'autre part de déterminer la place du virus dans les éruptions fébriles en Côte d'Ivoire.

Concernant l'approche animale, 256 micromammifères dont 76,2% de rongeurs et 23,8% d'insectivores ont été analysés. Les espèces étaient très variées avec une prédominance des genres *Rattus*, *Crocidura*, *Lophuromys*, *Praomys*, *Mus* et *Mastomys*. La PCR en temps réel a permis de détecter l'*Orthopoxvirus* chez *Crocidura olivieri* dans la zone périurbaine d'Abidjan soit une proportion de 0,39% des micromammifères. Le *Monkeypoxvirus* n'a pas été retrouvé dans cette étude. La circulation d'*Orthopoxvirus* au sein du réservoir potentiel reste faible à travers notre étude. Cependant la présence de l'*Orthopoxvirus* chez *Crocidura olivieri* constitue un risque majeur d'exposition humaine à cause de la fréquence de ce micromammifères dans l'environnement immédiat de l'homme.

Concernant le volet humain, l'évaluation de l'exposition à travers l'étude de la séroprévalence basée sur la recherche des anticorps IgG anti-*Orthopoxvirus*, la prévalence était de 4,93%. Plus de 80% des sujets qui avaient des IgG anti-*Orthopoxvirus* résidait dans la partie sud de Côte d'Ivoire et le titre IgG variait entre 100 et 800 chez les sujets positifs. La présence anticorps anti-*Orthopoxvirus* chez des sujets non vaccinés contre la variole est un indicateur d'exposition aux *Orthopoxvirus* en Côte d'Ivoire. Cette exposition reste faible en général et n'exclue pas la possibilité de l'implication de l'espèce *Monkeypoxvirus* dans cette exposition. Par contre la recherche directe du virus dans les échantillons biologiques des patients ayant présentés des lésions cutanées était négative. Les flux oraux et sérums de 102 patients suspects de rougeole et 45 prélèvements de lésions cutanées de patients suspects de *Molluscum contagiosum* avaient été analysés dans cette partie d'investigation du virus chez l'homme.

Les outils moléculaires mis en place dans cette présente étude ont permis la confirmation biologique de l'infection à *Molluscum contagiosum virus*. La PCR classique a permis une

confirmation des 93,33% des cas et la PCR temps réel a permis une confirmation de 100% des cas

Perspective

Au terme de cette étude portant sur l'Epidémiologie, écologie et moléculaire du *Monkeypoxvirus* en Côte d'Ivoire. Il serait important du point de vue des perspectives de réaliser des études suivantes :

- Poursuivre l'investigation du réservoir à travers une étude multicentrique sur les réservoirs animaux des virus émergents en Côte d'Ivoire
- Améliorer le diagnostic moléculaire par la mise en place de PCR multiplex pour la détection des *Orthopoxvirus* et le développement d'amorces spécifiques pour la détection du *Monkeypoxvirus*.
- Produire des antigènes peptidiques pour la mise en place des tests immunologiques spécifiques du *Monkeypoxvirus*
- Rechercher des gènes prédictifs de virulence dans la partie périphérique du génome des *Monkeypoxvirus* à travers des études comparatives des gènes des *Orthopoxvirus*
- Comprendre le mécanisme d'utilisation des *Poxvirus* comme vecteur de gènes étrangers en thérapie et en vaccinologie.

Récommandations

Nous recommandons au terme de cette étude :

- Une collaboration entre la médecine humaine et la médecine vétérinaire pour la surveillance des *Orthopoxvirus* en Côte d'Ivoire ;
- Intégrer la surveillance du *Monkeypoxvirus* à la surveillance nationale de la rougeole
- La sensibilisation des services de Dermatologie de la nécessité de diagnostic biologique de *Poxvirus* en cas d'éruption cutanée fébrile atypique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abrahamo JS, Lima LS, Assis FL, Alves PA, Silva-Fernandes AT, Cota M MG, Ferreira VM, Campos RK, Mazur C, Lobato IPZ, Trindade GS, and Kroon EG . Nested-multiplex PCR detection of Orthopoxvirus and Parapoxvirus directly from exanthematic clinical samples. *Virology Journal* 2009, 6: 140

AFAQAP. Techniques d'anatomie et de cytology pathologiques. 2000, 1 : 16 - 17

Afonso CL, Tulman ER, Lu Z, Zsak L, Sandybaev NT, Kerembekova UZ, Zaitsev VL, Kutish GF, Rock DL. The genome of camelpox virus. *Virology* 2002, 295(1):1-9.

Aplin, K.P., Chesser T. Ten Have, J. Evolutionary biology of the genus *Rattus*: profile of an archetypal rodent pest. In: Singleton GR, Hinds LA, Krebs CJ. & Spratt DM (eds) *Rats, mice and people: rodent biology and management*. ACIAR, Canberra, 2003 : pp 487– 498.

Appleyard G, Hapel AJ, Boulter EA. An antigenic difference between intracellular and extracellular Rabbitpox virus. *Journal of general Virology* 1971, 13: 9-17

Arita I, Gispén R, Kalter SS, Teong Wah L, Marennikova SS, Netter R, and Tagaya I. Outbreaks of monkeypox and serological surveys in nonhuman primates. *Bull World Health Organ*. 1972, 46(5): 625–631.

Armstrong JA, Metz DH, Young MR. The mode of entry of vaccinia virus into L cells. *Journal of general Virology* 1973, 21(3): 533-537

Baroudy BM and Moss B. Sequence homologies of diverse length tandem repetitions near ends of vaccinia virus genome suggest unequal crossing over. *Nucleic Acids Res*. 1982, 10(18): 5673–5679

Baroudy BM, Venkatesan S, Moss B. Incompletely base-paired flip-flop terminal loops link the two DNA strands of the vaccinia virus genome into one uninterrupted polynucleotide chain. *Cell*. 1982, 28(2): 315-24

Bawden A.L, Glassberg K.J, Diggans J, Shaw R, Farmerie W, Moyer R.W. Complete genomic sequence of the *amsacta moorei* entomopoxvirus: Analysis and comparison with other poxviruses. *Virology* 2000, 274 : 120–139.

Baxby D. The surface antigens of orthopoxviruses detected by cross-neutralization tests on cross-absorbed antisera. *Journal of General Virology* 1982, 58: 251–62.

Becker TM, Blount JH, Douglas J, Judson FN. Trends in molluscum contagiosum in the United States, 1966–1983. *Sex Transm Dis* 1986,13: 88–92.

Becker Y. Vaccinia virus pathogenicity in atopic dermatitis is caused by allergen –induced immune response that prevents the antiviral cellular and humoral immunity. *Virus Genes* 2003, 27(3): 269 – 282

Bedson HS and Dumbell KR. The effect of temperature on the growth of pox viruses in the chick embryo. *Journal of Hygienw of Cambridge*. 1961, 59: 457

Bellier L, Gillon D, Gillon Y, Guillaumet JL et Perraud A. recherches sur l'origine d'une savane incluse dans le bloc forestier du bas-cavally (Cote d'Ivoire) par l'étude des sols et de la biocoenose . *Cahier ORSTOM, ser. Biol.* 1969, 10 : 65 – 94.

Bennett M, Crouch AJ, Begon M, Duffy B, Feore S, Gaskell RM et al. Cowpox in british voles and mice. *J Comp Pathol* 1997, 116(1): 35 – 44

Berbegal-DeGracia L, Betlloch-Mas I, DeLeon-Marrero FJ, Martinez-Miravete MT, Miralles-Botella J. Neonatal Molluscum contagiosum: five new cases and a literature review. *Australasian Journal of Dermatology* 2015, 56(2): e35-8.

Biswas D, Yadav K, Borkakoty B, Mahanta J. Simultaneous infection of measles and varicella-zoster virus in a child in India. *J Med Virol*. 2011, 83(11): 2004-7

Boulter EA, Appleyard G . Differences between extracellular and intracellular forms of poxvirus and their implications. *Prog Med Virol* 1973, 16: 86-108

Boumandouki P, Bileckot R, Ibara JR, Satoukasi C, Wassa Wassa D, Libama F and al. Orthopoxvirose simienne (ou variole du singe): Etude de 8 cas observés à l'hôpital d'Impfondo de la République du Congo *Bull Soc Pathol Exot.* 2007, 100 (1) : 17-21

Buchman GW , Cohen ME, Xiao Y, Richardson-Harman N, Silvera P, DeTolla LJ and al. A protein-based smallpox vaccine protects non-human primates from a lethal monkeypox virus challenge. *Vaccine*, 2010, 28: 6627–6636.

Buller RM, Palumbo GJ. Poxvirus pathogenesis. *Microbiol Rev*, 1991, 55(1): 80-122

Butcher W, Ulaeto D. Contact inactivation of orthopoxviruses by household disinfectants. *Journal of Applied Microbiology*, 2005, 99 (2): 279-284

Carter GC, Law M, Hollinshead M, Smith GL Entry of the vaccinia virus intracellular mature virion and its interaction with glycoaminoglycans. *J. Gen. Virol*, 2005;86: 1279-1290

Centers for Disease Control and Prevention. Human monkeypox-Kasai Oriental, Zaire, 1996-1997. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1997; 46(14):304-7.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Guide D - Specimen Collection and Transport Guidelines

Centers for Disease Control and Prevention. (2007). In Richmond J. Y., McKinney R. W. (Eds.), *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL)* (5th Edition ed.). Washington D.C.: Centers for Disease Control and Prevention

Chahroudi A, Chavan R, Koyzr N, Waller EK, Silvestri G, Feinberg MB. Vaccinia virus tropism for primary hematology cells is determined by restricted expression of a unique virus receptor. *Journal of Virology* 2005, 79 (16): 10397 – 10407

Chastel C. Le monkeypox humain, *Pathologie Biologie* 2009, 57: 175-183

Chen N, Li G, Liszewski M.K, Atkinson J.P, Jahrling P.B, Feng Z. and al. Virulence differences between monkeypox virus isolates from West Africa and the Congo basin. *Virology* 2005, 340: 46–63

Cho CT, Wenner HA. Monkeypox virus. *Bacteriol Rev* 1973, 37(1): 1-18

Condit RC, Moussatche N, Traktman P. In a Nutshell : Structure and assembly of the Vaccinia Virion. *Advances in virus Research* 2006, 66: 31-124.

Connell CO, Oranje A, Van Gysel D, Silverberg NB. Congenital molluscum contagiosum: report of four cases and review of the literature. *Pediatr Dermatol.* 2008, 25(5): 553-6

Core Team R (2015). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org>

Cyrklaff M, Risco C, Fernandez JJ, Jimenez MV, Esteban M, Baumeister W, Carrascosa J L. Cryo-electron tomography of Vaccinia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005, 102: 2772-2777

Dales S, Pogo B G. Biology of poxvirus. *Viol. Monogr.* 1981, 18: 1-109.

Dales S, Siminovitch L. The development of Vaccinia Virus in Earle's strain Cells as examined by electron microscopy. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 1961, 10: 475-503

Dales S, Kajioka R . The cycle of multiplication of vaccinia virus in earle's strain l cells. I. uptake and penetration. *Virology* 1964, 24: 278-94

Dales S. The Uptake and Development of Vaccinia Virus in strain L cells followed with labelled viral deoxyribonucleic acid. *The Journal of Cell Biology* 1963, 18: 51-72

De Clercq, E. Cidofovir in the treatment of poxvirus infections. *Antiviral Research* 2002, 55 (1): 1-13.

DeLange AM, McFadden G. The role of telomeres in poxvirus DNA replication. *Current Topics in Microbiology and Immunology* book series 1990, 163: 71-92

Di Giulio DB, Eckburg PB. Monkeypox humain.: Une zoonose émergente *Lancet Infect Dis .* 2004, 4 (1): 15 – 25

Diagne CA, Charbonnel N, Henttonen H, Sironen T, and Brouat C. Serological Survey of Zoonotic Viruses in Invasive and Native Commensal Rodents in Senegal, West Africa. *Vector-borne and zoonotic diseases* 2017, 17 (10): 730 – 733.

Dohil MA, Lin P, Lee J, Lucky AW, Paller AS, Eichenfield LF. The epidemiology of molluscum contagiosum in children. *Journal of American Academy Dermatology* 2006, 54:47–54.

Doms RW, Blumenthal R, Moss B. Fusion of intra- and extracellular forms of vaccinia virus with the cell membrane. *Journal of Virology* 1990, 64: 4884-92

Du S, Traktman P. Vaccinia virus DNA replication: two hundred base pairs of telomeric sequence confer optimal replication efficiency on minichromosome templates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996 ; 93 : 9693-8

Dubochet J, Adrian M, Chang JJ, Homo JC, Lepault J, McDowell AW, Schultz P. Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. *Quarterly Reviews of Biophysics* 1988; 21(2):129-228.

Dubochet J, Adrian M, Richter K, Garces J, Wittek R. Structure of Intracellular Mature Vaccinia Virus Observed by Cryoelectron Microscopy. *Journal of Virology* 1994, 68(3):1935-1941

Dubois ME and Slifka MK. Retrospective Analysis of Monkeypox Infection. *Emerging Infectious Diseases* 2008, 14 (4):592 - 99

Dubois ME, Hammarlund E, Slifka MK. Optimization of Peptide-Based ELISA for Serological Diagnostics: A Retrospective Study of Human Monkeypox Infection. *Vector-borne and zoonotic diseases*, 2012, 12(5) : 400 - 9

Duplantier J. M., Duchemin J. B , Ratsitorahina M, Rahalison L, Chanteau S. Résurgence de la peste dans le district d'Ikongo à Madagascar en 1998. Réservoirs et vecteurs impliqués. *Bulletin sociologie Pathologie Exotique* 2001, 94(2): 119-122

Duraffour S, Andrei G, Snoeck R. Nouvelles armes thérapeutiques contre les poxvirus . *Virologie, Virologie* 2008, 12(5): 323-38

Esposito JJ and Knight JC. Orthopoxvirus DNA: a comparison of restriction profiles and maps. *Virology*, 1985; 143(1): 230-51

Esposito JJ, Fenner F. Poxviruses. In : *Fields Virology*. Lippincot Williams & Wilkins, 2001 : 2885-921

Essani K., Dales S. Biogenesis of vaccinia : Evidence for more than 100 polypeptides in the virion. *Virology* 1979, 95: 385-394.

Essbauer S, Meyer H. Genus Orthopoxvirus : Cowpox virus. In : Schmidt A, Wolff MH, Kaufman SHE, eds. *Poxviruses*. Basel : Birkhäuser Verlag, 2007: 75-88

Essbauer S, Meyer H. Genus Orthopoxvirus : Monkeypox virus. In : Schmidt A, Wolff MH, Kaufman SHE, eds. *Poxviruses*. Basel : Birkhäuser Verlag, 2007 : 65-74

Falendysz EA, Lopera JG , Lorenzsonn F, Salzer JS, Hutson C L, Doty J and al. Further Assessment of Monkeypox Virus Infection in Gambian Pouched Rats (*Cricetomys gambianus*) Using In Vivo Bioluminescent Imaging. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 2015, 9 (10): 1-19

Fenner F, Wittek R, Dumbell KR. The Orthopoxviruses. Academic press. 1989, 1: 227-268.

Fenner F. Vaccinia virus as a vaccine, and poxvirus pathogenesis in Recombinant Poxviruses. BINNS M. M. and SMITH G. L. Editors, CRC Press, Boca Raton, Florida 1992: p 1-43

Fenner F., Henderson DA, Arita I, Jezek Z., Ladny ID. Smallpox and its eradication. World Health Organization Ed, Geneva, (1988)

Fichet-Calvet E , Becker-Ziaja B, Koivogui L, and Gunther S. Lassa Serology in Natural Populations of Rodents and Horizontal Transmission. *Vector-borne and zoonotic diseases* 2014, 14(9) : 665 - 74

Fisher-hoch S.P, Hutwagner L, Brown B and Mac Cormick JB. Effective vaccine for Lassa fever. *Journal of Virology* 2000, 74: 6777-6783.

Fogg C, Lustig S, Whitbeck J C, Eisenberg RJ, Cohen G H, and Moss B. Protective immunity to vaccinia virus induced by vaccination with multiple recombinant outer membrane proteins of intracellular and extracellular virions. *Journal of Virology* 2004, 78(19): 10230-7

Formenty P, Muntasir MO, Damon IK, Chowdhary V, Opoca ML, Monimart C, et al. Human monkeypox outbreak caused by novel virus belonging to Congo Basin clade, Sudan, 2005. *Emerging Infection Disease* 2010, 16: 1539–45.

Foster OS, Brink WE, Hutchins LD, Pifer MJ, Lourie B, Moser RC and al. Human monkeypox. *Bulletin World Health Organization* 1972, 46(5): 569–576.

Galmiche MC, Goenga J, Wittek R, Rindisbacher L. Neutralizing and protective antibodies directed against vaccinia envelope and gens. *Virology* 1999, 254: 71 – 80

Gangemi JD, and Sharp DG. Use of a restriction endonuclease in analyzing the genomes from two different strains of vaccinia virus. *Journal of virology* 1976, 20(1): 319-23.

Gautun J-Cl. et Petter F. Liste préliminaire des Rongeurs d'une savane centrale de Côte-d'Ivoire : Foro-Foro. *Mammalia* 1972, 36: 634-637.

Gautun J-Cl., Bellier L. et Heim De Balsac H. Liste préliminaire des Rongeurs de la savane de Dabou (Côte-d'Ivoire). *Journal of the West African Science Association* 1969, 14: 219-223.

Gispén R, Brand-Saathof BB, Hekker AC. Monkeypox-specific antibodies in human and simian sera from the Ivory Coast and Nigeria. *Bulletin World Health Organization* 1976, 53: 355-360

Gispén R, Verlinde, JD, and Zwart, P. Histopathological and virological studies on monkeypox. *Arch. Gesamte Virusforsch* 1967, 21: 205

Goebel SJ, Johnson GP, Perkus ME, Davis SW, Winslow JP and Paoletti E. The complete DNA sequence of vaccinia virus. *Virology* 1990, 179(1): 247-66.

Goebel SJ, Johnson GP, Perkus ME, Davis SW, Winslow JP and Paoletti E. The complete DNA sequence of vaccinia virus. *Virology* 1990, 179(1): 517-63.

Gong SC, Lai CF, Esteban M. Vaccinia virus induces cell fusion at acid pH and this activity is mediated by the N-terminus of the 14-kDa virus envelope protein. *Virology* 1990, 178: 81-91

Gratz NG. The burden of rodent-borne diseases in Africa south of the Sahara. *Belgian Journal of Zoology* 2001. 127 (supplement 1): 7 1-84

Griffiths G, Wepf R, Wendt T, Krijnse-locker J, Cyrklaff M, Roos N. Structure and Assembly of Intracellular Mature Vaccinia Virus : Isolated- Particle Analysis. *Journal of Virology* 2001, 75(22): 11034-11055

Gubser C, Hue S, Kellam P, Smith G.L. Poxvirus genomes: A phylogenetic analysis. *Journal of General Virology* 2004, 85: 105–117

Gubser C, Smith G.L. The sequence of camelpox virus shows it is most closely related to variola virus, the cause of smallpox. *Journal of General Virology* 2002, 83: 855–872

Hammarlund E, Lewis MW, Hansen SG, Strelow LI, Nelson JA, Sexton GJ et al. Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination. *Nature Medicine* 2003, 9(9): 1131-7

Hansen H, Okeke MI, Nilssen O, Traavik T. Comparison and phylogenetic analysis of cowpox viruses isolated from cats and humans in Fennoscandia. *Arch Virology* 2009, 154: 1293–302

Heberling RL, Kalter SS, and Rodriguez AR. Poxvirus infection of the baboon (*Papio cynocephalus*). *Bulletin W.H.O.* 1976, 54: 285

Henderson DA, Inglesby TV, Bartlett JG, Ascher MS, Eitzen E, Jahrling PB, et al. Smallpox as a biological weapon: medical and public health management. Working Group on Civilian Biodefense. *JAMA* 1999, 281: 2127–37

Henderson DA. Smallpox-the death of a disease. Prometheus Books, Amherst, New York 2009

Hendrickson R C, Wang C, Hatcher EL and. Lefkowitz EJ. Orthopoxvirus Genome Evolution: The Role of Gene Loss .*Viruses* 2010, 2: 1933-1967

Herbreteau V., Jittapalapong S., Rerkamnuaychoke W., Chaval Y., Cosson J.-F. and Morand S. (Editors). 2011. Protocols for field and laboratory rodent studies. Retrieved from

CERoPath project:

Hooper JW, Custer DM, and Thompson E. Four-gene-combination DNA vaccine protects mice against a lethal vaccinia virus challenge and elicits appropriate antibody responses in nonhuman primates. *Virology* 2003, 306(1): 181-95.

Hooper JW, Thompson E, Wilhelmsen C, Zimmerman M, Ichou MA, Steffen SE, Schmaljohn CS, Schmaljohn A L, and Jahrling PB. Smallpox DNA vaccine protects nonhuman primates against lethal monkeypox. *Journal of Virology* 2004, 78(9): 4433-43.

Hsiao JC, Chung CS, Chang W. Cell surface proteoglycans are necessary for A27L protein-mediated cell fusion: identification of the Nterminal region of A27L protein as the glycosaminoglycan-binding domain. *Journal of Virology* 1998, 72: 8374–8379

Hu FQ, Pickup DJ. Transcription of the terminal loop region of vaccinia virus DNA is initiated from the telomere sequences directing DNA resolution. *Virology* 1991, 181(2): 716-20.

Hu FQ, Smith CA, Pickup DJ. Cowpox virus contains two copies of an early gene encoding a soluble secreted form of the type II TNF receptor. *Virology* 1994, 204(1): 343-56

Huchon D, Madsen O, Sibbald MJJB, Ament, K, Stanhope MJ, Catzeflis F, De Jong WW and Douzery EJP. Rodent phylogeny and a timescale for the evolution of glires: evidence from an extensive taxon sampling using three nuclear genes. *Molecular Biology and Evolution* 2002, 19(7): 1053-65.

Hügin AW, Hauser C. The epidermal growth factor receptor is not a receptor for vaccinia virus. *Journal of Virology* 1994, 68(12): 8409-12

Hunkeler Pierre. Les Cestodes parasites des petits mammifères (Rongeurs et Insectivores) de Côte-d'Ivoire et de Haute-Volta Extrait de la Rev. suisse Zoology 1973, Tome 80, fascicule 4

Husein-ElAhmed H, Ruiz-Molina I, Cívico-Amat V, Solís-García E. Molluscum Contagiosum Infection Involving a Benign Epidermoid Cyst in an Immunocompetent Patient. *Skinmed* 2016, 14(2): 151-2.

Hutin YJ, Williams RJ, Malfait P, Pebody R, Loparev VN, Ropp SL, Rodriguez M, Knight JC, Tshioko FK, Khan AS, Szczeniowski MV, Esposito JJ. Outbreak of Human Monkeypox, DEMOCRATIC Republic of Congo, 1996 – 1997. *Emerging Infectious Diseases*. 2001, 7(3): 434 – 3

Hutse V, Van Hecke K, De Bruyn R, Samu O, Lernout T, Muyembé B and Brochier B. Oral fluid for the serological and molecular diagnosis of measles. *International Journal of Infectious Diseases* 2010, 14: e991–e997

Hutson CL, Lee KN, Abel J, Carroll DS, Montgomery JM, Olson VA, Li Y, Davidson W, Hughes C, Dillon M, Spurlock P, Kazmierczak JJ, Austin C, Miser L, Sorhage FE, Howell J, Davis JP, Reynolds MG, Braden Z, Karem KL, Damon IK, Regnery RL. Monkeypox zoonotic associations: insights from laboratory evaluation of animals associated with the multi-state us outbreak. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2007, 76(4): 757–767

Hutson CL , Nakazawa YJ , Self J, Olson VA, Regnery RL , Braden Z. Laboratory investigations of african pouched rats (*Cricetomys gambianus*) as a potential reservoir host species for monkeypox virus PLOS Neglected Tropical Diseases 2015, DOI:10.1371/journal.pntd.0004013

Inosshima Y, Marooka A, Sentsui H. Detection and diagnosis of parapoxvirus by the polymerase chain reaction. Journal of Virology Methods 2000, 84: 201 – 8

Inosshima Y, Murakami K, Wu D, Sentsui H. Characterization of parapoxviruses circulating among wild Japanese serows (*Capricornis cripus*). Microbiology and Immunology 2002, 46(8): 583 -7.

Iyer LM, Aravind L, Koonin EV. Common origin and four diverse families of large eukaryotic DNA viruses. Journal of Virology 2001, 75: 11720-11734

Jacobson R H. Validation des épreuves sérologiques pour le diagnostic des maladies infectieuses. Revue scientifique et technique International Office of Epizootics 1998, 17 (2) : 487-506

Jesik Z, Fenner F. Humain Monkeypox. New York : Kanger; 1988

Jezek Z, Nakano JH, Arita I, Mutombo M, Szczeniowski M, Dunn C. Serological survey for human monkeypox infections in a selected population in Zaire. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 1987, 90: 31–8.

Jezek Z, Szczeniowski M, Paluku KM, Mutombo M, Grab B. Human monkeypox: confusion with chickenpox. Acta Tropica 1988 ; 45 : 297-307.

Jezek Z, Szczeniowski M, Paluku KM, Mutombo M. Human monkeypox: clinical features of 282 patients. Journal of Infectious Diseases, 1987, 156: 293–298

Karem KL, Reynolds M, Braden Z, Lou G, Bernard N, Patton J, Damon IK. Caractérisation de l'immunité humorale phase aiguë de singe: Utilisation d'immunoglobulines M dosage immuno-enzymatique pour la détection de l'infection simienne lors de l'épidémie en Amérique du Nord 2003. Clinical Diagnostic Laboratory Immunology 2005, 12 (7): 867-872.

Khodakevich L, M Szczeniowski, Manbu-ma-Disu, Jezek Z, Marennikova S, Nakano J, Messinger D. Le rôle des écureuils dans le maintien de la transmission du virus simien. Tropical and Geographical Medicine 1987; 39 (2): 115 – 122

Kingdon J. The kingdom field guide to African mammals. Academic press. 1997; 1: 159 – 206

Knight JC, Goldsmith CS, Tamin A, Regnery RE, Regnery DC, Esposito JJ. Further analyses of the orthopoxvirus volepox virus and raccoon poxvirus. Virology 1992; 190:423 – 433

Kouadio L, Nowak K, Akoua-Koffi C, Weiss S, Allali KB, Witkowski PT and al . Lassa Virus in Multimammate Rats, Côte d'Ivoire. *Emerging Infectious Diseases* 2013; 21(8): 1481 – 1483

Kouassi Kan S. Biogéographie, habitat et taxonomie moléculaire des rongeurs réservoirs d'Arenavirus en Côte d'Ivoire. PhD Dissertation. University of Abidjan-Cocody, Abidjan, Côte d'Ivoire. 2010 pp. 144

Koyaté B et Dosso H. Données sur le peuplement des rongeurs muridés des champs de riz pluvial dans la région de Taï (Côte d'Ivoire) *Ann. Univ. Abidjan, serie E (Ecologie)*, 1981 ; tome XIV, pp119-134

Kugelman JR., Johnston SC., Mulembakani PM, Kisalu N, Lee MS, Koroleva G et al. Genomic Variability of Monkeypox Virus among Humans, Democratic Republic of the Congo. *Emerging Infectious Diseases* 2014, 20(2) : 232 – 239

Kulesh DA, Loveless BM, Norwood D, J Garrison, Whitehouse CA, Hartmann C, and al. Détection de virus monkeypox chez les rongeurs à l'aide de tests TaqMan liant rainure 3 'mineures en temps réel sur la Roche LightCycler. *Laboratory Investigation* 2004, 84 (9): 1200-1208.

Lalani AS, Masters J, Zeng W, Barrett J, Pannu R, Everett H, Arendt CW, McFadden G. Use of chemokine receptors by poxviruses. *Science* 1999, 286(5446): 1968-71.

Laliberte JP, Moss B. Lipid membranes in poxvirus replication. *Viruses* 2010, 2: 972-86

Lapa S, Mikheev M, Shchelkunov S, Mikhailovich V, Sobolev A, Blinov V and al. identification des espèces au niveau des orthopoxvirus avec une puce oligonucléotide. *Journal of Clinical Microbiology* 2002, 40 (3): 753-757

Larcher C, Daniel E, Pagani E, Maier K, Paschetto V, Mellina-Bares MF and al. Generalized parapoxvirus infection associated with increased antibody titres for varicella zoster virus and measles. *European Journal of Dermatology* 2009, 19(4): 375-9

Law M, Carter GC, Roberts KL, Hollinshead M, Smith GL. Ligand induced and nonfusogenic dissolution of a viral membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006, 103: 5989-94

Law M, Hollinshead R, Smith GL. Antibody-sensitive and antibody-resistant cell-to-cell spread by vaccinia virus: role of the A33R protein in antibody-resistant spread. *Journal of General Virology* 2002, 83: 209 - 222

Le Quilliec P, Croci S . Piégeage de micromammifères Une nouvelle boîte-dortoir pour le piège non vulnérant Inra. 2006. *Le Cahier des Techniques de l'Inra. Le milieu vivant. Edition spéciale*, 125 – 28

Learned, L.A, Reynolds, M.G, Wassa-Wassa, D, Li, Y, Olson, V.A, Karem, K.L, Stempora, L.L. et al. Extended interhuman transmission of monkeypox in a hospital community in the Republic of the Congo, 2003. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2005, 73: 428–434.

Leite JA, Drumond BP, Trindade GS, Lobato ZI, da Fonseca FG, dos Santos and al. Passatempo virus, a vaccinia virus strain, Brazil . *Emerging Infect Disease* 2005, 11: 1935 - 1938.

Levine RS, Peterson AT, Yorita KL, Carroll D, Damon IK, Reynolds MG. Ecological niche and geographic distribution of humanmonkeypox in Africa. *PLoS ONE* 2007, 2(1): e176.

Levine¹ RS, Yorita LK, Walsh CM and Reynolds GM. A method for statistically comparing spatial distribution maps . *International Journal of Health Geographics* 2009, 8:7

Li Yu Ropp SL, Zhao H, Damon IK, Esposito JJ. Orthopoxvirus pan-genomic DNA assay. *Journal of Virological Methods* 2007, 141: 154–165.

Li Yu, Olson VA. , Laue T, Laker MT, Damon IK. Detection of monkeypox virus with real-time PCR assays. *Journal of Clinical Virology* 2006, 36: 194–203

Loparev VN, Massung RF, Esposito JJ, Meyer H. Detection and differentiation of old world orthopoxviruses:restriction fragment length polymorphism of the crmB gene region. *Journal of Clinical Microbiology* 2001; 39: 94–100.

Lourie B, Bingham GP, Evans HH, Foster OS, Nakano HJ, and Herrmann LH. Human infection with monkeypox virus: laboratory investigation of six cases in West Africa *Bull World Health Organ.* 1972, 46(5): 633–639.

Luis A, Hayman DT, O’Shea T, Cryan P, et al. A comparison of bats and rodents as reservoirs of zoonotic viruses: are bats special? *Proceedings of Royal Society B* 2013, 280 (1756): 20122753.

Mackett M, Archard LC. Conservation and variation in orthopoxvirus genome structure. *The Journal of General Virology* 1979, 45: 683–701.

MacNeil A, Abel J, Reynolds MG, Lash RR, Fonnier R, Kanneh LD and al . Serologic evidence of human orthopoxvirus infections in Sierra Leone. *BMC Research Notes* 2011, 4: 465

MacNeil A, Reynolds MG,Carroll DS, Karem K,Braden Z, Lash R and al. Monkeypox or Varicelle? Lessons from a rash outbreak investigation in the Republic of the Congo. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2009; 80(4): 503 – 507.

Magnus, P. von, Krag Andersen, E., Petersen, K. B , Birch-Andersen, A. *Acta pathologica and microbiologica scandinavica* 1959, 46: 156-176

Malkin AJ, McPherson A, Gershon P D. Structure of Intracellular Mature Vaccinia Virus Visualized by In situ Atomic Force Microscopy. *Journal of Virology* 2003, 77(11): 6332-6340.

Malkin AJ, McPherson A, Gershon PD. Structure of Intracellular Mature Vaccinia Virus Visualized by In situ Atomic Force Microscopy. *Journal of Virology* 2003, 77(11): 6332-6340.

Marsh YV, Eppstein DA. Vaccinia virus and the EGF receptor: a portal for infectivity? *Journal of Cellular Biochemistry* 1987, 34(4): 239-45.

Masters J, Hinek AA, Uddin S, Platanias LC, Zeng W, McFadden G, Fish EN. Poxvirus infection rapidly activates tyrosine kinase signal transduction. *Journal Biology Chemistry* 2001, 276(51): 48371-5

McConnell S, Herman YF, Mattson DE, Huxsoll DL, Lang CM, Yager RH. Protection of rhesus monkeys against monkeypox by vaccinia virus immunization. *American Journal Veterinary Research* 1964, 25: 192–195

Mcintosh AA, Smith GL. Vaccinia virus glycoprotein A34R is required for infectivity of extracellular enveloped virus. *Journal of Virology* 1996, 70: 272 – 281

Mcintosh K, Hendry RM, Fahnestock ML, Pierik LT. Enzyme-linked immunoabsorbent assay for detection of respiratory syncytial virus infection: application to clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology* 1982, 16: 329-333

Meerburg B, Singleton GR, Kijlstra A. Rodent-borne diseases and their risks for public health. *Critical Reviews in Microbiology* 2009, 35: 221–270.

Mercer J, Helenius A. Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells. *Science* 2008, 320: 531-5.

Meyer H, Perrichot M, Stemmler M, Emmerich P, Schmitz H, Varaine F, Shungu R, Tshioko F, Formenty P. Flambées de maladies suspectées d'être dus à une infection par le virus de la variole du singe l'homme en République démocratique du Congo en 2001. *Journal of Clinical Microbiology* 2002, 40 (8): 2919-2921

Meyer H, Ropp SL, Esposito JJ. Gène pour une protéine de type de corps d'inclusion est utile pour un dosage de la réaction en chaîne de la polymérase pour différencier orthopoxvirus. *Journal of Virology Methods* 1997, 64 (2): 217 – 221

Mills, JN, Chids JE, Ksiazek TG, Peters CJ and Veleca WM. Methods for trapping and sampling small mammals for virologic testing 1995 US department of Health, and Human services, Public Health service, centers for Disease control and prevention, Atlanta, G A

MIMS, C.A. Rift Valley fever virus protection test surveys. *East African Virus Research Institute, Annual Report* ,1 956; 1955-1 956

Moss B. Poxviridae : The Viruses and Their Replication. In : *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins 2001: 2849-83

Moss B. Poxviridae: The viruses and their replication. In: *Knipe DM, Howley PM. Field's virology*, 4th ed. Philadelphia: Lippincott- Raven; 2001 :2849–83.

Moss B. Poxvirus entry membrane fusion. *Virology* 2006, 344: 48 – 54

Nakano JH. Evaluation des méthodes de laboratoire applicable au diagnostic virologique de la variole. WHO/SE/72.44

Nakazawa Y, Mauldin M R , Emerson G L , Reynolds M G, Lash RR, Gao J. A Phylogeographic Investigation of African Monkeypox. *Viruses* 2015, 7: 2168-2184

Nakazawa Y, Emerson GL, Carroll DS, Zhao H, Li Y, Reynolds MG and al. Phylogenetic and Ecologic Perspectives of a Monkeypox Outbreak, Southern Sudan, 2005. *Emerging Infectious Diseases* • www.cdc.gov/eid • 19 No. 2, February 2013

Nalca A, Rimoin AW, Bavari S, Whitehouse CA. Reemergence of monkeypox: prevalence, diagnostics, and countermeasures. *Clinical Infectious Diseases*, 2005, 41 (12): 1765-1771

Neubauer H, Reischl U, S Ropp, Esposito JJ, Wolf H, Meyer H. Détection spécifique du virus simien par réaction en chaîne de la polymérase *Journal of Virology Methods* 1998, 74 (2): 201 – 207

Nguyen-Ba VY, Richard D, Gillet J P. Propriétés d'une souche d'orthopoxvirus isolée des dromadaires du Niger. *Revue d'élevage et de Médecine vétérinaire des Pays tropicaux* 1989, 42 (1): 19-25

Olson VA, Laue T, Laker MT, Babkin IV, Drosten C, Shchelkunov SN and al . Real-Time PCR System for Detection of Orthopoxviruses and Simultaneous Identification of Smallpox Virus *journal of clinical microbiology*, 2004; 42 (5): 1940–1946

OMS. Bulletin mensuel en RDC 2008, 15: 9 – 13

OMS. Surveillance des Orthopoxvirus : politique pour la période postérieure à l'éradication. *Relevé Epidémiologique Hebdomadaire* 1982, 57: 105 – 109

Orba Y, Sasaki M, Yamaguchi H, Ishii A, Thomas Y, Ogawa H, Hang'ombe BM, Mweene AS, Morikawa S, Saijo M and Sawa H. Orthopoxvirus infection among wildlife in Zambia. *Journal of General Virology* 2015, 96: 390–394

Oren B, Wende SO. An outbreak of molluscum contagiosum in a kibbutz. *Infection* 1991, 19: 159–161

Peters, J. C. A monkeypox-enzooty in the "Blijdorp" Zoo. *Tijdschr. Diergeneeskde* 1966, 91: 387

Pretorius A, Oelofsen M J, Smith M.S, and Van Der Ryst E. RiftValley fever virus : a seroepidemiologic study of small terrestrial vertebrates in South Africa. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1997, 57(6) : 693-698.

Prier JE, Sauer RM. A pox disease of monkeys. *Annals of New York Academic Sciences* 1960, 85: 951–959

Putz MM Aberini I, Midgley CM, Manini I, Montomoli E, Smith GL. Prevalence of antibodies to vaccinia virus after smallpox vaccination in Italy. *The Journal of General Virology* 2005, 86: 2955–2960

Reed KD, Melski JW, Graham Mo, Regnery RL, Sotir MJ, Wegner MV and al. La détection de la variole du singe à l'homme dans l'hémisphère occidental. *New England Journal of Medicine* 2004, 350 (4): 342 - 350.

Regnery D. Isolation and partial characterization of an orthopoxvirus from a California vole (*Microtus californicus*). *Archives of virology* 1987, 94: 159

Reynolds MG, Carroll DS, Olson VA, Hughes C, Galley J, Likos A and al. A silent enzootic of an orthopoxvirus in Ghana, West Africa: Evidence for Multi-Species involvement in the absence of widespread Human Disease. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2010, 82 (4): 746-754

Reynolds MG, Damon IK. Outbreaks of human monkeypox after cessation of smallpox vaccination. *Trends Microbiology* 2012, 20(2): 80-7.

Reynolds MG, Holman RC, Yorita Christensen KL, Cheek JE, Damon IK. The Incidence of *Molluscum contagiosum* among American Indians and Alaska Natives. *PloS One* 2009, 4(4): e5255

Rimoin AW, Mulembakani PM, Johnston SC, Lloyd Smith JO, Kisalu NK, Kinkela TL, et al. Major increase in human monkeypox incidence 30 years after smallpox vaccination campaigns cease in the Democratic Republic of Congo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* 2010, 107(37): 16262 – 7

Roberts JA. Histopathogenesis of mousepox I, Respiratory infection. *British Journal Experimental Pathology* 1962, 43: 451 – 461

Roberts JA. Histopathogenesis of mousepox II, Cutaneous infection. *British Journal Experimental Pathology* 1962, 43: 462 – 468

Roos N, Cyrklaff M, Cudmore S, Blasco R, Krijnse-locker J, Griffiths G. A novel immunogold cryoelectron microscopic approach to investigate the structure of the intracellular and extracellular forms of vaccinia virus. *The EMBO Journal* 1996, 15(10): 2343-2355

Ropp SL, Jin Q, Chevalier JC, Massung RF, Esposito JJ. Stratégie PCR pour l'identification et la différenciation de la variole et d'autres orthopoxvirus. *Journal of Clinical Microbiology* . 1995, 33(8): 2069-2076.

Saluzzo J.F., Adam, F., Heme G. et Digoutte, J.P. Isolements de virus à partir de rongeurs au Sénégal (1983-1985). Description d'un nouveau Poxivims. *Bulletin de Societe de Pathologie Exotique* 1986: 323-333

Salzer JS, Carroll DS, Rwego IB, Li Y, et al. Serologic evidence for circulating Orthopoxviruses in peridomestic rodents from rural Uganda. *J Wildl Dis* 2013; 49:125–131.

Saral Y, Kalkan A, Ozdarendeli A, Bulut Y, Doymaz MZ. Detection of *Molluscum contagiosum virus* (MCV) subtype I as a single dominant virus subtype in *Molluscum* lesions from a Turkish population. *Archives of Medical Research* 2006, 37(3): 388-91

Sauer RM, Prier JE, Buchanan RS, Creamer AA, Fegley HC. Studies on a pox disease of monkeys: I. Pathology. *American Journal of Veterinary Research* 1960, 21: 377–380

Shchelkunov SN, Totmenin AV, Babkin IV, Safronov PF, Ryazankina OI, Petrov NA and al. Human monkeypox and smallpox viruses: genomic comparison. *FEBS Letters* 2001, 509(1): 66-70

Shchelkunov SN, Totmenin AV, Sandakhchiev LS. Analysis of the nucleotide sequence of 23.8 kbp from the left terminus of the genome of *variola major virus* strain India-1967. *Virus Research* 1996, 40(2): 169-83

Smith G L, Murphy BJ, Law M. *Vaccinia Virus Motility*. *Annual Review of Microbiology* 2003, 57: 323-342

Smith GL, Vanderplasschen A, Law M. The formation and function of extracellular enveloped *vaccinia virus*. *Journal of General Virology* 2002, 83 (12): 2915-2931.

Smith GL, Vanderplasschen A. Extracellular enveloped *Vaccinia virus*: Entry, Egress, and Evasion. In : *Coronaviruses and Arteriviruses*. N. York : Ed. Enjuanes et al., 1998; p 395-414

Smith GL. Genus *Orthopoxvirus* : *vaccinia virus*. In : Schmidt A, Wolff MH, Kaufman SHE, eds. *Poxviruses*. Basel : Birkhäuser Verlag, 2007 : 1-45.

Smith GL. *Vaccinia virus* glycoproteins and immune evasion. *Journal of General Virology* 1993, 74: 1725-1740.

Smith, G L, and Law M. The exit of *Vaccinia virus* from infected cells. *Virus Research* 2004, 106(2): 189-97

Sollai S, Ghetti F, Bianchi L, Maurizio de Martino, Galli L, Chiappini E. Infectious diseases prevalence, vaccination coverage, and diagnostic challenges in a population of internationally adopted children referred to a Tertiary Care Children's Hospital from 2009 to 2015. *Medicine* 2017, 96(12): 1 -10

Stock I. *Molluscum contagiosum*--a common but poorly understood "childhood disease" and sexually transmitted illness. *Medizinische Monatsschrift für Pharmazeuten* 2013, 36(8): 282-90

Sunzan-Monti M, La sociale B, Raoult D. Genomic and evolutionary aspects of *Mimivirus*. *Virus Research* 2006, 117: 145 – 155.

Talani P, Maniane J, Konongo JD, Gromyko AI, Yala F. Prévalence des anticorps spécifiques du Monkeypox au Congo-Brazzaville. *Médecine d'Afrique Noire* 1990, 46 (8/9)

Tarbouriech N, Flusin O, Sele C, Iseni F. La synthèse du génome des poxvirus. *Virologie* 2012, 16(4): 210-24

Thompson C H. Identification and Typing of Molluscum Contagiosum Virus in Clinical Specimens by Polymerase Chain Reaction. *Journal of Medical Virology* 1997;53:205–211

Tranier M. et Dosso H. Recherches caryotypiques sur les rongeurs de Côte d'Ivoire: résultats préliminaires pour les milieux fermés. *Ann. Université Abidjan, série E (Ecologie), tome XII* ; 1979 : pp. 181-183

Traore K, Gautun J C et Diomande M. Comparaison des peuplements de Rongeurs Muridés dans trois savanes de Côte d'Ivoire. *Ann. Univ. Abidjan, Série E (Ecologie), Tome XIII*, 1980, pp 184 – 193

Tscharke DC, Smith GL. A model for vaccinia virus pathogenesis and immunity based on intradermal injection of mouse ear pinnae. *Journal of General Virology* 1999, 80(10): 2751-2755

Tulman ER, Afonso CL, Lu Z, Zsak L, Sur J-H, Sandybaev NT and al. The genomes of sheeppox and goatpox viruses. *Journal of Virology* 2002, 76(12): 6054-6061

Tuner PC, Moyer RW. Orthopoxvirus fusion inhibitor glycoprotein SPI-3 (open reading frame K2L) contains motifs characteristic of serine protease inhibitors that are not required for control of cell fusion . *Journal of Virology* 1995, 69: 5978 – 5987

Upton C, Macen JL., Schreiber M., and McFadden G. Myxoma virus expresses a secreted protein with homology to the tumor necrosis factor receptor gene family that contributes to viral virulence. *Virology* 1991, 184(1): 370-82.

Upton C, Slack S, Hunter A , Ehlers A, and. Roper RL. Poxvirus Orthologous Clusters: toward Defining the Minimum Essential Poxvirus Genome. *Journal of virology* 2003, 77(13): 7590–7600

Van Regenmortel M.H., Mayo M.A., Fauquet C.M., Maniloff J. Virus nomenclature: consensus versus chaos. *Archives of Virology* 2000, 145(10): 2227-2232

Van Regenmortel MH. Fauquet CM, Bishop DH., Carstens EB., Estes MK, Lemon SM and al. Virus taxonomy : Classification and 200 nomenclature of viruses. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of viruses. Academic Press, New York San Diego, (2000)

Vanderplasschen A, Hollinshead M., Smith GL. Intracellular and extracellular vaccinia virions enter cells by different mechanisms. *Journal of General Virology* 1998, 79: 877-887

Vanderplasschen A, Smith GL. A novel virus binding assay using confocal microscopy : demonstration that intracellular and extracellular vaccinia virions bind to different cellular receptors. *Journal of Virology* 1997, 71: 4032 – 4041

Vazquez M.I, Esteban M. Identification of functional domains in the 14-kilodalton envelope protein (A27L) of vaccinia virus. *Journal of Virology* 1999, 73: 9098– 9109

Vora RV, Pilani AP, Kota RK. Extensive Giant Molluscum Contagiosum in a HIV Positive Patient . *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 2015, 9(11): WD01-WD02

Westwood JC, Boulter EA, Bowen ETA, Maber HB. Experimental respiratory infection with Poxvirus 1, Clinical, virological and epidemiological studies. *British Journal Experimental pathology* 1966, 47: 453 – 458

WHO. Technical Advisory Group on Human Monkeypox. Report of a WHO Meeting. Geneva, Switzerland 11-12 January 1999. WHO/CDS/CSR/APH/99.5

Wilson, D.E. and Reeder, D.E.M (editors). (2005). *Mammal species of the world. A taxonomic and geographic reference* (3rd ed) , Johns Hopkins University Press, 2,142 pp. (Available from Johns Hopkins University Press, 1-800-537-5487 or (410) 516-6900

World Health Organization ‘‘The Global Eradication of Smallpox, Final Report of the global commission for the certification of smallpox eradication ‘’ History. *Int. Public Health* . 1980a; N° 4 . WHO, Geneva.

Xiao Y, Aldaz-Carroll L, Ortiz AM, Whitbeck J C, Alexander E, Lou H. and al. A protein-based smallpox vaccine protects mice from vaccinia and ectromelia virus challenges when given as a prime and single boost. *Vaccine*, 2007; 25(7):1214-24.

Zaucha GM, Jahrling PB, Geisbert TW, Swearingen JR, Hensley L. The pathology of experimental aerosolized monkeypox virus infection in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Laboratory Investigation* 2001, 81(12): 1581-600

Zeller, H.G., Fontenille, D., Traore-lamizana, M., Thiongane, Y, Digoutte, J.P. Enzootic activity of Rift Valley fever virus in Senegal. *American Journal of tropical Medicine and Hygiene* 1997, 56 (3): 265-272.

Zichichi L, Maniscalco M. The challenges of a neglected STI: Molluscum contagiosum. *Giornal Italiano di Dermatologia e Venereologia*. 2012, 147(5):447-53.

ANNEXES

Annexes 1 : Documents d'autorisation de capture dans les aires protégés

Annexe 1a : Document d'autorisation de l'OIPR

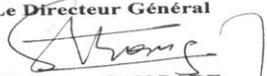
Annexe 1b : Document d'autorisation de la SODEFOR

Annexe 1c : Autorisation de transport d'Azote liquide

Document Annexe 1a : Autorisation de l'OIPR

	REPUBLIQUE DE CÔTE D'IVOIRE Union – Discipline – Travail ----- Ministère de la Salubrité, de l'Environnement et du Développement Durable ----- Office Ivoirien des Parcs et Réserves
N° <u>133</u> /MINSIEDD/OIPR/DG	Abidjan, le <u>06 MARS 2017</u>
<u>AUTORISATION D'ACCES</u>	
LE DIRECTEUR GENERAL DE L'OFFICE IVOIRIEN DES PARCS ET RESERVES	
Vu le courrier N/Réf : 002/ IPCI / DIR-1/2017/lk, formulé par le Directeur de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire le 23 février 201, relatif au renouvellement d'une autorisation d'accès et de prélèvement ;	
Vu le protocole de recherche joint au dossier ci-dessus visé ;	
En attendant la mise en place du Conseil Scientifique de l'Office Ivoirien des Parcs et Réserves ;	
AUTORISE	
L'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, à effectuer des captures de petits mammifères (Rongeurs, Musaraignes et Chauves-souris) dans les Parcs Nationaux du Banco et d'Azagny, et la Réserve Scientifique de Lamto, du 01^{er} février 2017 au 31 janvier 2018. Cette opération se situe dans le cadre de la surveillance des réservoirs animaux et environnementaux de microorganismes pathogènes, impliqués dans les maladies zoonotiques émergentes.	
Avant le début des activités de prélèvement, le responsable de l'équipe d'investigation pluridisciplinaire est invité à prendre toutes les dispositions nécessaires pour rencontrer et mettre à la disposition des gestionnaires des différentes aires protégées ciblées : <ul style="list-style-type: none">- La liste des équipes et le programme des activités de capture par Aire Protégée- Le nombre d'animaux à capturer pour chaque espèce ciblée.	
Au cours de leur séjour dans les parcs, les membres de l'équipe sont soumis au strict respect de la réglementation en vigueur dans les Parcs nationaux et Réserves de Côte d'Ivoire. Ils ne doivent en particulier, ni mutiler les espèces végétales et animales, ni se livrer à un quelconque acte de chasse ou de capture sortant du cadre du prélèvement décrit dans la demande adressée à l'OIPR.	
Le Directeur Technique et les Directeurs de Zone Sud et Zone Centre sont chargés de veiller à l'application de la présente autorisation.	
 Le Directeur Général Col. TONDOSSAMA Adama <i>Ingénieur en Chef des Eaux et Forêts</i>	
Ampliations : <ul style="list-style-type: none">- DZS- DZC	
06 B.P 426 Abidjan 06 / Tél. : (225) 22 41 40 59	

Document Annexe 1b : Autorisation de la SODEFOR

	SODEFOR SOCIÉTÉ DE DÉVELOPPEMENT DES FORÊTS SOCIÉTÉ D'ÉTAT
Direction Générale 195 <i>11/03/2015 01</i> Site de COCOP	Abidjan, le Prof. DOSSO Mireille Directrice de l'Institut Pasteur ABIDJAN
N/Réf. : N°/CTDG/FKK/CAK	
Objet : Votre demande d'autorisation d'accès et de prélèvement.	
Professeur, Nous avons accusé réception de votre demande citée en objet et vous en remercions. La gestion des forêts dont nous avons la charge inclut la protection de toutes leurs contenances qu'elles soient végétales, minérales ou animales. En conséquence, tout en vous marquant par la présente notre accord de principe pour vos recherches en forêt classée de Bossematié, nous voudrions attirer votre attention sur la nécessité d'éviter un prélèvement massif. Pour ce faire, nous vous prions de prendre contact avec le Centre de Gestion d'Abengourou (contact : 35913257/35914470) pour les modalités pratiques. Par ailleurs, vous voudriez bien nous transmettre copie du rapport d'étude. Veuillez agréer, Professeur , l'expression de mes cordiales salutations.	
	Le Directeur Général  Mamadou SANGARÉ Ingénieur des Eaux & Forêts
COPIE - MINEF (DGEF)	
<small>SIEGE SOCIAL: 01 B.P. 3770 ABIDJAN 01 - TEL.: (225) 22 48 30 00/ 22 44 46 16 -FAX: (225) 22 44 02 40 R.C. ABIDJAN 169778 - C.C. 5013117C - SODEFOR C.I. / info@sodefor.ci - www.sodefor.ci</small>	

Document Annexe 1c : Autorisation de transport d'Azote liquide

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

REPUBLIQUE DE COTE D'IVOIRE
union- discipline- travail



Institut Pasteur de Côte d'Ivoire
Tél. 22 48 53 63
01 BP 490 Abidjan 01

Autorisation de transport d'Azote liquide

Je soussignée, Pr **Dosso Mireille**, Directrice de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire (IPCI), autorise Docteur MEITE Syndou Médecin microbiologiste, Responsable du projet Orthopoxvirus, à transporter de l'**azote liquide de 35 litres** d'Abidjan à Abengourou - Bondoukou dans le cadre d'une mission de capture du 20 au 27 Février 2017.

Fait à Abidjan le 10/02/2017

 *[Signature]*
Le Directeur

Annexe 2 : Matériels de capture des micromammifères

Annexe 2a : Piège de type Chauvancy en position armée

Annexe 2b: ligne de trous-pièges Pitfalls: Dispositif comprenant une barrière obligeant le rongeur à se diriger vers le puits

Annexe 2a : Piège de type Chauvancy en position armée



Annexe 2b : ligne de trous-pièges Pitfalls: Dispositif comprenant une barriere obligeant le rongeur à se diriger vers le puits



Annexe 3 : Document de collecte des données de capture des micromammifères

Annexe 3a : Fiche de relevé de piégeage-village

Annexe 3b : Fiche de relevé de piégeage-extérieur

Annexe 3a : Fiche de relevé de piégeage-village

Localité :		Date
Coordonnées GPS :		
Nombre de personnes au foyer:		
N° ligne:		
Matrice paysagère :		
Position, Intérieur :		Nombre de pièce :
Extérieur :		Composition :
		Structure :
	Nombre de pièges posés	Nombre de captures
1^{er} Jour		
2^{ème} Jour		
3^{ème} Jour		
Divers : traces d'activités, plantes ou commentaires des personnes habitant la maison etc...		

Annexe 3b : Fiche de relevé de piégeage-extérieur

Localité :	Date :
Coordonnées GPS :	
Nombre de personnes au foyer:	
N° ligne:	
Matrice paysagère :	
Habitat	Composition :
	Structure :
	Position :

Rappel : composition= identification végétale, Structure= formations linéaires, compactes (haies, champ, bois), position= lisière, périphérique ou interne, si lisière, préciser l'habitat adjacent

	Nombre de pièges posés	Nombre de captures
1^{er} Jour		
2^{ème} Jour		
3^{ème} Jour		

Divers : traces d'activités, plantes ou commentaires des personnes fréquentant les lieux etc...
--

Annexe 4 : Document de collecte des données d'autopsie et de prélèvement

Annexe 4a : Fiche de prélèvement

Annexe 4b : Fiche d'autopsie

Annexe 5 : les équipements d'analyses moléculaires

Annexe 5a : Appareil d'amplification PCR classique

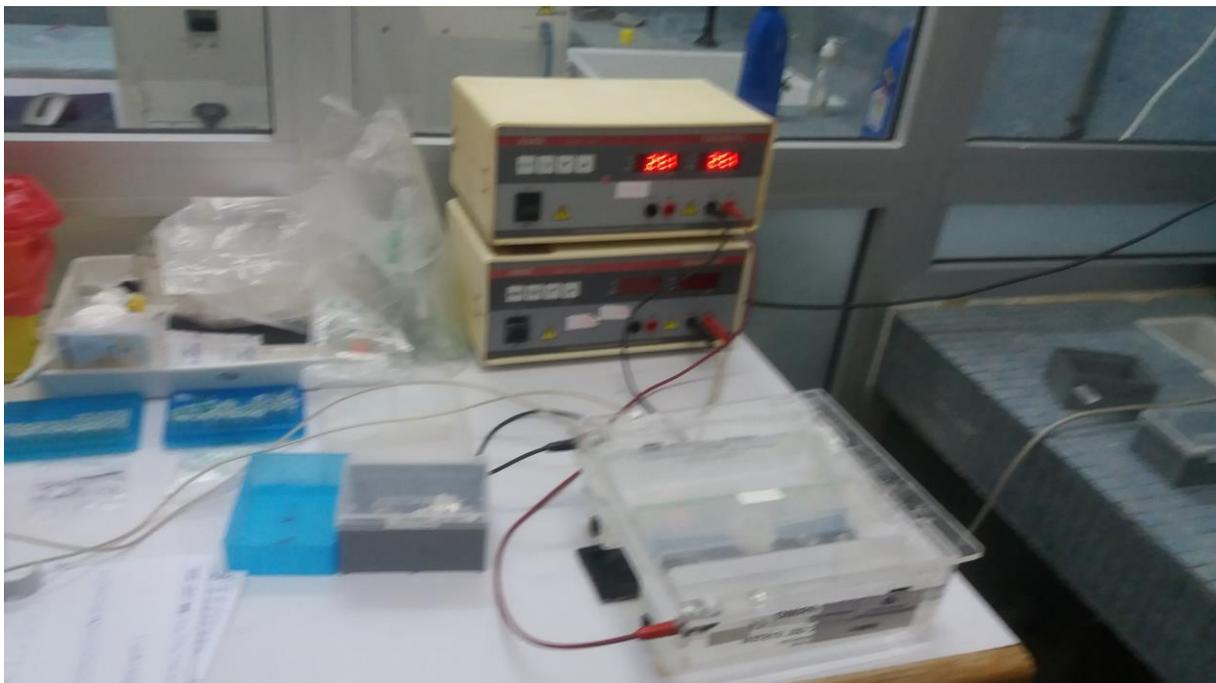
Annexe 5b : Equipement de migration de l'ADN

Annexe 5c : Appareil de revelation de l'ADN

Annexe 5d : Appareil d'amplification PCR temps réel



-Annexe 5a : Appareil d'amplification PCR classique (Thermocycler de type GeneAmp PCR System 9700 pour l'amplification de l'ADN)



Annexe 5b : Equipement de migration de l'ADN (Bac d'électrophorèse)



Annexe 5c : Appareil de revelation de l'ADN (Gel Doc)



Annexe 5d : Appareil d'amplification PCR temps réel (Appareil 7500 Fast et One step plus pour PCR temps réel)

Annexe 6 : Documents de collecte des données chez l'homme

Annexe 6a : Fiche épidémiologique fièvre jaune rougeole

Annexe 6b : Fiche d'enquête eruption Fébrile

Annexe 6a : Fiche épidémiologique Fievre jaune et Rougeole page 1

Ministère de la santé et de la lutte contre le SIDA République de Côte d'Ivoire
Union - Discipline - Travail

**SURVEILLANCE INTEGREE DES MALADIES ET REPOSE (SIMR)
FORMULAIRE GENERIQUE DE NOTIFICATION DES MALADIES (LABORATOIRE)**

Si les échantillons sont prélevés pour l'analyse au laboratoire

Formation Sanitaire			District			Région			RESERVE AU NIVEAU NATIONAL Date de Reception au niveau national : ____/____/____ N° Identification nationale : ____-____-____		
<input type="checkbox"/> Choléra	<input type="checkbox"/> Diarrhée Sanglante	<input type="checkbox"/> Dracunculose	<input type="checkbox"/> Tétanos Néonatal	<input type="checkbox"/> Rougeole	<input type="checkbox"/> Méningite	<input type="checkbox"/> Peste	<input type="checkbox"/> Fièvre Hemorragique virale	<input type="checkbox"/> Fièvre Jaune	Autres		
N° Identification : ____-____-____		Région : ____	District : ____	Année : ____	N° du cas : ____	Date de Réception au District : ____/____/____	Date d'envoi au niveau national : ____/____/____				

Nom du Malade : _____ **Sexe :** M Masculin F Féminin
Date de naissance : ____/____/____ **Age (Si date de naissance inconnue, préciser l'âge en Années, Mois ou Jours) :** ____
Domicile du malade : Village / Quartier _____ U=Urbain R=Rural
Ville : _____ **DISTRICT DE RESIDENCE** _____
Filiation (applicable si néonatal ou enfant) Nom du père : _____ **Nom de la mère** _____

Pour la formation sanitaire : Si un échantillon est collecté, compléter les informations suivantes et envoyer une copie de ce formulaire au laboratoire, avec l'échantillon.
Date début de la Maladie : ____/____/____
Date de collecte de l'échantillon : ____/____/____
Type d'échantillon : Selles Sang LCR Autre _____
Date d'envoi de l'échantillon au laboratoire : ____/____/____

Pour le laboratoire : Remplir cette section et retourner la fiche à l'équipe du district et au clinicien

Maladie / Affection	Type de test	Resultats (P= en Attente)	Maladie / Affection	Type de test	Resultats
Cholera	Culture	+ - P	Fièvre Jaune	IgM	+ - P
Méningite	Examen Direct	+ - P	Rougeole	IgM	+ - P
			Rubéole	IgM	+ - P
N. meningitidis	Culture	+ - P	RVF	IgM	+ - P
S. pneumonia	Culture	+ - P	Ebola	IgM	+ - P
H. influenza	Culture	+ - P	CCHF	IgM	+ - P
N. meningitidis	Latex	+ - P	Lassa	IgM	+ - P
S. Pneumonia	Latex	+ - P	Marburg	IgM	+ - P
H. influenza	Latex	+ - P			
Shigella dysenteriae	Culture	SD type 1 Autre shig Pas shig			
Peste	Culture	+ - P			
	IFA > 1: 64	+ - P			

Date réception de l'échantillon au laboratoire : ____/____/____ **Condition de l'échantillon :** Adéquat Non adéquat
Autres résultats de laboratoire : _____ **Autres tests en attente :** _____
Date d'expédition des résultats au district : ____/____/____
Nom du laboratoire produisant les résultats : _____

Date de réception des résultats au district : ____/____/____
Date d'envoi des résultats au clinicien par le district : ____/____/____
 NOTE: Le district est responsable de l'envoi des résultats labo aux cliniciens. Une défaillance à ce niveau compromettra la collaboration avec les cliniciens chargés de notifier les cas dans le futur

Annexe 6a : Fiche épidémiologique Fievre jaune et Rougeole page2

Ministère de la santé et de la lutte contre le SIDA

République de Côte d'Ivoire
Union - Discipline - Travail

SURVEILLANCE INTEGREE DES MALADIES ET REPONSE (SIMR)
FORMULAIRE GENERIQUE DE NOTIFICATION DES MALADIES (SURVEILLANCE)

Formation Sanitaire District Région			RESERVE AU NIVEAU NATIONAL Date de Reception au niveau national : ____/____/____ N° identification nationale : ____-____-____							
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Choléra	Diarrhée Sanglante	Dracunculose	Tétanos Néonatal	Rougeole	Méningite	Peste	Fièvre Hemorragique virale	Fièvre Jaune	Autres	•
N° Identification : ____-____-____-____ ____/____/____ ____/____/____ <div style="display: flex; justify-content: space-around; font-size: small;"> Région District Année N° du cas Date de Réception au District Date d'envoi au niveau national </div>										
Nom du Malade : _____					Sexe : <input type="checkbox"/> M Masculin <input type="checkbox"/> F Féminin					
Date de naissance : ____/____/____ Age (Si date de naissance inconnue, préciser l'âge en Années, Mois ou Jours) :										
Domicile du malade : Village /Quartier _____					<input type="checkbox"/> U=Urbain <input type="checkbox"/> R=Rural					
VILLE : _____					DISTRICT DE RESIDENCE : _____					
Filiation (applicable si néonatal ou enfant) Nom du père : _____ Nom de la mère _____										
Date d'accueil à la formation sanitaire : ____/____/____										
Date de notification de la formation sanitaire au district : ____/____/____										
Date d'enquête : ____/____/____										
Date début de la Maladie : ____/____/____										
Nombre de doses de vaccin reçu en rapport avec la maladie : _____ (Rougeole, Tétanos Néonatal (TT de la mère), Fièvre Jaune, Méningite seulement)										
Date de la dernière vaccination (VAR, VAT, VAA, VAM documenter par carte ou histoire) : ____/____/____										
Mode de Suivi du Malade : <input type="checkbox"/> Hospitalisé <input type="checkbox"/> Externe				Issue du patient <input type="checkbox"/> Vivant <input type="checkbox"/> Décédé <input type="checkbox"/> Inconnu						
Classification finale : <input type="checkbox"/> Confirmé par le laboratoire <input type="checkbox"/> Confirmé par lien épidémiologique <input type="checkbox"/> Probable /Compatible <input type="checkbox"/> Écarté <input type="checkbox"/> Résultat en attente										
Nom de la personne qui a rempli le formulaire : _____					Adresse téléphonique : _____					
Date d'envoi du formulaire au district : ____/____/____										

Annexe 6b : Fiche d'enquête éruption Fébrile

THEME : *Orthopoxvirus* dans les éruptions cutanées virales en Côte d'Ivoire

Identité du patient

Date :

N° d'enregistrement :

N° dossier patient

Age :

Sexe :

Lieu de résidence :

Profession :

Motif de consultation :

Signes cliniques

Date d'apparition :

Fièvre

Adénopathie

macules

Papules

Pustules

Vésicules

Croutes

Siège ;

Autres signes:

Diagnostic clinique :

Prélèvement

Date de prélèvement

Heure de prélèvement :

Type de prélèvement : Sécrétion cutanée

Sécrétions oropharyngées

Sang

Etude virologique

PCR temps réels

PCR classique

Culture

Microscopie électronique

Sérologie

Diagnostic virologique

Annexe 7 : Fiche de mise à disposition des échantillons biologiques du CeReb

 Institut Pasteur Côte d'Ivoire Centre des ressources biologiques Unité chargée de la gestion des échantillons (UGEC)	Fiche technique	RÉF : BIOB/UGRM/003
	FICHE DE DEMANDE DE MISE A DISPOSITION DES ECHANTILLONS	Version : 1 Date d'application 15/12/14 Révision : Page 1 sur 3

NB : La présente fiche comprend 3 grandes Parties que sont :

- 1- les engagements légaux, éthiques et réglementaires du demandeur*
- 2 – le cadre de la demande et les conditions d'envoi souhaitées par le demandeur*
- 3- les spécifications des microorganismes demandés*

L'acceptation de toute demande de mise à disposition est conditionnée par le renseignement correct de chacune de ces 3 parties

I- Engagements légaux, éthiques et réglementaires

Je soussigne,..... Responsable de..... par la présente fiche :

- Reconnais avoir adressé une demande de mise à disposition de microorganismes à la CRB-IPCI
- Déclare être parfaitement conscient de mes obligations légales et déontologiques une fois ces microorganismes mis à ma disposition
- Déclare être parfaitement conscient des risques rattachés à chaque microorganisme dont j'ai fait la demande de mise à disposition

Je m'engage également par la présente fiche, en ma qualité d'utilisateur à :

- Respecter la législation en vigueur ainsi que les recommandations de l'OCDE et de l'OMS pour l'utilisation des échantillons biologiques dans le cadre de recherches scientifiques
- Ne pas prêter ni céder au profit d'un tiers les échantillons mis à disposition sans accord préalable mis par écrit du CRB-IPCI
- Ne pas céder au profit d'un tiers les échantillons fournis par le CRB-IPCI, dans un but autre que celui de la poursuite des Motifs telles qu'exposées dans la demande.
- Ne pas utiliser les échantillons ou leurs dérivés dans un but lucratif.
- Citer le CRB-IPCI dans toutes publications scientifiques découlant des résultats obtenus à partir du matériel biologique mis à disposition (au rang d'auteur ou dans les remerciements selon le cas et dans les Méthodes)
- Informar le CRB-IPCI des résultats obtenus et des publications éventuelles qui découlent de la recherche entreprise.

Fait à Abidjan le.....

Signature et cachet du responsable de la demande

Rédigé par : Dr MONEY Marcelle	Contrôlé par : Dr Kouamé Clarisse	Approuvé par : Pr Dosso Mireille
--------------------------------	-----------------------------------	----------------------------------

 Institut Pasteur Côte d'Ivoire Centre des ressources biologiques Unité chargée de la gestion des échantillons (UGEC)	Fiche technique	RÉF : BIOB/UGRM/003
	FICHE DE DEMANDE DE MISE A DISPOSITION DES ECHANTILLONS	Version : 1 Date d'application 15/12/14 Révision : Page 2 sur 3

II- RENSEIGNEMENT DE LA DEMANDE DE MISE A DISPOSITION

Département : Unité

Date et Heure de dépôt de la demande a la salle de prétraitement:

Cadre de la demande des Spécimens :

Projet recherche Mémoire rôle qualité interne rôle qualité externe (Préciser).....

Si Projet recherche, Mémoire, Précisez :

Le thème de l'étude.....

Et l'intitulé actuel de l'étude:.....
.....

ORIGINE SPECIMENS	NOMBRE DE SPECIMENS DEMANDE (Précisez)	CONDITIONNEMENT SOUHAITE POUR L'ENVOI DES SPECIMENS (Cochez)			DATE SOUHAITEE POUR LA MISE A DISPOSITION
		<i>Cryotube</i>	<i>Bouillon</i>	<i>Autre (précisez)</i>	
Humaine					
Environnementale					
Animale					
Végétale					

Signature et cachet du responsable de la demande.....

Rédigé par : Dr MONEY Marcelle	Contrôlé par : Dr Kouamé Clarisse	Approuvé par : Pr Dosso Mireille
--------------------------------	-----------------------------------	----------------------------------

 Institut Pasteur Côte d'Ivoire Centre des ressources biologiques Unité chargée de la gestion des échantillons (UGEC)	Fiche technique	RÉF : BIOB/UGRM/003
	FICHE DE DEMANDE DE MISE A DISPOSITION DES ECHANTILLONS	Version : 1 Date d'application 15/12/14 Révision : Page 3 sur 3

III-LISTE ET SPECIFICATION DES MICROORGANISES A METTRE A DISPOSITION

Numéro d'ordre	Origine de l'échantillon	Numéro d'origine	Date de transfert à la CRB-IPCI
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			
18			
19			
20			

Signature et cachet du responsable de la demande.....

Partie réservée à la biobanque :

Date et Heure d'arrivée de la demande à la Biobanque:.....

Non, Prénom et signature du réceptionniste à la Biobanque:.....

Rédigé par : Dr MONEY Marcelle	Contrôlé par : Dr Kouamé Clarisse	Approuvé par : Pr Dosso Mireille
--------------------------------	-----------------------------------	----------------------------------

Annexe 8 : Collecte de fluides oraux en utilisant le matériel de prélèvement OraCol

Annexe 6 : Collecte de fluides oraux en utilisant le matériel de prélèvement OraCol



1) Matériel de prélèvement dans son emballage stérile



2) Retirer le matériel de prélèvement Oracol de son emballage



3) Frotter doucement l'écouvillon en éponge le long des gencives (à la base des dents si ces dernières existent) pendant environ 1 minute. Se servir de l'écouvillon en éponge comme d'une brosse à dent



4) Remettre l'écouvillon en éponge dans son tube et inscrire les informations d'identification de l'échantillon.

Annexe 9: Photographie de specimens de micromammifères



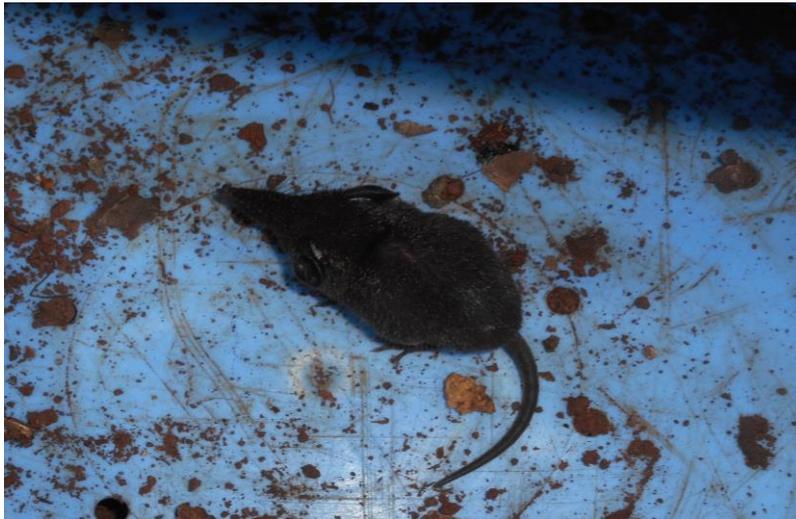
Photographie de *Cricetomys emini*



Photographie de *Cricetomys gambianus*



Photographie de *Funisciurus sp*



Photographie de *Crocidura obscurior* pris dans un piège pitfalls



Photographie de *Crocidura olivieri*



Photographie de *Lophuromys sikapusi*



Photographie de *Malacomys longipes*



Photographie de *Mastomys natalensis*



Photographie de *Mus musculus*



Photographie de *Myomys datoni*



Photographie de *Praomys sp*



Photographie de *Uranomys rudd*

RESUME

JUSTIFICATION : *Monkeypoxvirus* ou virus de la variole du singe est un *Orthopoxvirus* de la famille des *Poxvirus*, responsable d'éruption fébrile identique à celle de la variole à un degré moins sévère. Son réservoir potentiel serait *Funisciurus anerythrus* et la transmission à l'homme se fait généralement par contact avec le réservoir. Il s'agit d'une zoonose qui émerge chez l'homme depuis l'arrêt de la vaccination contre la variole. Son évolution épidémiologique et clinique de ces dernières années en font une préoccupation mondiale.

OBJECTIF : La présente étude avait pour but de confirmer la circulation des *Orthopoxvirus* en particulier le *Monkeypoxvirus* en Côte d'Ivoire. Il s'agissait spécifiquement d'identifier le virus à travers ses réservoirs potentiels, de déterminer la seroprévalence de l'infection à *Orthopoxvirus* afin d'avoir une idée de l'exposition de la population au virus et déterminer sa place dans les lésions cutanées fébriles en Côte d'Ivoire.

METHODOLOGIE : Cette étude a été réalisée entre 2013 et 2017 avec deux volets. Un volet animal où des captures de micromammifères ont été réalisées sur 9 sites répartis en trois zones dont la zone périurbaine, la zone péri rurale et la zone des aires protégées. Les tissus de foie, de poumon et de rein des micromammifères capturés ont été prélevés et analysés par PCR classique et PCR en temps réel pour rechercher le virus. Un volet humain portant sur des biocollections de sérums et de flux oraux collectées lors de la surveillance nationale de fièvre jaune et de rougeole entre 2013 et 2017 et des prélèvements cutanés de lésions suspectes de *Molluscum contagiosum* dans les services de Dermatologie du CHU de Yopougon et de Treichville. Les tests sérologiques ont concerné les sujets de moins de 30 ans afin d'éliminer toute immunisation par la vaccination contre la variole. Des anticorps IgG anti-*Orthopoxvirus* ont été recherchés par la méthode ELISA et les *Poxvirus* dont le *Monkeypoxvirus* ont été recherchés par PCR classique et PCR en temps réel.

RESULTATS : Concernant le volet animal, pour 4930 nuit-piège, 256 micromammifères ont été capturés soit un rendement de 5,19%. *Crocidura*, de *Rattus*, de *Lophuromys*, de *Praomys*, de *Mus* et de *Mastomys* ont été les plus capturés. 0,19% d'échantillons étaient positifs pour la recherche d'*Orthopoxvirus*, aucun *Monkeypoxvirus* n'a été retrouvé. Chez l'homme, sur un effectif de 255 chez des sujets de moins de 30 ans, la prévalence pour la recherche des anticorps IgG anti-*Orthopoxvirus* était de 4,93% avec des taux d'IgG variant entre 100 et 800. Dans la moitié sud de la Côte d'Ivoire se trouvaient 80% des sujets positifs. Chez les patients suspects de rougeole dont la recherche du virus de la rougeole et de la rubéole était négative et les patients suspects d'infection à *Molluscum*

contagiosum virus, la recherche des *Orthopoxvirus* a été négative. La recherche de *Molluscum contagiosum virus* a été confirmée chez 100% des patients suspects de l'infection à *Molluscum contagiosum*. **CONCLUSION :** La circulation des *Orthopoxvirus* reste très faible en Côte d'Ivoire sans la confirmation de la présence de *Monkeypoxvirus* à travers notre étude. Cependant la présence d'*Orthopoxvirus* chez *Crocidura*, un micromammifère de l'environnement immédiat de l'homme nécessite la mise en place de mesures de surveillance de ce groupe de virus.

MOTS CLES : Poxvirose - *Monkeypoxvirus* – réservoir – Côte d'Ivoire

ABSTRACT

BACKGROUND: *Monkeypoxvirus* is an *Orthopoxvirus* of the family *Poxvirus* which is responsible for febrile eruption identical to that of smallpox at a less severe degree. Its potential reservoir should be *Funisciurus anerythrus* and transmission to humans is usually occur by contact with the reservoir. It is a zoonosis that has emerged in humans since the cessation of vaccination against smallpox. Its epidemiological and clinical evolution in recent years make it a worldwide concern. **METHODOLOGY:** This study was conducted between 2013 and 2017 with two components. An animal component , micromammal captures were carried out at 9 sites in three zones, including the peri-urban zone, the peri-rural zone and the protected areas zone. The liver, lung and kidney tissues of captured micromammals were collected and analyzed by standard PCR and real-time PCR to search for the virus. A human component dealt with biocollections of sera and oral fluids collected during the national surveillance of yellow fever and measles between 2013 and 2017 and cutaneous samples of suspicious lesions of *Molluscum contagiosum* in the Dermatology departments of Yopougon and Treichville University Hospitals. Serologic testing involved subjects under 30 in order to eliminate any immunization by vaccination against smallpox. Anti-Orthopoxvirus IgG antibodies were investigated by the ELISA method and Poxviruses including *Monkeypoxvirus* were searched by classical PCR and real-time PCR. **RESULTS:** Regarding the animal component, for 4930 night-traps, 256 micromammals were caught, ie a yield of 5.19%. *Crocidura*, *Rattus*, *Lophuromys*, *Praomys*, *Mus* and *Mastomys* were the most captured. 0.19% positive samples for *Orthopoxvirus*, no *Monkeypoxvirus* was found. In humans, out of a total of 255 in subjects less than 30 years old, the prevalence for anti-Orthopoxvirus IgG antibodies was 4.93% with IgG levels ranging from 100 to 800. In the southern part of Côte d'Ivoire

were 80% positives. In patients suspected of measles with measles and rubella virus negative and patients suspected of Molluscum contagiosum virus infection, the search for *Orthopoxvirus* was negative. The search for *Molluscum contagiosum virus* has been confirmed among 100% of patients suspected of being infected with *Molluscum contagiosum*.

CONCLUSION: The circulation of *Orthopoxviruses* remains very weak in Ivory Coast without the confirmation of the presence of *Monkeypoxvirus* through our study. However, the presence of *Orthopoxvirus* in *Crocidura*, a micromammal living in the immediate environment of humans requires the establishment of surveillance measures of this group of viruses

KEY WORDS: Poxvirose - *Monkeypoxvirus* - reservoir – Côte d'Ivoire

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

ORIGINAL ARTICLE

AFRICAN JOURNAL OF CLINICAL AND EXPERIMENTAL MICROBIOLOGY MAY 2017 ISBN 1595-689X VOL18 No. 2
AJCEM/1713 <http://www.ajol.info/journals/ajcem>
COPYRIGHT 2017 <https://dx.doi.org/10.4314/ajcem.v18i2.5>
AFR. J. CLN. EXPER. MICROBIOL. 18 (2): 86- 91

MOLECULAR DIAGNOSTICS BY PCR OF POXVIRUSES (ORTHOPOXVIRUS (OPV) AND MOLLUSCUM CONTAGIOSUM VIRUS (MCV)) IN CÔTE D'IVOIRE WEST AFRICA

Meite S^{1,2}, Coulibaly N. D¹, Boni-Cissé C², Koffi KS², Sylla A¹, Kouassi KS¹, Mlan AP², Kouame SM¹, ZabaFS³, Ngazoa KS¹, Faye-Ketté H² DossouM²

1. Institut Pasteur Côte d'Ivoire, Platform of Molecular Biology, 2. Department of microbiology; Faculty of medical sciences FHB University Abidjan, 3. Laboratory of bacteriology virology , University hospital of Yopougon Abidjan

Correspondence: 22 BP 539 Abidjan Côte d'Ivoire. E mail: meitesynd@yahoo.fr

ABSTRACT

The *Orthopoxvirus* (OPV) and the *Molluscum contagiosum virus* (MCV) are Poxviruses involved in viruses skin lesions in humans. OPV infects many vertebrates and MCV mainly infects humans. A diagnostic confusion is often observed between the clinical lesions due to the different Poxviruses firstly and secondly with other viruses like the virus of the chickenpox. In Côte d'Ivoire, the diagnosis of MCV remains essentially clinical and that of OPV is non-existent despite the risk of circulation of the virus. This study aims to implement the molecular detection of the OPV and the MCV in Côte d'Ivoire. Material and method: *Cowpoxvirus* DNA and 21 DNA extracts from suspicious cutaneous lesions of the MCV were analyzed by conventional PCR. The consensus primers (EACP1, EACP2) designed from the surface hemagglutinin gene were used for the detection of the OPVs and the primers (MCV1, MCV2) targeting the K fragment of the MCV were used for the MCV's detection . A growing dilution series of the Cowpoxvirus DNA and the MCV allowed the study of the method's sensitivity used. The DNAs of *S.aureus*, *M. ulcerans*, VZV, HSV, the Measles virus and Varicella virus were used for the specificity tests. Results: The detection of the OPV from the Cowpoxvirus viral strain was positive with a positivity threshold at 10⁻¹ dilution. That of the MCV DNA from the suspected MCV's lesion was positive with a positivity threshold of up to 10⁻⁶ dilution. No non-specific amplification was observed with the DNAs of the other pathogens responsible for lesions Cutaneous. The clinical diagnosis of the MCV was confirmed by PCR in 18 out of the 21 patients, ie 85.71%. On the 3 patients with a negative MCV PCR, 2 were positive for the OPV PCR , reflecting the risk of confusion between clinical lesions due to Poxviruses.

Keywords: Molecular diagnostic, Poxviruses, West Africa

MISE AU POINT DU DIAGNOSTIC MOLECULAIRE PAR PCR DES POXVIRUS (ORTHOPOXVIRUS (OPV) ET MOLLUSCUM CONTAGIOSUM VIRUS (MCV)) EN COTE D'IVOIRE AFRIQUE DE L'OUEST.

Meite S^{1,2}, Coulibaly N D¹, Boni-Cissé C², Koffi KS², Sylla A¹, Kouassi KS¹, Mlan AP², Kouame SM¹, ZabaFS³, Ngazoa KS¹, Faye-Ketté H² DossouM²

1. Institut Pasteur Côte d'Ivoire, Platform of Molecular Biology, 2. Department of microbiology; Faculty of medical sciences FHB University Abidjan, 3. Laboratory of bacteriology virology , University hospital of Yopougon Abidjan

Correspondence: 22 BP 539 Abidjan Côte d'Ivoire.E mail: meitesynd@yahoo.fr

Résumé

Justification : *Orthopoxvirus* (OPV) et *Molluscum contagiosum virus* (MCV) sont des Poxvirus impliqués dans les lésions cutanées d'origine virale chez l'homme. OPV infecte de nombreux vertébrés et le MCV infecte essentiellement l'Homme. La confusion est souvent observée entre les lésions cliniques dues aux différents Poxvirus d'une part et d'autre part avec d'autres virus comme le virus de la varicelle. En Côte d'Ivoire, le diagnostic du MCV reste essentiellement clinique et celui des OPV est inexistant malgré le risque de circulation du virus. Cette étude vise à mettre au point la détection moléculaire des OPV et du MCV en Côte d'Ivoire. Matériel et méthode : ADN de *Cowpoxvirus* et 21 extraits d'ADN issus de lésions cutanées suspectes de MCV ont été analysés par PCR classique. Les amorces consensus (EACP1, EACP2) issus du gène de l'hémagglutinine de surface ont été utilisées pour la détection des OPV et les amorces (MCV1, MCV2) ciblant le fragment K de l'ADN du MCV ont été utilisées. Une série dilution croissante de l'ADN du *Cowpoxvirus* et du MCV ont permis l'étude de la sensibilité de la méthode utilisée. Les ADN de *S aureus*, de *M. ulcerans*, du VZV, du HSV, du Virus de la rougeole et du virus de la varicelle ont été utilisés pour les tests de spécificités. Résultats : La détection de l'OPV à partir de la souche virale *Cowpoxvirus* était positive avec un seuil de positivité à la dilution 10⁻¹. Celle du MCV à partir de l'ADN de lésion suspecte de MCV était positive avec un seuil de positivité pouvant aller jusqu'à la dilution 10⁻⁶. Aucune amplification non spécifique n'a été observée avec les ADN des autres pathogènes responsables de lésions cutanées. Le diagnostic clinique à MCV a été confirmé par la PCR chez 18 des 21 patients soit 85,71%. Sur les 3 patients à résultat PCR MCV négatif, 2 étaient positifs pour la PCR OPV traduisant le risque de confusion entre les lésions cliniques dues aux Poxvirus.

Mots clés : Diagnostic moléculaire - PCR - Poxvirus - Afrique de l'ouest

INTRODUCTION

Poxviruses are double-stranded DNA with cytoplasmic multiplication. They have a number of autonomous elements allowing this intracytoplasmic multiplication unlike the majority of other viruses [1]. Several genes of this family of viruses including Orthopoxviruses (OPV) and Molluscum contagiosum virus (MCV) are involved in skin infections in humans and other vertebrates.

Since the 1980s, the smallpox virus belonging to the Orthopox virus group has been eradicated [2]. However, viruses such as Monkeypox virus, Cowpox virus and other OPVs continue to infect humans accidentally but with a less severe degree of virulence than the smallpox virus [3]. Their eradication is problematic because they have many reservoirs. The emergence of Monkeypox virus, especially in Central Africa, with the epidemiological characteristics of the epidemic of 1996 - 1997 in Zaire [3] and the appearance of the virus in 2003 in the USA makes it a global concern. Clinically, confusion has already been made between certain oxic infections and chickenpox according to the literature [5, 6]. Côte d'Ivoire is a probable zone of virus circulation [7, 8]. Despite this fact, diagnostic methods for OPVs in general and Monkeypox virus in particular are non-existent.

The MCV is increasingly encountered with HIV infection. It is often involved in skin lesions in

children. To date, in Côte d'Ivoire, the diagnosis of this virus remains essentially clinical whereas atypical clinical forms were encountered with HIV infection [9, 10].

In order to monitor the emergence of this group of viruses in the population in Côte d'Ivoire, it could be necessary to set up molecular diagnostic tools to detect a certain number of viruses of this family.

MATERIALS AND METHODS:

This is an experimental study of the analytical type carried out at the Pasteur Institute of Côte d'Ivoire on the site of Adiopodoumé to the platform of molecular biology in 2016.

Biological material

In this study, the following biological products were used: strains of Cowpox virus derived from Cowpox virus culture on a Vero cell supplied by the Pasteur Institute of Bangui for the technical development of the detection of the Orthopoxviruses. Cutaneous lesions of 21 patients suspected of MCV infection for the detection of the Molluscum contagiosum virus. Microorganisms involved in cutaneous infections in Côte d'Ivoire from various biological products of patients were used for primer specificity tests (Table 1).

TABLE 1: PATHOGENS TESTED IN THE SPECIFICITY TEST OF PCR FOR THE ORTHOPOXVIRUS AND THE MOLLUSCUM C VIRUS

Number	Pathogens	Sample type	Laboratory where the pathogens used were isolated
Souche KN	<i>S. aureus</i>	Pus	UBY
258UB	<i>Mycobacterium ulcerans</i>	Cutaneous lesion	GER-Buruli
017 HSV	<i>Herpes simplex virus</i>	Cerebrospinal fluid	DVE
014 VZV	<i>Virus de la varicelle</i>	Cerebrospinal fluid	DVE
258 G	<i>Virus de la rougeole</i>	Oropharyngeal secretion	DVE

DVE: Department of epidemic viruses of the Pasteur Institute of Côte d'Ivoire, GER-Buruli: Research group on Buruli ulcer of the Pasteur Institute of Côte d'Ivoire, UBY: bacteriology unit of Hospital University Center of Yopougon

METHODS

Pre-treatment of samples
The cutaneous lesions were ground with mortar and dissolved in 2 ml of 1X PBS. They were then stored at -20 ° C until extraction of the DNA.

DNA extraction

The DNAs of the different microorganisms were extracted using the Nuclisens magnetic extraction protocol (Biomerieux). Briefly 400 µl samples were added to 800 µl of lysis buffer and incubated for 10 min. Then 40 µl of magnetic silica was added to the mix and incubated for 10 minutes at laboratory temperature. The solution was centrifuged for 30 s at 13000 rpm. A series of washing was carried out on the silica-DNA complex using the Minimag (Biomerieux). An elution buffer was used after washing to collect 25 µl of DNA.

Amplification and revelation

A PCR using consensus primers of *Orthopoxviruses* designed from the virus surface membrane HA gene were used (Forward: EACP1: 5 'ATG ACA CGA TTG CCA ATA C 3', Reverse: EACP2: 5 'CTA GAC TTT GTT TTC TG 3 '); the desired PCR product band size being 942 bp[11]. Amplification conditions were as following for the detection of *Orthopoxviruses*: 94 ° C 5 min (1 cycle), 94 ° C 30 sec, 48 ° C 1 min, 72 ° C 1 Min) (36 cycles), 72 ° C 8 min (1 cycle). Concerning the *Molluscum contagiosum virus*, primers targeting the fragment K gene of the virus DNA were used (MCV Primer1: 5'CCGATCTTTGCGAGCGTTCTTAA 3' 'MCV Primer 2: 5'TCCCATAACAGCGAGGACAGCATA 3'), the desired PCR product being 167 bp size[12]. Amplification conditions: 94 ° C 5 min (1 cycle), 94 °

C sec, 65 ° C C 1 min, 72 ° C 1 min) (36 cycles), 72 ° C 8 min (1 cycle)

The GoTaq G2 Flexi DNA polymerase kit (Promega Corporation, USA) was used for the PCR mixes containing 0.2µM of each primer, 1.5µM, MgCl, 0.1µM dNTPs, 1 unit Taq polymerase, 1X of buffer and 5µl of DNA template for a final volume of 50µl. The revelation was made on a GelDoc Bioanalyzer (BioRad) after electrophoresis on 1.5% agarose gel.

Study of sensitivity
It was made from a dilution series from the DNA extracted of the *Cowpoxvirus* viral strain for *Orthopoviruses* and a positive DNA MCV sample.

Study of the specificity
It was realized by carrying out PCR from the

primers specific to OPV (EACP1, EACP2) and MCV (MCV1, MCV2) in the presence of DNA from different microorganisms mentioned in Table 1.

RESULTS

The PCR carried out using our positive Cowpox virus DNA control allowed us to validate our method of amplification. Indeed, two samples corresponding to the pure sample and the dilutions 10^{-1} of our controls were positive (FIG. 1). The dilution series of 10^{-2} to 10^{-5} of the Cowpox virus DNA control obtained from 200 µl of viral strain on Véro cell being negative by PCR thus fixing the detection threshold of our method at 10^{-1} for a volume of 200 µl of viral strain. No amplification was detected with the DNAs from other pathogens frequently involved in cutaneous infections in Côte d'Ivoire (Figure 2).

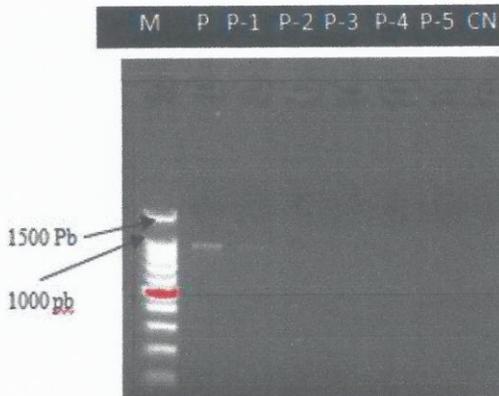


FIG 1 :DILUTION SERIES OF COXPOXVIRUS DNA

(P = undiluted Cowpoxvirus DNA, P-1 to P-5 = dilution series

CN: Negative control M: Marker (1500 bp to 100 bp)

This sensitivity could improve by performing extraction with a larger volume of viral strain.

The MCV detection tests were performed using cutaneous lesions from 21 patients diagnosed with

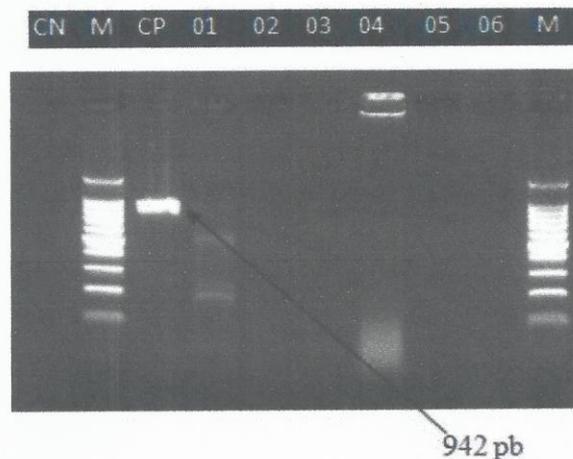


FIG 2 : SPECIFICITY TEST RESULT

CP = Cowpoxvirus (942 bp), 01 = MCV, 02 = 845 G (Measles virus, 03 = 258sub (*M ulcerans*), 04 = *S aureus*, 05 = 014 VZV (varicella

MCV infection clinically. The patients had the epidemiological and clinical characteristics presented in Table 2.

TABLE 2: CHARACTERISTICS OF THE 21 PATIENTS WHOSE SAMPLES WERE TESTED FOR THE DETECTION OF MCV

Number	Age	Sex	Clinical Lésion
1/YOP	15 Months	M	PAPULES
2/YOP	8 Years	M	PAPULES
5/YOP	24 Years	F	PAPULES
6/YOP	7 Years	F	VESICLES
7/YOP	4 Years	M	CRUSTS
8/YOP	3 Years	M	VESICLES
9/YOP	5 Years	F	MACULES
10/YOP	4 Years	F	PUSTULES
11/YOP	3 Years	M	MACULES
12/YOP	13 Years	M	VESICLES
13/YOP	7 Years	F	MACULES
14/YOP	5 Years	F	MACULES
2306	6 Years	F	VESICLES
2503	4 Years	F	PAPULES
2602	4 Years	F	VESICLES
2648	6 Years	F	PAPULES
2649	9 Years	M	PAPULES
2650	6 Years	F	PAPULES
2647	3 Years	F	PAPULES
2761	2 Years	F	Unspecified
2762	28 Years	F	Unspecified

A test for detection of MCV was carried out with the first three samples (1 / YOP, 2 / YOP, 5 / YOP). Each sample was diluted to 10^{-1} to reduce the risk of

PCR inhibition (Figure 3). The 167 bp PCR product was revealed for all three samples corresponding to positive MCV detection results.

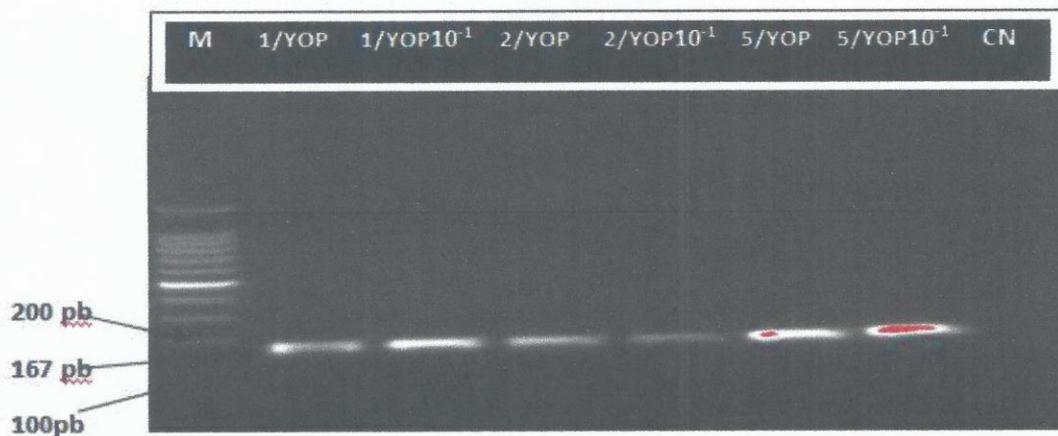


FIGURE 3: MCV PCR TEST OF SAMPLES
1/YOP, 2/YOP and 5/YOP, CN = negative control

A dilution series of 10^{-1} to 10^{-9} was carried out with the 1 / YOP sample in order to determine the sensitivity threshold of the PCR. Positive bands were observed up to 10^{-6} dilution (Figure 4). The specificity tests carried out with the DNA of other pathogens did not reveal nonspecific amplifications due to microorganisms often involved in human skin lesions. Of the 21 suspected samples of MCV

infection, 18 were confirmed on the 21, ie 85.71% agreement between the clinic and the molecular test used. Samples 2503, 2306 and 010/YOP were negative (Figure 5). Of the three negative samples, two were found to be positive for the conventional PCR detection of OPVs of sample 2503 and 010/YOP.

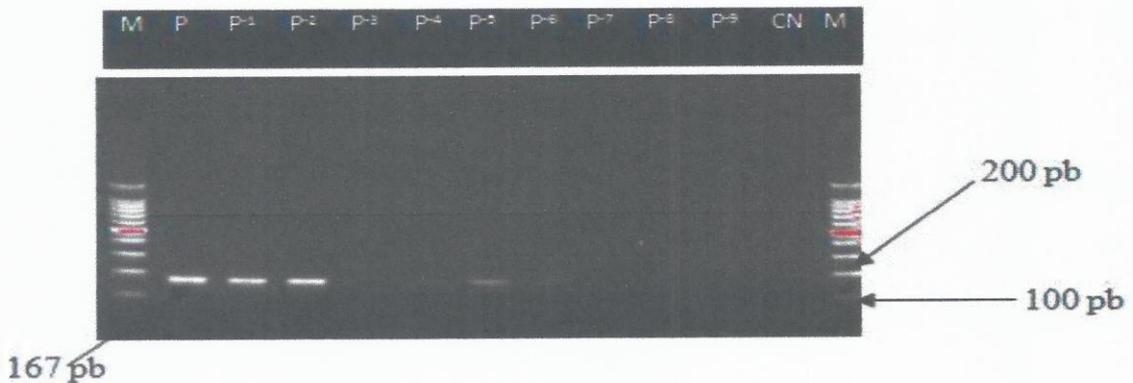


FIG 4: MCV DNA DILUTION SERIES

(P = undiluted MCV DNA, P⁻¹ to P⁻⁹ = dilution series, CN: Negative Control M: Marker (1500 bp to 100 bp)

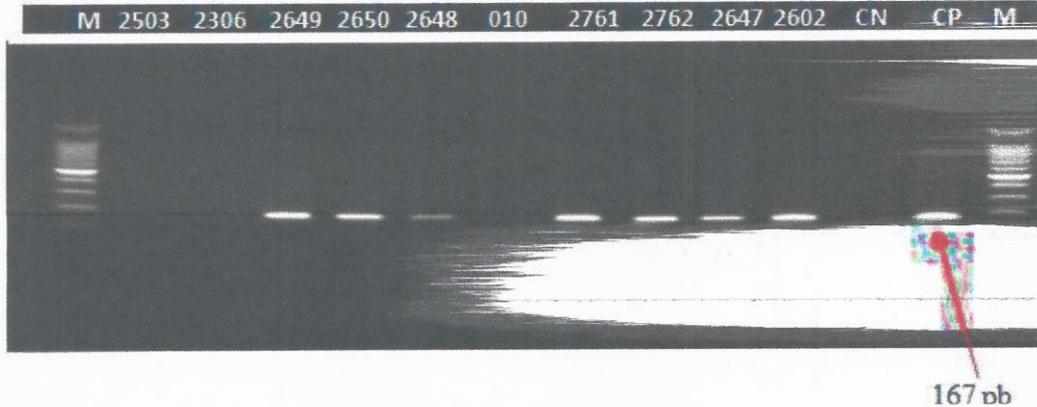


FIG 5 : RESULTS OF PATIENTS SUSPECTED OF MCV INFECTIONS

2503, 2306 and 010 = 10/YOP are negative. CN: Negative control CP: Positive control, M: Marker (1500 bp to 100 bp)

DISCUSSION

Molecular tools are increasingly being developed for the diagnosis of *Poxviruses* [13, 14, 15]. They have the advantage, on the one hand, of making a rapid and precise diagnosis and of others by avoiding the constraints of biosafety and biosurety related to the cultivation of *Poxviruses*; this development of the molecular detection for *Poxviruses* in our laboratory falls within this framework. It is one of the first studies in the establishment of the molecular diagnosis of *Poxviruses* in human medicine in Côte d'Ivoire. Despite the fact that this study may present biases related to the absence of a reference strain of

Poxvirus whose acquisition remains subject to rigorous measures in this context of global bioterrorism, this study constitutes a starting point in the implementation of the development of molecular tools for the detection of *Poxviruses* in Côte d'Ivoire. A discrepancy between the clinical diagnosis of MCV infection and the molecular outcome in three patients was observed in this study. Thus, two of the patients presented with OPV lesions. This clinical confusion is related to the similarity between the clinical lesions due to the different genera of the *Chordopoxviridae* subfamily. Thus, co-circulations have also been reported [16,

17, 18], hence the need for a biological diagnosis despite the strong clinical suspicion.

CONCLUSION

The emergence of Monkeypox virus in Central

Africa is a signal for West Africa. It is necessary to set up rapid diagnostic methods. This study is part of this approach. However, its sensitivity needs to be improved. Real-time PCR implementation is also a solution.

REFERENCES

1. Smith GL. Genus Orthopoxvirus : vaccinia virus. In : Schmidt A, Wolff MH, Kaufman SHE, eds. Poxviruses. Basel :BirkhäuserVerlag 2007 : 1-45.
2. World Health Organization (1980a) "The Global Eradication of Smallpox, Final Report of the global commission for the certification of smallpox eradication " Hist. Int. Public Health , N° 4 . WHO, Geneva.
3. Hutin Yvan J.F, Joel Williams R, Malfait P, Redody R, Loparev VN, Ropp SL and al. Outbreak of Human Monkeypox, DEMOCRATIC Republic of Congo, 1996 - 1997. Emerging Infectious Diseases. 2001;7(3): 434 - 38
4. Reynolds MG and al. A silent enzootic of an orthopoxvirus in Ghana, West Africa:Evidence for Multi-Species involvement in the absence of widespread Human Disease. Am. J. Trop.Med. Hyg.2010;82 (4): 746-754
5. Jezek Z, Szczeniowski M, Paluku KM, Mutombo M, Grab B. Human monkeypox: confusion with chickenpox. Acta Trop 1988; 45:297-307.
6. Adam MacNeil , Mary G. Reynolds , Darin S. Carroll , Kevin Kareem , Zach Braden , Ryan Lash , AmbaMoundeli and al. Monkeypox or Varicella? Lessons from a Rash Outbreak Investigation in the Republic of the Congo. Am. J. Trop. Med. Hyg 2009 ; 80(4): 503-507
7. Boumandouki P and al. Orthopoxvirosesimienne (ouvariole du singe). Bull SocPatholExot 2007; 100 (1): 17-21
8. Levine RS, Peterson AT, Yorita KL, Carroll D, Damon IK, et al . Ecological Niche and Geographic Distribution of Human MonkeypoxinAfrica. PLoS ONE 2007; 2(1): e176. doi:10.1371/journal.pone.0000176
9. Medical Imagery. Giant Molluscum Contagiosum in an HIV positive patient International Journal of Infectious Diseases 2015 ; 38:153-155
10. Rita V. Vora, Abhishek p. Pilani, Rahul Krishna Kota. Extensive Giant MolluscumContagiosum in a HIV Positive Patient. Journal of Clinical and Diagnostic Research. 2015 Nov; 9(11): WD01-WD02
11. S L Ropp, Q Jin, J C Knight, R F Massung, and J J Esposito. Pcr strategy for identification and differentiation of smallpox and other orthopoxviruses. Journal of clinical microbiology, aug. 1995;33(8); 2069-2076
12. Carol H. Thompson. Identification and Typing of Molluscum Contagiosum Virus in Clinical Specimens by Polymerase Chain Reaction. Journal of Medical Virology 1997;53:205-211
13. Yu Li, Victoria A. Olson, Thomas Laue, Miriam T. Laker , Inger K. Damon. Detection of monkeypox virus with real-time PCR assays. Journal of Clinical Virology 2006; 36: 194-203
14. David A Kulesh, Bonnie M Loveless, David Norwood, Jeffrey Garrison, Chris A Whitehouse, Chris Hartmann et al. Monkeypox virus detection in rodents using real-time 30-minor groove binder TaqMans assays on the Roche LightCycler. Laboratory Investigation 2004; 84: 1200-1208
15. JS Abrahao, LS Lima, FL Assis, PA Alves, AT Silva-Fernandes, M MG Cota and al. Nested-multiplex PCR detection of Orthopoxvirus and Parapoxvirus directly from exanthematic clinical samples. Virology Journal 2009; 6: 140
16. Y Inosshima, AMarooka, H Sentsui. Detection and diagnos of parapoxvirus by the polymeras chain reaction. J Virol Methods 2000; 84: 201 - 8
17. G de SouzaTrindade, FG da Fonseca, JT Marques, ML Nogueira, LC Mendes, AS Borges and al. Aracatuba virus : a vaccinalike virus associated with infection in humans and cattle. Emerg Infect Dis 2003; 9: 155 -60.
18. Y Inosshima, K Murakami, D Wu, H Sentsui. Characterization of parapoxviruses circulating among wild Japanese serows (Capricorniscripus). MicrobiolImmunol 2002; 46(8): 583 -7.

STIGMATE IMMUNOLOGIQUE DE LA CIRCULATION DES ORTHOPOXVIRUS CHEZ DES SUJETS NÉS APRÈS L'ÉRADICATION DE LA VARIOLE EN CÔTE D'IVOIRE AFRIQUE DE L'OUEST

MEITE S^{1,5}, KOFFI KS^{2,5}, OUATTARA A³, AKRAN AV⁴, BONI-CISSÉ C⁵, KOUASSI KS¹, MLAN A⁵, ADJOUGOUA EV⁴, FAYE-KETTE H⁵, DOSSO M⁵

RESUME

Justification : Depuis l'éradication du virus de la variole, on note une émergence des autres Orthopoxvirus surtout le Monkeypoxvirus en Afrique centrale. A ce jour aucun cas d'infection humaine à Orthopoxvirus n'a été notifié en Côte d'Ivoire. Cependant, l'activité humaine en milieu rural, la présence des réservoirs potentiels et le climat sont des facteurs favorables à la circulation de ce groupe de virus.

Objectif : Mettre en évidence la circulation des Orthopoxvirus en Côte d'Ivoire en situation post éradication de la variole dans la population non vaccinée contre cette maladie. **Matériel et méthode** : 385 sérums de sujets non vaccinés contre la variole, choisis parmi 1353 sérums collectés lors d'une surveillance nationale de la fièvre jaune, ont été analysés. La méthode ELISA a été utilisée pour rechercher les IgG anti Orthopoxvirus.

Résultats : l'âge moyen des patients était de 11 ans et le sex-ratio était de 1,97. Les IgG anti-Orthopoxvirus ont été détectées dans 4,95% des sérums ; seuls 0,78% de ces sérums avaient un titre ≥ 400 . La majorité des sérums contenant ces IgG (84,16%) provenaient d'individus habitant la moitié sud de la Côte d'Ivoire.

Conclusion : le niveau d'exposition aux Orthopoxvirus reste faible chez les sujets non vaccinés contre la variole. Cependant, vu le nombre croissant de sujets susceptibles à ces virus, il est nécessaire de mettre en place des sites sentinelles de surveillance, particulièrement du Monkeypoxvirus

Mots-clés : Immunoglobulines G – Orthopoxvirus – Monkeypoxvirus - ELISA

ABSTRACT

IMMUNOLOGICAL STIGMA OF ORTHOPOXVIRUS CIRCULATION IN SUBJECTS BORN AFTER THE ERADICATION OF SMALLPOX IN CÔTE D'IVOIRE WEST AFRICA

Since the eradication of the smallpox virus, there has been an emergence of other Orthopoxviruses, especially Monkeypoxvirus in Central Africa. To date, no cases of human infection with Orthopoxvirus have been reported in Côte d'Ivoire. However, human activity in rural areas, the presence of potential reservoirs and climate are factors conducive to the circulation of this group of viruses.

Objective: To demonstrate the circulation of Orthopoxviruses in Côte d'Ivoire in the post-eradication situation of smallpox in the non-vaccinated population. **Materials and methods**: 385 sera from unvaccinated subjects from a randomly selected national surveillance of yellow fever out of 1353 were analyzed. The ELISA method was used to look for anti-Orthopoxvirus IgG.

Results: 385 sera were analyzed, the mean age of patients was 11 years with a sex ratio (M/F) of 1.97. Ig G anti-Orthopoxvirus was detected in 4.95% of the sera. Only 0.78% of the sera had an antibody titer greater than or equal to 400. 84.16% sera with anti-Orthopoxvirus Ig G originated from the southern half of Côte d'Ivoire.

Conclusion: The level of exposure to Orthopoxviruses remains low in unvaccinated smallpox. However, with the growing number of susceptible individuals, it is necessary to set up sentinel surveillance sites for the virus, especially Monkeypoxvirus

Keywords: Immunoglobulin G - Orthopoxvirus - Monkeypoxvirus- ELISA

- 1 : Plateforme de biologie moléculaire –Institut Pasteur Côte d'Ivoire,
- 2 : Unité de Chimie et Microbiologie de l'Institut Pasteur Côte d'Ivoire,
- 3 : Département d'Epidémiologie et Recherche Clinique de l'Institut Pasteur Côte d'Ivoire,
- 4 : Département des Virus Epidémiques de l'Institut Pasteur Côte d'Ivoire,
- 5 : Département de Microbiologie - UFR Sciences Médicales Abidjan

Auteur correspondant : Meite S, Plateforme de biologie moléculaire –Institut Pasteur Côte d'Ivoire

INTRODUCTION

Les *Orthopoxvirus* font partie de la famille des *Poxviridae*. Il s'agit de gros virus à ADN bicaténaire, à multiplication intra cytoplasmique et responsables d'infection fébrile avec des lésions cutanées. Elle comprend plusieurs espèces dont le virus de la variole, le virus de la vaccine, le *Monkeypoxvirus* et le *Cowpoxvirus*.

Ce groupe de virus infecte de nombreux mammifères dont l'homme [1,2]. Le réservoir serait constitué d'animaux sauvages, majoritairement des rongeurs. *Funisciurus anerythrus*, *Cricetomys*, *Graphiurus*, *Heliosciurus*, *Xerus* et même *Mastomys natalensis* sont suspectés comme réservoir de certaines espèces d'*Orthopoxvirus* dont le *Monkeypoxvirus* [1,2]. Le passage du virus chez l'homme serait principalement lié au contact avec ces petits mammifères et certains animaux sauvages [1, 3]. Ce contact est favorisé par les activités de chasse pour des besoins alimentaires, les activités agropastorales et l'anthropisation liée à la recherche d'espace par l'homme. Une étude réalisée en Côte d'Ivoire et au Nigeria sur les sérums des singes a révélé la présence d'anticorps anti-*Monkeypoxvirus* chez *Cercopithecus* spp [4].

De ce fait, la population surtout rurale en Côte d'Ivoire serait exposée aux *Orthopoxvirus*. Cependant, il y a plus de trente ans, aucun cas d'infection à *Orthopoxvirus* en général et à *Monkeypoxvirus* en particulier n'a été déclaré en Côte d'Ivoire alors que le contact entre les rongeurs et la population rurale est fréquent. Si l'absence de cas chez les sujets nés avant 1980 peut être liée à la vaccination contre la variole car il existe une immunité croisée entre les espèces des *Orthopoxvirus*, qu'en est-il pour cette tranche importante de population née après l'éradication de la variole? A ce jour, la possibilité de circulation d'un autre *Orthopoxvirus* n'est pas exclue. Cette situation constituerait un risque non négligeable pour la population non vaccinée contre la variole dont le nombre ne cesse de s'accroître. L'épidémie à *Monkeypoxvirus* survenue au Kasaï oriental en République Démocratique du Congo en 1996-1997 [3] et aux United States of America (USA) en 2003 [1], provoquée par des rongeurs provenant du Ghana pays voisin de la Côte d'Ivoire illustre cette possibilité. C'est tout l'intérêt de ce travail qui se propose de mettre en évidence la circulation des *Orthopoxvirus* en Côte d'Ivoire, en situation post éradication de la variole, dans la population non vaccinée.

MATERIEL ET METHODES

Cadre de l'étude

La Côte d'Ivoire, pays de l'Afrique de l'Ouest, s'étend sur une superficie de 322.462 km². Ses frontières dessinent approximativement un carré s'inscrivant

entre les coordonnées de 2°30' et 8°30' de longitude ouest, 4°30' et 10°30' de latitude nord. Sa végétation présente une grande diversité du Nord au Sud. Le Sud est occupé par des forêts ombrophiles et méso-phile qui s'étendent d'Ouest en Est. La partie méso-phile sépare la forêt dense des savanes de basse-côte.

Type et période de l'étude

Il s'agit d'une étude transversale à visé descriptive menée sur des sérums archivés dans la sérothèque de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire et collectés entre 2013 et 2015, dans le cadre d'une surveillance nationale des fièvres hémorragiques (FH).

Population d'étude

A partir de la sérothèque de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire (IPCI), représentative sur le plan national, 385 sérums ont été choisis. Ils provenaient de sujets âgés de moins de 30 ans.

Critères de choix des sérums

Les critères d'inclusion étaient :

- Sérums enregistrés dans la sérothèque de l'IPCI ;
- Sérums prélevés dans chaque district de santé, en fonction du nombre de cas collectés par an durant la période de l'étude ;
- Sérums de personnes d'âge ≤30 ans, sans distinction de sexe ;
- Sérums de volume suffisant d'au moins 500µl pour pratiquer les analyses ;
- Sérums de sujets non vaccinés contre la variole

Les critères de non inclusion et d'exclusion étaient : sujet prélevé pour FH mais vacciné contre la variole ; sujet prélevé hors de l'enquête nationale sur les FH ; sujet prélevé pour une étude autre que l'enquête nationale sur les FH ; sujet d'âge >30 ans ; un volume de sérum insuffisant (inférieur à 500 µl).

Au total, sur les 1353 sérums de l'enquête nationale sur les FH, 400 ont été tirés au hasard. Les anticorps de type IgG anti *Orthopoxvirus* ont été recherchés dans 385 sérums échantillons provenant de sujets répondants aux critères d'inclusion.

Test de détection des anticorps IgG anti *Orthopoxvirus*

Les 385 sérums sélectionnés ont été analysés à l'aide du test ELISA indirect proposé par McIntosh et al [5], Il s'agit d'une technique de détection des IgG dirigées contre les *Orthopoxvirus*.

Chaque plaque de microtitration a été divisée en deux parties pour la sensibilisation. Les puits des lignes A à D de la plaque ont été sensibilisés à l'aide d'antigènes dilués au 1/100 dérivés de souche de *Cowpoxvi-*

rus cultivée sur Cellule Véro E6. Par contre, les puits des lignes E à H ne contenaient pas d'antigènes du *Cowpoxvirus*. Les plaques ont été incubées pendant 24H à 4°C. La révélation du complexe (Ag-IgG) a été faite à l'aide d'anticorps secondaire couplé à la peroxydase (Fab anti IgG fragment (H+L) humain marqué à la peroxydase) en présence du substrat (Tétraméthylbenzidine). La lecture de la densité optique (DO) a été faite à une longueur d'onde de 450 nm. La différence de DO (ΔDO) entre un puits sensibilisé par l'antigène du *Cowpoxvirus* et un puits sans antigène contenant chacun le même sérum a été calculée. Les sérums où une ΔDO était supérieure à 0,2 ont été quantifiés à partir d'une série de dilutions de 1/100 au 1/6400.

Chaque plaque était validée lorsque la ΔDO des 2 témoins positifs étaient $> 0,2$; concernant les 3 témoins négatifs, la moyenne des $\Delta DO + 3$ Ecart-Typés était calculée, et cette valeur doit être inférieure à 0,2

Analyses des données

La base de données liée à cette sérothèque a été réalisée en utilisant le logiciel Epi Info (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgie). L'analyse des données a été effectuée à l'aide du logiciel R 3.2.0 [6].

RESULTATS

Parmi les 385 personnes dont le sérum a été analysé, 254 (66%) étaient de sexe masculin ; le sex-ratio était de 1,97. Les âges extrêmes étaient de 6 mois et 30 ans ; la moyenne étant 11 ans. La tranche d'âge la plus représentée (41%) était celle de 0-10 ans ; parmi ces patients, 38,28% n'avaient pas 5 ans. (Tableau 1)

Les IgG anti-*Orthopoxvirus* ont été détectées dans 19 des 385 sérums testés (4,93%). Ce pourcentage a varié de 2,0% à 8,4% selon les tranches d'âge (Tableau 1) ; le pic était situé entre 26 et 30 ans. La différence était significative entre cette tranche d'âge et la tranche d'âge inférieure à 25 ans ($p = 0,0139$, Chi-Squares 6,04).

Tableau 1 : Répartition de la population d'étude selon la tranche d'âge

Tranche d'âge	Sujets testés (%) N = 385	Sujets testés positifs N = 19 (4,95%)
0 – 10 ans	197 (41,1%)	04 (2,0%)
11 – 20 ans	105 (27,2%)	08 (7,6%)
21 - 30 ans	83 (21,6%)	07 (8,4%)

Le dosage des IgG anti-*Orthopoxvirus* a montré des titres compris entre 100 et 800. Ce titre était ≥ 400 dans seulement trois échantillons (0,78%)

(Tableau 2).

Tableau 2: Distribution des titres d'IgG anti-*Orthopoxvirus* dans la population d'étude

Région sanitaire	District sanitaire	Age (Ans)	Sexe	Titre d'IgG Anti- <i>Orthopoxvirus</i>
Lagune 1	Bingerville	24	M	100
	Bingerville	28	M	100
	Jacqueville	14	F	100
Lagune 2	Abobo ouest	17	F	200
Agnéby	Akoupé	15	F	100
Denguélé	Adzopé	27	M	100
	Touba	20	M	200
	Odienné	26	M	100
Moyen Cavally	Bloléquin	16	M	200
	Bloléquin	5	F	100
Sud Co-moé	Aboisso	9	M	100
Sud Bandaman,	Fresco	3	M	100
	Divo	27	M	200
	Divo	15	M	400
Lac	Tiébissou	3	M	100
	Didiévi	7	F	100
Haut Sassandra	Daloa	26	M	800
Zanzan	Bondoukou	12	F	400
N'zi-Comoé	Daoukro	15	F	100

La majorité (84,16%) des personnes ayant une sérologie IgG anti-*Orthopoxvirus* positive a été prélevée dans la moitié Sud de la Côte d'Ivoire (Figure 1).

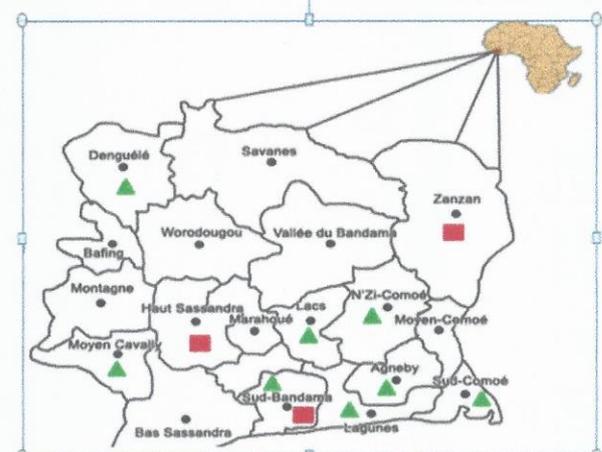


Figure 1 : Répartition géographique des sérums contenant des IgG anti-*Orthopoxvirus* selon les régions sanitaires

□ : Titre d'anticorps supérieur ou égal 400 ▲ : Titre d'anticorps inférieur à 400

DISCUSSION

L'Afrique de l'ouest reste une zone probable de circulation des *Orthopoxvirus* en général et du *Monkeypoxvirus* en particulier [7]. L'épidémie à *Monkeypoxvirus* aux USA en 2003 avait son origine au Ghana,

pays voisin de la Côte d'Ivoire [1] ; cela laisse penser à une circulation possible de ce virus dans notre pays. Une surveillance sérologique post-éradication de la variole, initiée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 1982, avait montré la présence d'anticorps anti-Poxvirus (dont les *Orthopoxvirus*) chez des sujets non vaccinés contre la variole [8]. Des études réalisées récemment en Sierra Leone et au Ghana [1, 9] ont corroboré l'hypothèse de la circulation des *Orthopoxvirus* dans la zone ouest de l'Afrique. Lors de notre étude, 4,93% des personnes testées avaient des IgG anti *Orthopoxvirus* ; ce taux était inférieur à celui retrouvé lors d'un travail mené en 1981 - 1982 en Afrique centrale, précisément au Congo Brazzaville, grâce à la technique ELISA qui était de 15,4% [10]. L'Afrique centrale reste une zone endémique de circulation des *Poxvirus*, particulièrement le *Monkeypoxvirus* [10]. Nous avons trouvé un titre d'IgG relativement bas (≤ 100) dans plus de la moitié des sérums positifs ; cette immunité résiduelle qui reste durable [11] pourrait signifier une exposition probable de notre population d'étude aux *Orthopoxvirus*. Cependant une absence d'exposition aux *Orthopoxvirus* n'est pas à écarter dans notre pays à cause des réactions croisées avec d'autres Poxvirus. Grâce à ce travail, nous avons découvert que la zone d'exposition aux *Orthopoxvirus* y compris le *Monkeypoxvirus*, se situait dans la moitié sud de la Côte d'Ivoire principalement. Cela correspond globalement aux zones favorables à la circulation de ce groupe de virus selon les données de la littérature [12, 7]. Rappelons que c'est dans la région du Haut Sassandra, précisément dans les villages de Gbetitappea qui héberge des singes sacrés que l'un des deux cas humains d'infection à *Monkeypoxvirus* confirmés en Côte d'Ivoire a été détecté. Il est à souligner également que le village de Soko dans la région du Zanzan qui héberge aussi des singes sacrés, se trouve à la frontière avec le Ghana, source de l'épidémie de 2003 [1]. A travers les données colligées dans la littérature, il apparait que les anticorps anti *Orthopoxvirus* sont plus fréquemment détectés chez les enfants [13, 14] ; ils participent autant que les adultes aux activités agricoles et forestières.

CONCLUSION

Les orthopoxviroses ne sont pratiquement plus détectées en Côte d'Ivoire malgré l'arrêt de la vaccination contre la variole en 1980. Le niveau d'exposition à ces virus reste faible chez le sujet non vacciné contre la variole malgré des conditions socio-environnementales favorables à leur émergence. Les caractéristiques écologiques de certaines zones nécessitent la mise en place de sites sentinelles de surveillance de ce groupe de virus. Cela permettra d'une part la détection précoce d'orthopoxviroses chez l'homme et d'autre part de mieux faire face à une épidémie

éventuelle dans la zone ouest africaine.

BIBLIOGRAPHIE

1. REYNOLDS MG, CARROLL DS, OLSON VA, HUGHES C, GALLEY J, LIKOS A, and al. A silent enzootic of an orthopoxvirus in Ghana, West Africa : evidence for Multi-Species involvement in the absence of widespread Human Disease. *Am J Trop Med Hyg* 2010;82 (4):746-754
2. GISPEN R, BRAND-SAATHOF BB, HEKKER AC.. Monkeypox-specific antibodies in human and simian sera from the Ivory Coast and Nigeria. *Bull WHO* 1976;53: 355-360
3. HUTIN YVAN J.F, JOEL WILLIAMS R, MALFAIT P, REDODY R, LOPAREV VN, ROPP SL and al . Outbreak of Human Monkeypox, DEMOCRATIC Republic of Congo, 1996 – 1997. *Emerg Infect Dis* 2001;7(3) : 434 – 38
4. R GISPEN, BB BRAND-SAATHOF, AC HEKKER. Monkeypox-specific antibodies in human and simian sera from the Ivory Coast and Nigeria. *Bull WHO* 1976; 53: 355- 60.
5. MCINTOSH K, HENDRY RM, FAHNESTOCK ML, PIERIK LT. Enzyme-linked immunoabsorbent assay for detection of respiratory syncytial virus infection: application to clinical samples. *J Clin Microbiol* 1982; 16: 329-333.
6. R Core Team (2015). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org>
7. LEVINE RS, PETERSON AT, YORITA KL, CARROLL D, DAMON IK, REYNOLDS MG.. Ecological Niche and Geographic Distribution of Human Monkeypox in Africa. *PLoS One* 2007; 2(1): e
8. OMS. Surveillance des Orthopoxvirus : politique pour la période postérieure à l'éradication. *Relevé EpidemHebd*1982 ; 57 : 105 – 109
9. AMACNEIL, J ABEL, MG REYNOLDS, RR LASH, R FONNIE, L D KANNEH, and al . Serologic evidence of human orthopoxvirus infections in Sierra Leone. *BMC Research Notes* 2011; 4:465
10. P TALANI, J MANIANE, J.D KONONGO , A.I GROMYKO, F YALA. Prévalence des anticorps spécifiques du Monkeypox au Congo-Brazzaville. *Mé d'Afr Noire* : 1990 ; 46 (8/9)
11. HAMMARLUND E1, LEWIS MW, HANSEN SG, STRELOW LI, NELSON JA, SEXTON GJ, et al. Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination. *Nat Med* 2003; 9(9):1131-7.
12. P BOUMANDOUKI , R BILECKOT, JR. IBARA, CSATOUNKAZI, DW WASSA, F LIBAMA and al. Orthopoxvirose simienne (ouvariole du singe: étude de 8 cas observées à l'Hôpital d'Impfondo de la République du Congo. *Bull Soc Pathol Exot* 2007; 100 (1):17-21
13. A MACNEIL, MG. REYNOLDS, DS CAR-

ROLL, K KAREM, Z BRADEN, R LASH and al. .
Monkeypox or Varicelle? Lessons from a rash out-
break investigation in the Republic of the Congo. Am
J Trop Med Hyg 2009; 80(4): 503 – 507.

14. Y J.F HUTIN, R WILLIAMS, P MALFAIT, R
PEBODY, V N LOPAREV, SL. ROPP and al. Out-
break of Human Monkeypox, Democratic Republic of
Congo, 1996 – 1997. Emer Infect Dis 2001;7(3): 434-
8.

pneumopathie interstitielle bilatérale chronique fébrile depuis 5 mois. L'évolution sous anituberculeux était défavorable marquée par la persistance des signes et surtout des anémies à répétition. La ponction médullaire et la lecture du myélogramme permettait de poser le diagnostic d'histiocytose maligne. La patiente est décédée avant le début de la chimiothérapie.

Conclusion

L'histiocytose est une cause rare de pneumopathie. Chez l'adulte, les manifestations respiratoires et osseuses sont en général de mauvais pronostic. Cependant un diagnostic précoce et la chimiothérapie peuvent améliorer la survie des patients. Les similitudes cliniques et radiologiques entre tuberculose et histiocytose peuvent retarder le diagnostic de ce dernier en zone d'endémie tuberculeuse.

C0-112 STIGMATE IMMUNOLOGIQUE DE LA CIRCULATION DES ORTHOPOXVIRUS CHEZ DES SUJETS NÉS APRES L'ERADICATION DE LA VARIOLE EN COTE D'IVOIRE AFRIQUE DE L'OUEST.

Meite S 1, 5, Koffi KS 2, Ouattara A3, Akran AV 4, Boni-Cissé C 5, Kouassi KS1, Mlan A5, Adjougoua EV 4, Faye- Kette H 5, Dosso M 5.

1 : Plateforme de biologie moléculaire –Institut Pasteur Côte d'Ivoire, 2 : Unité de Chimie et Microbiologie de l'Institut Pasteur Côte d'Ivoire, 3 : Département d'Epidémiologie et Recherche Clinique de l'Institut Pasteur Côte d'Ivoire, 4 : Département des Virus Epidémiques de l'institut Pasteur Côte d'Ivoire, 5 : Département de Microbiologie - UFR Sciences Médicales Abidjan

Justification

Depuis l'éradication du virus de la variole, on note une émergence des autres Orthopoxvirus surtout le Monkeypoxvirus en Afrique centrale. A ce jour aucun cas d'infection humaine à Orthopoxvirus n'a été notifié en Côte d'Ivoire. Cependant, l'activité humaine en milieu rural, la présence des réservoirs potentiels et le climat sont des facteurs favorables à la circulation de ce groupe de virus. Objectif : Mettre en évidence la circulation des Orthopoxvirus en Côte d'Ivoire en situation post éradication de la variole dans la population non vaccinée contre cette maladie. Matériel et méthode : 385 sérums de sujets non vaccinés contre la variole, choisis parmi 1353 sérums collectés lors d'une surveillance nationale de la fièvre jaune, ont été analysés. La méthode ELISA a été utilisée pour rechercher les IgG anti Orthopoxvirus. Résultats : l'âge moyen des patients était de 11 ans et le sex-ratio était de 1,97. Les IgG anti-Orthopoxvirus ont été détectées dans 4,95% des sérums ; seuls 0,78% de ces sérums avaient un titre ≥ 400 . La majorité des sérums contenant ces IgG (84,16%) provenaient d'individus habitant la moitié sud de la Côte d'Ivoire.

Conclusion : le niveau d'exposition aux Orthopoxvirus reste faible chez les sujets non vaccinés contre la variole. Cependant, vu le nombre croissant de sujets susceptibles à ces virus, il est nécessaire de mettre en place des sites sentinelles de surveillance, particulièrement du Monkeypoxvirus

Mots clefs : Immunoglobulines G – Orthopoxvirus – Monkeypoxvirus – ELISA.

CAF04-7. Détection moléculaire de Poxvirus chez les patients avec les lésions suspects de Molluscum contagiosum

Meite S^{1,2}, Boni-Cissé C², Diabaté A⁴, Coulibaly Ngolo D¹, Koffi KS², allou⁵ Kouassi KS¹, Mlan AP², Kouame SM¹, Zaba FS³, Ngazoa KS¹, Faye-Ketté H², Dosso M²

1. Institut Pasteur Côte d'Ivoire, Plateforme
2. Département de microbiologie UFR Sciences médicales Abidjan
3. Laboratoire de Bactériologie CHU Yopougon
4. Service de dermatologie CHU de Yopougon
5. Service de dermatologie CHU de Treichville

Introduction : Orthopoxvirus (OPV) et le virus du Molluscum contagiosum (MCV) sont des *Poxvirus* impliqués dans des lésions cutanées chez les humains. OPV infecte de nombreux vertébrés et le MCV infecte principalement les humains. Une confusion diagnostique est souvent observée entre les lésions cliniques dues aux différents Poxvirus d'abord et d'autre part avec d'autres virus comme le virus de la varicelle. En Côte d'Ivoire, le diagnostic de MCV reste essentiellement clinique et celui du OPV est inexistant malgré le risque de circulation du virus. Cette étude vise à mettre en œuvre la détection moléculaire des OPV et du MVC en Côte d'Ivoire.

Méthodologie : les lésions cutanées de 45 patients ont été analysées par PCR conventionnelle. Les amorces (MCV1, MCV2) ciblant le fragment K du MCV ont été utilisées pour la détection de MCV. Les amorces consensus (EACP1, EACP2) conçues à partir du gène de l'hémagglutine de surface ont été utilisées pour la détection des OPV lorsque la recherche du MCV était négative.

Résultats : 87% des patients étaient des enfants et le sex-ratio était de 0,44. Le diagnostic clinique était le molluscum contagiosum chez tous les patients. L'analyse moléculaire a confirmé une infection à MCV chez 88,8% des patients. Les patients avec une PCR MCV négative, 6% étaient positifs pour la PCR OPV.

Conclusion : Malgré le caractère clinique évident du MCV, des risques de confusion entre les lésions cliniques dues aux Poxvirus existent.

Mots clés : Lésions cutanées, PCR, *Poxvirus*.

CAF04-8. Etude des caractéristiques sociodémographiques, thérapeutiques et de suivi des cas de morsures exposant à la rage de 2011 à 2015 au Sénégal

Faye A¹, Ndiaye A², Niang K¹, Diop B², Tal-Dia A¹

1. Institut de Santé et Développement, UCAD, Dakar Sénégal
2. Direction de la prévention, Ministère de la Santé et de l'Action Sociale

Introduction : La rage est une zoonose majeure due à un virus neurotrope. L'objectif de ce travail était d'étudier les caractéristiques socio démographiques thérapeutiques et de suivi des cas de morsures exposant à la rage de 2011 à 2015.

Méthodologie : Il s'agissait d'une étude rétrospective à visée descriptive et analytique des cas de morsures exposant à la rage humaine de janvier 2011 à décembre 2015. L'échantillonnage est exhaustif. La collecte a été faite de fiches de notification qui étaient transmises à la Division de la surveillance épidémiologique et riposte vaccinale dans le cadre de la surveillance hebdomadaire de routine.

Résultats : Il y a eu 502 cas de morsures exposant à la rage soit une moyenne de 100 cas/an. L'âge moyen des patients était de 20 ans avec comme extrême 1 et 82 ans. La tranche d'âge de 15 ans et moins était la plus représentée. Il y avait une prédominance du sexe masculin de 65,3%. Les patients provenaient de toutes les régions du Sénégal et surtout la région de Fatick (21%). Le chien était généralement l'animal agresseur (82,5%), suivi du cheval (3,9%) de l'âne (3,0%). Seuls 7% des animaux incriminés étaient vaccinés. La morsure était le type d'exposition les plus représentés avec 88,2%. Les morsures prédominaient au niveau des membres inférieurs avec 45,9%. Elles étaient de niveau 1 dans 36,3%. Parmi les animaux mordeurs 14% ont été mis en observation. Au niveau des structures sanitaires 95,9% des cas de morsures avaient bénéficié de lavage de la plaie. Seul 6,8% des cas d'exposition avaient bénéficié de vaccination anti rabique.

Conclusion : Les résultats de notre étude montrent que les cas morsures exposant à la rage sont toujours fréquents au Sénégal. La vaccination chez les animaux et les personnes demeurent faible.

Mots clés : Rage, morsures, vaccination, Sénégal

RESUME

JUSTIFICATION : *Monkeypoxvirus* ou virus de la variole du singe est un *Orthopoxvirus* de la famille des *Poxvirus*, responsable d'éruption fébrile identique à celle de la variole à un degré moins sévère. Son réservoir potentiel serait *Funisciurus anerythrus* et la transmission à l'homme se fait généralement par contact avec le réservoir. Il s'agit d'une zoonose qui émerge chez l'homme depuis l'arrêt de la vaccination contre la variole. Son évolution épidémiologique et clinique de ces dernières années en font une préoccupation mondiale. **OBJECTIF :** La présente étude avait pour but de confirmer la circulation des *Orthopoxvirus* en particulier le *Monkeypoxvirus* en Côte d'Ivoire. Il s'agissait spécifiquement d'identifier le virus à travers ses réservoirs potentiels, de déterminer la seroprévalence de l'infection à *Orthopoxvirus* afin d'avoir une idée de l'exposition de la population au virus et déterminer sa place dans les lésions cutanées fébriles en Côte d'Ivoire. **METHODOLOGIE :** Cette étude a été réalisée entre 2013 et 2017 avec deux volets. Un volet animal où des captures de micromammifères ont été réalisées sur 9 sites répartis en trois zones dont la zone périurbaine, la zone péri rurale et la zone des aires protégées. Les tissus de foie, de poumon et de rein des micromammifères capturés ont été prélevés et analysés par PCR classique et PCR en temps réel pour rechercher le virus. Un volet humain portant sur des biocollections de sérums et de flux oraux collectées lors de la surveillance nationale de fièvre jaune et de rougeole entre 2013 et 2017 et des prélèvements cutanés de lésions suspectes de *Molluscum contagiosum* dans les services de Dermatologie du CHU de Yopougon et de Treichville. Les tests sérologiques ont concerné les sujets de moins de 30 ans afin d'éliminer toute immunisation par la vaccination contre la variole. Des anticorps IgG anti-*Orthopoxvirus* ont été recherchés par la méthode ELISA et les *Poxvirus* dont le *Monkeypoxvirus* ont été recherchés par PCR classique et PCR en temps réel. **RESULTATS :** Concernant le volet animal, pour 4930 nuit-piège, 256 micromammifères ont été capturés soit un rendement de 5,19%. *Crocidura*, de *Rattus*, de *Lophuromys*, de *Praomys*, de *Mus* et de *Mastomys* ont été les plus capturés. 0,19% d'échantillons étaient positifs pour la recherche d'*Orthopoxvirus*, aucun *Monkeypoxvirus* n'a été retrouvé. Chez l'homme, sur un effectif de 255 chez des sujets de moins de 30 ans, la prévalence pour la recherche des anticorps IgG anti-*Orthopoxvirus* était de 4,93% avec des taux d'IgG variant entre 100 et 800. Dans la moitié sud de la Côte d'Ivoire se trouvaient 80% des sujets positifs. Chez les patients suspects de rougeole dont la recherche du virus de la rougeole et de la rubéole était négative et les patients suspects d'infection à *Molluscum contagiosum virus*, la recherche des *Orthopoxvirus* a été négative. La recherche de *Molluscum contagiosum virus* a été confirmée chez 100% des patients suspects de l'infection à *Molluscum contagiosum*. **CONCLUSION :** La circulation des *Orthopoxvirus* reste très faible en Côte d'Ivoire sans la confirmation de la présence de *Monkeypoxvirus* à

travers notre étude. Cependant la présence d'*Orthopoxvirus* chez *Crocidura*, un micromammifère de l'environnement immédiat de l'homme nécessite la mise en place de mesures de surveillance de ce groupe de virus.

MOTS CLES : Poxvirose - *Monkeypoxvirus* – réservoir – Côte d'Ivoire

ABSTRACT

BACKGROUND: *Monkeypoxvirus* is an *Orthopoxvirus* of the family *Poxvirus* which is responsible for febrile eruption identical to that of smallpox at a less severe degree. Its potential reservoir should be *Funisciurus anerythrus* and transmission to humans is usually occur by contact with the reservoir. It is a zoonosis that has emerged in humans since the cessation of vaccination against smallpox. Its epidemiological and clinical evolution in recent years make it a worldwide concern.

METHODOLOGY: This study was conducted between 2013 and 2017 with two components. An animal component , micromammal captures were carried out at 9 sites in three zones, including the peri-urban zone, the peri-rural zone and the protected areas zone. The liver, lung and kidney tissues of captured micromammals were collected and analyzed by standard PCR and real-time PCR to search for the virus. A human component dealt with biocollections of sera and oral fluids collected during the national surveillance of yellow fever and measles between 2013 and 2017 and cutaneous samples of suspicious lesions of *Molluscum contagiosum* in the Dermatology departments of Yopougon and Treichville University Hospitals. Serologic testing involved subjects under 30 in order to eliminate any immunization by vaccination against smallpox. Anti-Orthopoxvirus IgG antibodies were investigated by the ELISA method and Poxviruses including *Monkeypoxvirus* were searched by classical PCR and real-time PCR. **RESULTS:** Regarding the animal component, for 4930 night-traps, 256 micromammals were caught, ie a yield of 5.19%. *Crocidura*, *Rattus*, *Lophuromys*, *Praomys*, *Mus* and *Mastomys* were the most captured. 0.19% positive samples for *Orthopoxvirus*, no *Monkeypoxvirrus* was found. In humans, out of a total of 255 , subjects less than 30 years old, the prevalence for anti-Orthopoxvirus IgG antibodies was 4.93% with IgG levels ranging from 100 to 800. In the southern part of Côte d'Ivoire were 80% positives. In patients suspected of measles with measles and rubella virus negative and patients suspected of *Molluscum contagiosum* virus infection, the search for *Orthopoxvirus* was negative. The search for *Molluscum contagiosum* virus has been confirmed among 100% of patients suspected of being infected with *Molluscum contagiosum*.

CONCLUSION: The circulation of *Orthopoxviruses* remains very weak in Ivory Coast without the confirmation of the presence of *Monkeypoxvirus* through our study. However, the presence of *Orthopoxvirus* in *Crocidura*, a micromammal living in the immediate environment of humans requires the establishment of surveillance measures of this group of viruses

KEY WORDS: Poxvirose - *Monkeypoxvirus* - reservoir – Côte d'Ivoire