



OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible

This is an author's version published in: <http://oatao.univ-toulouse.fr/> 26802

To cite this version:

Peltier, Claire. Étude de la faune sauvage brésilienne comme potentiel réservoir du virus de la vaccine. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse – ENVT, 2020, 105 p.

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: tech-oatao@listes-diff.inp-toulouse.fr

ETUDE DE LA FAUNE SAUVAGE BRESILIENNE COMME POTENTIEL RESERVOIR DU VIRUS DE LA VACCINE

THÈSE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLÔME D'ÉTAT

*présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Claire PELTIER

Née le 23 juin 1994 à Monaco (98)

Directeur de thèse : M. Timothée VERGNE

JURY

PRÉSIDENT :

M. Christophe PASQUIER

Doyen de la Faculté de Pharmacie de TOULOUSE

ASSESEURS :

M. Timothée VERGNE

Maître de Conférences à l'École Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

M. Stéphane BERTAGNOLI

Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation
ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE

Directeur: Professeur Pierre SANS

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Pharmacologie –Thérapeutique*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 1° CLASSE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des aliments d'Origine animale*
- Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie Vétérinaire*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootchnie*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie Médicale Animale et Comparée*

PROFESSEURS 2° CLASSE

- Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mme **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique, animaux d'élevage*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*
- M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
- M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*

PROFESSEURS CERTIFIÉS DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

- Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
- M. **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

MAÎTRES DE CONFÉRENCES (HORS CLASSE)

- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mme **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
- M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
- M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
- Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
- M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*

MAÎTRES DE CONFÉRENCES (CLASSE NORMALE)

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
- Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
- M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
- M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **DANIELS Hélène**, *Immunologie-Bactériologie-Pathologie infectieuse*
- Mme **DAVID Laure**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- Mme **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
- M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie vétérinaire et comparée*
- Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*
- Mme **GRANAT Fanny**, *Biologie médicale animale*
- Mme **JOURDAN Géraldine**, *Anesthésie – Analgésie*
- Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des Equidés*
- Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
- M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*
- M. **LHERMIE Guillaume**, *Economie de la santé animale*
- M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
- Mme **MILA Hanna**, *Elevage des carnivores domestiques*
- M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*
- Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
- Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
- M. **VERGNE Timothée**, *Santé publique vétérinaire – Maladies animales règlementées*
- Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT CONTRACTUELS

- M. **DIDIMO IMAZAKI Pedro**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- M. **LEYNAUD Vincent**, *Médecine interne*
- Mme **ROBIN Marie-Claire**, *Ophthalmologie*
- Mme **ROMANOS Lola**, *Pathologie des ruminants*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- Mme **BLONDEL Margaux**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
- M. **CARTIAUX Benjamin**, *Anatomie-Imagerie médicale*
- M. **COMBARROS-GARCIA Daniel**, *Dermatologie vétérinaire*
- M. **GAIDE Nicolas**, *Histologie, Anatomie Pathologique*
- M. **JOUSSERAND Nicolas**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
- M. **LESUEUR Jérémy**, *Gestion de la santé des ruminants – Médecine collective de précision*
- M. **TOUITOU Florian**, *Alimentation animale*

Remerciements

Au directeur de jury Monsieur le Professeur Christophe Pasquier

Doyen de la Faculté de Pharmacie

Praticien Hospitalier au CHU Toulouse

Virus à potentiel oncogène

Qui m'a fait l'honneur d'accepter la demande de direction de mon jury de thèse

Hommages respectueux

A Monsieur le Docteur Timothée Vergne

Epidémiologiste et maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de

Toulouse

Santé publique vétérinaire

Qui m'a fait l'honneur d'accepter d'être mon directeur de thèse

Qui a eu le courage de lire et corriger mon manuscrit

Merci pour votre patience et votre réactivité

Remerciements chaleureux

A Monsieur le Professeur Stéphane Bertagnoli

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Virologie – Infectiologie

Qui m'a fait l'honneur de faire partie de mon jury de thèse

Sincères remerciements

A Jane Megid, Docteur et Professeur à la Faculdade de Medicina Veterinaria e Zootecnia de l'UNESP, Botucatu, qui m'a très chaleureusement accueillie dans son laboratoire et m'a enseigné les techniques de base de biologie moléculaire. Merci pour vos conseils et votre implication.

Table des matières

Introduction	5
Partie 1 : Etude bibliographique.....	7
I. Le virus de la vaccine	8
1. Classification systématique.....	8
2. Morphologie et structure du virus de la vaccine (VACV)	9
a) Morphologie	9
b) Structure	9
c) Composition protéique	10
d) Génome viral.....	11
3. Propriétés physico-chimiques et antigéniques	12
a) Propriétés physico-chimiques.....	12
b) Propriétés antigéniques.....	13
II. Résumé de l'étiopathogénie du VACV.....	13
1. Cycle viral au sein de la cellule	13
a) Entrée dans la cellule	14
b) Réplication du génome.....	15
c) L'assemblage de nouveaux virions.....	17
2. Echappement au système immunitaire	18
a) Effets sur l'organisme hôte et détournement des outils cellulaires	18
b) Défenses du virus contre le système immunitaire de l'hôte	19
(i) Lutte contre les systèmes de défense extracellulaires	19
(ii) Lutte contre les systèmes de défense intracellulaires.....	20
III. Epidémiologie, présentation clinique et lutte	22
1. Epidémiologie	22
a) Distribution géographique du virus de la vaccine.....	22
(i) Le VACV dans le monde.....	22
(ii) La situation au Brésil	24
b) Spectre d'hôte	27
c) Voies de transmission et sources	28
2. Présentation clinique et lésionnelle	29
(i) Signes cliniques locaux et généraux	29
(ii) Complications vaccinales	31
3. Principes de lutte contre le VACV	32
(i) Diagnostic.....	32
(ii) Traitement.....	35
(iii) Vaccination	36
Partie 2 : Etude expérimentale	39
I. Objectif et contexte de l'étude expérimentale	40

II. Matériels et méthodes	42
1. Choix des animaux et modalités de prélèvement	42
a) Echantillonnage.....	43
b) Prélèvement et préparation des échantillons	44
c) Analyses des échantillons	45
2. Analyse sérologique par Séroneutralisation par Réduction des Plages de Lyse (PRNT) des échantillons de sérum	47
3. Analyse moléculaire par Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR) nichée et PCR quantitative (qPCR).....	48
a) Extraction de l'ADN des échantillons de sang et d'urine	48
b) Recherche du gène C11R par PCR nichée dans les échantillons de sang et urine	49
c) Visualisation des produits de PCR nichée par électrophorèse.....	50
d) Vérification des résultats par séquençage	50
e) Recherche des gènes C11R et A56R par PCR quantitative (qPCR) ou PCR en temps réel des échantillons d'urine.....	51
III. Résultats de l'étude expérimentale	53
1. Résultats de la Séroneutralisation par Réduction des Plages de Lyse (PRNT)	55
2. Résultats de la réaction de PCR nichée sur le gène C11R	56
a) Résultats des expériences préliminaires	56
b) Résultats des analyses des échantillons de sang par PCR nichée	57
c) Résultats des analyses des échantillons d'urine par PCR nichée.....	58
d) Clonage et séquençage d'une sélection d'échantillons positifs.....	60
3. Résultats des PCR en temps réel (qPCR) pour la recherche des gènes C11R et A56R	61
IV. Interprétation et discussion	63
1. Séroneutralisation par Réduction des Plages de Lyse (PRNT)	63
2. Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR)	64
Conclusion	67
Bibliographie	69
Annexes	76

Table des figures

Figure 1.	Arbre phylogénétique des souches de VACV basé sur la séquence du gène A56R.....	9
Figure 2.	Structure complète du génome du VACV.....	12
Figure 3.	Schéma du cycle de réplication du VACV.....	14
Figure 4.	Carte de la répartition mondiale du virus de la vaccine.....	23
Figure 5.	Ebauche du cycle de transmission du virus de la vaccine entre les populations humaines et animales.....	27
Figure 6.	Position du gène C11R au sein des séquences RIT du génome viral.....	41
Figure 7.	Localisation de la commune de Botucatu, état de São Paulo, Brésil.....	42
Figure 8.	Lieux de provenance de tous les animaux inclus dans l'étude.....	44
Figure 9.	Organigramme des analyses réalisées dans cette étude.....	46
Figure 10.	Sélection des animaux à analyser.....	47
Figure 11.	Résumé du principe d'extraction d'ADN.....	48
Figure 12.	Répartition des espèces prélevées.....	53
Figure 13.	Répartition des zones d'origine des animaux étudiés.....	54
Figure 14.	Répartition des lieux d'origine des animaux issus de la commune de Botucatu.....	54
Figure 15.	Répartition des âges des animaux étudiés.....	54
Figure 16.	Extrait du résultat de séquençage du témoin positif, séquence de la bande à 170pb.....	60
Figure 17.	Courbe de fluorescence des échantillons 138 et 173.....	62
Figure 18.	Courbe de dissociation du mélange n°5.....	62

Table des images

Image 1.	Structure du virus de la vaccine en microscopie électronique.....	10
Image 2.	Mécanismes d'entrée du MV dans la cellule hôte.....	15
Image 3.	Morphogénèse et sortie du virion mature de la cellule.....	18
Image 4.	Lésions de VACV sur les trayons et mamelles de vaches.....	30
Image 5.	Lésions de VACV chez l'homme.....	30
Image 6.	Pièges type Tomahawk utilisés par Felipe Fornazari.....	43
Image 7.	Prélèvements d'urine et de sang.....	45
Image 8.	Extrait des résultats des expériences préliminaires à la PCR nichée du gène C11R.....	56
Image 9.	Résultats de PCR nichée de l'ADN nouvellement et anciennement extrait des prélèvements de sang.....	57
Image 10.	Extrait des résultats : exemple d'échantillon positif (A) et douteux (B) à la PCR nichée..	59

Table des tableaux

Tableau 1.	Amorces utilisées dans chaque réaction de PCR et taille de l'amplicon obtenu.....	50
Tableau 2.	Répartition des échantillons entre les deux PCR en temps réel.....	51
Tableau 3.	Séquences des amorces utilisées au cours des réactions de PCR en temps réel.....	52
Tableau 4.	Exemple d'utilisation des plaques à 48 puits des qPCR.....	52
Tableau 5.	Extrait des résultats de la PRNT sur les échantillons de sérum.....	55
Tableau 6.	Synthèse des résultats des analyses des échantillons d'urine par PCR nichée.....	58
Tableau 7.	Lieux et zones d'origine des 28 opossums originaires de Botucatu.....	59
Tableau 8.	Prévalence calculée du virus de la vaccine parmi les opossums en zone rurale, urbaine ou inconnue.....	59
Tableau 9.	Prévalence calculée du virus de la vaccine parmi les daguets gris prélevés.....	60
Tableau 10.	Comparaison des séquences des amplicons clonés et de l'amorce vgf R.....	61
Tableau 11.	Synthèse des informations concernant les animaux positifs à la qPCR C11R.....	63

Table des annexes

Annexe 1. Tableau des informations relatives à chaque animal prélevé	76
Annexe 2. Principe de la Séroneutralisation par Réduction des Plages de Lyse (PRNT)	83
Annexe 3. Protocoles des kits d'extraction d'ADN	86
Annexe 4. Principe de la Réaction en Chaîne par Polymérase (PCR)	87
Annexe 5. Electrophorèse	90
Annexe 6. Séquence des fragments amplifiés lors des différentes réactions de PCR. D'après le logiciel in silico	91
Annexe 7. Principe de la PCR quantitative ou PCR en temps réel avec la technique SYBR Green® .	92
Annexe 8. Table des mélanges des 126 échantillons négatifs à la PCR nichée et testés en qPCR C11R	96
Annexe 9. Tableau simplifié des résultats des analyses sérologiques et moléculaires	97
Annexe 10. Tableau des résultats des analyses sérologiques par PRNT	100
Annexe 11. Tableau des résultats des analyses moléculaires par PCR nichée	103

Introduction

Le virus de la vaccine appartient au genre *Orthopoxvirus* de la famille des *Poxviridae*. Il est responsable d'une maladie appelée la vaccine, et est zoonotique. Il a été mis en évidence par Allan Downie dans les années 1930 bien que probablement utilisé déjà depuis plusieurs dizaines d'années. En 1796, Edward Jenner inventa le principe de vaccination en inoculant le virus de la variole bovine (cowpox) aux individus pour les protéger de la variole humaine provoquant alors près de 40% de mortalité. Ce n'est que dans les années 1880 que Louis Pasteur vulgarise les termes de vaccin et de vaccination désignant le fait d'utiliser un agent modifié pour se protéger d'une maladie infectieuse.

La variole est une maladie infectieuse apparue il y a près de 5 000 ans au sein des populations humaines (Fenner, 1993). A l'époque de Jenner, la vaccination des populations s'est d'abord effectuée par contact direct avec les lésions de vaccination des individus vaccinés vers les non vaccinés (Trindade et al., 2007). Entre le XVIII^e et le XIX^e siècle, les vaccins ont ensuite été produits par inoculation du cowpox à des veaux. (Oliveira et al., 2017). Il est supposé que c'est au cours de cette pratique qu'aurait été introduit aléatoirement le virus de la vaccine. Dès 1950, ce VACV a alors été inoculé aux veaux pour produire les vaccins (Fenner, 1993).

En 1980, l'OMS a déclaré la variole comme officiellement éradiquée et l'utilisation du VACV a été arrêtée. La mortalité était alors de 1/10⁶ et principalement liée à des complications vaccinales (encéphalomyélite vaccinale, vaccine progressive, etc.) (Knipe et al., 2013).

Par sa structure morphologique et génomique, son cycle épidémiologique et sa facilité d'étude, le virus de la vaccine (VACV) constitue un virus prototype du genre *Orthopoxvirus*. C'est en effet le premier virus animal à avoir été vu, isolé et dont le génome a été entièrement séquencé (Knipe et al., 2013). Le VACV est impliqué dans de nombreuses études sur les vaccins recombinants ou encore les traitements contre le cancer.

Actuellement, il est principalement retrouvé chez les bovins. Les signes cliniques sont cutanés et l'homme se contamine majoritairement par contact direct avec l'animal infecté. Alors que la pratique de la vaccination antivariolique avait été arrêtée, le nombre de cas humains est aujourd'hui en augmentation, et particulièrement au Brésil.

Plusieurs hypothèses ont été formulées quant à l'origine du virus circulant au sein du pays. L'une d'elles étant l'échappement et l'adaptation d'une souche vaccinale à une certaine population animale (Peres et al., 2018). Une autre suggérait qu'il s'agisse d'un virus génétiquement et phénotypiquement différent du précédent, et présent dans des réservoirs naturels inconnus, tels que la faune sauvage (Peres et al., 2013).

Dans ce travail nous allons dans une première partie présenter les caractéristiques biologiques et épidémiologiques du virus de la vaccine, et nous pencher particulièrement sur sa présence au Brésil. Dans une seconde partie, nous traiterons de la partie expérimentale de ce travail dont l'objectif était de savoir si la faune sauvage constituait un réservoir du virus de la vaccine dans une région indemne.

Partie 1 : Etude bibliographique

Le virus de la vaccine (VACV),
étude clinique et histoire

I. Le virus de la vaccine

1. Classification systématique

Le virus de la vaccine (VACV) est une espèce de poxvirus de la famille des *Poxviridae*. Les virus de cette famille possèdent la particularité de se répliquer dans le cytoplasme de la cellule hôte qu'ils infectent. Ils ont également la caractéristique de pouvoir être entourés d'une double enveloppe. Leur génome est composé d'une seule molécule d'ADN double brin de 130 à plus de 400 kilo-paires de base (kpb) dont les extrémités sont repliées en épingle à cheveux.

Le VACV fait partie de la sous-famille des *Chordopoxvirinae*, infectant les vertébrés, et au genre *Orthopoxvirus* (OPV). Les 9 espèces de virus de ce genre peuvent être responsables de maladies graves telles que la variole humaine (VARV) et zoonotiques pour certaines telles que la variole bovine (cowpox) et la variole simienne (monkeypox).

Au sein de ce genre, 6 espèces (e.g. VACV, camelpox, cowpox, virus ectromelia, monkeypox, taterapox et VARV) forment un groupe phylogénétiquement proche à plus de 90%, distinct des 3 autres espèces endémiques d'Amérique du Nord (e.g. raccoonpox, skunkpox, et volepox) (Smithson et al., 2017).

Plusieurs souches de VACV ont été identifiées et classées selon leur proximité génétique. Au cours de l'évolution se sont opérées des délétions de nucléotides au sein de certains gènes du VACV (Knipe et al., 2013). L'un d'eux, très conservé entre les *Orthopoxvirus*, est le gène A56R responsable de la synthèse d'hémagglutinine virale (HA). Chaque souche de VACV partage les mêmes délétions et l'étude de la séquence du gène A56R a permis de les apparenter entre elles (Figure 1) (Oliveira et al., 2017). Les souches de VACV rencontrées au Brésil, intéressant particulièrement ce travail, sont réunies en deux groupes, comme indiqué sur la Figure 1.

L'origine du virus de la vaccine est encore inconnue, aucun hôte naturel ne lui est connu bien qu'il semble infecter préférentiellement les bovins et l'homme (Knipe et al., 2013). Certaines études ont montré la contamination d'animaux domestiques et péri-domestiques par le VACV (Costa et al., 2017) tandis que d'autres sont menées afin d'éclaircir le cycle épidémiologique de ce virus.

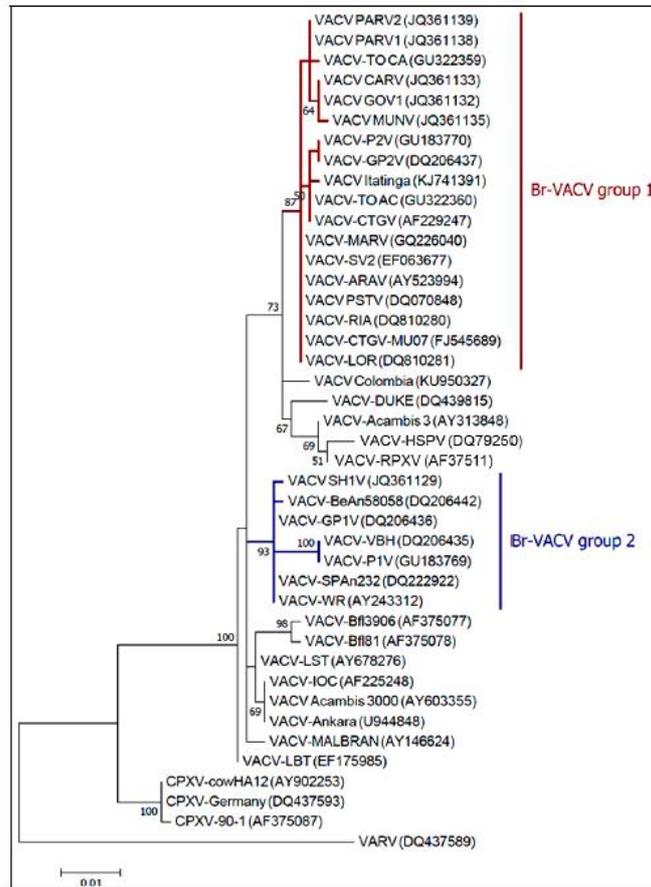


Figure 1. [Arbre phylogénétique des souches de VACV basé sur la séquence du gène A56R.](#) Les virus cowpox (CPXV) et de la variole (VARV) constituent le groupe extérieur. Les séquences sont disponibles dans la banque de données NCBI sous les numéros d'accès GenBank cités entre parenthèses. Courtoisie de Jaqueline Silva de Oliveira.

2. Morphologie et structure du virus de la vaccine (VACV)

a) Morphologie

Le VACV est un virus de grande taille, 360 x 270 x 250nm, et de poids important, 9,5fg. Il est composé à 90% de protéines, 5% de lipides et 3,2% d'ADN. Il apparaît en microscopie optique sous la forme d'un carré ou d'un rectangle présentant des stries désorientées à sa surface. Le microscope électronique permet de dévoiler son ultrastructure, typique d'un poxvirus. Il existe sous deux formes infectantes (**Image 1**) : le virion mature (MV) simplement enveloppé pouvant donner naissance à des formes doublement enveloppées (EV).

b) Structure

La double enveloppe est constituée de deux bicouches lipidiques (issues de lipides cellulaires et comprenant des protéines virales originales) séparées par des éléments

tubulaires de surface donnant l'aspect strié en microscopie optique. Les éléments contenus dans ces enveloppes déterminent les propriétés antigéniques du virus et jouent un rôle central dans la contamination d'une cellule hôte (Knipe et al., 2013).

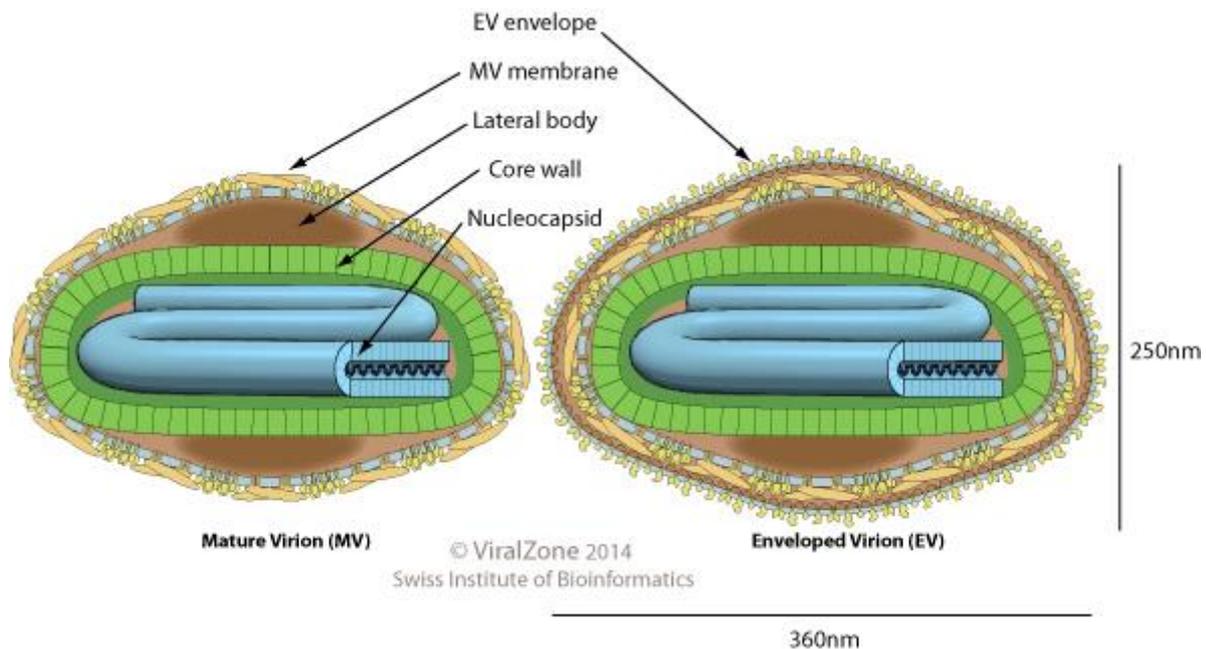


Image 1. Structure du virus de la vaccine. Issue de <https://viralzone.expasy.org/149>. Illustration des deux formes virales, MV simplement enveloppé et EV doublement enveloppé. « Lateral body » désigne les corps latéraux, « core wall » désigne la palissade protéique, « nucleocapsid » désigne le nucléosome.

Le MV est formé de deux éléments, le core au centre et les corps latéraux à la périphérie entourés d'une enveloppe (Image 1). Les corps latéraux sont des agrégats de matériel hétérogène remplissant les parties concaves du core, ils seraient un lieu privilégié de stockage de matériel viral nécessaire à l'infection d'une cellule hôte (Cyrklaff et al., 2005). Le core du virion est composé du nucléosome, regroupant le matériel génétique et des protéines virales, entouré d'une palissade protéique.

c) Composition protéique

Le protéome du VACV est organisé par de nombreux polypeptides, entre 58 et 73 ont été dénombrés (Mirzakhanyan, Gershon, 2019), dont les rôles sont variés. La double enveloppe du virus contient six protéines uniques, glycosylées ou non, réparties en proportion différentes entre les deux couches lipidiques. Ces protéines sont impliquées dans la structure du virus et la reconnaissance et la fixation à la cellule (Mirzakhanyan, Gershon, 2019). L'enveloppe du MV contient des complexes dits « d'entrée/fusion » ayant un rôle particulier dans l'attachement du virus aux

glycosaminoglycanes ou à la laminine de la matrice extracellulaire des cellules, ce qui assure la pénétration du virus dans la cellule hôte (Gray et al., 2018).

Au contraire, la palissade du core ne contient aucune glycoprotéine. Elle possède 22 protéines connues dont seulement 2 sont des enzymes assurant la stabilité des ponts disulfures liants les 20 protéines restantes. Ces protéines de structure jouent également un rôle dans la morphogénèse, l'infection et la virulence du virus. Ces protéines forment des complexes compacts et solidifiés par des ponts disulfures.

Le nucléosome compte cinquante protéines virales différentes. Trente d'entre elles sont des enzymes, dont la moitié participent à la synthèse précoce d'ARN messager et forment le « transcriptosome » du virus (Mirzakhanyan, Gershon, 2019). La présence de ce transcriptosome dans le core du virus est particulier aux poxvirus. Cette entité permet au virus lui-même de synthétiser et modifier l'ARNm, sans détourner la machinerie de la cellule hôte au contraire des autres virus à ADN (Baroudy, Moss, 1980). Les vingt protéines restantes régulent la morphogénèse et constituent la structure du virus.

d) Génome viral

Le génome du VACV est formé d'un ADN en éventail, linéaire, double brin d'une longueur d'environ 200kpb et d'un diamètre entre 30 et 40nm. Au sein du virion mature, le génome est lié aux protéines constituant un complexe nucléo-protéique (Condit et al., 2006).

L'ADN est replié en épingle à cheveux à chacune de ses extrémités, maintenues par des liaisons covalentes, formant des domaines RIT (A+T rich). Ces domaines sont des régions terminales répétées, inversées à chaque extrémité et d'une longueur d'environ 10kpb chacune (Figure 2.A.). Les gènes qui y sont contenus sont très conservés, d'en général moins de 100pb, et codent pour les facteurs de pathogénicité responsables du contournement des défenses immunitaires de l'hôte. Ces séquences présentent néanmoins des spécificités liées à l'espèce et à la souche virale permettant leur détection et leur différenciation en laboratoire (Shchelkunov et al., 2011). Les domaines RIT contiennent également des séquences en tandem (Figure 2.B.), plusieurs cadres de lecture ouverts (ORF) et des sites de terminaison de la réplication.

Entre les domaines RIT, la séquence génétique du VACV est unique et d'une longueur d'environ 180kpb (Figure 2).

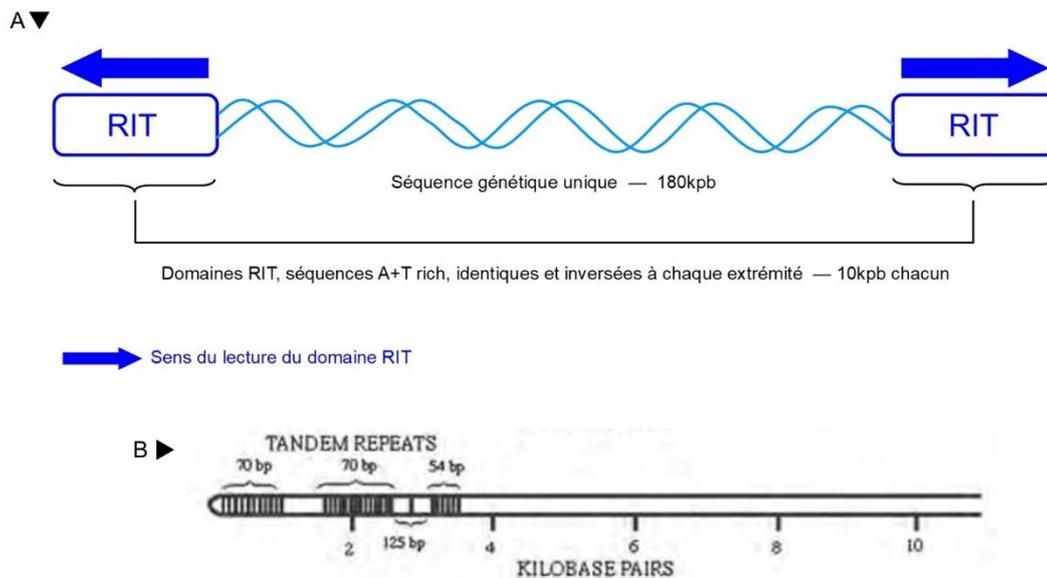


Figure 2. Structure complète du génome du VACV. A) Schéma de la structure du génome viral. Un ADN linéaire, double brin replié en épingle à cheveux en ses extrémités formant des domaines RIT, séquences identiques, inversées à chaque extrémité. D'après Knipe *et al.*, 2013. Illustration : C. Peltier. B) Schéma des séquences en tandem retrouvées dans les domaines RIT. Issu de Knipe *et al.*, 2013.

Le core du virus contient une ARN polymérase virale assurant la transcription du génome en ARN messager (Baroudy, Moss, 1980). Avec le transcriptosome du nucléosome, elle forme un système de transcription viral précoce et indépendant, activé lors de l'entrée dans la cellule (Knipe *et al.*, 2013).

3. Propriétés physico-chimiques et antigéniques

a) Propriétés physico-chimiques

Bien qu'étant un virus enveloppé, le VACV résiste dans l'environnement, particulièrement en milieu sec et chaud et dans la matière organique. Des particules virales de VACV ont notamment été retrouvées au Brésil dans des fromages fabriqués à partir de lait contaminé, malgré un traitement thermique à 65°C pendant 30 minutes (de Oliveira *et al.*, 2010).

Le VACV est également résistant dans certains solvants et très stable dans les aérosols en particulier à basse température (11°C) et à un taux d'humidité inférieur à 50% (Essbauer *et al.*, 2007).

Le virus est tout de même facilement éliminé par l'utilisation de la plupart des désinfectants. L'exposition aux rayons UV engendre rapidement des mutations génétiques et provoque l'inactivation du virus en 20 secondes dans l'eau potable (Essbauer et al., 2007). La stabilité du virus dépend également du pH du milieu.

b) Propriétés antigéniques

Tous les virus du genre *Orthopoxvirus* (OPV) offrent une protection croisée importante (Moss, 2011) grâce à une séquence génétique très conservée entre les espèces. De plus leur grande taille et leur structure élaborée commune engendrent la synthèse de nombreux anticorps anti-OPV qui seront alors dirigés contre plusieurs virus du même genre (Knipe et al., 2013). Cette propriété a très largement été utilisée lors de la campagne de vaccination contre la variole à partir de cowpox puis de VACV.

Une réponse inflammatoire primaire est mise en place par l'hôte dès l'entrée du virus dans l'organisme. S'en suivent des réponses immunitaires humorales et cellulaires impliquant des lymphocytes T CD4 et CD8 et des anticorps anti-OPV. Les lymphocytes T CD8 sont orientés vers des antigènes viraux produits précocement, tandis que les lymphocytes T CD4 et les anticorps ciblent préférentiellement les produits de gènes viraux traduits tardivement ainsi que les protéines virales de structure (Moutaftsi et al., 2010).

Grâce aux facteurs de pathogénicité, les poxvirus sont capables de contourner les défenses immunitaires de l'hôte. Il s'agit de protéines qui ressembleront aux protéines inflammatoires de l'hôte ou bien qui interféreront avec les messagers et canaux intercellulaires. Ces mécanismes restent cependant spécifiques à chaque virus et sont très adaptés à l'hôte qu'il infecte préférentiellement (Knipe et al., 2013).

II. Résumé de l'étiopathogénie du VACV

1. Cycle viral au sein de la cellule

Une fois dans l'organisme, la forme EV du virus de la vaccine se fixe à une cellule. L'enveloppe la plus externe est rejetée mettant en contact le MV avec la cellule. Un mécanisme de fusion des membranes ou d'endocytose permet d'introduire le core

qui occupe alors le cytoplasme pour y réaliser la réplication de son génome. S'en suit la formation de nouveaux virions puis la sortie de la cellule et la dissémination du virus dans l'organisme. Le cycle du virus est lytique et ses étapes sont regroupées sur la [Figure 3](#).

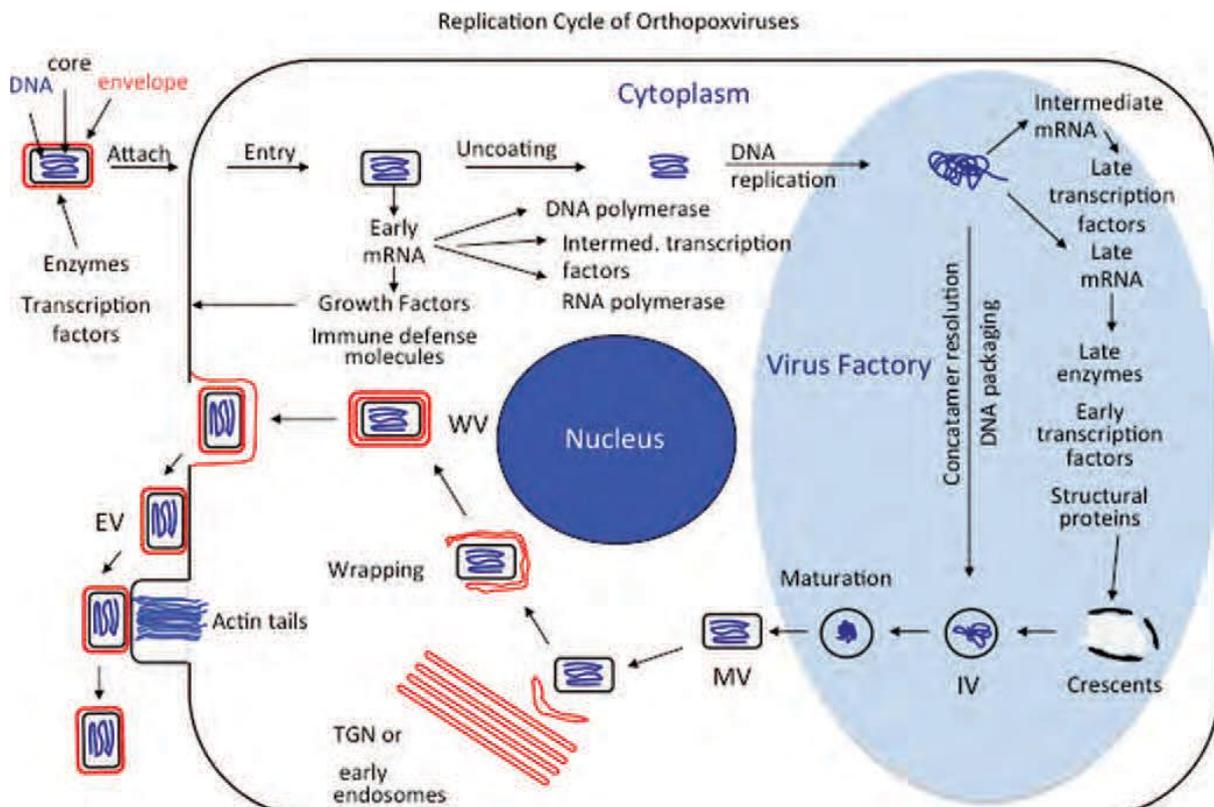


Figure 3. [Schéma du cycle de réplication du VACV.](#) Ce cycle est commun aux OPV, chaque étape est représentée sur le schéma. IV désigne le virion immature, MV le virion mature simplement enveloppé, TGN l'appareil de Golgi, WV le virion triplement enveloppé, EV le virion doublement enveloppé sorti de la cellule. Issu de Knipe *et al.*, 2013.

a) Entrée dans la cellule

L'EV reconnaît et se fixe à la cellule par le complexe de protéines d'entrée membranaire (Knipe *et al.*, 2013). L'enveloppe de l'EV est ensuite éliminée par fixation des glycoprotéines aux glycosaminoglycanes de la cellule. Le MV est alors exposé à la surface de la cellule. Trois mécanismes d'entrée peuvent avoir lieu : l'endocytose en milieu acide, la macropynocitose ou la fusion membranaire.

Quatre protéines sont impliquées dans la fixation du MV à la surface de la cellule. De cette fixation découle une cascade de réactions responsables de la formation de doigts d'actine et de cytovilline enveloppant le MV et le faisant entrer par endocytose ([Image 2.B.](#)) (Knipe *et al.*, 2013). Le mécanisme de fusion membranaires implique le complexe protéique d'entrée/fusion très localisé sur la membrane du MV (Mirzakhanyan, Gershon, 2019) rendant ce mécanisme moins fréquent car le MV doit

être dans une orientation précise (Gray et al., 2018) (Image 2.A.). Le mécanisme précis ainsi que les protéines cellulaires spécifiquement impliquées dans la fusion de la membrane avec le MV n'ont pas encore été identifiés.

Une fois le core entré, il est transporté par des microtubules jusqu'au site de transcription et le génome viral est exprimé.

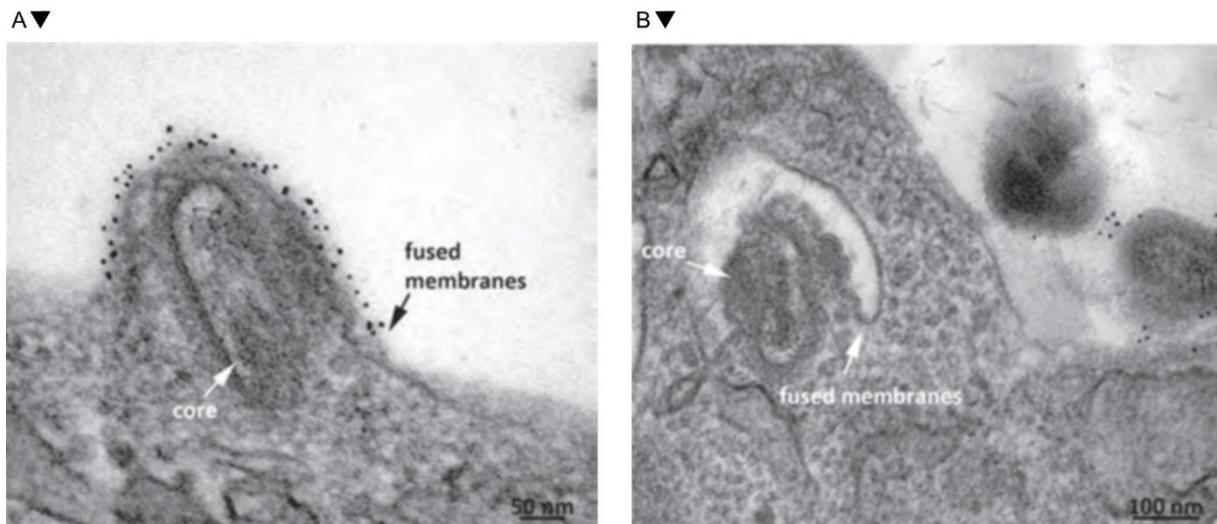


Image 2. [Mécanismes d'entrée du MV dans la cellule hôte.](#) Issu de Knipe et al., 2013. A) Entrée par fusion membranaire, les membranes de la cellule et du MV ont fusionné, le core est dans le cytoplasme. B) Entrée par endocytose en milieu acide, le MV est entouré par les proliférations d'actine et de cytofilline

b) Réplication du génome

L'expression du génome viral a exclusivement lieu dans le cytoplasme de la cellule. Le core est tout d'abord transporté par des microtubules jusqu'au lieu de transcription (Leite, Way, 2015) où le système de transcription précoce est activé 20 minutes après l'entrée du MV. Près de 50% du génome est alors transcrit en ARNm (Baldick, Moss, 1993). Ces ARNm vont d'abord traduire des gènes indispensables synthétisant des facteurs de croissance, impliqués dans la morphogénèse, et des facteurs de pathogénicité, détournant les défenses immunitaires de l'hôte. Ensuite, les ARNm précoces forment le système de transcription intermédiaire par la traduction de gènes d'ADN polymérase, d'ARN polymérase et de facteurs de transcription intermédiaire. La transcription précoce est arrêtée par la décapsulation et l'élimination de la palissade du core (Knipe et al., 2013).

La décapsulation du génome permettrait l'ouverture de la molécule d'ADN pour la rendre accessible aux facteurs de réplication et aux facteurs de transcription nouvellement synthétisés (Keck et al., 1990). L'ADN est alors répliqué et engendre la

formation de près de 10 000 copies du génome dont la moitié seront intégrés à de nouveaux virions (Knipe et al., 2013). Au cours de la réplication, l'ADN prend une forme en concatémère par la jonction de deux exactes copies des extrémités en épingle à cheveux de l'ADN mature, provoquant l'alignement de deux molécules d'ADN en miroir (Moyer, Graves, 1981). La résolution de la forme concatémère s'opère rapidement car les jonctions ne sont pas stables.

Au cours de la réplication, l'ADN est transcrit en de nombreux ARNm intermédiaires permettant la synthèse de facteurs de transcription tardive se continuant tout au long du cycle de vie du virus. Cette dernière étape assure la production d'ARNm tardifs permettant la traduction de gènes tardifs impliqués dans la morphogénèse du nouveau virion. Seraient alors traduits 38 gènes codant pour des protéines de structure, des enzymes de la morphogénèse et des facteurs de transcription précoce (Yang et al., 2011). Tous ces produits sont réunis en une « usine à virus » assurant la formation de nouveaux virions (Knipe et al., 2013).

Certains produits de l'hôte semblent nécessaires à l'accomplissement de certaines étapes. La terminaison des phases de transcription intermédiaires et précoces ferait intervenir des protéines de la cellule hôte encore non identifiées (Broyles, 2003). Il est cependant supposé que les protéines de l'hôte ne soient mises à profit qu'à partir d'une certaine quantité d'ADN viral présent, *i. e.* après la réplication de l'ADN (Broyles, 2003).

De nombreuses recombinaisons peuvent avoir lieu entre l'ADN viral et le génome de l'hôte, mais aussi entre les génomes viraux, en particulier au niveau des régions terminales du génome (Knipe et al., 2013). Cela peut expliquer les variations spécifiques rencontrées entre les domaines RIT des différentes souches de VACV ainsi que leur spécificité d'hôte.

Dans une cellule eucaryote, la réplication et la transcription de l'ADN se produisent dans le noyau et la traduction au contraire a lieu dans le cytoplasme. Ainsi les sites de production d'ARN et de protéines sont distincts et cette particularité est souvent maintenue par les virus à ADN. Le VACV diffère en cela que les sites de réplication, transcription et traduction sont confondus au sein de « l'usine à virus » dans le cytoplasme de la cellule. Cela représente un avantage considérable du virus sur la cellule et contribue à sa prise de contrôle sur les mécanismes cellulaires (Katsafanas, Moss, 2007).

c) L'assemblage de nouveaux virions

L'assemblage de nouveaux virions commence aux sites des « usines à virus ». A partir des produits synthétisés lors de la transcription tardive, une membrane en forme de croissant est formée ([Image 3.C.](#)). Cette membrane reste partiellement ouverte en attendant d'y accueillir le matériel génétique du futur virion. Cette faculté est permise par le réseau en nid d'abeille qu'elle présente à sa surface (Heuser, 2005).

La membrane en croissant reçoit un viroplasma constitué de protéines virales du core (Szajner et al., 2004). A ce viroplasma se joint le matériel génétique sous forme de nucléoïdes d'ADN. Lors de la résolution des concatémères, l'ADN s'accumule ensuite en crystalloïdes et subit une nouvelle encapsidation avant d'intégrer le virion immature (IV) ([Image 3.IV.](#)) sous forme de nucléoïde (Knipe et al., 2013). Sont également joints au viroplasma les facteurs et enzymes de transcription précoce. Une fois le complexe nucléoprotéique du virion entièrement constitué, la membrane en croissant se ferme et perd son réseau en nid d'abeille pour prendre une forme sphérique, formant l'enveloppe de l'IV. L'IV subit une maturation importante impliquant la lyse de certaines protéines virales et la formation de ponts disulfure entre les protéines membranaires. Ces modifications donnent alors sa forme de brique à l'IV mature (MV) ([Image 3.MV.](#)) (Szajner et al., 2004).

Avant leur sortie de la cellule par lyse, certains MV subissent un passage par l'appareil de Golgi et les citernes de l'endosomes (Hiller, Weber, 1985) et deviennent des virions triplement enveloppés intracellulaires (WV) ([Image 3.WV.](#)). Ces derniers sont ensuite transportés par les microtubules jusqu'à la périphérie de la cellule. Leur membrane la plus externe fusionne alors avec la membrane de la cellule permettant de libérer un virion mature doublement enveloppé (EV) ([Image 3.EV.](#)) complètement capable d'infecter de nouvelles cellules. Au site de sortie de l'EV une polymérisation d'actine et de cytoilline propulse le nouvel EV et favorise la contamination de proche en proche par ce dernier (Blasco, Moss, 1992). Les MV n'ayant pas été triplement enveloppés sont ensuite libérés par lyse de la cellule et représentent entre 70% et 95% de la progénie virale.

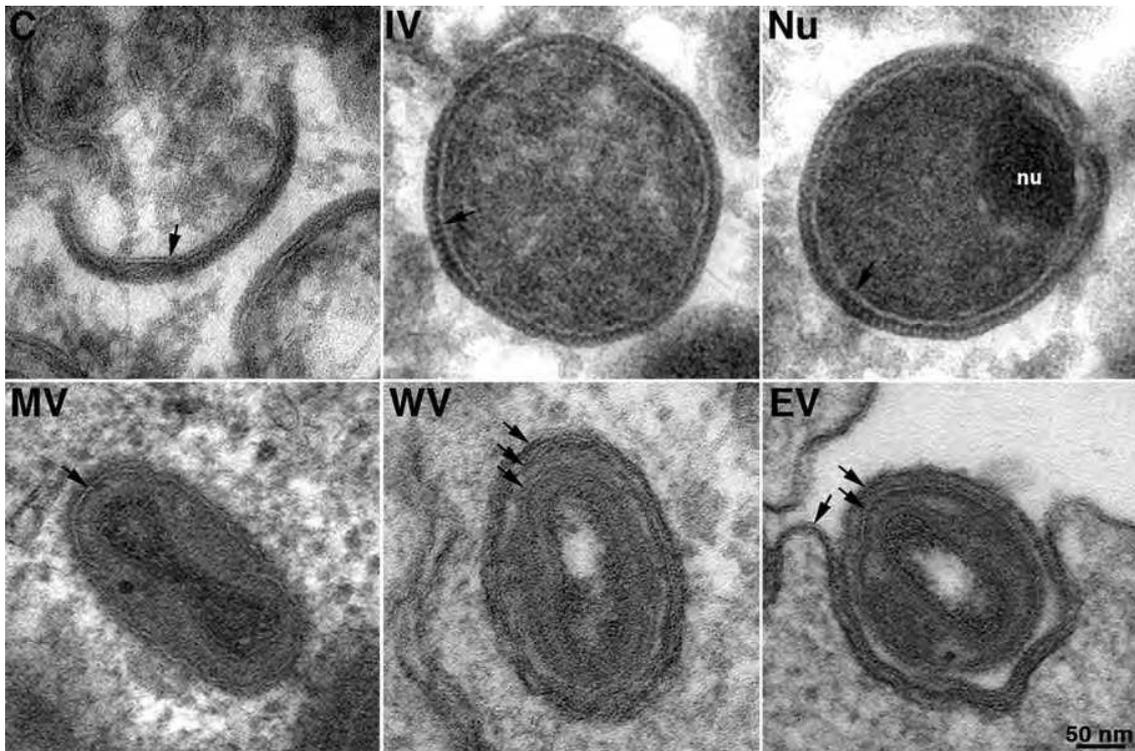


Image 3. [Morphogénèse et sortie de l'EV de la cellule.](#) Les différents stades sont visibles, C désigne la membrane en croissant, IV le virion immature, Nu le nucléoïde de l'IV, MV le virion mature, WV l'IMV doublement enveloppé, EV le virion mature enveloppé sorti de la cellule. Sur la dernière image est visible la fusion de la membrane externe du WV avec la membrane de la cellule. Issu de Knipe et al., 2013.

2. Echappement au système immunitaire

a) Effets sur l'organisme hôte et détournement des outils cellulaires

L'infection par le VACV engendre des modifications du cytosquelette de la cellule et de l'espace intercellulaire provoquant un arrondissement et une dissociation des cellules les unes des autres (Knipe et al., 2013). Au sein de la cellule, les microtubules sont détournés pour la migration du core puis du virion mature, et la synthèse de filament d'actine et de cytovilline est activée pour l'expulsion et la dissémination du virus (Leite, Way, 2015).

S'opère également un détournement de la synthèse protéique de l'hôte au profit des protéines virales. Une protéine virale intermédiaire ou tardive serait responsable de ce détournement (Knipe et al., 2013) en plus d'une augmentation de la quantité d'ARNm viral dans la cellule provoquant une diminution de la quantité d'ARNm hôte (Chou et al., 2012). Le VACV possède également la capacité de s'approprier les facteurs d'initiation de la traduction de l'hôte afin de favoriser sa production d'ARNm et de protéines virales (Katsafanas, Moss, 2007), et parvient à inhiber la réplication

de l'ADN hôte afin de profiter de toute la machinerie cellulaire de réplication du génome (Knipe et al., 2013).

Des études ont montré que le virus de la vaccine utiliserait également le système ubiquitine/protéasome, régulant de nombreux événements cellulaires, pour assurer la réplication de son génome et la bonne expression des protéines virales intermédiaires et tardives (Satheshkumar et al., 2009).

Les OPV stimulent certaines voies cellulaires pouvant être néfastes à l'hôte et provoquant par exemple des hyperplasies et des tumeurs par la sécrétion d'un homologue du facteur de croissance de l'épiderme, le *vaccinia growth factor* (VGF) (Buller et al., 1988) responsable de la formation d'un foyer d'infection où la croissance cellulaire se trouve très augmentée. D'autres mécanismes sont aussi détournés afin de favoriser la dissémination du virus dans l'organisme (Wise et al., 2003).

b) Défenses du virus contre le système immunitaire de l'hôte

(i) *Lutte contre les systèmes de défense extracellulaires*

Les poxvirus sont capables d'échapper aux défenses immunitaires grâce aux nombreuses protéines qu'ils synthétisent. Les gènes codant pour ces protéines occupent entre un tiers et la moitié du génome (Smith et al., 2013) et sont exprimés précocement au cours de l'infection. Les protéines de défenses peuvent avoir plusieurs fonctions immunomodulatrices parmi trois principaux modes d'action : certaines ressemblent aux cytokines de l'hôte (virokines) ; d'autres forment des virorécepteurs, mimant des récepteurs cellulaires ayant perdu leur domaine transmembranaire et capables de séquestrer des ligands ; ou encore interfèrent avec les signaux cellulaires (Smith et al., 2013).

Un des premiers systèmes à être détourné par le virus est le complément. Le VACV synthétise une protéine de contrôle du complément (VCP) capable de se fixer à ce dernier et d'inhiber son activation (Kotwal et al., 1990). Une partie de ce VCP est fixée à des molécules *heparin-like* à la surface de la cellule ou bien à la protéine A56R (hémagglutinine) du virus présente à la surface des cellules infectées et des EV (Smith et al., 2013). Le VCP reconnaît le complément aidé par les protéines de contrôle du complément de l'hôte elles-mêmes qui auront été intégrées à la membrane de l'EV au cours de la morphogénèse.

Lorsqu'un ARN étranger est détecté, l'organisme émet des interférons (IFN). Le VACV parvient à bloquer ces IFN par la synthèse de protéines inhibitrices se fixant aux IFN. Ces protéines sont présentes à la surface des cellules ou dans le milieu extracellulaire, bloquant ainsi à la fois l'action autocrine et paracrine des IFN (Colamonici et al., 1995). Les IFN sont activés par l'interleukine 18 (IL-18). Pour se défendre, le VACV produit une protéine homologue de l'IL-18 BP des mammifères capables de se lier et d'inactiver l'IL-18 (Born et al., 2000).

Les virorécepteurs produits par le VACV sont notamment des homologues des récepteurs des facteurs de nécrose tumorale (TNF) ou bien des IL-1 β , médiateurs de réponses inflammatoires ou immunitaires (Smith et al., 2013).

Lors de l'infection par un virus, les chimiokines assurent l'activation et la migration des leucocytes jusqu'au virus. Le VACV code également pour des protéines de ligation empêchant l'action des chimiokines et, en particulier la souche Western Reserve (WR), exprime une protéine capable de bloquer les messages intracellulaires de la synthèse de chimiokines (Smith et al., 2013).

(ii) Lutte contre les systèmes de défense intracellulaires

De nombreux mécanismes de défenses de l'hôte ont lieu au sein même de la cellule. Par exemple, les récepteurs de reconnaissance de pathogènes sont des récepteurs du système immunitaire inné situés à la surface des cellules et capables de reconnaître de nombreux composants viraux tels que l'ADN, l'ARN ou les protéines. Parmi eux se trouvent les récepteurs Toll-like (TLR) fixant l'ARN et déclenchant une cascade de réactions intracellulaires à l'origine de l'expression des IFN et des cytokines pro-inflammatoires. Le VACV synthétise des protéines allant interférer à différents niveaux de cette cascade empêchant alors la production d'IFN et de cytokines (Smith et al., 2013).

Les IFN ont également un rôle intracellulaire en activant la transcription de gènes stimulés par l'interféron (Smith et al., 2013). Les protéines du VACV sont capables d'inhiber directement les IFN, ou bien de bloquer les facteurs de transcription (Smith et al., 2013).

Une autre réponse à l'infection par un virus est dépendante du système NF-kB présent dans le cytoplasme et activé par l'Ik kinase (IKK), elle-même activée par les TLR. Les protéines du VACV pourront se fixer à l'IKK ou bien intervenir dans la

cascade de réaction du TLR en s'y fixant ou en bloquant les différents intervenants (Smith et al., 2013).

L'apoptose est un mécanisme puissant de lutte contre les infections virales, il s'agit de la mort programmée d'une cellule infectée. Tous les constituants intracellulaires sont détruits mais la membrane cellulaire est maintenue afin de ne pas endommager les cellules voisines (Veyer et al., 2017). Les signaux de mort cellulaire sont transmis par la voie extrinsèque ou par la voie intrinsèque. La voie extrinsèque implique des molécules de ligation, le ligand Fas ou le TNF α , se liant à des récepteurs de mort cellulaire à la surface de la cellule et provoquant la formation d'un complexe activant la synthèse de caspase 8 responsable de la mort de la cellule. Lorsque la caspase 8 est déficiente, des kinases RIP prennent le relais dans la signalisation de la mort cellulaire (Veyer et al., 2017). La voie intrinsèque dépend des mitochondries, une protéine pro-apoptotique BH3 est activé et se lie au complexe Bax/Bak qui va former des pores dans la membrane de la mitochondrie. Vont alors s'échapper vers le cytoplasme les cytochromes c induisant la formation du complexe d'apoptose et l'activation des caspases 3 et 7 (Veyer et al., 2017). La voie intrinsèque peut également s'opérer à travers l'endosome et l'appareil de Golgi ayant subi un stress, *i. e.* une infection virale. Les poxvirus produisent de nombreuses protéines capables d'interférer avec les signaux extrinsèques ou intrinsèques de l'apoptose. Certaines souches de VACV sont capables de bloquer la fixation de Fas ligand et de TNF α et d'inhiber l'activité des caspases (Veyer et al., 2017). D'autres possèdent également des gènes codant pour des protéines stoppant l'activation du complexe Bax/Bak des mitochondries, empêchant la sortie des cytochromes c (Veyer et al., 2017). Certaines protéines sont capables de bloquer la voie extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose (Veyer et al., 2017). D'autres mécanismes d'inhibition de l'apoptose sont réalisés par le VACV, et sont disponible dans le travail de Veyer et al., 2017.

Enfin, au cours de son cycle le virus produit des antigènes reconnu par les anticorps grâce à des cellules présentatrices d'antigènes. La protéine A35 produite par le VACV est capable d'inhiber ces cellules par un mécanisme encore inconnu (Knipe et al., 2013).

Les poxvirus possèdent un panel très large de protéines impliquées dans l'inhibition des réponses immunitaires de l'organisme, beaucoup de leurs mécanismes restent encore à élucider (Knipe et al., 2013).

III. Epidémiologie, présentation clinique et lutte

1. Epidémiologie

a) Distribution géographique du virus de la vaccine

(i) *Le VACV dans le monde*

Depuis environ 40 ans, les populations ne sont donc plus vaccinées systématiquement contre la variole et ne sont théoriquement plus exposées au virus de la vaccine. Il avait de plus été supposé que le VACV ne pouvait pas infecter naturellement un hôte car son utilisation massive dans les campagnes de vaccination en aurait fait une souche de laboratoire atténuée (Oliveira et al., 2017). Cependant des cas humains et animaux sont encore recensés aujourd'hui dans le monde, comme le virus buffalopox (BPXV) en Inde, sous-espèce de VACV, touchant les buffles et l'homme, ou le virus rabbitpox aux Pays-Bas et aux Etats-Unis, touchant les lapins. D'autres preuves de circulation du VACV ont été trouvées en Amérique du sud en Argentine, en Uruguay, en Colombie ou encore au Brésil (Oliveira et al., 2017).

Le VACV est particulièrement actif et étudié en Inde et au Brésil (Figure 4) où les infections à poxvirus sont recensées depuis de nombreuses années et où elles constituent une menace pour l'élevage bovin. En effet, les virus infectent les bovins (vaches et buffles) et se transmettent aux éleveurs les manipulant (Singh et al., 2012), réduisant le taux de production de l'animal et causant l'arrêt de travail des éleveurs. Les infections à poxvirus sont rapportées en Inde depuis 1934, où des cas de BPXV avaient éclaté lors de la campagne de vaccination contre la variole, de même qu'en Egypte et au Népal. Aujourd'hui le BPXV est toujours présent en Inde et a également été retrouvé au Pakistan et en Indonésie (Singh et al., 2012) (Figure 4).

Le VACV se concentre principalement dans deux zones du globe mais des cas isolés ont également été notés au cours des dernières années. Des cas sporadiques ont notamment été rapportés aux Etats-Unis en 2009, liés à des complications vaccinales chez un militaire et une personne immunodéprimée (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2009b). Plus récemment, en 2018, a été rapporté en Chine le cas de 5 travailleurs contaminés par la voie respiratoire à la suite de la manipulation d'une peau de lapin mort du VACV (Hu et al., 2018). L'origine précise de ces virus ré-émergents n'a pas encore été déterminée, l'implication de la faune

sauvage dans leur circulation est évoquée (Singh et al., 2012) et sera discutée dans la suite de ce travail.

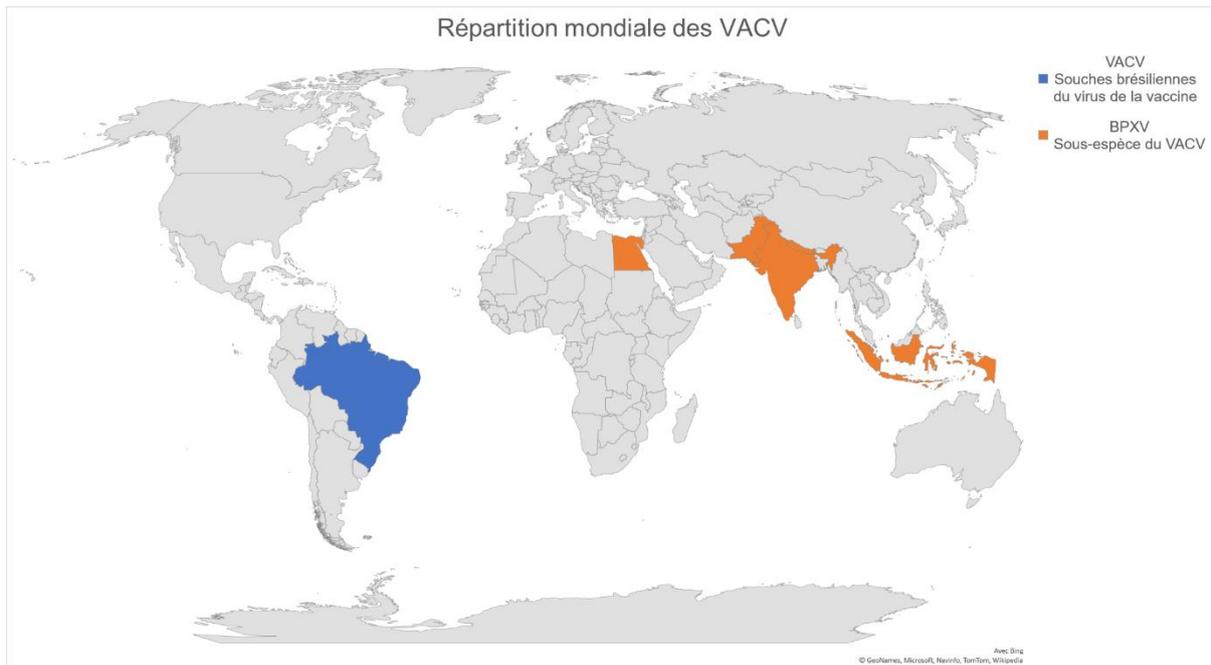


Figure 4. [Carte de la répartition mondiale du virus de la vaccine.](#) Sont représentés ici les pays où de nombreux cas de VACV sont encore rapportés aujourd'hui. En bleu, le Brésil et les différentes souches de VACV qu'il abrite. En orange, l'Inde, l'Égypte, le Népal, le Pakistan et l'Indonésie où le Buffalopox est actif. D'après (Singh et al., 2012). Illustration : C. Peltier

Le VACV étant un grand virus facilement isolable et visualisable, il est beaucoup utilisé aujourd'hui en recherche pour ses propriétés antigéniques. Il est notamment utilisé en tant que vecteur biologique et représente un outils important en immunologie et biochimie (Knipe et al., 2013). Sa grande diversité d'hôte rend son étude possible sur de nombreuses espèces avec une fiabilité de prédiction des conséquences immunologiques associées (Henderson, Moss, 1999). Il constitue la base de nombreux vaccins recombinants, en effet les protéines produites par ces virus au sein des mammifères sont normalement repliées, exprimées et transportées et peuvent ainsi être utilisées pour induire la production d'anticorps donnés. Les vaccins recombinant du VACV sont par exemple utilisés contre des maladies infectieuses telles que l'hépatite B et la rage (Henderson, Moss, 1999). La souche Modified Vaccinia Ankara (MVA) est principalement utilisée et son usage est sûr car elle n'engendre que très peu d'effets secondaires, étant non multiplicative chez les mammifères, et peut être administrée à des individus immunodéprimés (Overton et al., 2015).

Le VACV fait également l'objet d'études sur la thérapie contre le cancer. Son utilisation seul en tant que vaccin ne semble pas concluante alors que son

association à d'autres traitements donne une efficacité thérapeutique supérieure aux précédents essais (Guo et al., 2019).

(ii) La situation au Brésil

La première mention supposée du VACV au Brésil daterait de 1804 à l'époque de l'esclavage, lorsque des esclaves brésiliens ayant travaillé et été vaccinés en Europe sont revenus au Brésil. Ils sont alors arrivés dans un port de l'état de Bahia, Brésil, et ont transmis aux autres esclaves puis à la population le VACV par contacts directs. Les esclaves ont ensuite été envoyés au sud dans l'état de Rio de Janeiro et ont contribué à la distribution du vaccin (Trindade et al., 2007).

A partir de 1832 la vaccination contre la variole est devenue obligatoire dans certaines villes et en 1887 a été apporté au Brésil le premier vaccin produit sur veau (Trindade et al., 2007) à l'institut Oswaldo Cruz de Rio de Janeiro, probablement déjà à partir de VACV. L'éradication de la variole a commencé en Amérique Centrale et du Nord dès 1951 et en Europe en 1953. Cependant, le Brésil n'a pas mené de campagne nationale de vaccination avant 1962 grâce à l'aide de l'Organisation Panaméricaine de la Santé (Pan American Health Organization), campagne qui fut renouvelée en 1966 par le programme mondial de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (Trindade et al., 2007). Au cours de cette campagne, les souches Paris, Lister et NYCBH de VACV ont été utilisées alors que la souche Western Reserve (WR), largement utilisée et disponible aujourd'hui, n'a probablement pas été impliquée (Trindade et al., 2007). Cette dernière souche aurait subi différentes modifications suite à l'utilisation répétée en laboratoire sur des souris, sélectionnant alors son tropisme central à l'origine de l'encéphalomyélite, complication possible de la vaccination (Trindade et al., 2007).

Jusqu'au début des années 2000, la vaccine était considérée comme ré-émergente et sporadique car seulement quelques cas avaient été rapportés. Des épidémies ont cependant éclaté dans des élevages bovins de différents états du Brésil et des cas sauvages ont été rapportés (Dutra et al., 2017). La maladie causée par le VACV peut donc être considérée aujourd'hui comme endémique. Cependant le nombre de cas relatés aujourd'hui est probablement inférieur à la réalité à cause de la confusion entre le VACV et le cowpox, et le traitement inadapté alors mis en place (Oliveira et al., 2017). L'éducation des éleveurs et des professionnels de santé est donc primordiale à la bonne détection et prise en charge de la maladie.

Lorsque des cas ont été rapportés, des échantillons ont été prélevés sur l'homme, les animaux domestiques, péri-domestiques et sauvages, et ont permis d'extraire différentes souches de VACV. Le séquençage des souches brésiliennes a montré qu'elles sont regroupées en deux groupes monophylétiques (Trindade et al., 2007) basés sur la séquence de leur gène A56R. L'arbre phylogénétique regroupant ces souches est indiqué à la [Figure 1](#). Le virus cowpox (CPXV) de la vache et celui de la variole humaine (VARV) appartiennent à des taxons frères liés au VACV par un ancêtre commun. La souche WR appartient au groupe 2, la souche Ankara, très utilisée dans la recherche médicale, en revanche n'appartient à aucun groupe brésilien mais semble en être proche. Le lien établi entre les souches vaccinales et les souches sauvages suggère que le VACV circulant aujourd'hui puisse être issu d'une souche vaccinale anciennement utilisée (Trindade et al., 2007). Cela constitue la première hypothèse de l'origine de la recirculation du VACV au Brésil. Toutefois, la souche Lister et celle de l'institut Oswaldo Cruz (utilisées pour la vaccination dans le passé) sont distantes phylogénétiquement des souches brésiliennes actuelles, rendant cette hypothèse peu probable.

La souche circulant au Brésil serait alors issue de la souche de VACV originellement apportées par les esclaves ou bien aurait été apportée lors du programme de vaccination de l'OMS (Trindade et al., 2007) et aurait suivi une évolution différente des souches vaccinales. Différents échanges avec l'Europe auraient contribué à la diversité de souches de VACV rencontrées aujourd'hui (Trindade et al., 2007). Cependant ces hypothèses ne peuvent être élucidées tant que l'hôte naturel du VACV n'aura été déterminé. Différentes études ont été menées afin de rechercher la ou les espèces initialement porteuses du VACV afin d'en déterminer le cycle de transmission au sein des populations.

Les cas de VACV fréquemment rapportés touchent des populations issues de milieux ruraux, ainsi que le bétail, dans différents états du pays (Oliveira et al., 2017). La maladie s'exprimait chez des individus vaccinés comme chez ceux jamais vaccinés contre la variole. Outre l'homme et le bovin, le VACV a été détecté chez d'autres animaux domestiques, péri-domestiques et sauvages, pouvant alors constituer un hôte auquel le VACV se serait adapté. Parmi les espèces domestiques, le VACV a été détecté chez des chats, des chiens, des porcs, des chevaux, des ânes et des buffles (Lima et al., 2019). Les espèces péri-domestiques positives seraient les souris, les rats et les chiens et chats dans une moindre mesure (Lima et al., 2019). Concernant la faune sauvage, les espèces mises en cause sont de la famille des

procionidés (ratons laveurs, coatis), des primates non-humains, des marsupiaux et des rongeurs y compris des capybaras (Lima et al., 2019). Ces espèces semblent toutes porteuses de souches issues du groupe I et l'homme, le bétail, les chevaux, les chats et les rongeurs sauvages abritent également des souches du groupe II (Lima et al., 2019). Les deux groupes brésiliens ont démontré pouvoir provoquer des co-infections et circuler ensemble lors d'épidémies (Lima et al., 2019). L'hypothèse d'un portage du VACV par la faune sauvage ou péri-domestique et d'un maintien de sa circulation par la contamination de l'environnement est forte. En effet, des animaux sauvages ont été déclarés positifs alors qu'ils évoluaient dans une zone où aucun cas de VACV n'avait encore été rapporté (Dutra et al., 2017). D'autres l'ont été dans des zones n'ayant pas déclaré de cas depuis plusieurs années (Jônatas S. Abrahão et al., 2010). Sans savoir si le VACV circulant aujourd'hui au Brésil est originaire des animaux mentionnés ci-dessus, il est très fortement suspecté que ces derniers participent à la circulation du virus et constitue une source importante de contamination. En effet, le VACV a été détecté dans un élevage bovin en Amazonie, dans une région indemne (Mota et al., 2010), dont l'origine de la contamination était très probablement sauvage. Il a de plus été montré que les rongeurs sauvages sont capables d'excréter le VACV dans leurs urines et leurs fèces, sans pour autant exprimer de signes cliniques (Peres et al., 2018).

L'origine du virus de la vaccine circulant actuellement au Brésil n'a pas clairement été élucidée. Plusieurs hypothèses ont été émises. Celle supposant sa dérivation d'une souche vaccinale actuelle a en partie été infirmée (Trindade et al., 2007) mais il reste possible qu'une souche issue du programme de vaccination de 1966 ait évolué différemment pour se maintenir aujourd'hui (Trindade et al., 2007). L'hypothèse d'une souche naturelle s'étant développée dans un hôte sauvage est également forte (Peres et al., 2018). Outre la possibilité que cette hypothèse soit juste, les animaux de la faune sauvage constituent certainement une source de contamination pour le bétail, les animaux péri-domestiques et l'homme. La manière dont ils se contaminent restent encore à élucider mais un cycle de transmission du virus entre les populations a été proposé par Oliveira *et al* (2017) et est présenté dans la [Figure 5](#).

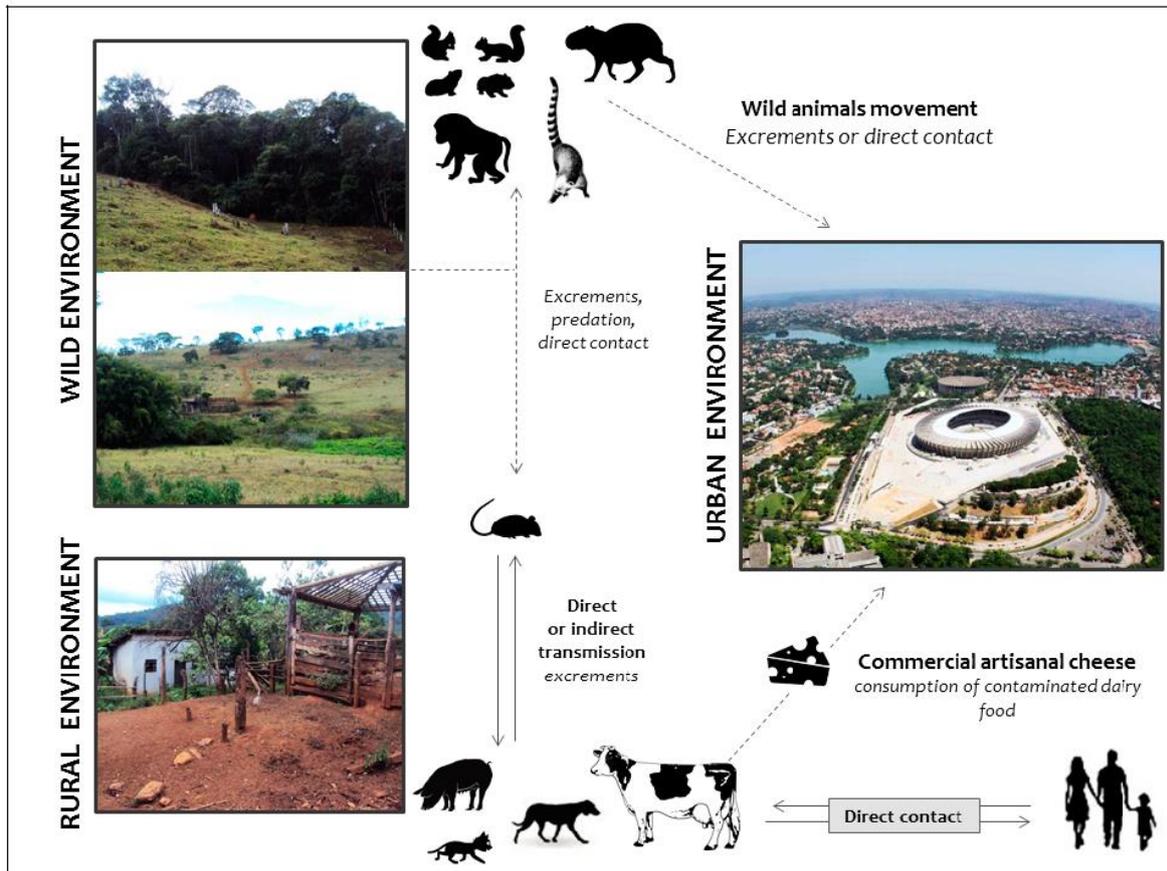


Figure 5. [Ebauche du cycle de transmission du virus de la vaccine entre les populations humaines et animales](#). Les flèches pointillées indiquent les contacts possibles entre les animaux, non encore mis en évidence. Courtoisie de Jaqueline Silva de Oliveira.

b) Spectre d'hôte

Les poxvirus sont nommés selon l'animal au sein duquel ils ont été découverts, alors considéré comme l'hôte principal du virus. Le VACV a pour la première fois été décrit par Allan Downie dans les années 1930 lorsqu'il a démontré que le matériel vaccinal utilisé à cette époque contre la variole était différent génétiquement du virus cowpox (CPXV) utilisé jusque-là. Le nom de vaccine désignerait donc une souche virale introduite aléatoirement au cours de la campagne de vaccination ou bien une souche vaccinale s'étant adaptée à son hôte (Oliveira et al., 2017). Bien que détecté sur un bovin, l'hôte naturel du VACV reste inconnu.

Le spectre d'hôte des poxvirus est généralement étroit, sauf pour les virus zoonotiques. En effet, le VACV ne toucherait pas seulement le bovin et l'homme. Certaines études ont détecté la présence de VACV chez des chiens et des coatis en zone urbaine (Costa et al., 2018), alors que d'autres ont prouvé qu'il pouvait toucher une faune plus sauvage telle qu'une population de capybaras (Dutra et al., 2017).

Ainsi, le spectre d'hôte du VACV est ample, lié à son potentiel zoonotique. Il est capable d'atteindre l'homme mais également des espèces animales domestiques, péri-domestiques et sauvages. De plus, les souches de VACV séquencées au cours des différentes études semble particulières d'un hôte donné (Costa et al., 2017), démontrant une importante capacité d'adaptation du virus. Face à un nombre de cas animaux et humains en augmentation, utiliser des techniques adaptées et précises de détection du VACV est donc primordial (Shchelkunov et al., 2011).

c) Voies de transmission et sources

Plusieurs voies de transmission du VACV ont été décrites. La principale s'effectue par contact direct. Il peut s'agir d'un contact entre des muqueuses saines, le virus étant excrété par les fluides, comme la salive, le jetage ou le lait (Rehfeld et al., 2015). L'entrée du virus se fera alors par la muqueuse, en particulier la muqueuse oro-nasale. Un individu sain peut également se contaminer par contact avec une zone de lésion, étant la majeure voie de contamination des éleveurs bovins pratiquant la traite manuelle et manipulant les trayons d'un bovin infecté (Megid et al., 2008).

Un individu peut également se contaminer de manière indirecte à travers son milieu et des vecteurs passifs du virus. Le VACV résiste dans les aérosols pouvant constituer une source majeure d'infection par le tractus respiratoire (Westwood et al., 1966). Le tropisme du virus est principalement cutané, s'exprimant par des lésions vésiculeuses puis croûteuses abritant le VACV (Peres et al., 2018). Ainsi, ces croûtes représentent une source importante de contamination lorsqu'elles se détachent et tombent au sol, souillant alors l'environnement. Il a été démontré l'excrétion du virus dans l'urine de souris inoculées expérimentalement (Ferreira et al., 2008). La paille salie par cette urine représentait alors une source de contamination pour des souris saines introduites dans l'enclos. De ce fait, du fourrage souillé par des animaux infectés, domestiques ou non, est une source de contamination par voie indirecte.

Les différentes voies de contamination sont favorisées par différents facteurs tels qu'un climat sec et chaud assurant le maintien du virus dans l'environnement, ou principalement par la présence de plaies cutanées ou muqueuses privilégiant l'entrée

du virus dans l'organisme. La voie d'entrée empruntée par le virus détermine la forme clinique que prendra ensuite la maladie (Knipe et al., 2013).

2. Présentation clinique et lésionnelle

(i) Signes cliniques locaux et généraux

Le virus de la vaccine possède un tropisme cutanéomuqueux provoquant des lésions localisées sur la peau et sur les muqueuses. Selon la souche virale et la voie d'entrée, la maladie peut toutefois se généraliser et avoir de graves conséquences (Knipe et al., 2013).

La voie d'entrée préférée du VACV est la voie cutanée avec l'expression de lésions localisées. Chez les bovins il est observé sur les trayons et les mamelles des vaches des papules évoluant en vésicules par accumulation de pus. Si la lésion n'est pas traitée, la vésicule devient une pustule pédiculée contenant du tissu inflammatoire formant ensuite un ulcère lorsque la pustule éclate ([Image 4](#)). En l'absence de surinfection bactérienne, l'ulcère cicatrise spontanément et il y a autorésolution des lésions (Oliveira et al., 2017). Lorsque les vaches infectées ne sont pas écartées du troupeau, les signes d'une infection par le VACV sont détectables sur leurs veaux présentant alors des lésions sur les lèvres, le museau et dans la bouche (Oliveira et al., 2017). Ils se seront contaminés par contact direct avec les trayons au moment de la tétée. Il est donc primordial de détecter les animaux infectés et de les séparer afin d'éviter une dissémination importante du virus au sein du troupeau.

Dans les élevages pratiquant encore la traite manuelle, les éleveurs et leurs proches peuvent également exprimer des lésions. Celles-ci prennent la même forme que chez les bovins et sont principalement retrouvées au niveau des mains, et surtout des doigts, et parfois sur le nez et à la commissure des lèvres ou des yeux lorsque le malade se touche le visage (Megid et al., 2008) ([Image 5](#)). Dans certains cas, les lésions cutanées sont associées à des signes généraux tels que des lymphadénopathies, des maux de têtes ou de la fièvre. Ces signes ont été observés chez des individus ayant comme n'ayant pas été vaccinés contre la variole (Megid et al., 2008).



Image 4. Lésions de VACV sur les trayons et mamelles de vaches. Des lésions ulcéreuses sont visibles sur l'image de gauche, une pustule est visible sur l'image de droite. Courtoisie de Jane Megid.

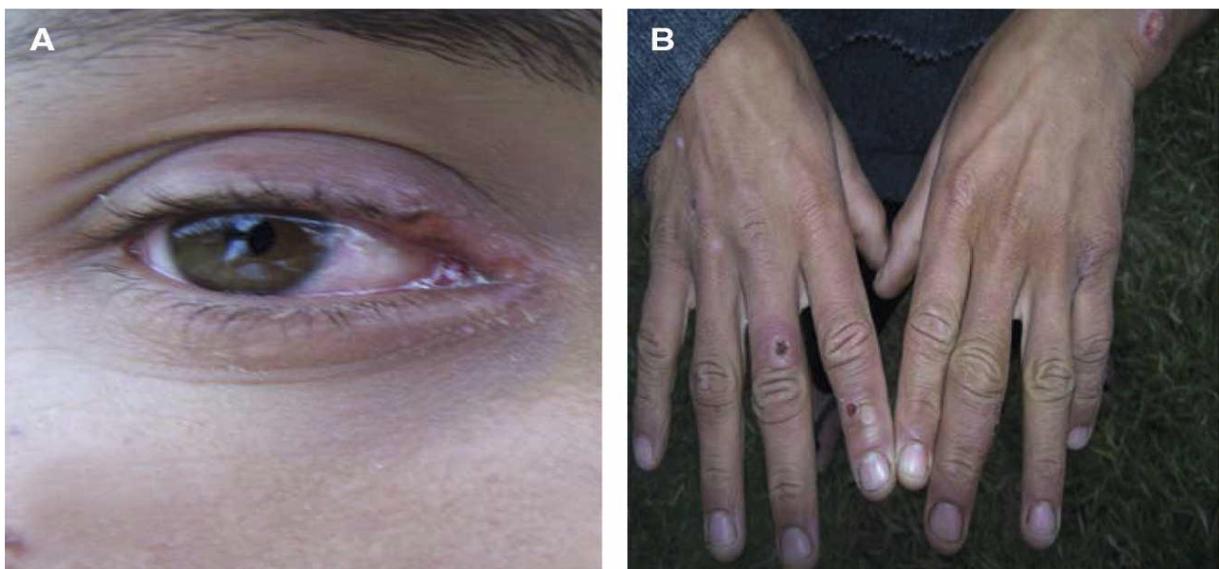


Image 5. Lésions de VACV chez l'homme. A) Lésions à la commissure de l'œil. B) Lésions sur les doigts. Courtoisie de Jane Megid.

Lorsque la voie d'entrée du VACV est respiratoire, les signes cliniques sont alors généraux, le VACV est disséminé dans l'organisme et infecte les poumons, le foie, la rate et le cerveau (Zaitseva et al., 2012). Chez des souris infectées expérimentalement par voie intra-nasale par le VACV Western Reserve, 100% des souris infectées ont exprimé des signes cliniques 2 à 3 jours post-infection. Les animaux présentaient alors une perte de poids, un poil ébouriffé et un dos voussé sans atteinte de l'appareil respiratoire (Ferreira et al., 2008). Cependant des cas humains de contamination respiratoire par le VACV ont été rapportés (Hu et al., 2018). Les malades présentaient alors de la fièvre, de la toux et des difficultés respiratoires évoluant en détresse respiratoire, accompagné parfois de lésions cutanées sur différentes parties du corps. Des lésions nodulaires dans les poumons des patients avaient également été mises en évidence jusqu'à un an après l'infection, sans séquelles associées (Hu et al., 2018).

Bien que présentant majoritairement des lésions mineures, le VACV peut avoir des conséquences bien plus graves lorsque la maladie se généralise. Des précautions particulières doivent être prises avec les individus immunodéprimés exprimant alors plus facilement la forme généralisée menant parfois à la mort (Shchelkunov et al., 2011).

Chez l'homme, le VACV provoquerait ainsi des lésions cutanées localisée, de la fièvre, des malaises, des myalgies, des maux de tête, des douleurs articulaires mais protégerait contre une nouvelle infection (Hu et al., 2018). Chez l'animal en revanche ces signes ne sont pas toujours observés. Hormis le bovin et les souris citées précédemment, les animaux domestiques comme sauvages n'expriment pas de signes cliniques à la suite d'une infection naturelle par le VACV (Costa et al., 2018). En revanche, lors d'une inoculation expérimentale, des signes cliniques sont observés, même si parfois frustes (Westwood et al., 1966), probablement lié à la dose de virus inoculée.

(ii) Complications vaccinales

Les signes cliniques décrits précédemment peuvent également se déclencher lors de vaccination avec le virus de la vaccine, notamment au cours des campagnes contre la variole utilisant un vaccin vivant. Aujourd'hui seules les personnes à risque, tels que les travailleurs en laboratoire, les militaires ou les individus manipulant des vaccins recombinant de VACV ou d'autres OPV, sont encore vaccinées (Singh et al., 2012).

En plus des signes cités, il peut être observé une vaccine généralisée, terme désignant un érythème cutané généralisé causé par la vaccination. Aucun facteur prédisposant ne lui est connu et cela semble se produire au même titre que des allergies ou des réponses inflammatoires excessives au point d'injection (Knipe et al., 2013).

Plus grave mais plus rare, la vaccination au VACV peut causer une encéphalomyélite dite post-vaccinale, en particulier lors d'une primo-vaccination. Les signes cliniques sont nerveux (fièvre, maux de tête, vomissement, confusion, délire, désorientation, étourdissement, syncopes, coma) dus à une colonisation rapide du système nerveux central par le virus (Knipe et al., 2013). Chez les enfants de moins de 2 ans peut se développer une forme très rare d'encéphalite post-vaccinale dont les symptômes

sont similaires à l'encéphalomyélite. Cette forme se développe rapidement après la vaccination, entre 6 et 10 jours (Knipe et al., 2013).

Chez les personnes immunodéprimées, une complication très grave consiste en une progression du VACV à partir du site d'injection souvent associée à de la nécrose progressive et appelée vaccine progressive. La vaccine progressive est caractérisée par une plaie au niveau du point d'injection ne cicatrisant pas jusqu'à 14 à 21 jours après la vaccination, malgré une réponse inflammatoire même faible (Fulginiti et al., 2003).

En cas d'antécédents de dermatite atopique, les vaccinés peuvent développer un *eczema vaccinatum* sous la forme de papules, vésicules ou pustules sur n'importe quelle partie du corps ou sur d'anciens sites d'eczéma. Cette complication peut être le résultat d'une dissémination du virus depuis le site d'injection ou d'un contact avec un site d'injection vaccinale non désinfecté (Fulginiti et al., 2003).

Des contaminations accidentelles peuvent avoir lieu en cas de contacts cutanés rapprochés avec le site de vaccination. De même des auto-inoculations sont possibles lorsque les précautions ne sont pas prises et se manifestent généralement au niveau de la bouche, des lèvres et des parties génitales. Les lésions sont bénignes et ne nécessitent pas de traitement. Lorsque l'œil est atteint en revanche les conséquences peuvent être plus graves et compromettre la vision si aucun traitement n'est mis en place (Knipe et al., 2013).

3. Principes de lutte contre le VACV

(i) Diagnostic

Le diagnostic d'une infection au VACV est d'abord clinique. Les signes apparaissent entre 3 et 20 jours après l'infection et durent entre 2 et 5 jours (Geessien Kroon et al., 2016).

Outre la clinique, les analyses sérologiques pour la détection d'anticorps anti-*Orthopoxvirus* sont très utilisées pour le diagnostic du VACV. Il faut cependant être précautionneux dans l'interprétation des résultats de ces tests à cause des réactions croisées existantes entre les OPV (Geessien Kroon et al., 2016). Le test ELISA par exemple est très avantageux par sa rapidité d'exécution et sa fiabilité. Il permet de détecter et quantifier des anticorps spécifiques d'un grand nombre d'échantillons

dans le but, par exemple, de mettre en évidence la circulation du virus au sein d'une population.

Un autre test sérologique pouvant être associé à l'ELISA est le test de Séroneutralisation par Réduction des Plages de Lyse (PRNT). Ce dernier permet de détecter les anticorps neutralisants dirigés contre un virus donné et d'en déterminer leur titre, c'est-à-dire leur quantité, dans un individu donné. La PRNT est aujourd'hui considérée comme le test de référence dans la recherche d'anticorps neutralisants. Elle peut être associée à l'ELISA pour confirmer les résultats tout en restant critique face aux résultats car l'ELISA est beaucoup plus sensible et permet la détection de tous types d'anticorps. Il est donc parfois possible d'analyser des échantillons dont le titre en anticorps neutralisants est très faible et ne sera détectable qu'à l'ELISA (Geessien Kroon et al., 2016). De plus, la PRNT est une technique longue, le temps de croissance du tapis cellulaire et le temps d'action des anticorps neutralisants sur le virus inoculé diffèrent l'obtention des résultats de 2 à 5 jours après le début du test. Les tests ELISA et PRNT sont très informatifs et permettent de déterminer l'état sérologique du patient. Il est cependant nécessaire d'attendre au moins 10 jours après l'infection (Trindade et al., 2009), que l'individu ait produit les anticorps en réponse au VACV afin d'avoir une interprétation valable de ces tests.

Il peut être associé aux tests ci-dessus des analyses moléculaires de détection d'ADN viral par Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR). Ces analyses ont l'avantage de pouvoir être réalisées sur tout fluide (sang, urine etc.) ou matériel (croûte, fèces etc.) contenant le virus (Peres et al., 2018) après extraction de l'ADN. Différentes variantes de la PCR existent et sont utilisables pour la détection du VACV. La plus sensible est la PCR en temps réel (qPCR) constituée d'une PCR classique au cours de laquelle les résultats sont observés en temps réel. Cette technique permet de détecter même d'infimes concentrations en ADN et de les quantifier (Geessien Kroon et al., 2016). Des PCR nichées ou semi-nichées, enchaînement de deux PCR classiques, assurent également la détection du virus bien qu'elles soient souvent moins sensibles. Le gène fréquemment recherché au cours de ces analyses est le gène C11R responsable de la synthèse du *vaccinia growth factor*. Il s'agit d'un gène très conservé au sein des OPV, favorisant la croissance et la virulence du virus et présent en deux exemplaires sur le génome, un dans chaque domaine RIT (Jônatas Santos Abrahão et al., 2010). Une fois mis en évidence, le VACV peut être caractérisé afin d'en déterminer la souche et de la classer dans un groupe. Pour cela, les mêmes réactions de PCR peuvent être

menées en recherchant cette fois le gène A56R codant pour l'hémagglutinine, polypeptide exprimé à la surface des virions enveloppé et jouant un rôle dans la protection contre le complément. Ce gène est également présent dans les domaines RIT et présente des délétions de nucléotides selon la souche virale. Ainsi, après détection, l'isolement puis le séquençage de ce gène permettent d'identifier la souche de VACV trouvée (Geessien Kroon et al., 2016). D'autres gènes sont également disponibles pour différencier les souches de VACV, s'agissant par exemple du gène C23L ou A26L (Geessien Kroon et al., 2016).

L'histologie peut également être utile au diagnostic. Réalisée sur des biopsies au point d'entrée du virus ou de vaccination, elle montre des inclusions virales dans le cytoplasme ainsi qu'une infiltration inflammatoire (sauf très précocement après la vaccination) (Knipe et al., 2013). L'histologie est également post-mortem chez l'homme ou les animaux de laboratoire afin d'analyser les organes touchés par le VACV. Les mêmes images sont alors observées (Hu et al., 2018).

L'imagerie fait également partie des examens diagnostiques possibles. Chez l'homme, le scanner montre des lésions nodulaires internes, en particulier sur les poumons lorsque la voie de contamination a été respiratoire (Hu et al., 2018). Une nouvelle technique d'imagerie par bioluminescence sur corps entier de souris a été développée et permet de visualiser en même temps tous les organes que le virus a infecté (Zaitseva et al., 2012).

En cas de doute sur les résultats, les échantillons peuvent être envoyés au Centres pour le Contrôle et la Prévention des Maladies. Ces centres, en collaboration avec d'autres organismes internationaux, assurent la protection de la santé publique grâce à la détection de maladies telles que la vaccine ou la variole (Knipe et al., 2013).

L'histologie et l'imagerie ne sont généralement pas réalisées sur les animaux, en particulier les animaux de rente exprimant les signes cliniques. En effet, les pays étant encore aujourd'hui confronté au VACV sont des pays en voie de développement où les conditions d'élevage ne sont pas optimales. Ces conditions, en plus d'être un facteur favorisant de l'apparition du VACV, sont à relier avec le niveau de vie des éleveurs. Tous n'ont pas les moyens de posséder une étable ni de faire appel à un vétérinaire. Ainsi, les prélèvements limitant au plus la contamination de l'échantillon et le risque de surinfection du lieu de prélèvement sont les prélèvements de sang ou de fluides naturels. De même tous les vétérinaires ne possèdent pas de matériel d'imagerie transportable. De ce fait, les examens

sérologiques ou moléculaires sur sang, urine ou fèces vont être préférés. Pour les mêmes raisons, et car ceux-ci sont également soumis à une anesthésie générale pour les prélèvements, ces examens vont également être favorisés sur la faune sauvage. A noter cependant que les animaux sauvages n'expriment pas de signes cliniques liés à l'infection (Peres et al., 2016), les analyses sérologiques peuvent donc être faiblement positives, ou négative, alors que les analyses moléculaires seront positives.

(ii) Traitement

L'usage d'antiviraux est en général de dernier recours. Les patients atteints de vaccine sont d'abord pris en charge par un traitement symptomatique à l'aide d'anti-inflammatoires, anti-pyrétiques et anti-infectieux (Hu et al., 2018) et par l'application de soins locaux afin d'éviter les surinfections des lésions cutanées. Ce traitement de soutien permet une très bonne réduction des symptômes jusqu'à la guérison du patient. Des cas plus graves, ne répondant pas au traitement symptomatique, nécessitent l'usage d'antiviraux. Quelques antiviraux contre le virus de la vaccine sont disponibles sur le marché et d'autres sont encore à l'étude. Deux molécules ressortent actuellement pour la thérapie contre les OPV.

Le cidofovir, inhibiteur de l'ADN polymérase, est très prometteur dans le traitement des maladies à OPV animales en laboratoire. Elle n'est cependant biodisponible oralement que sous une forme dérivée et est plus efficace sous forme injectable. De plus, une administration sur le long terme engendre une néphrotoxicité importante (Kern, 2003). Il peut cependant être utilisé localement lors de vaccine cutanée en complément d'un traitement oral (Smee et al., 2011). Au cours d'études similaires, le ST-246, bloquant les étapes tardives du cycle viral, s'est également révélé efficace. Cette molécule a été principalement utilisée pour le traitement de complications vaccinales en administration orale et locale sur les lésions cutanées (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2009b). Bien que ces molécules soient efficaces chez l'homme et les animaux de laboratoire, aucune étude n'a été menée sur les animaux domestiques ou de rente. Leur coût est de plus élevé rendant leur usage en médecine vétérinaire limité.

Dans les cas de complications vaccinales, et pour limiter les risques de vaccine progressive, des immunoglobuline de vaccine humaines (VIGIV) peuvent être

administrées par voie intra-veineuse à la dose de 6 000UI/kg en une seule fois répétable si nécessaire (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2009a).

D'autres molécules ont été proposées pour le traitement contre le VACV telles que la gemcitabine (immunosuppresseur), idoxuridine (antiviral), trifluridine (antiviral) et vidarabine (antiviral) (Kern, 2003).

L'imiquimod est une molécule de la famille des imidazoquinolones induisant la production de cytokine par fixation au récepteur TLR. Elle existe sous forme de crème, efficace pour le traitement de la vaccine cutanée chez des souris immunodéprimées (Kroon et al., 2011). L'imiquimod a également fait l'objet d'études en dermatologie vétérinaire, sur le chat et le cheval notamment, et s'est montré très efficace dans le traitement d'affections virales à tropisme cutané (Pressanti, Cadiergues, 2013), bien que provoquant parfois un érythème local. Son coût est également peu élevé et en ferait alors un traitement intéressant des bovins d'élevage, en respectant une mise à l'écart de l'animal et un temps d'attente adéquat.

En pratique, aucun traitement n'est appliqué aux animaux, peut-être par une toxicité trop importante ou bien par manque d'efficacité, de considération, d'éducation ou simplement de moyens du propriétaire. Un traitement symptomatique potentiellement efficace serait l'imiquimod, à un prix abordable, et facile d'application, son utilisation contre le VACV n'a cependant pas encore été étudiée.

(iii) Vaccination

Grâce à la protection croisée offerte par les OPV, un vaccin contre le VACV serait en réalité un vaccin contre la variole (Moss, 2011). En effet, ce vaccin est encore aujourd'hui produit à partir du VACV et une infection par le VACV est immunisante (Hu et al., 2018). Toutefois, depuis la fin du programme de vaccination contre la variole, les populations ne sont plus obligatoirement vaccinées. Seules les personnes à risque, tels que les travailleurs en laboratoire, les militaires ou les individus manipulant des vaccins recombinant de VACV ou d'autres OPV, le sont encore (Singh et al., 2012). La moitié de la population mondiale n'a pas été vaccinée contre la variole et n'a donc pas les défenses immunitaires nécessaires pour lutter contre une infection au VACV.

Avec la menace croissante du bioterrorisme, il est devenu important de constituer de nouveaux vaccins plus sûrs contre le VACV ou d'autres OPV (Singh et al., 2012). De plus, le vaccin Dryvax très largement utilisé lors de la campagne contre la variole présente des effets secondaires très graves, comme expliqué précédemment.

Différents vaccins sont aujourd'hui à l'étude. En médecine humaine, la souche MVA est très intéressante pour la sécurité d'emploi qu'elle procure. Elle a fait l'objet d'une sélection importante la rendant non multiplicative dans l'organisme mais déclenchant néanmoins une réponse immunitaire (Overton et al., 2015). Elle active plus de voies de signalisation de l'infection que les autres vaccins, contribuant certainement à une protection plus importante (Moss, 2011).

La souris et le lapin sont principalement utilisés comme modèle animal d'expression et d'efficacité clinique, avec respectivement les souches Western Reserve (WR) et rabbitpox. Les doses inoculées sont très hautes causant généralement la mort de l'animal dans les 10 jours post-inoculation (Moss, 2011). La souche MVA a permis d'obtenir des résultats très encourageant chez ces petits animaux comme chez des animaux plus proches de l'homme comme les primates non humains (Moss, 2011). Cette souche pourrait ainsi être utilisable afin de protéger les animaux de rentes. Des études sont malgré tout nécessaires afin d'évaluer les effets secondaires potentiels sur de tels animaux, et l'existence ou non d'une excrétion virale associée pouvant compromettre les produits de l'élevage.

Une étude sur des marsupiaux en Australie a montré que des vaccins à base de VACV procuraient une protection efficace, dont la réponse immunitaire persistait plus ou moins longtemps et sans effets secondaires (Cross et al., 2011). Le VACV constituerait alors la structure de nombreux vaccins recombinant contre lui-même ou d'autres virus. Dans l'hypothèse où la faune sauvage constituerait un réservoir du VACV, ces vaccins efficaces sur des animaux sauvages sont une piste intéressante à explorer pour enrayer le cycle épidémiologique de VACV dans le monde, bien que vacciner la faune sauvage reste très illusoire.

Partie 2 : Etude expérimentale

Etude de la faune sauvage brésilienne comme
potentiel réservoir du virus de la vaccine

I. Objectif et contexte de l'étude expérimentale

Le Brésil rencontre depuis 2003 une résurgence des cas de vaccine, touchant à la fois l'homme et l'animal. De plus en plus de souches différentes de virus de la vaccine (VACV) sont mises en évidence au Brésil, et le nombre de cas humains est en augmentation (Oliveira et al., 2017). Ces cas humains touchent principalement les éleveurs bovins laitiers pratiquant encore une traite à la main et se contaminant par contact direct avec la mamelle du bovin infecté. La production laitière du bovin malade diminue et l'éleveur contaminé doit être arrêté entraînant une perte financière importante. Les voies d'infection des bovins n'ont pas toutes été élucidées. Une des hypothèses suggère qu'il existe un réservoir sauvage du VACV pouvant s'introduire dans les élevages et contaminer le bétail. Eclaircir le rôle de la faune sauvage dans le cycle de transmission du virus est donc un enjeu économique et de santé publique.

Rechercher un virus nécessite d'allier une analyse immunologique, pour détecter les anticorps produits par l'organisme en réponse à ce virus, et une analyse moléculaire, pour détecter l'ADN du virus lui-même. Des études précédemment menées par Peres M. *et al.* (2018) à la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Universidade Estadual Paulista (UNESP) de Botucatu, Brésil, sur des élevages laitiers de villages alentours ayant ou non rapporté des cas de vaccine, ont mis en évidence près de 14% de positivité pour la recherche d'anticorps anti-*Orthopoxvirus* (OPV) à l'analyse immunologique par PRNT dont 8,6% au sein de la faune sauvage. Sont mis en évidence par cette analyse des anticorps neutralisants. Ils sont produits lorsque l'hôte est infecté par le virus et persistent dans l'organisme après guérison. Détecter leur présence permet donc de savoir si l'animal est actuellement ou a été infecté par le virus.

Cette même équipe a également analysé les urines et fèces de rongeurs sauvages. Environ 5% des fèces et 1,8% des urines collectées ont donné un résultat positif à la détection du gène viral C11R à l'analyse moléculaire sur sang par PCR nichée. Le gène C11R est très conservé au sein du genre des *Orthopoxvirus*, il code pour le polypeptide Vaccinia Growth Factor (vgf). Il possède une séquence assez courte (en moyenne 420pb sur Genbank référence S61049.1) présente dans chacune des extrémités RIT de l'ADN viral (Figure 6). Sa présence en deux exemplaires facilite sa détection et en fait une cible idéale pour les expériences de ce travail. Lorsqu'il est présent, cela signifie que l'animal est infecté par le virus au moment de l'analyse.

Pour chacune des études, la majorité des résultats positifs étaient obtenus dans des régions supposées indemnes de VACV (M. Peres, et al. 2018).

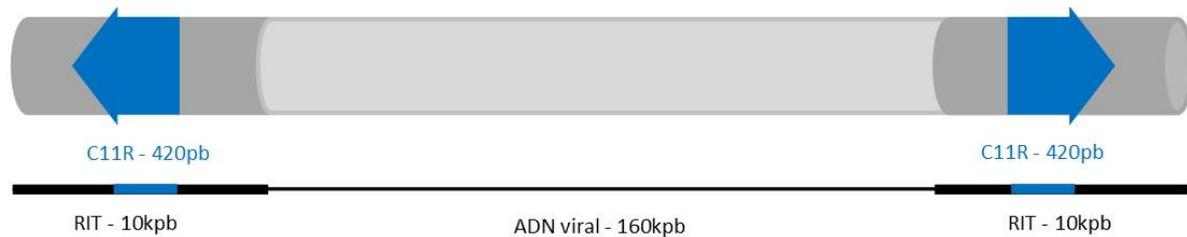


Figure 6. Position du gène C11R au sein des séquences RIT du génome viral. D'après Abrahão et al., 2010. Crédit illustration : C. Peltier

Lorsque détectées, les souches brésiliennes de VACV ont été classées en deux groupes selon la séquence de leur gène A56R (Oliveira et al., 2017). Ce dernier est responsable de la synthèse de la protéine hémagglutinine virale (HA), antigène s'exprimant à la surface des cellules infectées. Ce gène permet de différencier les *Orthopoxvirus* des autres *Poxvirus* (Ropp et al., 1995), il n'est présent qu'en un seul exemplaire sur le génome viral et possède des délétions selon les souches. Le gène A56R a donc également été utilisé dans ce travail afin de classer le VACV potentiellement découvert. Les amorces de PCR nichée existantes pour ce gène sont beaucoup moins sensibles que celle du gène C11R pour la même réaction (Peres et al., 2018). Ainsi, le gène A56R n'a été recherché qu'au cours de PCR en temps réel avec des amorces très sensibles et très spécifiques (Geessien Kroon et al., 2016).

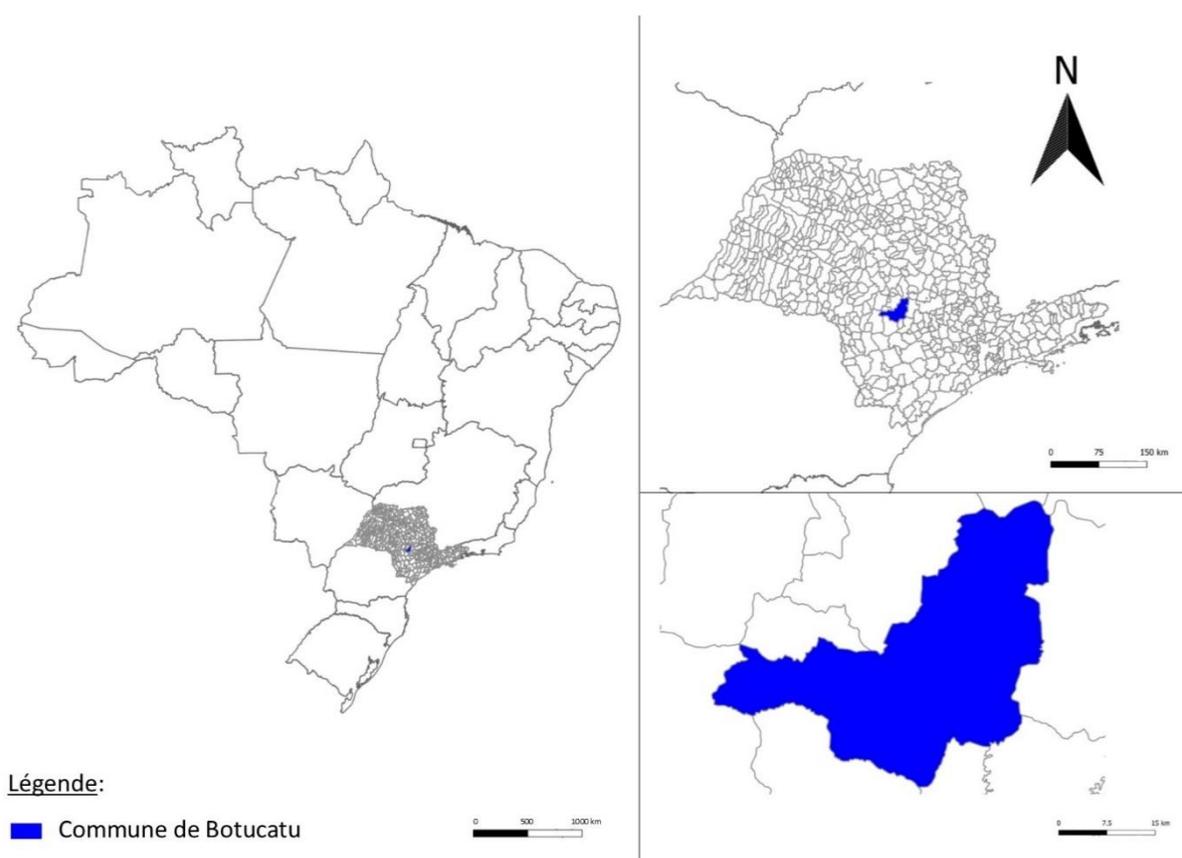
Les échantillons utilisés dans ce travail proviennent d'animaux sauvages capturés entre 2012 et 2014 dans la ville de Botucatu, zone où aucun cas de VACV n'a encore été rapporté. Cependant des foyers avaient été détectés en 2009 et 2010 à environ 50km de Botucatu. La faible distance entre les communes et l'intervalle de temps important (2 ans) entre la détection et les prélèvements suggéraient une dissémination possible du virus par la faune sauvage jusqu'à Botucatu, celle-ci constituant alors un réservoir du virus. De chaque animal a été prélevé du sang et de l'urine. Le sang a été utilisé pour mener les analyses immunologiques tandis que l'urine a servi aux analyses moléculaires.

L'objectif de ce travail est d'étudier le rôle de la faune sauvage comme potentiel réservoir du virus de la vaccine au Brésil par l'analyse d'une région encore indemne de cas animaux comme humains à l'époque des prélèvements. Notre étude permettra de déterminer l'implication de la faune sauvage dans la recirculation et la propagation du VACV afin d'établir des mesures de prévention adaptées.

II. Matériels et méthodes

1. Choix des animaux et modalités de prélèvement

Les échantillons utilisés dans ce travail proviennent d'animaux sauvages capturés entre 2012 et 2014 dans la ville de Botucatu et alentours ([Figure 7](#)), zone où aucun cas de VACV n'avait encore été rapporté. Cependant des foyers avaient été détectés en 2009 et 2010 dans les communes de Itatinga et Torre de Pedra (Megid et al., 2012), respectivement situées à 37km et 70km de Botucatu. La distance entre les communes étant faible et l'intervalle de temps écoulé important (2 ans), une dissémination du virus par la faune sauvage avait pu avoir lieu depuis le signalement des foyers.



[Figure 7. Localisation de la commune de Botucatu, état de São Paulo, Brésil.](#) Crédits illustration : C. Vitoria et C. Peltier

Ces animaux avaient été capturés dans le cadre d'une thèse de recherche réalisée par Felipe Fornazari à la Faculté de Médecine Vétérinaire et de Zootechnie (FMVZ) de l'UNESP de Botucatu, état de São Paulo, Brésil (Fornazari, [sans date]). Cette thèse portait sur l'épidémiologie de la leptospirose au sein de mammifères sauvages de la région de Botucatu. Les animaux prélevés avaient été capturés dans leur environnement naturel, ou hospitalisés au Centre de Médecine et de Recherche de

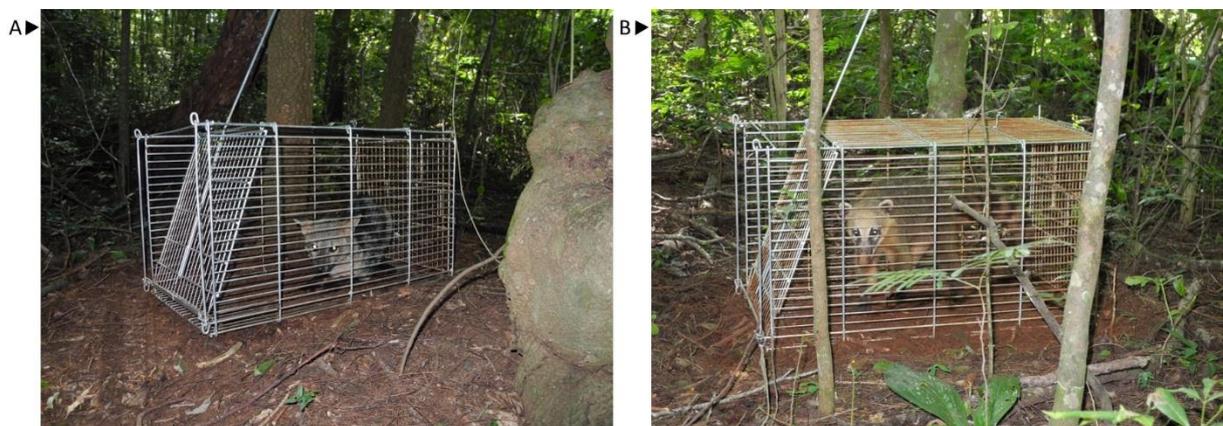
la Faune Sauvage (CEMPAS) de l'UNESP. Ces captures avaient été approuvées par l'Institut Chico Mendes de la Conservation et de la Biodiversité (ICMBio), à la suite de l'autorisation émise par le Système d'Autorisation et d'Information de la Biodiversité (SISBIO) n°33162-2. Ce travail fut également étudié et accepté par le Comité d'Ethique d'Utilisation des Animaux de la FMVZ, n°10/2012.

Pour cette étude, 334 animaux ont été prélevés, du sang a été obtenu de 331 d'entre eux, du sérum de 334 et de l'urine de 191.

a) Echantillonnage

Préalablement aux captures, le nombre d'individus à prélever a été déterminé en se basant sur les données de travaux précédemment menés par l'équipe et une durée prévisionnelle d'étude de 22 mois (Fornazari, [sans date]). Pour une prévalence attendue de 8,6% (Peres et al., 2018) du virus de la vaccine au sein de la faune sauvage, et une précision désirée de 5%, le nombre d'individus à prélever était de 112 (d'après le logiciel Epi info™), 334 était donc une taille d'échantillon suffisant.

L'auteur a choisi des lieux de capture représentant au mieux la faune sauvage de la région de Botucatu. Il s'agissait principalement de zones forestières étendues, capable d'accueillir d'importantes populations animales et facile d'accès. En fonction de leur proximité avec la ville, ces zones étaient classées comme « zone rurale » ou « zone urbaine ». Les captures ont été menées entre avril 2012 et janvier 2014 grâce à des pièges du type Tomahawk (Gabrisa®) en métal galvanisé, pliables et mesurant 40x40x70 cm ([Image 6](#)).



[Image 6.](#) [Pièges type Tomahawk utilisés par Felipe Fornazari.](#) Capture d'un renard des savanes (1.A) et d'un coati (1.B). Crédits : Felipe Fornazari.

Les pièges étaient mis en place le matin, à l'ombre, et vérifiés seulement le lendemain matin. Un mélange à base de banane et/ou de viande crue était utilisé comme appât. Cinq à vingt pièges étaient installés par jour selon l'étendue de la zone de capture et l'inclinaison du terrain.

Les animaux présentés au CEMPAS, provenaient de Botucatu mais aussi de localités alentours, la plus distante située à 220km (Figure 8).

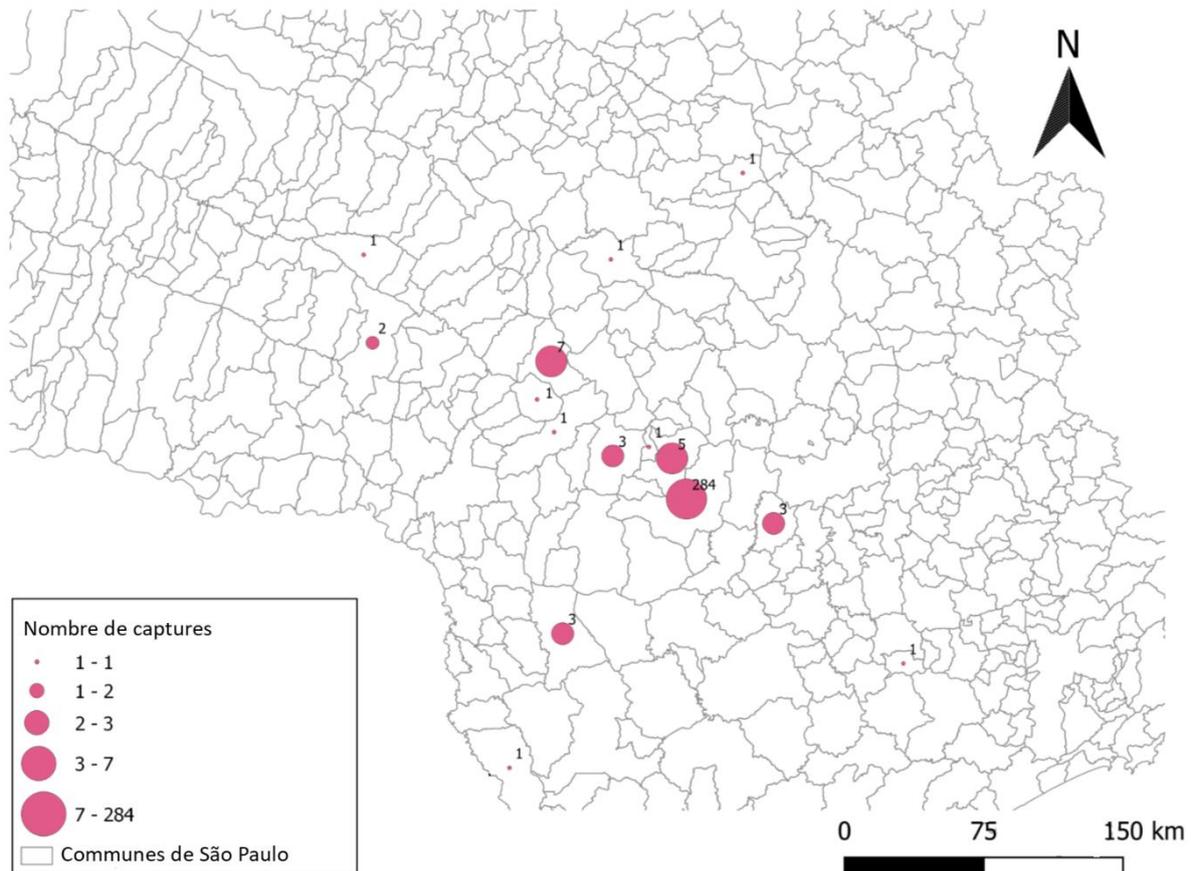


Figure 8. [Lieux de provenance de tous les animaux inclus dans l'étude.](#) Crédit illustration : C. Vitoria

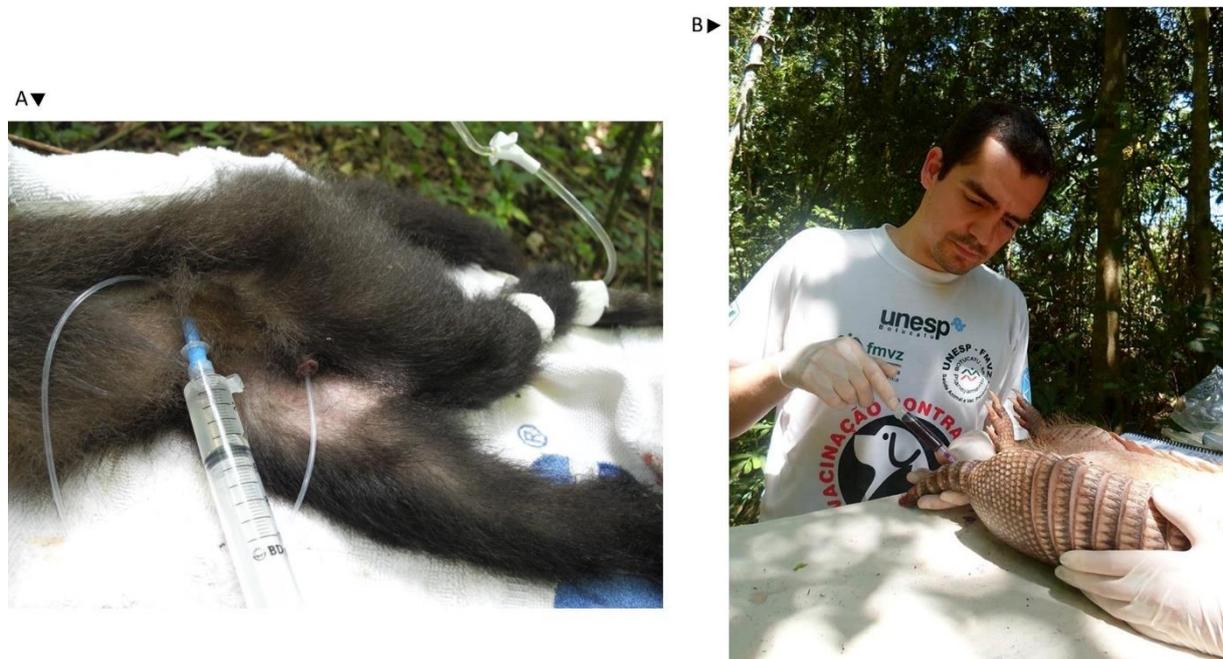
b) Prélèvement et préparation des échantillons

Les prélèvements de sang et urine (Image 7) des animaux capturés ont été réalisés sous sédation profonde grâce à une association de Kétamine (Dopalen®) et de Midazolam (Dormire®), administrée par voie intraveineuse ou intramusculaire par fléchage aux doses adaptées à chaque espèce (Fornazari, [sans date]). Cette combinaison a été choisie pour sa rapidité d'action, sa sécurité d'utilisation et sa possible réversion.

Chaque animal a été soumis à un examen clinique complet puis identifié avec une boucle métallique modèle ZT 900 7mm afin d'éviter une recapture. Du sang était

ensuite obtenu par prise de sang périphérique sur tube EDTA, et de l'urine par cystocentèse, sondage urétral ou miction spontanée. Les animaux n'étaient relâchés qu'après complète récupération de l'anesthésie.

Les prélèvements des animaux reçus au CEMPAS de l'UNESP étaient effectués au cours de l'anesthésie générale d'entrée ou sur animal vigile jusqu'à 4 jours après hospitalisation ([Image 7](#)). Ce délai était basé sur la durée avant excrétion de leptospires dans les urines post-infection (7 jours) additionnée d'une marge de sécurité (Fornazari, [sans date]), et permettait ainsi d'éviter toute contamination au cours de l'hospitalisation.



[Image 7](#). [Prélèvements d'urine et de sang](#). Exemple de prélèvement d'urine par sondage urétral sur un singe (2.A) et de sang par ponction à la veine caudale d'un tatou (2.B). Crédits : Felipe Fornazari.

Tous les échantillons ont été envoyés au Centre de Recherche sur les Zoonoses (NUPEZO) de l'UNESP. Les prélèvements de sang ont été séparés en deux tubes Eppendorf, un premier de sang total et un second centrifugé pour obtenir du sérum. Les échantillons d'urine n'ont subi aucun traitement. Tout le matériel a été stocké au congélateur à -80°C dans l'attente d'être analysé.

c) [Analyses des échantillons](#)

Les analyses ont pour notre travail été effectuées en deux étapes ([Figure 9](#)).

La première étape consistait en une analyse immunologique par Séroneutralisation par Réduction des Plages de Lyse (PRNT) des 334 animaux dont du sérum avait été

obtenu. Le but était de détecter les animaux ayant développé des anticorps anti-OPV par une exposition actuelle ou passée au virus de la vaccine. Un premier triage a été réalisé en écartant de la suite des analyses les animaux dont aucun résultat n'avait été obtenu en PRNT. Ont également été éliminés les animaux pour lesquels aucun prélèvement de sang ou d'urine n'avait été conservé (Figure 10).

La seconde étape était une analyse moléculaire par Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR) sur de l'urine et du sang. L'objectif était de déterminer les individus infectés par le virus au moment du prélèvement et les possibles voies d'excrétion.

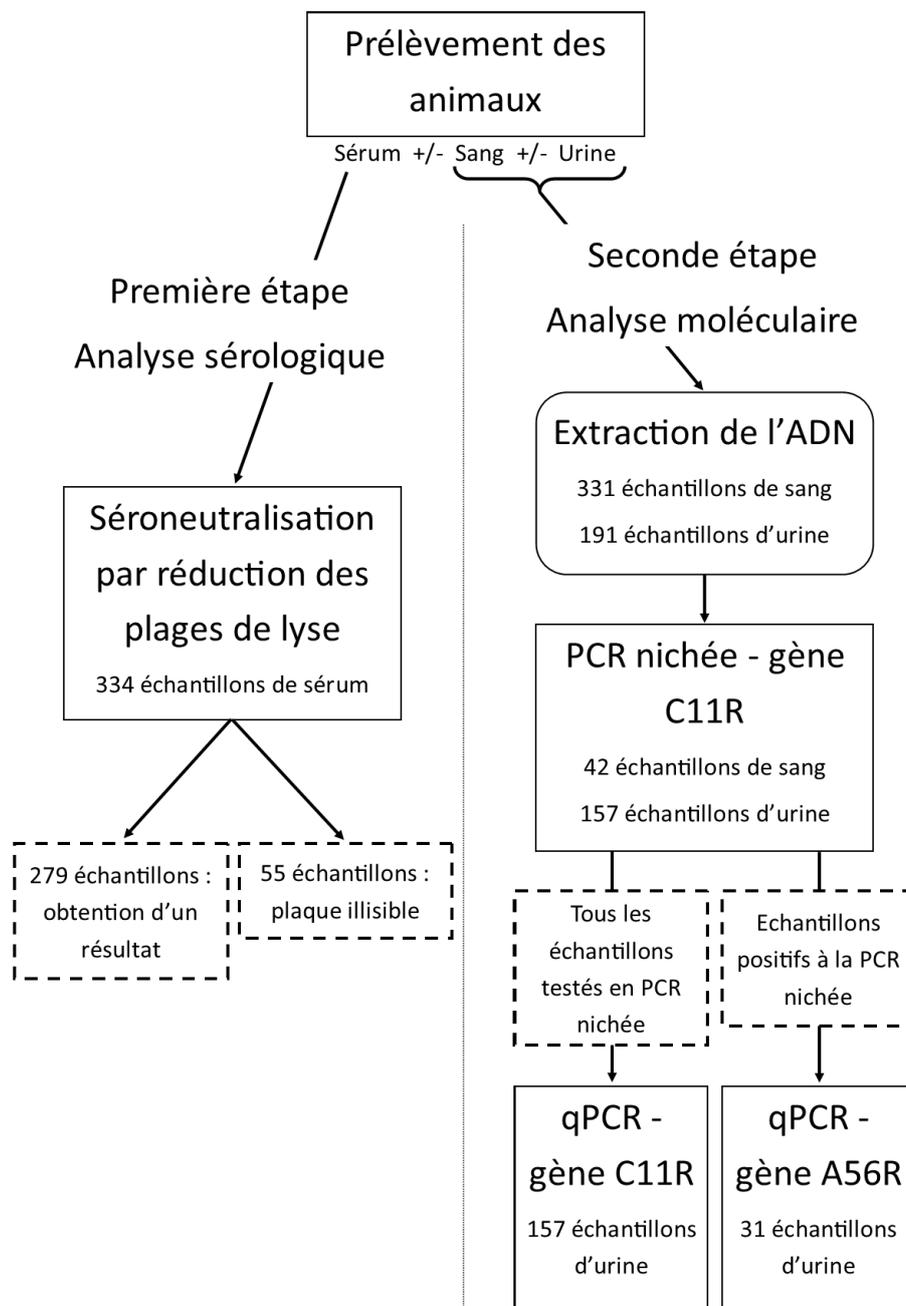


Figure 9. Organigramme des analyses réalisées dans cette étude. Crédit illustration : C. Peltier

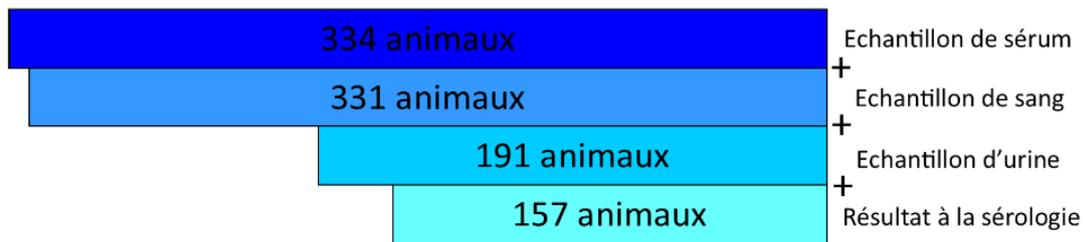


Figure 10. Sélection des animaux à analyser. Le but de cette sélection était de réduire les coûts des analyses réalisées à la seconde étape. Crédit illustration : C. Peltier

2. Analyse sérologique par Séroneutralisation par Réduction des Plages de Lyse (PRNT) des échantillons de sérum

Les 334 prélèvements de sérum de notre étude ont préalablement été envoyés au laboratoire de virologie de l'Université Fédérale du Minas Gerais (UFMG) de Belo Horizonte pour la recherche d'anticorps anti-OPV par Séroneutralisation par Réduction de Plage de Lyse (PRNT). La technique de ce test est détaillée dans l'Annexe 2.

La PRNT est un test de choix pour la recherche de virus, en particulier dans les pays en développement car il ne requiert pas d'équipement sophistiqué et permet de tester de nombreux échantillons à la fois (Borges et al., 2008). Avec une sensibilité d'environ 93% et une spécificité de 90% (Borges et al., 2008) pour la détection d'anticorps anti-Orthopoxvirus (OPV), il s'agit d'une méthode clé dans la surveillance épidémiologique de la maladie. Le protocole expérimental utilisé est détaillé dans l'Annexe 2.

Des plaques à 6 puits ont été utilisées pour tester les échantillons, quatre puits étaient consacrés aux tests des échantillons (deux puits par échantillon) et les deux restant aux témoins positifs et négatifs. Pour chaque puits le nombre de plaques virales a été compté. Le nombre de plaques virales d'un échantillon correspondait à la moyenne du nombre compté sur ses deux puits.

Les résultats ont été déterminés par le calcul du taux de Plaque Forming Unit (PFU), soit le pourcentage de plaque virale d'un échantillon (ECH) par rapport à son témoin positif (TP). Du taux de PFU était obtenu le pourcentage de réduction (R), opposé du taux de PFU, représentant la capacité du sérum à protéger le tapis cellulaire, soit sa séropositivité.

$$PFU = \frac{ECH}{TP} \times 100 (\%)$$

$$R = 100 - PFU (\%)$$

L'échantillon était considéré séropositif aux anticorps anti-OPV lorsque R était supérieur ou égal à 50%.

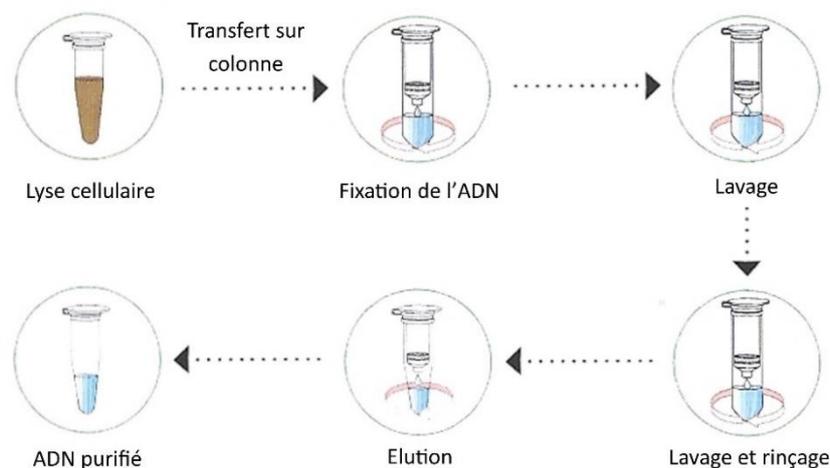
3. Analyse moléculaire par Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR) nichée et PCR quantitative (qPCR)

a) Extraction de l'ADN des échantillons de sang et d'urine

L'ADN des échantillons de sang a préalablement été extrait par Felipe Fornazari pour son étude sur la leptospirose (Fornazari, [sans date]) avec le kit commercial d'extraction « illustra™ blood genomicPrep Mini Spin Kit » de GE Healthcare®, basé sur la technique des membranes de silice.

Il a fallu pour notre étude extraire l'ADN des échantillons d'urine grâce au kit « illustra™ tissue & cells genomicPrep Mini Spin Kit » de GE Healthcare®, utilisant la même technologie.

Les protocoles d'extraction des deux kits sont très similaires ([Figure 11](#)) et consistent succinctement en une lyse cellulaire libérant les molécules d'ADN qui pourront alors être fixées à la membrane de silice. Cette membrane subit plusieurs lavages avant récupération de l'ADN purifié par élution. Les protocoles sont détaillés dans l'[Annexe 3](#).



[Figure 11. Résumé du principe d'extraction d'ADN.](#) D'après les manuels des kits de GE Healthcare

Felipe Fornazari a décidé de n'utiliser aucun témoin positif ni négatif lors de l'extraction des échantillons de sang. La contamination était évitée en laissant beaucoup d'espace entre les échantillons et en ne traitant que peu d'échantillons à la

fois. Les 100µL d'ADN obtenus en fin d'extraction ont été stockés au congélateur à -80°C jusqu'à réalisation des PCR nichées.

Concernant les échantillons d'urine, le témoin négatif de l'extraction était constitué de 200µL d'eau ultrapure tous les cinq échantillons d'urine. Pour des raisons de financement et d'accessibilité, aucun témoin positif n'a été utilisé pour l'extraction afin de conserver ce dernier pour les analyses allant suivre. Les 50µL d'ADN obtenus en fin d'extraction ont été stockés à -20°C jusqu'à réalisation des PCR nichées.

b) Recherche du gène C11R par PCR nichée dans les échantillons de sang et urine

Les analyses moléculaires par PCR réalisées au cours de cette seconde étape possédaient divers objectifs. Cela permettait tout d'abord de détecter le virus chez des individus récemment infectés ou en phase de séroconversion, n'ayant pas encore un titre en anticorps suffisamment élevé. Ces réactions de PCR venaient également compléter les analyses précédentes, s'agissant d'une méthode plus rapide et plus sensible car les *Orthopoxvirus* engendrent de nombreuses réactions croisées en sérologie (Damaso et al., 2007).

La technique de PCR nichée pour la détection du gène viral C11R a été choisie en se basant sur le matériel disponible au laboratoire, les travaux de Peres M. *et al.* (données non publiées) et nos expériences préliminaires. Sa technique est détaillée dans l'[Annexe 4](#). Les auteurs ont constaté une sensibilité supérieure en comparaison aux autres amorces disponibles pour la détection du VACV. Des résultats positifs avaient été obtenus à partir d'échantillons possédant une charge virale plus faible. Ces amorces étaient en revanche peu spécifiques, provoquant l'amplification de fragments non désirés et donnant des résultats faux positifs. Cependant, les amplicons obtenus grâce à ces amorces étaient de petite taille, rendant plus facile leur séquençage lors de vrais positifs. La séquence des amorces utilisées dans notre étude a été adaptée des travaux de Peres M. *et al.* et Abrahão *et al.* (2009) ([Tableau 1](#)). Nos expériences préliminaires ont permis de valider ces amorces ainsi que le témoin positif conservé au laboratoire.

Réaction	Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce	Taille des amplicons obtenus
PCR 1	vgf F	CGCAGGATCCATAATCAGATCATT	391 pb
	vgf R	ATAAAAATTATGGCACAACCATATC	
PCR 2	vgf F2	ACACGGTGACTGTATCCA	170 pb
	vgf R2	CTAATACAAGCATAATAC	

Tableau 1. Amorces utilisées dans chaque réaction de PCR et taille de l'amplicon obtenu. La taille des amplicons obtenus a été déterminée grâce au logiciel in Silico (http://insilico.ehu.es/PCR_virus/)

L'alignement de chaque amorce avec le génome du virus de la vaccine a été vérifié par l'utilisation du logiciel in Silico (http://insilico.ehu.es/PCR_virus/). Le logiciel BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) a permis de démontrer une correspondance de 89% à 100% des amplicons attendus avec le gène C11R. Les séquences des amplicons figurent dans l'[Annexe 6](#).

Le protocole réactionnel utilisé dans ce travail est détaillé dans l'[Annexe 4](#).

c) Visualisation des produits de PCR nichée par électrophorèse

Une fois la PCR nichée terminée, les fragments d'ADN amplifiés étaient séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% et le résultat révélé par lumière UV. La constitution du gel et le protocole d'électrophorèse sont détaillés dans l'[Annexe 5](#). Les échantillons étaient considérés positifs lorsqu'ils présentaient une bande à la hauteur de 170pb.

d) Vérification des résultats par séquençage

Six amplicons séparés à l'électrophorèse et mesurant la taille de 170pb attendue ont été soumis à un test de séquençage génétique par la technique de Sanger à l'Institut de Biotechnologie (IBTEC) de l'UNESP.

Deux de ces amplicons ont également été clonés après purification grâce au kit « Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System » de Promega, utilisant la technologie des membranes de silice. Le kit de clonage utilisé était le « pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems » de Promega, mettant en jeu un plasmide pGEM®-T permettant l'isolement et l'amplification de la séquence recherchée. La séquence des

échantillons a ensuite été obtenue par la technique de séquençage de Sanger grâce au séquenceur « Applied Biosystems™ 3500 » de ThermoFisher.

e) Recherche des gènes C11R et A56R par PCR quantitative (qPCR) ou PCR en temps réel des échantillons d'urine

Le principe de PCR en temps réel est détaillé dans l'[Annexe 7](#).

Cette dernière étape consistait en une vérification des résultats précédemment obtenus. La PCR en temps réel est reconnue pour sa sensibilité accrue et sa rapidité d'exécution, en faisant une méthode coûteuse et très dépendante de la contamination (Trindade et al., 2008). Elle n'a donc été réalisée qu'en second lieu dans le but de confirmer les résultats obtenus.

Deux gènes ont été visés au cours de deux qPCR différentes. La première concernait une séquence du gène C11R différente de celle de la PCR nichée. La seconde détectait une séquence du gène A56R. Utiliser deux cibles différentes permettait d'accroître les chances de détecter des faux négatifs et de certifier la présence du VACV lorsque détecté.

Les 157 échantillons testés en PCR nichée n'ont pas été soumis aux mêmes qPCR ([Tableau 2](#)). La PCR en temps réel du gène C11R étant plus sensible (Geessien Kroon et al., 2016), tous les échantillons y ont été soumis. En revanche, seuls les 31 échantillons positifs ou douteux à la PCR nichée ont été soumis à la seconde réaction de qPCR, cette dernière ne détectant qu'une charge virale élevée (Peres M et al. 2018).

qPCR du gène C11R	qPCR du gène A56R
30 échantillons positifs 1 échantillons douteux 126 échantillons négatifs	30 échantillons positifs 1 échantillon douteux

[Tableau 2. Répartition des échantillons entre les deux PCR en temps réel.](#) "positifs", "douteux" et "négatifs" qualifient les résultats obtenus en PCR nichée.

Ces deux réactions de qPCR SYBR Green ont été menées au sein du laboratoire de virologie de l'Université Fédérale du Minas Gerais (UFMG) de Belo Horizonte, Brésil, avec l'aide de G. Trindade et collectif. Le protocole réactionnel utilisé dans ce travail est détaillé dans l'[Annexe 7](#).

Les mêmes auteurs ont validé la séquence des amorces utilisées dans ces réactions de PCR quantitatives (**Tableau 3**). Leur alignement avec le génome du virus de la vaccine a été vérifiée par l'utilisation du logiciel *in silico* (http://insilico.ehu.es/PCR_virus/). Le logiciel BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) a permis de montrer la correspondance des amplicons avec les gènes C11R et A56R à 100%.

Réaction	Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce	Température de fusion (T _m) des amplicons obtenus
qPCR vgf	vgf F	CGCTACAACAGATATTCCAGCTATCAG	T _m = 78,6°C
	vgf R	AGCGTGGATACAGTCACCGTGTA	
qPCR ha	ha F	CATCATCTGGAATTGTCACTACTAAA	Groupe 1 : T _m =75,8°C Groupe 2 : T _m =76,3°C
	ha R	ACGGCCGACAATATAATTAATGC	

Tableau 3. [Séquences des amorces utilisées au cours des réactions de PCR en temps réel.](#) Les températures de fusion des amplicons obtenus sont issues de [Geessien Kroon et al.2016](#). L'alignement des amorces avec le génome a été prouvée grâce au logiciel *in Silico* (http://insilico.ehu.es/PCR_virus/) et leur correspondance à 100% avec les gènes C11R et A56R avec le logiciel BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

Les 31 échantillons positifs ou douteux à la PCR nichée ont été testés individuellement. Les 126 échantillons négatifs ont été mélangés deux à deux (**Annexe 8**). Les qPCR ont été menées sur des plaques à 48 puits. Les échantillons et les témoins négatifs et positifs ont été testé en duplicata pour les deux réactions (**Tableau 4**).

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	T-	T-	114	114	161	161	208	208
B	38	38	121	121	165	165	224	224
C	73	73	125	125	166	166	226	226
D	99	99	136	136	173	173	228	228
E	106	106	138	138	181	181	203	203
F	113	113	145	145	190	190	T+	T+

Tableau 4. [Exemple d'utilisation des plaques à 48 puits des qPCR.](#) T- représente le témoin négatif et T+ le témoin positif. Les numéros correspondent aux numéros d'identification des échantillons analysés individuellement ou des mélanges lorsque réalisés. Chaque échantillon est déposé dans deux puits afin d'être testé en duplicata.

Les échantillons étaient considérés positifs lorsque leur cycle seuil Ct était inférieur à 38 et leur température de fusion T_m égale à un degré Celsius près à celle du témoin

positif. Cela dans les deux puits de l'échantillon. Quand un seul des puits montrait une amplification, l'échantillon était alors de nouveau testé.

Dans le cas des mélanges, si les deux puits remplissaient les critères de positivité, alors les échantillons du mélange étaient séparés puis testés individuellement. En revanche, lorsqu'un seul puits était amplifié, le mélange entier était de nouveau testé.

III. Résultats de l'étude expérimentale

Au total, 334 individus ont été capturés et échantillonnés. Les captures ont été assez équilibrées entre les zones rurales (54%) et les zones urbaines (43%), avec seulement 3% des échantillons provenant de zones non précisées (Figure 13). Les individus prélevés provenaient de 24 espèces différentes dont la grande majorité était des opossum (Figure 12). Le ratio mâles/femelles était de 94% et la majorité des individus capturés étaient adultes (Figure 15). Toutes les informations concernant les animaux prélevés sont regroupées dans l'Annexe 1.

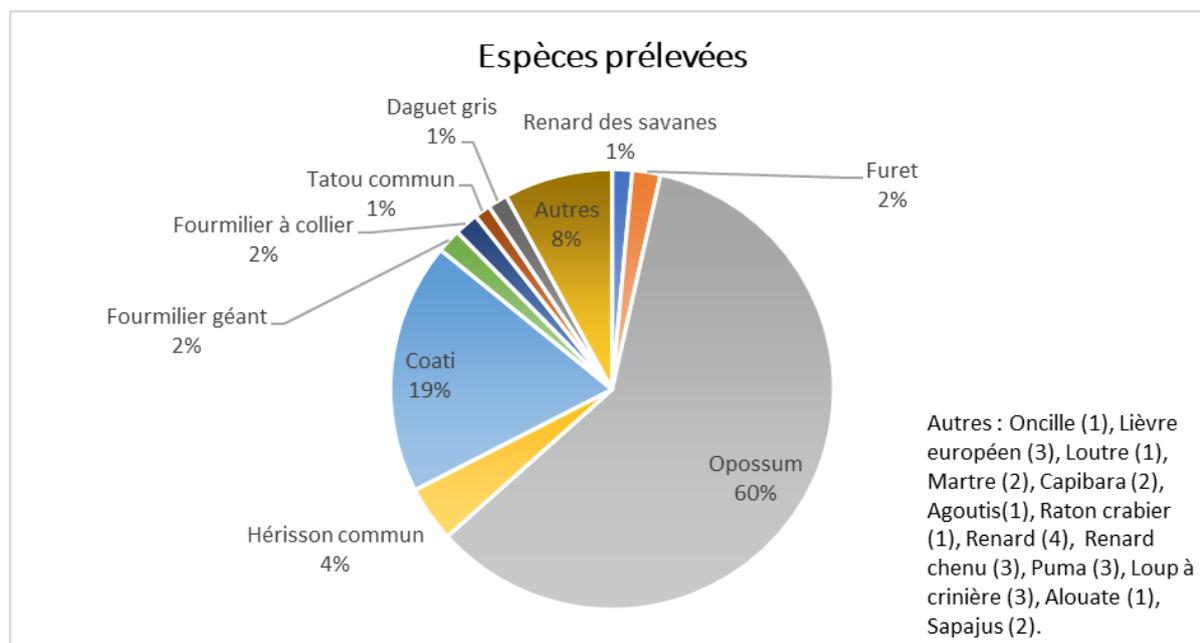


Figure 12. Répartition des espèces prélevées. La catégorie « Autres » regroupe les espèces dont 4 ou moins d'individus ont été prélevés.

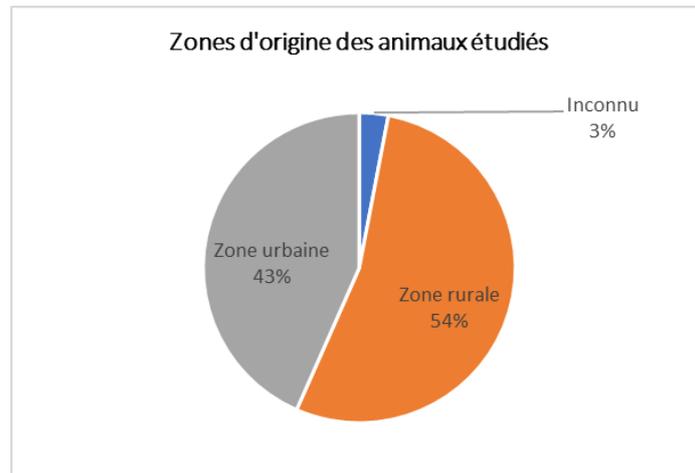


Figure 13. Répartition des zones d'origine des animaux étudiés. La classification des zones d'origine des animaux en « urbaine » ou « rurale » a été basée sur leur proximité avec les villes. Pour 3% des échantillons, la zone d'origine n'a pas pu être déterminée.

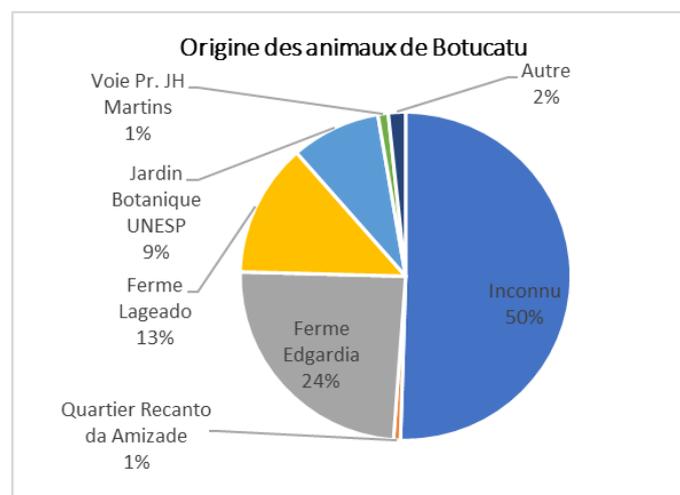


Figure 14. Répartition des lieux d'origine des animaux issus de la commune de Botucatu. La catégorie « Autre » regroupe les lieux desquels seul un animal est originaire. Pour les animaux dont l'origine est inconnue, 69% provenaient d'une zone urbaine, 2% d'une zone rurale et pour 1,3% d'entre eux l'origine n'a pas pu être déterminée.

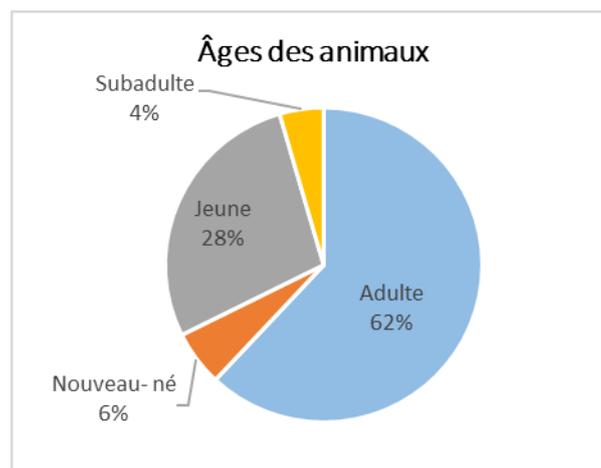


Figure 15. Répartition des âges des animaux étudiés. La catégorie « Nouveau-né » regroupe les individus non encore sevrés ; la catégorie « Jeune » regroupe les individus sevrés mais encore en phase de croissance ; la catégorie « Subadulte » regroupe les individus jeunes adultes ; la catégorie « Adulte » regroupe les individus adultes et âgés.

Les résultats des analyses sérologiques par PRNT et moléculaires par réaction de PCR sont réunis dans l'Annexe 9.

1. Résultats de la Séroneutralisation par Réduction des Plages de Lyse (PRNT)

Les 334 échantillons de sérum de l'étude ont été analysés par le Laboratoire de Virologie de l'UFMG. La totalité des résultats figure dans l'Annexe 10, un extrait est présenté dans le Tableau 5.

Pour 55 des sérums, soit 16,47% des échantillons, aucun résultat n'a pu être obtenu (NE), c'est-à-dire qu'il n'a pas été possible de compter les plaques virales dans les puits. Pour 49 de ces échantillons, le défaut de comptage s'était porté sur le puits du témoin positif de la plaque comme sur celui de l'échantillon (ligne bleu clair du Tableau 5). Pour les 6 autres, cela ne concernait que le puits du témoin positif (ligne bleu foncé du Tableau 5).

ID	ECH	TP	PFU (%)	Réduction (%)	Résultat
1	152	180	84,44	15,56	Négatif
2	177	180	98,33	1,67	Négatif
16	171	144	118,75	-18,75	Négatif
17	NE	NE	NE	NE	NE
192	216	NE	NE	NE	NE
297	94	44	213,64	-113,64	Négatif
334	38	69	55,07	44,93	Négatif

Tableau 5. Extrait des résultats de la PRNT sur les échantillons de sérum. Les résultats sont indiqués avec deux chiffres significatifs après la virgule. ECH désigne le nombre de plaques virales comptées dans le puits de l'échantillon. TP désigne celui du témoin positif. NE signifie « Non évaluable ».

Pour aucun des échantillons, un pourcentage de réduction supérieur ou égal à 50% n'a été obtenu. Aucun des échantillons analysés n'a donc été considéré positif à l'analyse sérologique par PRNT.

Le plus haut pourcentage de réduction obtenu a été de 44,93% (échantillon 334, Renard des savanes adulte de la commune de Marilia) alors que le plus bas a été de -113,64% (échantillon 297, Opossum adulte de la commune de Botucatu). Environ 37% (103/334) des échantillons présentaient un pourcentage de réduction négatif ; 45,16% (126) possédaient un pourcentage de réduction compris entre 0% inclus et 20% ; et 17,92% (50) étaient compris entre 20% inclus et 45%.

Le nombre d'échantillons ayant permis d'obtenir un résultat étant important (279/334), il avait été décidé de ne pas répéter les tests pour lesquels aucun résultat

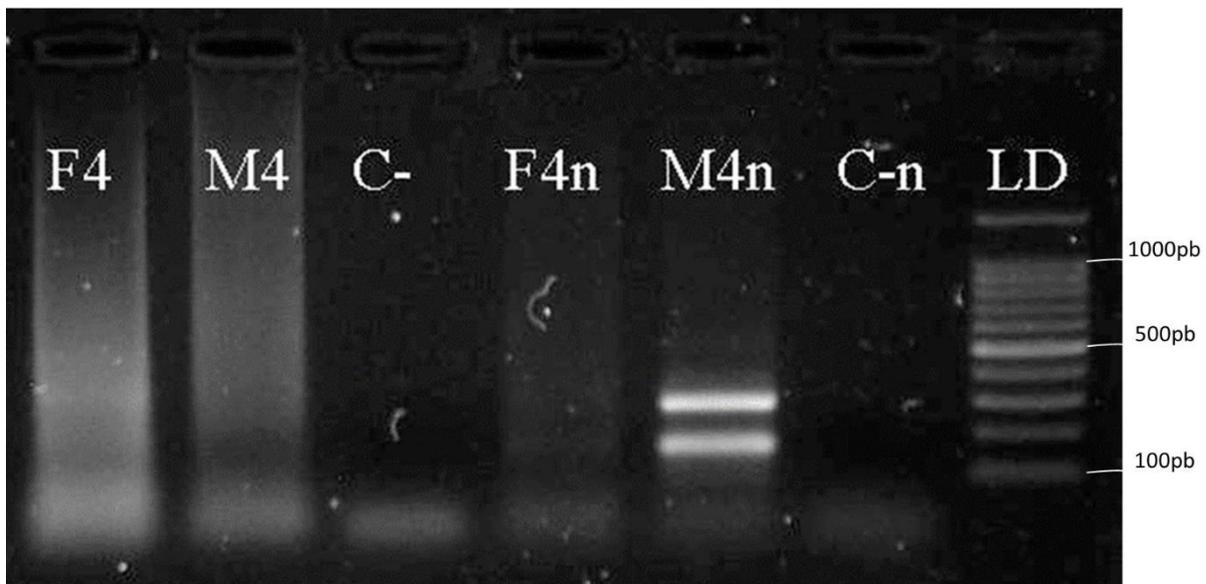
n'avait été obtenu. Cela avait de plus permis de trier les échantillons dans l'objectif de réduire le nombre d'analyses par PCR réalisées ensuite.

2. Résultats de la réaction de PCR nichée sur le gène C11R

Tous les résultats de PCR nichée sont regroupés dans l'[Annexe 11](#).

a) Résultats des expériences préliminaires

Par les expériences préliminaires menées, il a été confirmé que la PCR nichée, avec l'utilisation des amorces vgf du laboratoire et du mélange « PCR Master Mix » de Promega, était nécessaire à l'obtention d'un résultat ([Image 8](#)). Lors de la réalisation d'une seule réaction de PCR (F4, M4, C-), aucune bande n'était visualisable. En revanche, après la seconde réaction de PCR (F4n, M4n, C-n) deux bandes apparaissent sur la ligne de M4n. F4 et M4 étaient constitués par l'ADN extrait de poumons de souris inoculées expérimentalement par Peres *et al.* M4 présentait deux bandes, la plus basse à la hauteur de 170pb, hauteur attendue pour le produit de PCR nichée, la plus haute aux alentours de 300pb, probablement résiduelle de l'amplicon obtenu à la première réaction de PCR nichée. M4 a par la suite constitué le témoin positif des PCR nichées.

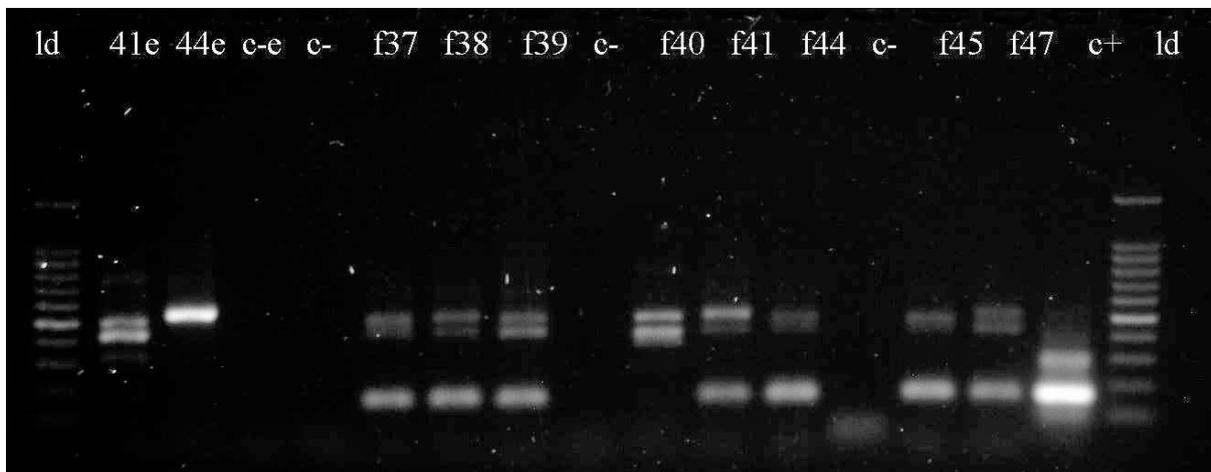


[Image 8](#). Extrait des résultats des expériences préliminaires à la PCR nichée du gène C11R. Les témoins négatifs (C- et C-n) ne présentent aucune bande, preuve de la non-contamination de la réaction. F4 et M4 désignent l'ADN extrait des poumons de la femelle n°4 et le mâle n°4 respectivement, inoculés par Peres *et al.* LD désigne la solution « échelle ». Les puits F4, M4 et C- ont reçu les produits de PCR1. Les puits F4n, M4n et C-n ont reçu les produits de PCR2.

b) Résultats des analyses des échantillons de sang par PCR nichée

Les analyses ont d'abord été menées sur les échantillons de sang dont l'ADN avait été extrait par Fornazari et al. entre 2012 et 2014. Seulement 40 échantillons ont été analysés car les résultats obtenus ne coïncidaient pas avec le contexte épidémiologique de l'étude. En effet, 45% de positivité a été obtenu sur cet ensemble. Un tel taux n'était pas attendu au vu de l'historique de la région. De plus, les travaux menés par Peres *et al.* (2018), sur des échantillons sanguins d'animaux de la faune sauvage prélevés en zone indemne et soumis à la même PCR nichée, ont montré une positivité d'environ 1,6% (3/191). Trois échantillons *a priori* positifs ont néanmoins été envoyés à séquencer à l'IBTEC de l'UNESP. Aucune séquence n'a pu être obtenue. La bande visible à la hauteur de 170pb n'était donc probablement qu'un artefact dû à une amplification non spécifique.

Dans l'hypothèse où le matériel génétique ait été extrait il y a trop longtemps et ait subi une altération, il a été décidé de procéder à une nouvelle extraction du matériel génétique. Des prélèvements de sang total ont été retrouvés pour deux échantillons (f41 et f44). Ces nouveaux échantillons, ainsi que les anciens, ont été soumis à la réaction de PCR nichée et les résultats comparés ([Image 9](#)).



[Image 9.](#) Résultats de PCR nichée de l'ADN nouvellement et anciennement extrait des prélèvements de sang. 1d désigne la solution échelle, c- désigne les témoins négatifs de PCR et c-e celui de l'extraction d'ADN, c+ désigne le témoin positif de PCR. 41e et 44e désignent les échantillons dont l'ADN a été nouvellement extrait. F37 à f47 désignent les échantillons d'ADN anciennement extraits. Aucune contamination n'a eu lieu au cours de la réaction et le témoin positif est bien positif.

Les échantillons précédemment classés positifs le sont restés après répétition de la PCR nichée (bande à la hauteur de 170pb). En revanche, les échantillons nouvellement extraits présentaient des modifications. L'échantillon f41 préalablement positif ne l'était plus et possédait une bande à la hauteur de 500pb contre 550pb

auparavant. De même, l'échantillon f44 ne possédait plus qu'une seule bande à la hauteur d'environ 550pb.

Par la proportion importante d'échantillons positifs obtenus et la non-répétabilité des résultats, il a été décidé de ne pas poursuivre les analyses des échantillons de sang. Seule l'urine a donc été considérée pour chaque animal. De plus, une grande partie des échantillons d'urine avait déjà été extraite. Par limite de financement, le restant du kit d'extraction avait donc été réservé aux échantillons d'urine restants.

c) Résultats des analyses des échantillons d'urine par PCR nichée

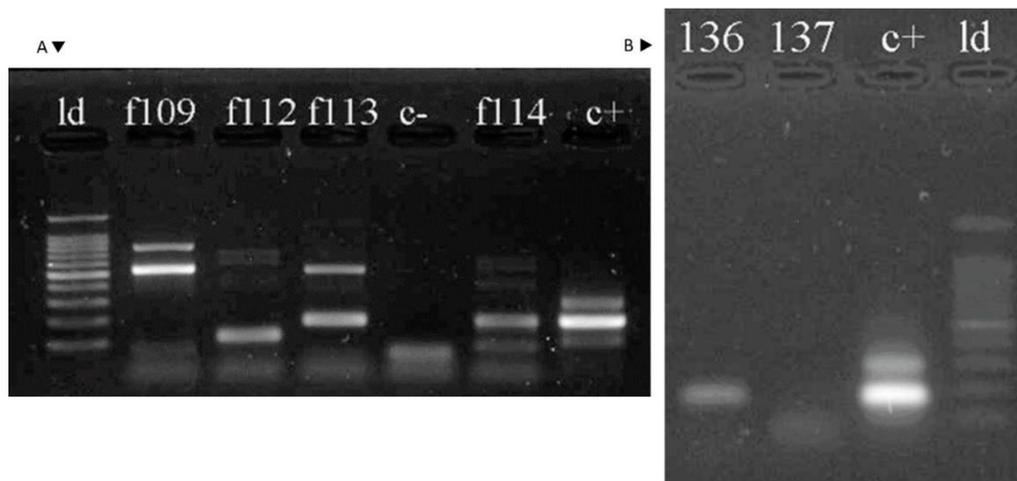
Le matériel génétique utilisé dans cette partie avait été extrait de prélèvements d'urine conservés à -80°C entre un et deux mois avant la réalisation des PCR nichées. Pour chacune des PCR nichées menées, aucune contamination n'a été détectée et le bon déroulement des réactions a toujours été assuré.

La synthèse des résultats obtenus figure dans le [Tableau 6](#) ci-dessous.

Environ 19% (30/157) des échantillons ont présenté une bande à la hauteur de 170pb ([Image 10.A](#)) et ont donc été considérés comme positifs. Un échantillon a été considéré douteux ([Image 10.B](#)) car il présentait une bande à une hauteur légèrement supérieure à celle du témoin positif. Ce doute serait ensuite écarté avec la réalisation des PCR en temps réel.

Espèce	PCR nichée réalisée	Résultat positif	% positif
Coati	31	0	0,00
Daguet gris	5	1	20,00
Fourmilier à collier	3	0	0,00
Fourmilier géant	5	0	0,00
Furet	1	0	0,00
Hérisson commun	6	0	0,00
Lièvre européen	2	0	0,00
Opossum	97	29	29,90
Puma	1	0	0,00
Renard commun	2	0	0,00
Renard des savanes	3	0	0,00
Tatou commun	1	0	0,00
Total	157	30	19,11

[Tableau 6. Synthèse des résultats des analyses des échantillons d'urine par PCR nichée.](#) 12 espèces différentes ont été analysées.



[Image 10. Extrait des résultats : exemple d'échantillon positif \(A\) et douteux \(B\) à la PCR nichée.](#) c- désigne le témoin négatif et c+ le témoin positif, ld désigne la solution échelle. (A) Les échantillons f113 et f114 présentent une bande à la même hauteur que celle du témoin positif, ils ont donc été considérés positifs. Les autres échantillons ont été considérés négatifs. (B) 136 désigne l'échantillon considéré comme douteux.

Les échantillons positifs étaient représentés par 29 opossums et un daguet gris :

- Le daguet gris était originaire de Agudos (77km de Botucatu), d'une zone rurale et d'un lieu inconnu.
- Parmi les opossums, un était originaire de Bauru (96km de Botucatu) et les 28 autres de différents lieux de Botucatu ([Tableau 7](#)) (2 de la ferme Edgardia, 3 de la ferme Lageado, 2 du jardin botanique de l'UNESP et 21 d'un lieu inconnu). Dix-neuf (65,5%) étaient issus d'une zone urbaine, 8 (27,6%) d'une zone rurale et 2 (6,9%) d'une zone inconnue.

	Ferme Edgardia	Ferme Lageado	Jardin Botanique	Inconnu	Total
Zone rurale	2	3	2	1	8
Zone urbaine	0	0	0	19	19
Zone inconnue	0	0	0	2	2
Total	2	3	2	22	28

[Tableau 7. Lieux et zones d'origine des 28 opossums originaires de Botucatu.](#)

La prévalence du virus de la vaccine a été calculée pour chacune des zones d'origine des opossums ([Tableau 8](#)) et du daguet gris ([Tableau 9](#)) positifs :

	Positifs	Négatifs	Total	Prévalence (p)	Intervalle de confiance de p
Zone rurale	8	17	25	32%	[13-50]
Zone urbaine	19	49	69	27%	[21-42]
Zone inconnue	2	1	3		
Total	29	67	97	29%	[23-41]

[Tableau 8. Prévalence calculée du virus de la vaccine parmi les opossums en zone rurale, urbaine ou inconnue.](#)

	Positifs	Négatifs	Total	Prévalence (p)	Intervalle de confiance de p
Zone rurale	1	4	5	20%	[-15 - 55]

Tableau 9. Prévalence calculée du virus de la vaccine parmi les daguets gris prélevés.

Les opossums issus d'une zone inconnue n'ont pas été pris en compte pour l'analyse statistique. La prévalence du VACV chez les opossums semble plus élevée en zone rurale qu'en zone urbaine, les opossums auraient donc plus de risque de se contaminer en zone rurale qu'en zone urbaine. Cependant, le risque relatif RR ayant été estimé à 1,18 (IC95% : 0.59-2.35), la différence de prévalence entre les deux zones n'est pas statistiquement significative. Tous les daguets gris prélevés (5) étaient issus d'une zone rurale, la prévalence estimée du virus de la vaccine dans cette population était de 20% (IC95% : -15-55).

d) Clonage et séquençage d'une sélection d'échantillons positifs

Six des échantillons positifs (5 opossums et 1 daguet gris) ont été envoyés à séquencer à l'IBTEC. Ils ont été choisis car ils présentaient une bande à la hauteur de 170pb épaisse et avec une forte fluorescence, signe d'une importante quantité d'ADN. Les deux bandes du témoin positif ont également été séquencées.

Hormis pour le témoin positif (Figure 16), aucune séquence n'a pu être obtenue. Afin d'exclure l'hypothèse d'un important mélange d'amplicons interférant avec le séquençage, il a été décidé de cloner certains échantillons. Le clonage aurait permis d'isoler et d'amplifier chaque amplicon. Pour des raisons de coûts et d'approvisionnement en matériel, seulement deux échantillons sur les six précédents ont été clonés.

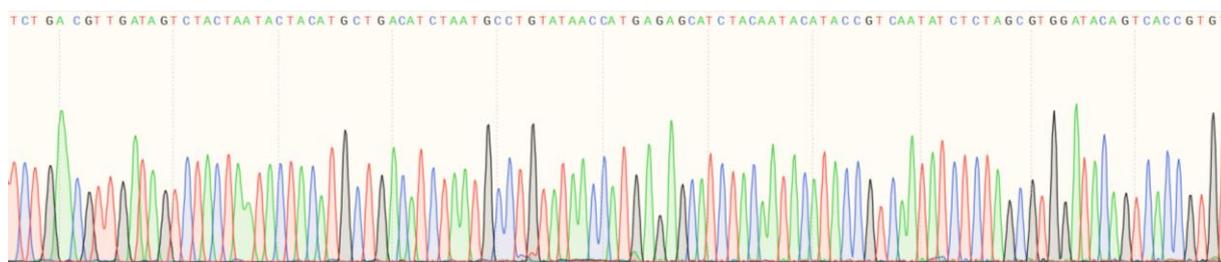


Figure 16. Extrait du résultat de séquençage du témoin positif, séquence de la bande à 170pb. Image issue du logiciel « SnapGene® Viewer » de SnapGene.

La séquence obtenue pour les deux échantillons clonés s'alignait à 78% avec le gène X du Diable de Tasmanie et 14% avec le gène C11R du virus de la vaccine

(Tableau 10). La petite partie s'alignant avec le gène d'intérêt correspondait à une séquence complémentaire de l'amorce vgf R de première réaction de PCR nichée.

Séquence des amplicons clonés	CAGGATCCATAATCAGATCATTTCAATATTTTCAGGCATGAGGTG ACAAGGACTTGAAGTAGATTGACAATATTATCAGAGGAAAAAAG GGGCGAAATTTGAGAAATGTTTTAGAGGTGAAATGAATAATCTT TGACAACAGCATGGATATGGTTGTGCCATAATTTTTAT
Séquence de l'amorce vgf R	ATAAAAATTATGGCACAACCATATC

Tableau 10. Comparaison des séquences des amplicons clonés et de l'amorce vgf R. La partie en gras dans la séquence des clones est complémentaire de la séquence de l'amorce vgf R.

3. Résultats des PCR en temps réel (qPCR) pour la recherche des gènes C11R et A56R

Toutes les réactions de qPCR ont présenté une absence de contamination et ont assuré une bonne amplification du témoin positif.

Les 31 échantillons soumis à la qPCR du gène A56R (Tableau 2) ont donné un résultat négatif.

L'échantillon 136, douteux à la PCR nichée, a été négatif à la qPCR du gène C11R. Parmi les 30 échantillons précédemment positifs, un puits sur deux des échantillons 138 et 173 a été amplifié (Figure 17). Leur Ct étaient respectivement de $Ct_{138}=36,53$ et $Ct_{173}=36,87$ et leur T_m de $T_{m138}=78,6^{\circ}\text{C}$ et $T_{m173}=78,3^{\circ}\text{C}$. Testés sur la même plaque, ils possédaient le même témoin positif dont les valeurs étaient $Ct_p=22,8$ et $T_{m_p}=78,6^{\circ}\text{C}$ (moyennes des valeurs des deux puits). Ces deux échantillons ont donc de nouveau été testés. Les répétitions ont ensuite été négatives.

Un seul des mélanges (mélange n°5) testés en qPCR du gène C11R a subi une nouvelle fois la réaction. En effet, un de ses deux puits a montré une amplification avec un $Ct=32,4$ et une $T_m=79,02^{\circ}\text{C}$ (Figure 18). Les valeurs du témoin positif étaient $Ct_p=18,4$ et $T_{m_p}=78,57^{\circ}\text{C}$ (moyennes des valeurs des deux puits). Le mélange entier a de nouveau été testé et s'est révélé négatif.

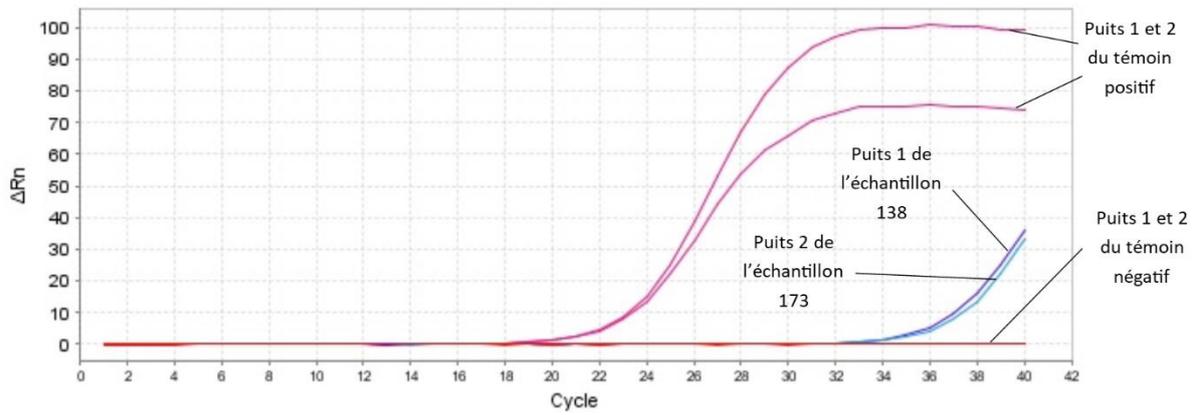


Figure 17. Courbe de fluorescence des échantillons 138 et 173. « ΔRn » désigne la fluorescence et « Cycle » le nombre de cycles réalisés. Les courbes des puits du témoin négatif restent planes, signes de la non-contamination de la réaction. Le plateau des courbes des deux puits du témoin positif sont différents, cela n'altère en rien la positivité du témoin. Les courbes des échantillons 138 et 173 présentent une phase d'inflexion plus tardive. Graphique obtenu grâce au logiciel « StepOne Software » de StepOne.

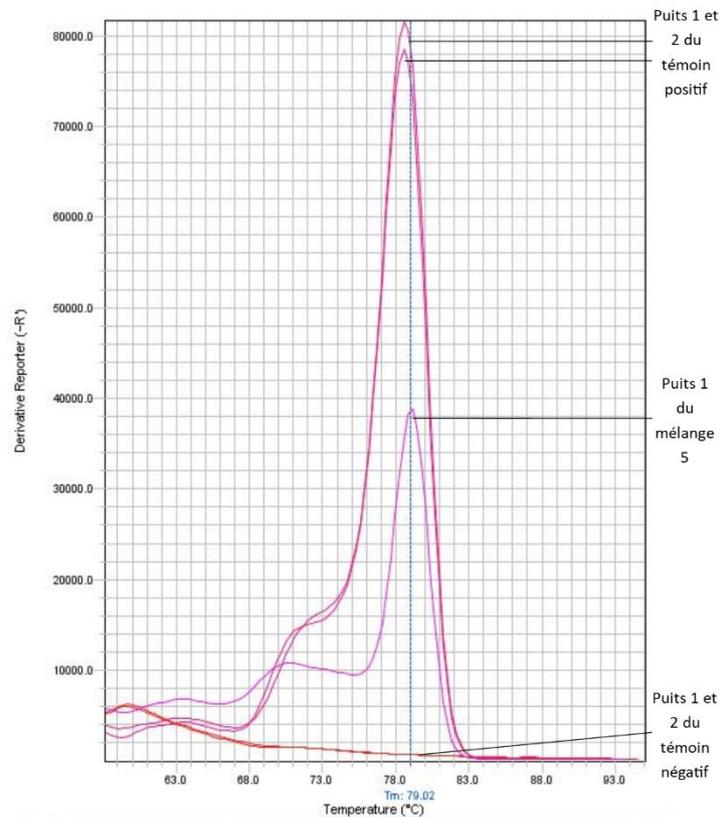


Figure 18. Courbe de dissociation du mélange n°5. « Derivative Reporter » désigne la dérivée première de la fluorescence et « Temperature » la température de fusion. Les courbes des puits du témoin négatif restent planes, signe d'aucune contamination. Les courbes des puits du témoin positif ont un pic unique à la même température, $T_m=78,57^{\circ}C$, la qPCR s'est donc bien déroulée. La courbe du puits 1 du mélange n°5 présentent un pic unique à la température $T_m=79,02^{\circ}C$. Graphique issu du logiciel « StepOne Software » de StepOne.

Le **Tableau 11** ci-après regroupe les informations concernant les échantillons testés une nouvelle fois. Le mélange n°5 était constitué des échantillons f49 et f50. Ces derniers avaient été négatifs à la PCR nichée et n'ont donc pas été soumis à la qPCR A56R. Il s'agissait d'animaux de l'espèce des coatis, un mâle et une femelle tous deux jeunes et issus du Jardin Botanique de l'UNESP, zone rurale au sein de

Botucatu. Les échantillons 138 et 173 avaient donné un résultat positif à la PCR nichée mais étaient revenus négatifs à la qPCR A56R. Il s'agissait d'opossums, un mâle et une femelle, tous deux adultes et issu d'un lieu inconnu d'une zone urbaine de Botucatu.

ID	Espèce	Sexe	Âge	Commune	Zone	Lieu	PCR nichée	qPCR C11R	qPCR A56R
F49	Coati	M	Jeune	Botucatu	Rurale	J. B. UNESP	Négatif	1/4	
F50	Coati	F	Jeune	Botucatu	Rurale	J. B. UNESP	Négatif	1/4	
F138	Opossum	F	Adulte	Botucatu	Urbaine	Inconnu	Positif	1/4	Négatif
F173	Opossum	M	Adulte	Botucatu	Urbaine	Inconnu	Positif	1/4	Négatif

Tableau 11. Synthèse des informations concernant les animaux positifs à la qPCR C11R. ID signifie « Identification », M signifie « Mâle », F signifie « Femelle », J. B. UNESP signifie « Jardin Botanique UNESP, 1/4 signifie « une répétition positive sur 4 » après répétition du test.

IV. Interprétation et discussion

Aucun échantillon n'a été considéré positif à l'analyse sérologique, aucun anticorps anti-*Orthopoxvirus* n'avait été suffisamment synthétisé par les animaux analysés. Cela peut être dû à une absence d'infection, ou bien à une infection débutante en phase d'incubation. Les résultats négatifs ensuite obtenus à l'analyse moléculaire orientent plutôt vers une absence de contamination, donc une très probable absence de contact des animaux avec le virus de la vaccine. Les témoins positifs étant bien positifs à chaque étape, les résultats étaient bien négatifs.

1. Séroneutralisation par Réduction des Plages de Lyse (PRNT)

Pour certains échantillons, aucun résultat n'a pu être obtenu, plusieurs facteurs peuvent en être la cause. Tout d'abord, les plaques virales sont comptées manuellement, une trop grande quantité de plaques rend alors le décompte difficile voire impossible et le résultat n'est pas évaluable. Néanmoins, une trop grande quantité de plaque virale implique probablement un taux en anticorps très faible, donc un échantillon séronégatif. Ensuite, lorsque la qualité du tapis cellulaire n'est pas optimale, et que celui-ci couvre moins des trois quarts de la surface du puits, le comptage est alors faussé et n'est également pas considéré. Finalement, toute erreur de manipulation au cours des différentes étapes de la réaction peut également

compromettre la lecture des résultats. Les PRNT ont été menées en amont et les plaques n'ont pas été conservées, il n'a donc pas été possible de déterminer l'origine de l'absence de résultat de certaines plaques.

Un pourcentage de réduction (R) négatif signifiait que l'échantillon testé possédait une charge virale supérieure à celle du témoin positif de la même plaque. Or dans le puits du témoin positif est supposée être inoculée la même quantité de virus que dans celui des échantillons. Ainsi un R négatif peut être causé par une erreur de manipulation au moment de la préparation des puits ou bien une sous-estimation du nombre de PFU du témoin positif lors du comptage.

Les plus hauts R autour de 40% suggéraient une production d'anticorps et un possible portage du virus. Cependant les analyses moléculaires se sont révélées négatives pour tous les animaux. Ces anticorps pouvaient être issus d'une vaccination ou d'une infection passée. Or, aucune vaccination n'a été pratiquée sur ces animaux et les anticorps restent détectables des années après immunisation par le VACV (Moutaftsi et al., 2010). Un R élevé pourrait être le signe d'un contact passé avec le virus de la vaccine à une date et un lieu ne pouvant être déterminés. Si celui-ci avait été récent nous nous serions alors attendus à trouver des animaux positifs.

Ces R proches de 50% pourraient également être dus à une erreur de manipulation au cours de l'expérience, ou bien à une réaction croisée avec un autre *Orthopoxvirus*, car il existe une protection croisée entre les virus de ce genre (Moss, 2011).

2. Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR)

Aucun témoin positif n'a été utilisé pour les extractions d'ADN des échantillons d'urine. De ce fait, aucune certitude ne peut être émise quant au bon fonctionnement de ces réactions. Toutefois, des bandes étaient visibles à l'électrophorèse indiquant qu'une amplification génétique avait eu lieu, donc que de l'ADN était bien présent. Tous les animaux positifs à la PCR nichée étaient considérés séronégatifs à la PRNT. Ces animaux seraient donc capables d'abriter et d'excréter le virus dans leurs urines sans produire d'anticorps et sans exprimer de signes cliniques (Jônatas S. Abrahão et al., 2009). Ils seraient ainsi des porteurs asymptomatiques du VACV.

La quantité de résultats positifs (19%) obtenue dépassait de dix fois le pourcentage de travaux précédemment menés dans la même région (M. Peres et al. 2018). Toutefois, il a été montré que le virus de la vaccine était excrété dans l'urine jusqu'à 6 jours post-infection chez toutes les souris inoculées expérimentalement par la souche Western Reserve (Ferreira et al., 2008). Les résultats de notre travail pourraient alors être valides à condition que l'on puisse appliquer ce modèle de rongeurs domestiques à des opossums et daguets gris sauvages.

La fiabilité des prévalences calculées pour les opossums (29%) et les daguets gris (20%) est à nuancer avec le biais de sélection ayant pu avoir lieu lors des captures. Les animaux plus jeunes, plus curieux ainsi que ceux affaiblis et affamés par une pathologie ont probablement été capturés plus facilement que ceux en bonne santé. La population capturée n'était alors pas représentative de la population naturelle sauvage. Il est donc possible que la prévalence du VACV soit en réalité plus faible que celle calculée ici.

Lorsque contaminés, les opossums abritent le virus dans leur sang mais ne produisent pas d'anticorps (M. Peres et al. 2018). Il aurait donc été intéressant de soumettre les échantillons de sang correspondant aux animaux positifs à une PCR nichée visant une autre cible du VACV. Utiliser une autre cible aurait permis de confirmer les résultats précédents et d'éviter les faux positifs comme obtenu au début de ce travail.

Les amorces utilisées dans ce travail étaient très sensibles mais assez peu spécifiques. Lors de la soumission de leur séquence au logiciel BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), toutes s'alignaient avec le VACV sauf l'amorce vgf F de première réaction de PCR nichée. Cette amorce pouvait alors provoquer l'amplification de fragments non désirés et expliquer une telle proportion de résultats positifs. Cependant le clonage des amplicons a donné un fragment d'une taille de 170pb dont la séquence s'alignait avec le génome du Diable de Tasmanie et l'amorce vgf R de première réaction de PCR nichée. Les résultats obtenus à la PCR nichée, de l'urine comme du sang, ne seraient donc que des faux positifs dus à une amplification non spécifique impliquant l'amorce vgf R et non vgf F comme supposé.

Le manque de spécificité de l'amorce vgf F aurait néanmoins pu provoquer des résultats faux négatifs par absence de fixation aux séquences recherchées. Dans ce cas-là, des résultats positifs auraient été obtenus aux PCR en temps réel, ce qui n'a pas été le cas dans notre travail.

L'impossibilité de séquencer les amplicons obtenus signifiait que la quantité d'ADN qu'ils contenaient était trop faible pour être détectée, voire qu'aucun matériel génétique n'était en réalité présent. Cela était favorable au fait que les résultats de PCR nichée aient été des faux positifs.

Les expériences de PCR en temps réel ont également confirmé la négativité des résultats de PCR nichée. Les échantillons dont un des puits a été positif à la qPCR de C11R possédaient des Ct élevés proches de 38, signifiant que l'amplification de l'ADN n'a été que tardive, donc que la quantité d'ADN était très faible. Les répétitions se sont par la suite révélées négatives, le séquençage des puits supposés positifs n'aurait donc probablement pas abouti. De même qu'à la PCR nichée, il est possible que ces résultats ne soient que des artefacts d'une amplification non spécifique. Il peut être supposé que les amorces vgf F et R du gène C11R soient moins spécifiques que celles du gène A56R, expliquant une amplification non spécifique à la qPCR de C11R.

Les températures de fusion T_m des échantillons faux positifs étaient proches des T_m des témoins positifs, pouvant être dû à la présence des amorces dans le produit amplifié. Leurs séquences étant complémentaires du gène C11R, il est possible que leurs T_m soient semblables à celle du produit attendu.

Conclusion

Les animaux capturés à Botucatu entre 2012 et 2014 n'excrétaient pas le virus de la vaccine dans leurs urines au moment des captures. Il est possible que les animaux possédant un taux en anticorps élevé à la PRNT aient abrité le virus dans leur sang. Pour vérifier cela il aurait fallu de nouveau extraire l'ADN des échantillons de sang et les soumettre à une réaction de PCR plus fiable que celle utilisée dans ce travail. Si la technique de PCR nichée est à favoriser pour son prix avantageux, il serait alors nécessaire de dessiner de nouvelles amorces plus spécifiques pour limiter les faux positifs. Cependant, d'après le contexte épidémiologique de la région au moment des prélèvements, il reste peu probable que les animaux aient constitué un réservoir du virus de la vaccine. L'analyse des échantillons de sang n'aurait donc certainement rien révélé.

La PRNT est une technique de choix dans la détection d'anticorps neutralisants dirigés contre un virus. Bien que longue à réaliser, elle est peu coûteuse et adaptée à des enquêtes épidémiologiques pour lesquels l'obtention de résultats peut être différée. D'autres tests immunologiques plus rapides, mais également plus coûteux, tels que ELISA (Khlusevich et al., 2018), vont lui être préférés dans des contextes cliniques où une réponse immédiate est attendue. Le test ELISA peut également se révéler plus sensible selon l'anticorps testé (Overton et al., 2015), caractéristique primordiale dans les études menées en santé publique sur le potentiel vaccinal du VACV. Ce test peut être très avantageux pour connaître les animaux porteurs et stopper une épidémie de VACV.

En résumé, entre 2012 et 2014, les animaux de la faune sauvage de Botucatu n'étaient pas porteurs du virus de la vaccine. La question de leur rôle de réservoir du virus de la vaccine n'a cependant pas été élucidée. Ces animaux étaient négatifs dans une région saine mais auraient pu se révéler positifs dans un contexte épidémiologique favorable (Peres et al., 2016). De nouvelles analyses plus actuelles sont nécessaires afin de vérifier cette hypothèse, laquelle pourrait s'avérer exacte. En effet, une étude récente (décembre 2019) a montré des résultats positifs pour la recherche de VACV à la PRNT d'animaux domestiques de la ferme Edgardia (Botucatu) (Oliveira *et al.* données non publiées). Il n'est donc pas à exclure que de nouvelles captures dévoilent aujourd'hui un portage asymptomatique du VACV par la faune sauvage. Une enquête épidémiologique plus détaillée avec des tests plus

fiables que ceux de ce travail permettrait de connaître le statut de la faune sauvage et d'éclaircir le cycle de transmission du virus de la vaccine.

Bibliographie

ABRAHÃO, Jônatas S., GUEDES, Maria Isabel M., TRINDADE, Giliane S., FONSECA, Flávio G., CAMPOS, Rafael K., MOTA, Bruno F., LOBATO, Zélia I. P., SILVA-FERNANDES, André T., RODRIGUES, Gisele O. L., LIMA, Larissa S., FERREIRA, Paulo C. P., BONJARDIM, Cláudio A. et KROON, Erna G., 2009. One More Piece in the VACV Ecological Puzzle: Could Peridomestic Rodents Be the Link between Wildlife and Bovine Vaccinia Outbreaks in Brazil? In : MONTGOMERY, Joel Mark (éd.), *PLoS ONE*. 19 octobre 2009. Vol. 4, n° 10, p. e7428. DOI 10.1371/journal.pone.0007428.

ABRAHÃO, Jônatas S., LIMA, Larissa S., ASSIS, Felipe L., ALVES, Pedro A., SILVA-FERNANDES, André T., COTA, Marcela MG, FERREIRA, Vanessa M, CAMPOS, Rafael K, MAZUR, Carlos, LOBATO, Zélia IP, TRINDADE, Giliane S et KROON, Erna G, 2009. Nested-multiplex PCR detection of Orthopoxvirus and Parapoxvirus directly from exanthematic clinical samples. In : *Virology Journal*. 2009. Vol. 6, n° 1, p. 140. DOI 10.1186/1743-422X-6-140.

ABRAHÃO, Jônatas S., SILVA-FERNANDES, André T., LIMA, Larissa S., CAMPOS, Rafael K., GUEDES, Maria I.M.C., COTA, Marcela M.G., ASSIS, Felipe L., BORGES, Iara A., SOUZA-JÚNIOR, Milton F., LOBATO, Zélia I.P., BONJARDIM, Cláudio A., FERREIRA, Paulo C.P., TRINDADE, Giliane S. et G., Erna, 2010. Vaccinia Virus Infection in Monkeys, Brazilian Amazon. In : *Emerging Infectious Diseases*. juin 2010. Vol. 16, n° 6, p. 976-979. DOI 10.3201/eid1606.091187.

ABRAHÃO, Jônatas Santos, DRUMOND, Betânia Paiva, DE SOUZA TRINDADE, Giliane, DA SILVA-FERNANDES, André Tavares, FERREIRA, Jaqueline Maria Siqueira, ALVES, Pedro Augusto, CAMPOS, Rafael Kroon, SIQUEIRA, Larissa, BONJARDIM, Cláudio Antônio, FERREIRA, Paulo César Peregrino et KROON, Erna Geessien, 2010. Rapid detection of *Orthopoxvirus* by semi-nested PCR directly from clinical specimens: A useful alternative for routine laboratories: Direct Detection of *Orthopoxvirus* by *vgf* Semi-Nested PCR. In : *Journal of Medical Virology*. avril 2010. Vol. 82, n° 4, p. 692-699. DOI 10.1002/jmv.21617.

BALDICK, C. J. et MOSS, B., 1993. Characterization and temporal regulation of mRNAs encoded by vaccinia virus intermediate-stage genes. In : *Journal of Virology*. juin 1993. Vol. 67, n° 6, p. 3515-3527. DOI 10.1128/JVI.67.6.3515-3527.1993.

BAROUDY, Bahige M et MOSS, Bernard, 1980. Purification and Characterization of a DNA-dependent RNA Polymerase from Vaccinia Virions. In : *The Journal of Biological Chemistry*. 10 mai 1980. Vol. 255, n° 9, p. 9.

BLASCO, R et MOSS, B, 1992. Role of cell-associated enveloped vaccinia virus in cell-to-cell spread. In : *Journal of Virology*. juillet 1992. Vol. 66, n° 7, p. 4170-4179.

BORGES, Maria Beatriz J., KATO, Sayuri E.M., DAMASO, Clarissa R.A., MOUSSATCHÉ, Nissin, DA SILVA FREIRE, Marcos, LAMBERT PASSOS, Sonia Regina et DO NASCIMENTO, Jussara Pereira, 2008. Accuracy and repeatability of a micro plaque reduction neutralization test for vaccinia antibodies. In : *Biologicals*. mars 2008. Vol. 36, n° 2, p. 105-110. DOI 10.1016/j.biologicals.2007.07.001.

BORN, T. L., MORRISON, L. A., ESTEBAN, D. J., VANDENBOS, T., THEBEAU, L. G., CHEN, N., SPRIGGS, M. K., SIMS, J. E. et BULLER, R. M., 2000. A poxvirus protein that binds to and inactivates IL-18, and inhibits NK cell response. In : *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. 15 mars 2000. Vol. 164, n° 6, p. 3246-3254. DOI 10.4049/jimmunol.164.6.3246.

BROYLES, Steven S., 2003. Vaccinia virus transcription. In : *Journal of General Virology*. 1 septembre 2003. Vol. 84, n° 9, p. 2293-2303. DOI 10.1099/vir.0.18942-0.

BULLER, R. M., CHAKRABARTI, S., MOSS, B. et FREDRICKSON, T., 1988. Cell proliferative response to vaccinia virus is mediated by VGF. In : *Virology*. mai 1988. Vol. 164, n° 1, p. 182-192. DOI 10.1016/0042-6822(88)90635-6.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC), 2009a. Human vaccinia infection after contact with a raccoon rabies vaccine bait - Pennsylvania, 2009. In : *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*. 6 novembre 2009. Vol. 58, n° 43, p. 1204-1207.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC), 2009b. Progressive vaccinia in a military smallpox vaccinee - United States, 2009. In : *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*. 22 mai 2009. Vol. 58, n° 19, p. 532-536.

CHOU, Wayne, NGO, Tuan et GERSHON, Paul D., 2012. An Overview of the Vaccinia Virus Infectome: a Survey of the Proteins of the Poxvirus-Infected Cell. In : *Journal of Virology*. février 2012. Vol. 86, n° 3, p. 1487-1499. DOI 10.1128/JVI.06084-11.

COLAMONICI, O. R., DOMANSKI, P., SWEITZER, S. M., LARNER, A. et BULLER, R. M., 1995. Vaccinia virus B18R gene encodes a type I interferon-binding protein that blocks interferon alpha transmembrane signaling. In : *The Journal of Biological Chemistry*. 7 juillet 1995. Vol. 270, n° 27, p. 15974-15978. DOI 10.1074/jbc.270.27.15974.

CONDIT, Richard C., MOUSSATCHE, Nissin et TRAKTMAN, Paula, 2006. In A Nutshell: Structure and Assembly of the Vaccinia Virion. In : *Advances in Virus Research* [en ligne]. S.l. : Elsevier. p. 31-124. [Consulté le 18 août 2020]. ISBN 978-0-12-039869-0. Disponible à l'adresse : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065352706660028>.

COSTA, Galileu Barbosa, MIRANDA, Júlia Bahia, ALMEIDA, Gregório Guilherme, SILVA DE OLIVEIRA, Jaqueline, PINHEIRO, Mariana Siqueira, GONÇALVES, Stefanne Aparecida, PIMENTA DOS REIS, Jenner Karlisson, GONÇALVES, Ricardo, FERREIRA, Paulo César Peregrino, BONJARDIM, Cláudio Antônio, ABRAHÃO, Jônatas Santos, KROON, Erna Geessien et TRINDADE, Giliane de Souza, 2017. Detection of Vaccinia Virus in Urban Domestic Cats, Brazil. In : *Emerging Infectious Diseases*. février 2017. Vol. 23, n° 2, p. 360-362. DOI 10.3201/eid2302.161341.

COSTA, Galileu Barbosa, RIBEIRO DE ALMEIDA, Lara, CERQUEIRA, Aline Gabriele Ribeiro, MESQUITA, Wander Ulisses, SILVA DE OLIVEIRA, Jaqueline, MIRANDA, Júlia Bahia, SARAIVA-SILVA, Ana Teresa, ABRAHÃO, Jônatas Santos, DRUMOND, Betânia Paiva, KROON, Erna Geessien, PEREIRA, Pedro Lúcio Lithg, SOARES, Danielle Ferreira de Magalhães et TRINDADE, Giliane de Souza, 2018. Vaccinia Virus among Domestic Dogs and Wild Coatis, Brazil, 2013–2015. In : *Emerging Infectious Diseases*. décembre 2018. Vol. 24, n° 12, p. 2338-2342. DOI 10.3201/eid2412.171584.

CROSS, Martin L., FLEMING, Stephen B., COWAN, Phil E., SCOBIE, Susie, WHELAN, Ellena, PRADA, Diana, MERCER, Andrew A. et DUCKWORTH, Janine A., 2011. Vaccinia virus as a vaccine delivery system for marsupial wildlife. In : *Vaccine*. 20 juin 2011. Vol. 29, n° 28, p. 4537-4543. DOI 10.1016/j.vaccine.2011.04.093.

CYRKLAFF, M., RISCO, C., FERNANDEZ, J. J., JIMENEZ, M. V., ESTEBAN, M., BAUMEISTER, W. et CARRASCOSA, J. L., 2005. Cryo-electron tomography of vaccinia virus. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 22 février 2005. Vol. 102, n° 8, p. 2772-2777. DOI 10.1073/pnas.0409825102.

DAMASO, Clarissa R.A., REIS, Sheila A., JESUS, Desyreé M., LIMA, Patrícia S.F. et MOUSSATCHE, Nissin, 2007. A PCR-based assay for detection of emerging vaccinia-like viruses isolated in Brazil. In : *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. janvier 2007. Vol. 57, n° 1, p. 39-46. DOI 10.1016/j.diagmicrobio.2006.07.012.

DE OLIVEIRA, Tércia M. Ludoulfo, REHFELD, Izabelle S., SIQUEIRA, Jaqueline Maria Ferreira, ABRAHÃO, Jônatas S., CAMPOS, Rafael K., DOS SANTOS, Andréia Kelly R., CERQUEIRA, Mônica Maria O. P., KROON, Erna G. et LOBATO, Zélia I. P., 2010. Vaccinia virus is not inactivated after thermal treatment and cheese production using experimentally contaminated milk. In : *Foodborne Pathogens and Disease*. décembre 2010. Vol. 7, n° 12, p. 1491-1496. DOI 10.1089/fpd.2010.0597.

DE SOUZA JÚNIOR, Milton Formiga, LOBATO, Zélia Inês Portela, LOBATO, Francisco Carlos Faria, MOREIRA, Elvio Carlos, DE OLIVEIRA, Rogério Rodrigues, LEITE, Geysa Goulart, FREITAS, Theonys Diógenes et DE ASSIS, Ronnie Antunes, 2006. [Presence of IgM antibodies for *Leptospira interrogans* in wild animals from Tocantins State, 2002]. In : *Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical*. juin 2006. Vol. 39, n° 3, p. 292-294. DOI 10.1590/s0037-86822006000300015.

DUTRA, Lara Ambrosio Leal, DE FREITAS ALMEIDA, Gabriel Magno, OLIVEIRA, Grazielle Pereira, ABRAHÃO, Jônatas Santos, KROON, Erna Geessien et TRINDADE, Giliane de Souza, 2017.

Molecular evidence of Orthopoxvirus DNA in capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) stool samples. In : *Archives of Virology*. février 2017. Vol. 162, n° 2, p. 439-448. DOI 10.1007/s00705-016-3121-3.

ESSBAUER, S., MEYER, H., PORSCH-ÖZCÜRÜMEZ, M. et PFEFFER, M., 2007. Long-Lasting Stability of Vaccinia Virus (Orthopoxvirus) in Food and Environmental Samples. In : *Zoonoses and Public Health*. mai 2007. Vol. 54, n° 3-4, p. 118-124. DOI 10.1111/j.1863-2378.2007.01035.x.

FENNER, F., 1993. Smallpox: emergence, global spread, and eradication. In : *History and philosophy of the life sciences* [en ligne]. 1993. [Consulté le 25 août 2020]. Disponible à l'adresse : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7529932/>.

FERREIRA, Jaqueline Maria Siqueira, ABRAHÃO, Jônatas Santos, DRUMOND, Betânia Paiva, OLIVEIRA, Fernando Meireles, ALVES, Pedro Augusto, PASCOAL-XAVIER, Marcelo Antônio, LOBATO, Zélia Inês Portela, BONJARDIM, Cláudio Antônio, FERREIRA, Paulo César Peregrino et KROON, Erna Geessien, 2008. Vaccinia virus: shedding and horizontal transmission in a murine model. In : *Journal of General Virology*. 1 décembre 2008. Vol. 89, n° 12, p. 2986-2991. DOI 10.1099/vir.0.2008/003947-0.

FORNAZARI, Felipe, [sans date]. EPIDEMIOLOGIA DA LEPTOSPIROSE EM MAMÍFEROS SILVESTRES DE VIDA LIVRE DA REGIÃO DE BOTUCATU, SP. In : . p. 71.

FULGINITI, Vincent A., PAPIER, Arthur, LANE, J. Michael, NEFF, John M. et HENDERSON, D. A., 2003. Smallpox vaccination: a review, part II. Adverse events. In : *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*. 15 juillet 2003. Vol. 37, n° 2, p. 251-271. DOI 10.1086/375825.

GEESIEN KROON, Erna, SANTOS ABRAHÃO, Jônatas, DE SOUZA TRINDADE, Giliane, PEREIRA OLIVEIRA, Grazielle, MOREIRA FRANCO LUIZ, Ana Paula, BARBOSA COSTA, Galileu, TEIXEIRA LIMA, Mauricio, SILVA CALIXTO, Rafael, DE OLIVEIRA, Danilo Bretas et DRUMOND, Betânia Paiva, 2016. Natural *Vaccinia Virus* Infection: Diagnosis, Isolation, and Characterization. In : *Current Protocols in Microbiology* [en ligne]. août 2016. Vol. 42, n° 1. [Consulté le 21 mars 2020]. DOI 10.1002/cpmc.13. Disponible à l'adresse : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cpmc.13>.

GRAY, Robert D. M., ALBRECHT, David, BEERLI, Corina, COHEN, Gary H., HENRIQUES, Ricardo et MERCER, Jason, 2018. *Nanoscale Polarization of the Vaccinia Virus Entry Fusion Complex Drives Efficient Fusion* [en ligne]. preprint. S.I. Microbiology. [Consulté le 19 août 2020]. Disponible à l'adresse : <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/360073>.

GUO, Zong Sheng, LU, Binfeng, GUO, Zongbi, GIEHL, Esther, FEIST, Mathilde, DAI, Enyong, LIU, Weilin, STORKUS, Walter J., HE, Yukai, LIU, Zuqiang et BARTLETT, David L., 2019. Vaccinia virus-mediated cancer immunotherapy: cancer vaccines and oncolytics. In : *Journal for Immunotherapy of Cancer*. 09 2019. Vol. 7, n° 1, p. 6. DOI 10.1186/s40425-018-0495-7.

HENDERSON, Donald A. et MOSS, Bernard, 1999. *Recombinant Vaccinia Virus Vaccines* [en ligne]. S.I. : Saunders. [Consulté le 25 août 2020]. Disponible à l'adresse : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7288/>.

HEUSER, John, 2005. Deep-etch EM reveals that the early poxvirus envelope is a single membrane bilayer stabilized by a geodetic "honeycomb" surface coat. In : *Journal of Cell Biology*. 25 avril 2005. Vol. 169, n° 2, p. 269-283. DOI 10.1083/jcb.200412169.

HILLER, G et WEBER, K, 1985. Golgi-derived membranes that contain an acylated viral polypeptide are used for vaccinia virus envelopment. In : *Journal of Virology*. septembre 1985. Vol. 55, n° 3, p. 651-659.

HU, Zhigang, YANG, Xue, ZHUANG, Shaoxia et LIU, Jie, 2018. Respiratory infection due to direct contact with rabbit-skin powder contaminated by vaccinia virus. In : *International journal of infectious diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases*. novembre 2018. Vol. 76, p. 70-72. DOI 10.1016/j.ijid.2018.09.005.

KATSAFANAS, George C. et MOSS, Bernard, 2007. Linkage of Transcription and Translation within Cytoplasmic Poxvirus DNA Factories Provides a Mechanism to Coordinate Viral and Usurp Host

Functions. In : *Cell host & microbe*. 11 octobre 2007. Vol. 2, n° 4, p. 221-228. DOI 10.1016/j.chom.2007.08.005.

KECK, J. G., BALDICK, C. J. et MOSS, B., 1990. Role of DNA replication in vaccinia virus gene expression: a naked template is required for transcription of three late trans-activator genes. In : *Cell*. 1 juin 1990. Vol. 61, n° 5, p. 801-809. DOI 10.1016/0092-8674(90)90190-p.

KERN, Earl R., 2003. In vitro activity of potential anti-poxvirus agents. In : *Antiviral Research*. janvier 2003. Vol. 57, n° 1-2, p. 35-40. DOI 10.1016/s0166-3542(02)00198-5.

KHLUSEVICH, Yana, MATVEEV, Andrey, BAYKOV, Ivan, BULYCHEV, Leonid, BORMOTOV, Nikolai, ILYICHEV, Ivan, SHEVELEV, Georgiy, MOROZOVA, Vera, PYSHNYI, Dmitrii et TIKUNOVA, Nina, 2018. Phage display antibodies against ectromelia virus that neutralize variola virus: Selection and implementation for p35 neutralizing epitope mapping. In : *Antiviral Research*. avril 2018. Vol. 152, p. 18-25. DOI 10.1016/j.antiviral.2018.02.006.

KNIPE, David M., HOWLEY, Peter M., COHEN, Jeffrey I., GRIFFIN, Diane E., LAMB, Robert A., MARTIN, Malcolm A., RACANIELLO, Vincent R. et ROIZMAN, Bernard, 2013. *Fields Virology Sixth Edition*. 6. S.l. : Wolters Kluwer - Lippincott Williams & Wilkins. ISBN 978-1-4511-0563-6.

KOTWAL, G. J., ISAACS, S. N., MCKENZIE, R., FRANK, M. M. et MOSS, B., 1990. Inhibition of the complement cascade by the major secretory protein of vaccinia virus. In : *Science (New York, N.Y.)*. 9 novembre 1990. Vol. 250, n° 4982, p. 827-830. DOI 10.1126/science.2237434.

KROON, Erna Geessien, MOTA, Bruno Eduardo F., ABRAHÃO, Jônatas Santos, DA FONSECA, Flávio Guimarães et DE SOUZA TRINDADE, Giliane, 2011. Zoonotic Brazilian Vaccinia virus: from field to therapy. In : *Antiviral Research*. novembre 2011. Vol. 92, n° 2, p. 150-163. DOI 10.1016/j.antiviral.2011.08.018.

LEITE, Flavia et WAY, Michael, 2015. The role of signalling and the cytoskeleton during Vaccinia Virus egress. In : *Virus Research*. novembre 2015. Vol. 209, p. 87-99. DOI 10.1016/j.virusres.2015.01.024.

LIMA, Mauricio Teixeira, OLIVEIRA, Grazielle Pereira, AFONSO, José Augusto Bastos, SOUTO, Rodolfo José Cavancanti, DE MENDONÇA, Carla Lopes, DANTAS, Antonio Flavio Medeiros, ABRAHAO, Jonatas Santos et KROON, Erna Geessien, 2019. An Update on the Known Host Range of the Brazilian Vaccinia Virus: An Outbreak in Buffalo Calves. In : *Frontiers in Microbiology*. 22 janvier 2019. Vol. 9, p. 3327. DOI 10.3389/fmicb.2018.03327.

MEGID, Jane, APPOLINÁRIO, Camila Michele, LANGONI, Hélio, PITUCO, Edviges Maristela et OKUDA, Liria Hiromi, 2008. Short Report: Vaccinia Virus in Humans and Cattle in Southwest Region of São Paulo State, Brazil. In : *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2008. Vol. 79, p. 5.

MEGID, Jane, BORGES, Iara A., ABRAHAO, Jonatas Santos, TRINDADE, Giliane, APPOLINÁRIO, Camila, RIBEIRO, Marcio, ALLENDORF, Susan D., ANTUNES, João Marcelo Azevedo Paula, SILVA-FERNANDES, André T et KROON, Erna G, 2012. Vaccinia virus zoonotic infection, São Paulo state, Brazil. In : *Emerging Infectious Diseases*. janvier 2012. Vol. 18, n° 1, p. 188-189. DOI 10.3201/eid1801.111176.

MIRZAKHANYAN, Yeva et GERSHON, Paul, 2019. The Vaccinia virion: Filling the gap between atomic and ultrastructure. In : CRISTEA, Ileana M. (éd.), *PLOS Pathogens*. 7 janvier 2019. Vol. 15, n° 1, p. e1007508. DOI 10.1371/journal.ppat.1007508.

MOSS, Bernard, 2011. Smallpox vaccines: targets of protective immunity: Smallpox vaccines. In : *Immunological Reviews*. janvier 2011. Vol. 239, n° 1, p. 8-26. DOI 10.1111/j.1600-065X.2010.00975.x.

MOTA, B. E. F., TRINDADE, G. S., DINIZ, T. C., DA SILVA-NUNES, M., BRAGA, E. M., URBANO-FERREIRA, M., RODRIGUES, G. O. L., BONJARDIM, C. A., FERREIRA, P. C. P. et KROON, E. G., 2010. Seroprevalence of orthopoxvirus in an Amazonian rural village, Acre, Brazil. In : *Archives of Virology*. juillet 2010. Vol. 155, n° 7, p. 1139-1144. DOI 10.1007/s00705-010-0675-3.

MOUTAFTSI, Magdalini, TSCHARKE, David C, VAUGHAN, Kerrie, KOELLE, David M, STERN, Lawrence, CALVO-CALLE, Mauricio, ENNIS, Francis, TERAJIMA, Masanori, SUTTER, Gerd,

CROTTY, Shane, DREXLER, Ingo, FRANCHINI, Genoveffa, YEWDELL, Jon W, HEAD, Steven R, BLUM, Janice, PETERS, Bjoern et SETTE, Alex, 2010. Uncovering the interplay between CD8, CD4 and antibody responses to complex pathogens. In : *Future Microbiology*. février 2010. Vol. 5, n° 2, p. 221-239. DOI 10.2217/fmb.09.110.

MOYER, R. W. et GRAVES, R. L., 1981. The mechanism of cytoplasmic orthopoxvirus DNA replication. In : *Cell*. décembre 1981. Vol. 27, n° 2 Pt 1, p. 391-401. DOI 10.1016/0092-8674(81)90422-0.

OLIVEIRA, Jaqueline, FIGUEIREDO, Poliana, COSTA, Galileu, ASSIS, Felipe, DRUMOND, Betânia, DA FONSECA, Flávio, NOGUEIRA, Maurício, KROON, Erna et TRINDADE, Giliane, 2017. Vaccinia Virus Natural Infections in Brazil: The Good, the Bad, and the Ugly. In : *Viruses*. 15 novembre 2017. Vol. 9, n° 11, p. 340. DOI 10.3390/v9110340.

OVERTON, Edgar Turner, STAPLETON, Jack, FRANK, Ian et HASSLER, Shawn, 2015. Safety and Immunogenicity of Modified Vaccinia Ankara-Bavarian Nordic Smallpox Vaccine in Vaccinia-Naive and Experienced Human Immunodeficiency Virus-Infected Individuals: An Open-Label, Controlled Clinical Phase II Trial. In : *Open forum infectious diseases* [en ligne]. 2015. DOI 10.1093/ofid/ofv040. Disponible à l'adresse : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4567089/>.

PERES, Marina, BACCHIEGA, Thais, APPOLINÁRIO, Camila, VICENTE, Acácia, MIONI, Mateus, RIBEIRO, Bruna, FONSECA, Clóvis, PELÍCIA, Vanessa, FERREIRA, Fernando, ABRAHÃO, Jonatas et MEGID, Jane, 2018. Vaccinia virus in Feces and Urine of Wild Rodents from São Paulo State, Brazil. In : *Viruses*. 23 janvier 2018. Vol. 10, n° 2, p. 51. DOI 10.3390/v10020051.

PERES, Marina, BACCHIEGA, Thais, APPOLINÁRIO, Camila, VICENTE, Acácia, MIONI, Mateus, RIBEIRO, Bruna, FONSECA, Clóvis, PELÍCIA, Vanessa, FERREIRA, Fernando, OLIVEIRA, Grazielle, ABRAHÃO, Jonatas et MEGID, Jane, 2018. Vaccinia Virus in Blood Samples of Humans, Domestic and Wild Mammals in Brazil. In : *Viruses*. 18 janvier 2018. Vol. 10, n° 1, p. 42. DOI 10.3390/v10010042.

PERES, Marina G., BARROS, Claudenice B., APPOLINÁRIO, Camila M., ANTUNES, João M.A.P., MIONI, Mateus S.R., BACCHIEGA, Thais S., ALLENDORF, Susan D., VICENTE, Acácia F., FONSECA, Clóvis R. et MEGID, Jane, 2016. Dogs and Opossums Positive for Vaccinia Virus during Outbreak Affecting Cattle and Humans, São Paulo State, Brazil. In : *Emerging Infectious Diseases*. février 2016. Vol. 22, n° 2, p. 271-273. DOI 10.3201/eid2202.140747.

PERES, Marina Gea, BACCHIEGA, Thais Silva, APPOLINÁRIO, Camila Michele, VICENTE, Acácia Ferreira, ALLENDORF, Susan Dora, ANTUNES, João Marcelo Azevedo Paula, MOREIRA, Sabrina Almeida, LEGATTI, Emerson, FONSECA, Clóvis Rinaldo, PITUCO, Edviges Maristela, OKUDA, Liria Hiromi, PANTOJA, José Carlos de Figueiredo, FERREIRA, Fernando et MEGID, Jane, 2013. Serological study of vaccinia virus reservoirs in areas with and without official reports of outbreaks in cattle and humans in São Paulo, Brazil. In : *Archives of Virology*. décembre 2013. Vol. 158, n° 12, p. 2433-2441. DOI 10.1007/s00705-013-1740-5.

PRESSANTI, C. et CADIERGUES, M.-C., 2013. Mécanismes d'action de l'imiquimod et implication dans le traitement des affections cutanées virales humaines et animales. In : *Pratique Médicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie*. octobre 2013. Vol. 48, n° 4, p. 105-112. DOI 10.1016/j.anicom.2013.10.001.

REHFELD, Izabelle Silva, GUEDES, Maria Isabel Maldonado Coelho, FRAIHA, Ana Luiza Soares, COSTA, Aristóteles Gomes, MATOS, Ana Carolina Diniz, FIÚZA, Aparecida Tatiane Lino et LOBATO, Zélia Inês Portela, 2015. Vaccinia virus Transmission through Experimentally Contaminated Milk Using a Murine Model. In : ANDREI, Graciela (éd.), *PLOS ONE*. 22 mai 2015. Vol. 10, n° 5, p. e0127350. DOI 10.1371/journal.pone.0127350.

ROPP, S L, JIN, Q, KNIGHT, J C, MASSUNG, R F et ESPOSITO, J J, 1995. PCR strategy for identification and differentiation of small pox and other orthopoxviruses. In : *Journal of clinical microbiology*. 1995. Vol. 33, n° 8, p. 2069-2076. DOI 10.1128/JCM.33.8.2069-2076.1995.

SATHESHKUMAR, P. S., ANTON, Luis C., SANZ, Patrick et MOSS, Bernard, 2009. Inhibition of the Ubiquitin-Proteasome System Prevents Vaccinia Virus DNA Replication and Expression of

Intermediate and Late Genes. In : *Journal of Virology*. mars 2009. Vol. 83, n° 6, p. 2469-2479. DOI 10.1128/JVI.01986-08.

SHCHELKUNOV, Sergei N., SHCHERBAKOV, Dmitrii N., MAKSYUTOV, Rinat A. et GAVRILOVA, Elena V., 2011. Species-specific identification of variola, monkeypox, cowpox, and vaccinia viruses by multiplex real-time PCR assay. In : *Journal of Virological Methods*. août 2011. Vol. 175, n° 2, p. 163-169. DOI 10.1016/j.jviromet.2011.05.002.

SINGH, R. K., BALAMURUGAN, V., BHANUPRAKASH, V., VENKATESAN, G. et HOSAMANI, M., 2012. Emergence and Reemergence of Vaccinia-Like Viruses: Global Scenario and Perspectives. In : *Indian journal of virology: an official organ of Indian Virological Society*. juin 2012. Vol. 23, n° 1, p. 1-11. DOI 10.1007/s13337-012-0068-1.

SMEE, Donald F., BAILEY, Kevin W., WONG, Min-Hui et TARBET, E. Bart, 2011. Topical treatment of cutaneous vaccinia virus infections in immunosuppressed hairless mice with selected antiviral substances. In : *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*. 12 mai 2011. Vol. 21, n° 5, p. 201-208. DOI 10.3851/IMP1734.

SMITH, Geoffrey L., BENFIELD, Camilla T. O., MALUQUER DE MOTES, Carlos, MAZZON, Michela, EMBER, Stuart W. J., FERGUSON, Brian J. et SUMNER, Rebecca P., 2013. Vaccinia virus immune evasion: mechanisms, virulence and immunogenicity. In : *Journal of General Virology*. 2013. Vol. 94, n° 11, p. 2367-2392. DOI 10.1099/vir.0.055921-0.

SMITHSON, Chad, TANG, Nick, SAMMONS, Scott, FRACE, Mike, BATRA, Dhvani, LI, Yu, EMERSON, Ginny L., CARROLL, Darin S. et UPTON, Chris, 2017. The genomes of three North American orthopoxviruses. In : *Virus Genes*. février 2017. Vol. 53, n° 1, p. 21-34. DOI 10.1007/s11262-016-1388-9.

SZAJNER, Patricia, JAFFE, Howard, WEISBERG, Andrea S. et MOSS, Bernard, 2004. A complex of seven vaccinia virus proteins conserved in all chordopoxviruses is required for the association of membranes and viroplasm to form immature virions. In : *Virology*. décembre 2004. Vol. 330, n° 2, p. 447-459. DOI 10.1016/j.virol.2004.10.008.

TRINDADE, Giliane de Souza, LI, Yu, OLSON, Victoria A., EMERSON, Ginny, REGNERY, Russell L., FONSECA, Flavio Guimaraes da, KROON, Erna Geessien et DAMON, Inger, 2008. Real-time PCR assay to identify variants of Vaccinia virus: Implications for the diagnosis of bovine vaccinia in Brazil. In : *Journal of Virological Methods*. septembre 2008. Vol. 152, n° 1-2, p. 63-71. DOI 10.1016/j.jviromet.2008.05.028.

TRINDADE, Giliane S., EMERSON, Ginny L., CARROLL, Darin S., KROON, Erna G. et DAMON, Inger K., 2007. Brazilian Vaccinia Viruses and Their Origins. In : *Emerging Infectious Diseases*. juillet 2007. Vol. 13, n° 7, p. 965-972. DOI 10.3201/eid1307.061404.

TRINDADE, Giliane S., GUEDES, Maria I. C., DRUMOND, Betânia P., MOTA, Bruno E. F., ABRAHÃO, Jônatas S., LOBATO, Zélia I. P., GOMES, Juliana A. S., CORRÊA-OLIVEIRA, Rodrigo, NOGUEIRA, Maurício L., KROON, Erna G. et DA FONSECA, Flávio G., 2009. Zoonotic Vaccinia Virus: Clinical and Immunological Characteristics in a Naturally Infected Patient. In : *Clinical Infectious Diseases*. 1 février 2009. Vol. 48, n° 3, p. e37-e40. DOI 10.1086/595856.

VEYER, David L., CARRARA, Guia, MALUQUER DE MOTES, Carlos et SMITH, Geoffrey L., 2017. Vaccinia virus evasion of regulated cell death. In : *Immunology Letters*. juin 2017. Vol. 186, p. 68-80. DOI 10.1016/j.imlet.2017.03.015.

WESTWOOD, J C N, BOULTER, E A, BOWEN, E T W et MABER, H B, 1966. Experimental Respiratory Infection with Poxviruses. In : *Microbiological Research Establishment*. 22 février 1966. p. 13.

WISE, Lyn M., UEDA, Norihito, DRYDEN, Nicola H., FLEMING, Stephen B., CAESAR, Carol, ROUFAIL, Sally, ACHEN, Marc G., STACKER, Steven A. et MERCER, Andrew A., 2003. Viral vascular endothelial growth factors vary extensively in amino acid sequence, receptor-binding specificities, and the ability to induce vascular permeability yet are uniformly active mitogens. In : *The Journal of Biological Chemistry*. 26 septembre 2003. Vol. 278, n° 39, p. 38004-38014. DOI 10.1074/jbc.M301194200.

YANG, Zhilong, REYNOLDS, Sara E., MARTENS, Craig A., BRUNO, Daniel P., PORCELLA, Stephen F. et MOSS, Bernard, 2011. Expression profiling of the intermediate and late stages of poxvirus replication. In : *Journal of Virology*. octobre 2011. Vol. 85, n° 19, p. 9899-9908. DOI 10.1128/JVI.05446-11.

ZAITSEVA, Marina, KAPNICK, Senta et GOLDING, Hana, 2012. Measurements of vaccinia virus dissemination using whole body imaging: approaches for predicting of lethality in challenge models and testing of vaccines and antiviral treatments. In : *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*. 2012. Vol. 890, p. 161-176. DOI 10.1007/978-1-61779-876-4_10.

Annexes

Annexe 1. Tableau des informations relatives à chaque animal prélevé

M signifie « Mâle » ; F signifie « Femelle » ; ? signifie « Inconnu »

ID	Espèce	Sexe	Âge	Date	Commune	Zone	Lieu	Sérum	Sang	Urine
F01	Opossum	M	Jeune	05/05/12	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	
F02	Opossum	M	Adulte	06/05/12	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	
F03	Opossum	M	Jeune	06/05/12	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	
F04	Martre à tête grise	M	Adulte	09/09/12	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	
F05	Opossum	M	Jeune	09/05/12	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	
F06	Furet	F	Adulte	10/05/12	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	
F07	Furet	F	Adulte	10/05/12	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	
F08	Opossum	F	Jeune	11/05/12	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	
F09	Opossum	F	Adulte	12/05/12	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	
F10	Opossum	M	Adulte	17/05/12	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	
F11	Opossum	F	Adulte	19/05/12	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	
F12	Coati	F	Jeune	11/06/12	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	
F13	Coati	F	Jeune	12/06/12	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	
F14	Coati	F	Jeune	12/06/12	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	
F15	Opossum	F	Adulte	15/06/12	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	
F16	Furet	F	Adulte	16/06/12	Inconnue	Inconnue	Inconnu	X	X	
F17	Opossum	M	Jeune	17/06/12	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	
F18	Opossum	F	Adulte	29/06/12	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	
F19	Coati	M	Adulte	30/06/12	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	
F20	Coati	F	Subadulte	30/06/12	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	
F21	Opossum	F	Adulte	30/06/12	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	
F22	Opossum	M	Adulte	02/07/12	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	
F23	Opossum	M	Adulte	02/07/12	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	
F24	Renard des savanes	M	Adulte	03/07/12	Inconnue	Rurale	Inconnu	X	X	
F25	Furet	F	Adulte	14/07/12	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	
F26	Opossum	M	Adulte	01/08/12	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	
F27	Furet	M	Adulte	02/08/12	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	
F28	Coati	F	Adulte	05/08/12	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	
F29	Coati	F	Adulte	05/08/12	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	
F30	Opossum	M	Adulte	06/08/12	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	
F31	Opossum	M	Adulte	06/08/12	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	
F32	Opossum	F	Adulte	07/08/12	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	
F33	Opossum	M	Adulte	07/08/12	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	
F34	Fourmilier à collier	F	Adulte	12/08/12	São manoel	Inconnue	Inconnu	X	X	
F35	Opossum	F	Adulte	18/08/12	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	
F36	Loup à crinière	F	Adulte	24/08/12	Botucatu	Rurale	Voie Professeur João Hipolito Martins	X	X	
F37	Opossum	F	Adulte	04/09/12	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	X
F38	Opossum	M	Adulte	03/09/12	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F39	Opossum	F	Adulte	04/09/12	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	X
F40	Opossum	M	Adulte	06/09/12	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	X
F41	Opossum	F	Adulte	06/09/12	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F42	Opossum	M	Adulte	07/09/12	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X		X
F43	Hérisson commun	F	Adulte	08/09/12	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	
F44	Coati	F	Jeune	09/09/12	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	X
F45	Coati	F	Jeune	09/09/12	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	X
F46	Loup à crinière	M	Adulte	14/09/12	Inconnue	Rurale	Inconnu	X		X
F47	Opossum	M	Adulte	15/09/12	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F48	Coati	M	Jeune	15/09/12	Botucatu	Rurale	Jardin Botanique UNESP	X	X	
F49	Coati	M	Jeune	16/09/12	Botucatu	Rurale	Jardin Botanique UNESP	X	X	X
F50	Coati	F	Jeune	17/09/12	Botucatu	Rurale	Jardin Botanique UNESP	X	X	X
F51	Hérisson commun	F	Adulte	18/09/12	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	
F52	Coati	F	Jeune	19/09/12	Botucatu	Rurale	Jardin Botanique	X	X	X

							UNESP			
F53	Coati	M	Jeune	20/09/12	Botucatu	Rurale	Jardin Botanique UNESP	X	X	X
F54	Coati	F	Jeune	24/09/12	Botucatu	Rurale	Jardin Botanique UNESP	X	X	
F55	Coati	M	Jeune	24/09/12	Botucatu	Rurale	Jardin Botanique UNESP	X	X	X
F56	Opossum	M	Adulte	22/10/12	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	
F57	Opossum	M	Adulte	24/10/12	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	
F58	Fourmilier géant	M	Subadulte	25/10/12	Botucatu	Rurale	Ferme Lageado	X	X	
F59	Coati	M	Adulte	31/10/12	Botucatu	Rurale	Ferme Lageado	X	X	X
F60	Opossum	M	Adulte	04/11/12	Botucatu	Rurale	Jardin Botanique UNESP	X	X	
F61	Opossum	F	Adulte	05/11/12	Botucatu	Rurale	Quartier RubiãoJunior	X	X	
F62	Opossum	M	Adulte	05/11/12	Botucatu	Rurale	Jardin Botanique UNESP	X	X	X
F63	Opossum	M	Adulte	06/11/12	Botucatu	Rurale	Ferme Lageado	X	X	
F64	Coati	F	Jeune	07/11/12	Botucatu	Rurale	Ferme Lageado	X	X	X
F65	Coati	F	Jeune	07/11/12	Botucatu	Rurale	Ferme Lageado	X	X	X
F66	Coati	F	Adulte	08/11/12	Botucatu	Rurale	Ferme Lageado	X	X	X
F67	Opossum	M	Adulte	10/11/12	Botucatu	Rurale	Jardin Botanique UNESP	X	X	X
F68	Opossum	M	Adulte	10/11/12	Botucatu	Rurale	Ferme Lageado	X	X	
F69	Opossum	F	Adulte	22/11/12	Botucatu	Rurale	Jardin Botanique UNESP	X	X	X
F70	Opossum	F	Adulte	23/11/12	Botucatu	Rurale	Ferme Lageado	X	X	X
F71	Coati	M	Adulte	23/11/12	Botucatu	Rurale	Ferme Lageado	X	X	X
F72	Coati	M	Adulte	25/11/12	Botucatu	Rurale	Ferme Lageado	X	X	X
F73	Opossum	F	Adulte	25/11/12	Botucatu	Rurale	Jardin Botanique UNESP	X	X	X
F74	Opossum	M	Jeune	25/11/12	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	
F75	Coati	M	Adulte	27/11/12	Botucatu	Rurale	Ferme Lageado	X	X	X
F76	Tatou commun	F	Adulte	08/12/12	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F77	Renard commun	M	Nouveau-né	10/12/12	São manoel	Rurale	Inconnu	X	X	
F78	Coati	F	Adulte	09/01/13	Botucatu	Rurale	Ferme Lageado	X	X	X
F79	Opossum	M	Adulte	09/01/13	Botucatu	Rurale	Ferme Lageado	X	X	X
F80	Coati	M	Subadulte	10/01/13	Botucatu	Rurale	Ferme Lageado	X	X	X
F81	Coati	F	Nouveau-né	10/01/13	Botucatu	Rurale	Ferme Lageado	X	X	
F82	Coati	M	Nouveau-né	10/01/13	Botucatu	Rurale	Ferme Lageado	X	X	
F83	Opossum	F	Adulte	10/01/13	Botucatu	Rurale	Ferme Lageado	X	X	
F84	Opossum	F	Adulte	10/01/13	Botucatu	Rurale	Ferme Lageado	X	X	X
F85	Coati	M	Subadulte	11/01/13	Botucatu	Rurale	Ferme Lageado	X	X	
F86	Opossum	M	Jeune	11/01/13	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	
F87	Opossum	M	Jeune	12/01/13	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	X
F88	Opossum	M	Jeune	18/01/13	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	
F89	Coati	M	Jeune	19/01/13	Botucatu	Rurale	Ferme Lageado	X	X	X
F90	Coati	M	Jeune	19/01/13	Botucatu	Rurale	Ferme Lageado	X	X	X
F91	Opossum	M	Jeune	19/01/13	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	X
F92	Opossum	M	Nouveau-né	19/01/13	Botucatu	Rurale	Ferme Lageado	X		
F93	Hérisson commun	M	Adulte	19/01/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F94	Fourmilier à collier	M	Adulte	21/01/13	Lencois Paulista	Rurale	Inconnu	X	X	X
F95	Opossum	F	Adulte	23/01/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F96	Opossum	M	Adulte	23/01/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	
F97	Coati	M	Adulte	23/01/13	Botucatu	Rurale	Ferme Lageado	X	X	X
F98	Opossum	F	Adulte	23/01/13	Botucatu	Rurale	Ferme Lageado	X	X	X
F99	Opossum	M	Jeune	23/01/13	Botucatu	Rurale	Ferme Lageado	X	X	X
F100	Opossum	M	Jeune	28/01/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	

F101	Opossum	M	Jeune	29/01/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	
F102	Opossum	F	Adulte	31/01/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F103	Opossum	F	Jeune	05/02/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F104	Opossum	M	Jeune	05/02/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F105	Opossum	F	Jeune	05/02/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F106	Opossum	F	Jeune	05/02/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F107	Opossum	F	Jeune	05/02/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F108	Opossum	F	Adulte	07/02/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	
F109	Opossum	F	Adulte	09/02/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F110	Opossum	M	Jeune	09/02/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	
F111	Opossum	F	Jeune	09/02/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	
F112	Opossum	M	Jeune	09/02/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F113	Opossum	M	Jeune	09/02/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F114	Opossum	M	Adulte	13/02/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F115	Opossum	F	Adulte	13/02/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F116	Opossum	M	Adulte	15/02/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F117	Opossum	F	Adulte	15/02/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	
F118	Opossum	F	Jeune	16/02/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F119	Opossum	F	Jeune	16/02/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F120	Opossum	M	Jeune	20/02/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	
F121	Opossum	M	Adulte	20/02/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F122	Opossum	F	Jeune	20/02/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F123	Opossum	M	Jeune	20/02/13	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	
F124	Coati	M	Adulte	21/02/13	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	X
F125	Opossum	F	Adulte	21/02/13	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	X
F126	Renard des savanes	M	Subadulte	23/02/13	Botucatu	Rurale	Ferme Lageado	X	X	X
F127	Martre à tête grise	F	Adulte	23/02/13	Botucatu	Rurale	Ferme Lageado	X	X	?
F128	Coati	M	Adulte	22/02/13	Botucatu	Rurale	Ferme Lageado	X	X	X
F129	Opossum	M	Jeune	23/02/13	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	X
F130	Opossum	F	Jeune	23/02/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	
F131	Opossum	F	Adulte	28/02/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F132	Opossum	F	Jeune	01/03/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F133	Renard commun	F	Adulte	01/03/13	Botucatu	Rurale	Voie Gastão Dal Farra	X	X	X
F134	Opossum	F	Jeune	05/03/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F135	Opossum	M	Jeune	06/03/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	
F136	Opossum	F	Adulte	07/03/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F137	Opossum	M	Adulte	12/03/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F138	Opossum	F	Adulte	12/03/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F139	Opossum	F	Adulte	13/03/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F140	Opossum	M	Adulte	13/03/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F141	Opossum	F	Jeune	15/03/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	
F142	Opossum	M	Jeune	18/03/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F143	Opossum	M	Jeune	18/03/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F144	Opossum	F	Jeune	18/03/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	
F145	Opossum	F	Jeune	18/03/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F146	Opossum	F	Adulte	18/03/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F147	Opossum	F	Adulte	19/03/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F148	Opossum	F	Jeune	20/03/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	
F149	Opossum	F	Jeune	20/03/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	
F150	Opossum	F	Adulte	20/03/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F151	Fourmilier géant	M	Adulte	22/03/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F152	Opossum	M	Jeune	22/03/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F153	Opossum	F	Adulte	23/03/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F154	Opossum	F	Jeune	23/03/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	
F155	Opossum	F	Jeune	27/03/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F156	Opossum	M	Adulte	04/04/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	
F157	Opossum	F	Nouveau-né	04/04/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	
F158	Opossum	M	Jeune	05/04/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	
F159	Coati	F	Subadulte	07/04/13	Botucatu	Rurale	Ferme Lageado	X	X	
F160	Opossum	M	Adulte	07/04/13	Botucatu	Rurale	Ferme Lageado	X	X	X
F161	Opossum	F	Jeune	07/04/13	Botucatu	Rurale	Ferme Lageado	X	X	X

F162	Coati	M	Adulte	08/04/13	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	X
F163	Coati	F	Subadulte	08/04/13	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	
F164	Opossum	F	Jeune	08/04/13	Botucatu	Rurale	Ferme Lageado	X	X	
F165	Opossum	M	Adulte	09/04/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F166	Opossum	M	Jeune	09/04/13	Botucatu	Rurale	Ferme Lageado	X	X	X
F167	Coati	M	Jeune	10/04/14	Botucatu	Rurale	Ferme Lageado	X	X	
F168	Coati	F	Jeune	10/04/14	Botucatu	Rurale	Ferme Lageado	X	X	
F169	Coati	F	Jeune	10/04/14	Botucatu	Rurale	Ferme Lageado	X	X	
F170	Opossum	M	Jeune	10/04/14	Botucatu	Rurale	Ferme Lageado	X	X	
F171	Coati	M	Jeune	11/04/13	Botucatu	Rurale	Ferme Lageado	X	X	
F172	Coati	F	Jeune	11/04/13	Botucatu	Rurale	Ferme Lageado	X	X	
F173	Opossum	M	Adulte	13/04/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F174	Opossum	F	Adulte	13/04/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	
F175	Opossum	M	Adulte	16/04/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	
F176	Opossum	F	Adulte	18/04/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F177	Opossum	F	Jeune	18/04/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	
F178	Opossum	M	Nouveauté	22/04/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F179	Opossum	F	Adulte	23/04/13	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	
F180	Opossum	F	Adulte	23/04/13	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	X
F181	Opossum	F	Adulte	23/04/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F182	Opossum	F	Adulte	23/04/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F183	Sapajus	M	Adulte	24/04/13	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	X
F184	Opossum	M	Adulte	24/04/13	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	X
F185	Opossum	F	Nouveauté	24/04/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F186	Opossum	M	Adulte	25/04/13	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	
F187	Opossum	M	Nouveauté	25/04/13	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X		
F188	Opossum	M	Adulte	25/04/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F189	Opossum	M	Jeune	27/04/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F190	Opossum	M	Adulte	27/04/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F191	Opossum	F	Adulte	30/04/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	
F192	Opossum	F	Adulte	30/04/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X		X
F193	Hérisson commun	M	Adulte	03/05/13	Botucatu	Rurale	Quartier Vista Alegre	X	X	X
F194	Opossum	F	Jeune	04/05/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F195	Opossum	F	Adulte	04/05/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F196	Opossum	M	Adulte	07/05/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F197	Opossum	M	Adulte	14/05/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	
F198	Opossum	F	Adulte	14/05/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F199	Opossum	F	Jeune	14/05/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F200	Opossum	F	Jeune	18/05/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F201	Opossum	F	Adulte	21/05/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	
F202	Opossum	M	Adulte	23/05/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F203	Hérisson commun	F	Adulte	25/05/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F204	Daguet gris	M	Adulte	27/05/13	Lencois Paulista	Rurale	Inconnu	X	X	X
F205	Opossum	F	Adulte	05/06/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F206	Opossum	M	Adulte	05/06/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	
F207	Opossum	M	Adulte	05/06/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F208	Opossum	M	Adulte	05/06/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F209	Opossum	F	Adulte	18/06/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F210	Opossum	F	Adulte	18/06/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F211	Opossum	M	Adulte	18/06/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F212	Opossum	M	Adulte	18/06/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F213	Hérisson commun	F	Adulte	25/06/13	Botucatu	Rurale	Voie Marechal Rondon	X	X	X
F214	Opossum	M	Jeune	25/06/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	
F215	Fourmilier géant	F	Adulte	28/06/13	Conchas	Rurale	Inconnu	X	X	X
F216	Agoutis	M	Adulte	03/07/13	Conchas	Rurale	Inconnu	X	X	
F217	Opossum	M	Adulte	10/07/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F218	Opossum	M	Adulte	18/07/13	Botucatu	Inconnue	Inconnu	X	X	
F219	Raton laveur	M	Subadulte	30/07/13	Votorantim	Rurale	Inconnu	X	X	

F220	Loup à crinière	M	Adulte	31/08/13	Itarare	Rurale	Inconnu	X	X	
F221	Opossum	F	Adulte	31/08/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	
F222	Hérisson commun	F	Adulte	31/08/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	
F223	Opossum	M	Adulte	02/08/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	
F224	Daguet gris	M	Adulte	07/08/13	Agudos	Rurale	Inconnu	X	X	X
F225	Lièvre européen	F	Adulte	07/08/13	Botucatu	Rurale	Inconnu	X	X	X
F226	Opossum	M	Adulte	07/08/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F227	Opossum	F	Adulte	07/08/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	
F228	Opossum	M	Adulte	07/08/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F229	Furet	F	Adulte	14/08/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F230	Opossum	F	Adulte	19/08/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F231	Fourmilier à collier	F	Jeune	20/08/13	Botucatu	Rurale	Voie Professeur João Hipolito Martins	X	X	X
F232	Opossum	F	Adulte	23/08/13	Botucatu	Rurale	Ferre Edgardia	X	X	
F233	Opossum	M	Adulte	26/08/13	Bauru	Inconnue	Inconnu	X	X	X
F234	Opossum	M	Adulte	28/08/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	
F235	Opossum	F	Adulte	28/08/13	Botucatu	Rurale	Quartier Recanto da Amizade	X	X	X
F236	Opossum	F	Adulte	05/09/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F237	Opossum	F	Adulte	05/09/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F238	Opossum	F	Adulte	05/09/13	Botucatu	Rurale	Quartier Recanto da Amizade	X	X	X
F239	Fourmilier à collier	F	Adulte	09/09/13	Piratinga	Rurale	Inconnu	X	X	
F240	Opossum	F	Adulte	14/09/13	Botucatu	Rurale	Jardin Botanique UNESP	X	X	X
F241	Opossum	M	Adulte	14/09/13	Botucatu	Rurale	Jardin Botanique UNESP	X	X	X
F242	Coati	F	Adulte	14/09/13	Botucatu	Rurale	Jardin Botanique UNESP	X	X	
F243	Coati	F	Jeune	14/09/13	Botucatu	Rurale	Jardin Botanique UNESP	X	X	X
F244	Coati	F	Adulte	14/09/13	Botucatu	Rurale	Jardin Botanique UNESP	X	X	X
F245	Coati	M	Jeune	14/09/13	Botucatu	Rurale	Jardin Botanique UNESP	X	X	X
F246	Coati	F	Subadulte	14/09/13	Botucatu	Rurale	Jardin Botanique UNESP	X	X	X
F247	Coati	M	Subadulte	14/09/13	Botucatu	Rurale	Jardin Botanique UNESP	X	X	X
F248	Opossum	M	Adulte	16/09/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F249	Opossum	F	Adulte	16/09/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	
F250	Daguet gris	F	Adulte	19/09/13	São Manoel	Rurale	Inconnu	X	X	X
F251	Coati	F	Adulte	21/09/13	Botucatu	Rurale	Jardin Botanique UNESP	X	X	X
F252	Coati	F	Adulte	21/09/13	Botucatu	Rurale	Jardin Botanique UNESP	X	X	X
F253	Coati	M	Jeune	21/09/13	Botucatu	Rurale	Jardin Botanique UNESP	X	X	X
F254	Coati	M	Adulte	21/09/13	Botucatu	Rurale	Jardin Botanique UNESP	X	X	
F255	Coati	M	Adulte	21/09/13	Botucatu	Rurale	Jardin Botanique UNESP	X	X	X
F256	Tatou commun	F	Adulte	21/09/13	Botucatu	Rurale	Jardin Botanique UNESP	X	X	
F257	Opossum	M	Adulte	21/09/13	Botucatu	Inconnue	Inconnu	X	X	X
F258	Daguet gris	M	Adulte	23/09/13	Getulina	Rurale	Inconnu	X	X	X
F259	Tatou commun	M	Adulte	24/09/13	Bauru	Rurale	Inconnu	X	X	X
F260	Alouate	M	Adulte	24/09/13	Botucatu	Rurale	Voie Professeur João Hipolito Martins	X	X	
F261	Renard des savanes	F	Nouveau-né	24/09/13	São Manoel	Rurale	Inconnu	X	X	X
F262	Opossum	F	Adulte	25/09/13	Conchas	Inconnue	Inconnu	X	X	
F263	Opossum	M	Jeune	01/10/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X

F264	Opossum	F	Adulte	01/10/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F265	Opossum	F	Jeune	17/10/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	
F266	Opossum	F	Adulte	17/10/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	
F267	Renard des savanes	M	Adulte	19/10/13	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	X
F268	Opossum	F	Adulte	19/10/13	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	X
F269	Opossum	F	Adulte	19/10/13	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	
F270	Opossum	F	Jeune	19/10/13	Lencois Paulista	Inconnue	Inconnu	X	X	X
F271	Opossum	M	Adulte	19/10/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F272	Opossum	M	Jeune	21/10/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	
F273	Hérisson commun	M	Adulte	21/10/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F274	Opossum	M	Adulte	24/10/13	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	X
F275	Opossum	M	Adulte	24/10/13	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	
F276	Opossum	M	Jeune	24/10/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	
F277	Opossum	M	Adulte	24/10/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	
F278	Hérisson commun	F	Adulte	24/10/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F279	Sapajus	M	Adulte	25/10/13	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	X
F280	Opossum	F	Adulte	25/10/13	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	X
F281	Hérisson commun	F	Adulte	25/10/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F282	Puma	F	Subadulte	29/10/13	Lucilandia	Rurale	Inconnu	X	X	
F283	Opossum	F	Adulte	29/10/13	Bauru	Inconnue	Inconnu	X	X	X
F284	Opossum	F	Jeune	31/10/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	
F285	Opossum	F	Jeune	31/10/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	
F286	Opossum	F	Adulte	31/10/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F287	Daguet gris	F	Adulte	01/11/13	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	X
F288	Opossum	M	Jeune	01/11/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	
F289	Opossum	F	Adulte	06/11/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F290	Opossum	F	Jeune	06/11/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F291	Opossum	M	Adulte	06/11/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F292	Opossum	F	Jeune	06/11/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	
F293	Opossum	M	Jeune	06/11/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F294	Opossum	M	Nouveauté	06/11/13	Bauru	Inconnue	Inconnu	X	X	
F295	Opossum	F	Adulte	06/11/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F296	Opossum	M	Jeune	06/11/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F297	Opossum	F	Adulte	06/11/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F298	Opossum	F	Nouveauté	06/11/13	Bauru	Inconnue	Inconnu	X	X	
F299	Opossum	M	Adulte	20/11/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F300	Opossum	F	Jeune	20/11/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	
F301	Tatou commun	F	Adulte	20/11/13	São manoel	Rurale	Inconnu	X	X	
F302	Opossum	F	Adulte	20/11/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F303	Hérisson commun	F	Subadulte	21/11/13	Botucatu	Rurale	Inconnu	X	X	X
F304	Opossum	F	Adulte	22/11/13	Botucatu	Rurale	Inconnu	X	X	X
F305	Opossum	M	Jeune	22/11/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F306	Opossum	F	Adulte	22/11/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F307	Hérisson commun	F	Adulte	03/12/13	Botucatu	Rurale	Voie Antonio Butignoli	X	X	X
F308	Puma	M	Subadulte	03/12/13	Bauru	Rurale	Inconnu	X	X	X
F309	Hérisson commun	F	Adulte	10/12/13	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	
F310	Renard commun	M	Adulte	10/12/13	Guariba	Rurale	Inconnu	X	X	X
F311	Opossum	M	Jeune	16/01/14	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	
F312	Coati	F	Adulte	17/01/14	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	X
F313	Coati	M	Nouveauté	17/01/14	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	
F314	Coati	?	Nouveauté	17/01/14	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	
F315	Coati	F	Adulte	17/01/14	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	X
F316	Coati	F	Adulte	17/01/14	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	X
F317	Coati	M	Nouveauté	17/01/14	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	
F318	Fourmilier géant	M	Adulte	17/01/14	Itai	Rurale	Inconnu	X	X	X
F319	Fourmilier géant	M	Subadulte	17/01/14	Itai	Rurale	Inconnu	X	X	X

F320	Coati	F	Nouveauné	18/01/14	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	
F321	Coati	M	Nouveauné	18/01/14	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	
F322	Coati	M	Nouveauné	18/01/14	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	
F323	Coati	F	Nouveauné	18/01/14	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	X
F324	Coati	M	Adulte	18/01/14	Botucatu	Rurale	Ferme Edgardia	X	X	
F325	Furet	M	Adulte	24/01/14	Botucatu	Rurale	Voie Castelo Branco	X	X	
F326	Hérisson commun	F	Subadulte	24/01/14	Bauru	Rurale	Inconnu	X	X	X
F327	Fourmilier à collier	M	Adulte	04/02/14	Areiopolis	Rurale	Inconnu	X	X	X
F328	Lièvre européen	M	Adulte	10/02/14	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F329	Renard commun	F	Adulte	11/02/14	Botucatu	Urbaine	Inconnu	X	X	X
F330	Fourmilier géant	M	Adulte	21/02/14	Coronel Macedo	Rurale	Inconnu	X	X	X
F331	Lièvre européen	F	Nouveauné	01/04/14	Ibitinga	Rurale	Inconnu	X	X	
F332	Puma	M	Adulte	03/04/14	Agudos	Rurale	Inconnu	X	X	
F333	Fourmilier à collier	?	Adulte	10/04/14	Marilia	Rurale	Inconnu	X	X	
F334	Renard des savanes	?	Adulte	10/04/14	Marilia	Rurale	Inconnu	X	X	

Annexe 2. Principe de la Séroneutralisation par Réduction des Plages de Lyse (PRNT)

La Séroneutralisation par Réduction des Plages de Lyse ou Plaque Reduction Neutralisation Test (PRNT) est un test de diagnostic indirect de la présence d'un virus. Il permet en effet de mettre en évidence la présence d'anticorps neutralisants associés à ce virus dans un sérum donné. Ces anticorps, développés par l'organisme lors du contact avec le virus, témoignent de la présence actuelle ou passée du virus dans l'individu testé.

Le test de Séroneutralisation par Réduction des Plages de Lyse ou Plaque Reduction Neutralisation Test (PRNT) nécessite le matériel suivant :

- L'échantillon de sérum à tester ;
- Le virus dont on recherche les anticorps associés ;
- Un témoin négatif sans anticorps et un témoin positif sans virus ;
- Un tapis cellulaire sain et sensible à l'infection virale permettant la visualisation de l'effet cytopathogène du virus.

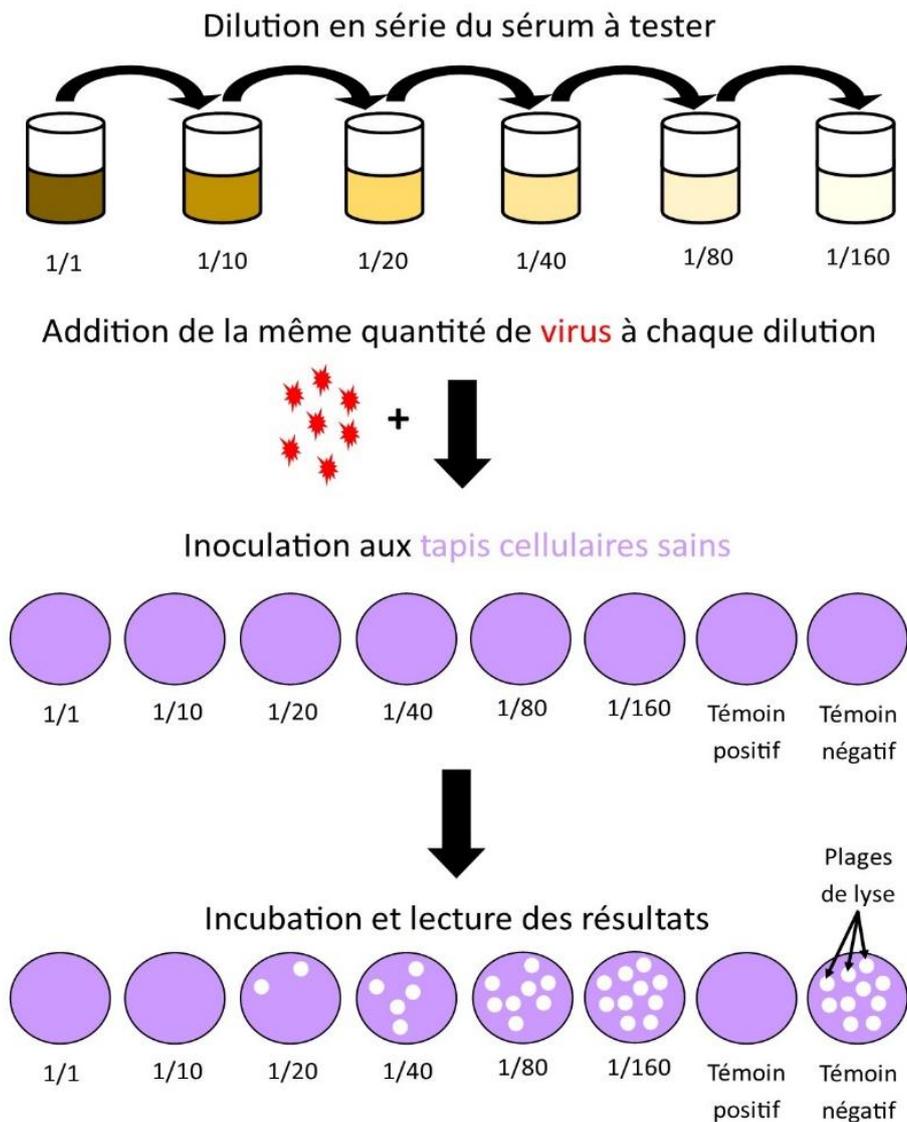
Le sérum à tester est dilué en série, d'un facteur 10 à chaque fois, à l'aide d'une plaque à 96 puits. La quantité d'anticorps est donc décroissante d'un puits à l'autre. Dans chaque puits est ajouté la même quantité de virus. Le tout est laissé à incuber en moyenne 60 minutes à 37°C puis 60 minutes à 4°C afin de permettre aux anticorps de neutraliser une partie ou la totalité du virus. Le contenu de chaque puits est ensuite inoculé à un tapis cellulaire et mis à l'étuve quelques jours à 37°C sous CO₂. Les virus qui n'auront pas été neutralisés par les anticorps vont ainsi infecter le tapis et provoquer la lyse des cellules, visualisable sous forme de plages de lyse (ou plaque virale).

Le témoin positif est constitué par un tapis cellulaire non inoculé par du virus, et où les cellules restent intègres. Un tapis cellulaire inoculé par une solution ne contenant aucun anticorps sert de témoin négatif, le virus n'y est donc pas neutralisé et l'effet cytopathogène est maximal. La lecture se fait lorsque l'effet cytopathogène du témoin négatif est total (entre trois et quatre jours).

Le nombre de plaques de lyse obtenu pour chaque dilution est comparé à celui du témoin négatif. Le titre en anticorps du sérum est déterminé par l'inverse de la plus grande dilution permettant de protéger 50% du tapis cellulaire, soit dont le nombre de plaques de lyse est égal à la moitié de celui du témoin négatif ([Figure 19](#)).

Cette technique peut être simplifiée lorsque l'objectif n'est pas de connaître le titre en anticorps d'un échantillon mais seulement d'en déterminer l'état sérologique. Au plus une dilution du sérum est alors faite, ensuite mélangée à une quantité connue de virus puis inoculée au tapis cellulaire. Si le mélange sérum-virus provoque la lyse d'au moins 50% des cellules alors l'échantillon est séropositif.

La PRNT, très sensible et très spécifique, est une référence dans la détection d'anticorps neutralisants de virus à effet cytopathogène. Elle permet notamment de démontrer des réactions croisées de différents isolats viraux ou encore de mettre en évidence des anticorps vaccinaux. Il s'agit cependant d'une méthode très chronophage, nécessitant la culture de cellules *in vitro*, pouvant prendre jusqu'à quatre jours. De plus, ce type de test n'est utilisable que pour des virus à effet cytopathogène, limitant donc son application.



Le titre en anticorps du sérum testé est de **40** (inverse de la plus grande dilution protégeant 50% du tapis cellulaire)

[Figure 19. Résumé des étapes du test PRNT.](#) Crédit illustration : C. Peltier

Protocole expérimental réalisé dans ce travail : d'après Geessien Kroon et al., 2016.

La culture cellulaire utilisée par l'UFMG était constituée de cellules BSC-40 (cellules d'épithélium rénale de primate) trypsinisées grâce à une solution de trypsine/EDTA et mises en culture dans un milieu minimum essentiel (MEM) contenant 5% de sérum fœtal bovin. Les cellules étaient réparties sur des plaques de culture cellulaire à 6 puits, ensuite laissées à incuber à 37°C et 5% de CO₂, jusqu'à ce que le tapis cellulaire recouvre toute la surface des puits (au moins 24 heures).

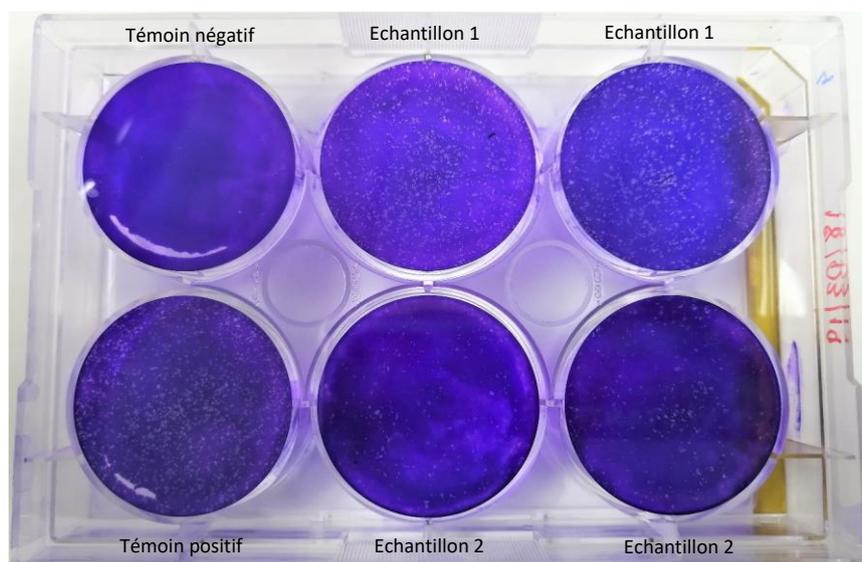
Les sérums testés nécessitaient également une préparation. Environ 20µL de chaque échantillon de sérum ont été portés à une température de 56°C pendant 30 minutes, afin d'inactiver le système du complément pouvant interférer au cours de la réaction. Ce sérum était ensuite dilué au vingtième par addition de 427,5µL d'une

solution MEM sans sérum foetal bovin. Le volume total d'échantillon devenait alors de 450µL. Dans ce protocole, une seule dilution du sérum était réalisée, le but étant seulement de déterminer l'état sérologique de l'échantillon et non le titre en anticorps.

La souche virale VACV Western Virus utilisée pour ce test a été cultivée au laboratoire de l'UFMG. Son titre viral et son nombre total de Plaque Forming Units (PFU)/mL de cellules BSC-40 étaient ainsi connus. Cette souche a été diluée dans une solution de MEM sans sérum foetal bovin jusqu'à obtenir entre 100 et 200 PFU/mL de cellules, facilitant le comptage lors de la lecture des résultats. Le volume final de virus dilué était de 450µL. La totalité du virus dilué était alors ajouté au sérum dilué, donnant un volume total de 900µL. Ce mélange était ensuite mis à l'étuve pendant 16 heures à 37°C et 5% de CO₂.

Pour chaque plaque, quatre puits étaient consacrés au test des échantillons (deux puits par échantillon) ([Image 11](#)). Chacun de ces puits était donc inoculé par 400µL de mélange sérum-virus précédemment préparé. Un des puits était réservé au témoin positif, sans virus, contenant seulement 400µL de MEM avec 2% de sérum foetal bovin. Le dernier puits était destiné au témoin négatif, constitué de 400µL d'un mélange virus-sérum foetal bovin ne contenant aucun anticorps, montrant un effet cytopathique maximum. Les plaques de culture cellulaire étaient ensuite incubées pendant deux jours à 37°C et 5% de CO₂.

La lecture des résultats était permise par l'addition de cristal violet n'adhérant qu'aux cellules vivantes et révélant ainsi les plages de lyse où les cellules avaient été détruites par le virus. Ces plages été ensuite comptées manuellement pour chaque puits.



[Image 11.](#) [Exemple de révélation des résultats obtenus en PRNT sur une plaque de culture cellulaire à six puits.](#) Cette plaque ne provient pas de la PRNT menée sur les échantillons de ce travail, le principe de lecture est cependant le même. L'absence de contamination de la plaque cellulaire était vérifiée par un témoin négatif dénué de plaque virale. Les plaques virales sont représentées par les lacunes circulaires visibles sur le tapis cellulaire après coloration au cristal violet.

Annexe 3. Protocoles des kits d'extraction d'ADN

Etape 1 : Lyse cellulaire

Sang	Urine
<ul style="list-style-type: none">- Prélèvement de 200µL de sang total dans un tube de 1,5mL- Ajouter 20µL de Protéinase K- Ajouter 400µL du Tampon de Lyse Type 10	<ul style="list-style-type: none">- Prélèvement de 200µL d'urine dans un tube de 2mL- Ajouter 50µL du Tampon de Lyse Type 1- Ajouter 10µL de Protéinase K
Incuber 10 minutes à température ambiante	Incuber 10 minutes à 56°C

Etape 1 bis : Purification (pour l'urine seulement)

Ajouter 500µL du Tampon de Lyse Type 4 et laisser incuber 10 minutes à température ambiante.

Etape 2 : Fixation de l'ADN à la membrane de silice (identique pour le sang et l'urine)

Monter les colonnes avec filtre à membrane de silice sur des tubes de collecte. Transférer la totalité des lysats dans les colonnes. Centrifuger 1 minute à 11 000 x g. Vider les tubes de collecte et y replacer les colonnes.

Etape 3 : Lavage

Sang	Urine
<ul style="list-style-type: none">- Dans la colonne ajouter 500µL du Tampon de Lyse Type 10	<ul style="list-style-type: none">- Dans la colonne ajouter 500µL du Tampon de Lyse Type 4

Centrifuger pour 1 minute à 11 000 x g. Vider les tubes de collecte et y replacer les colonnes.

Etape 4 : Lavage et séchage (identique pour le sang et l'urine)

Dans la colonne ajouter 500µL de Tampon de Lavage Type 6. Centrifuger pour 3 minutes à 11 000 x g. Vider les tubes de collecte et y replacer les colonnes.

Etape 5 : Elution

Transférer les colonnes dans des microtubes libres d'ADNase.

Sang	Urine
<ul style="list-style-type: none">- Dans la colonne ajouter 100µL du Tampon d'Elution Type 5	<ul style="list-style-type: none">- Dans la colonne ajouter 50µL du Tampon d'Elution Type 5

Laisser à incuber pendant 1 minute à température ambiante. Centrifuger pour 1 minute à 11 000 x g. Jeter les colonnes et conserver les microtubes contenant l'ADN purifié. Conserver le matériel obtenu à -20°C.

Annexe 4. Principe de la Réaction en Chaîne par Polymérase (PCR)

La Réaction en Chaîne par Polymérase ou Polymerase Chain Reaction (PCR) est une technique mise au point en 1986 permettant l'amplification spécifique *in vitro* d'un segment particulier d'ADN. Cette technique se base sur la répétition de cycles de réplication de l'ADN.

La Réaction en Chaîne par Polymérase ou Polymerase Chain Reaction (PCR) nécessite le matériel suivant :

- L'échantillon à analyser contenant un ensemble de séquence ou un génome complet appelé ADN matrice
- Une ADN polymérase thermo résistante
- Des désoxyribonucléotides (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)
- Deux amorces limitant le segment à amplifier, une « forward » et une « reverse »
- Une solution tampon de MgCl₂.

Tous ces éléments sont joints dans des proportions adaptées selon les protocoles utilisés et constituent le mélange réactionnel. Ce mélange, d'en moyenne 25µL, est introduit dans un thermocycleur réalisant une succession de cycles constitués des mêmes étapes :

1. Dénaturation de l'ADN matrice et séparation des deux brins à 94°C. Cette étape permet d'ouvrir l'ADN pour accéder à la séquence recherchée ;
2. Hybridation des amorces à une température T inférieure à la température de fusion des nucléotides. Les amorces se fixent à chaque extrémité de la séquence et servent de marqueur d'initiation de la réplication pour l'ADN polymérase ;
3. Activation de l'ADN polymérase et élongation à 72°C. L'enzyme va construire un brin d'ADN néoformé à partir du double brin d'ADN ouvert à l'étape 1.

Dès le troisième cycle, est obtenu un ADN néoformé, ou amplicon, entièrement constitué de la séquence recherchée comme indiqué sur la [Figure 20](#) ci-après.

Après environ 30 cycles on a obtenu 60 amplicons à longs brins d'ADN et plus d'un milliard d'amplicons à brins courts contenant la séquence recherchée ([Figure 20](#)). Les produits obtenus peuvent être déposés sur gel d'électrophorèse pour séparation et visualisation.

La technique de PCR est très sensible et une technique de choix dans la détection d'ADN. Elle nécessite cependant un matériel de bonne qualité, en particulier lorsque la séquence rechercher est longue. L'ADN polymérase est un élément clé de cette réaction, et doit être choisie selon les exigences de travail recherchées. Par sa forte capacité à détecter du matériel génétique, la PCR peut donner des résultats faux positifs en amplifiant des fragments d'ADN non recherchés mais présents dans l'échantillon. Cela peut également se produire s'il y a contamination du matériel, toutes les précautions doivent donc être prises.

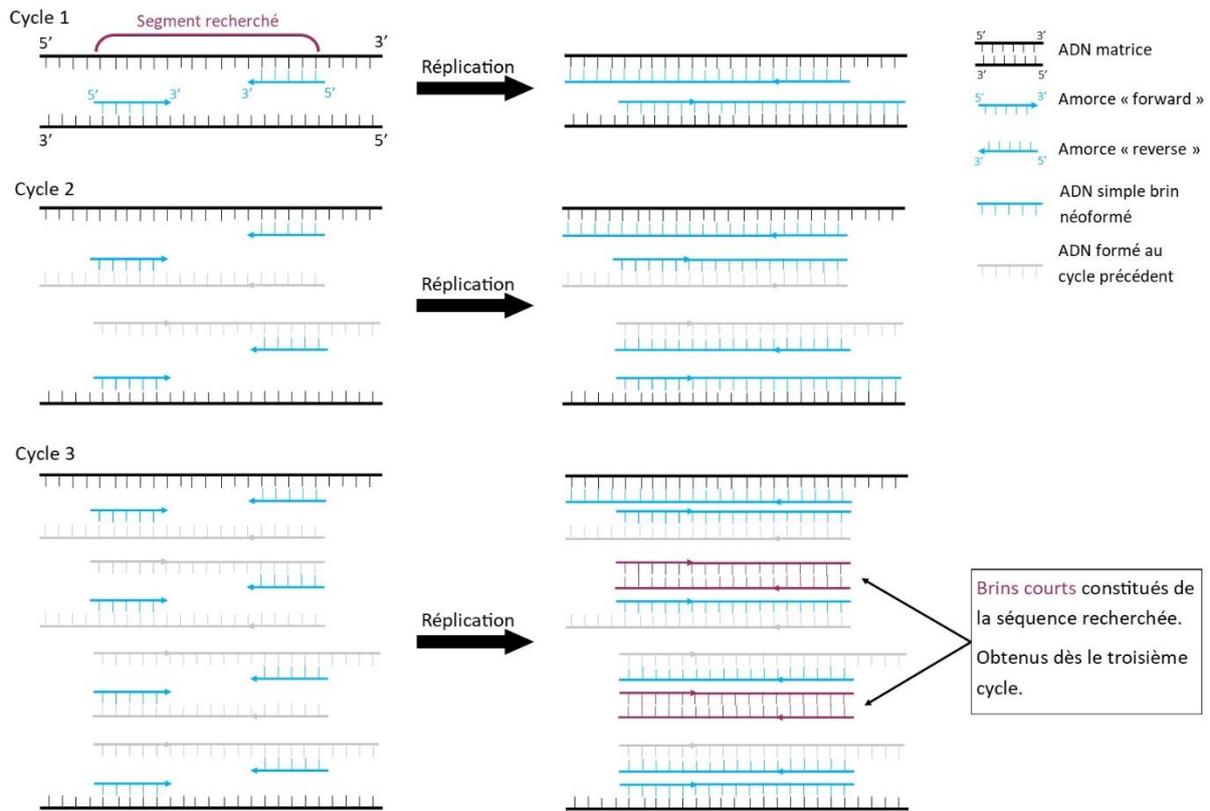


Figure 20. Principe d'obtention de brins courts par la succession des cycles de réplication. Crédit illustration : C. Peltier

La technique de PCR nichée consiste en la succession de deux réactions de PCR classiques (Figure 21). La seconde permet d'amplifier un segment d'ADN contenu dans la séquence visée par la première réaction, d'où le terme « nichée ». Cela assure alors l'amplification du segment recherché et permet la détection de très faibles quantités d'ADN (puisque doublement amplifié). Cette méthode représente un gain de spécificité et de sensibilité important. Elle est cependant très sujette à contamination et peut engendrer des résultats faux positifs lorsqu'aucune précaution n'est prise.

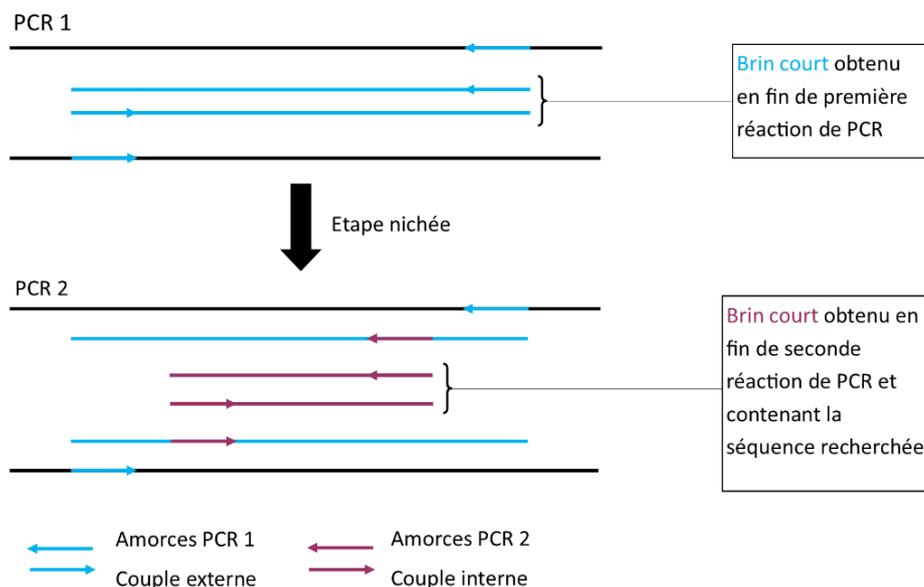


Figure 21. Principe de la PCR nichée. Crédit illustration : C. Peltier

Protocole expérimental réalisé dans ce travail : d'après (Jônatas S Abrahão et al., 2009)

Le mélange réactionnel préparé pour chaque réaction de PCR (Tableau 12) était constitué d'eau ultrapure, des amorces, du matériel à analyser et d'une solution commerciale « PCR Master Mix » de Promega. Un millilitre de cette solution contient 50 unités de Taq polymérase dans un tampon réactionnel de pH=8,5, 400µM de chaque désoxyribonucléotide et 3mM de MgCl₂. Ce mélange réactionnel a été validé par nos expériences préliminaires.

Mélange réactionnel PCR 1 Pour un échantillon Volume total : 25µL	Mélange réactionnel PCR 2 Pour un échantillon Volume total : 25µL
<ul style="list-style-type: none">- 12,5µL de PCR Master Mix- 8µL d'eau ultrapure- 1µL de vgf F (dilué à 20pmol/µL)- 1µL de vgf R (dilué à 20pmol/µL)- 2,5µL d'ADN matrice	<ul style="list-style-type: none">- 12,5µL de PCR Master Mix- 8µL d'eau ultrapure- 1µL de vgf F2 (dilué à 20pmol/µL)- 1µL de vgf R2 (dilué à 20pmol/µL)- 2,5µL du produit de la PCR1

Tableau 12. Composition des mélanges réactionnels à base de « PCR Master Mix », selon les indications du fabricant.

Ce protocole a été réalisé dans un thermocycleur « LifePro » de BIOER. Pour chaque réaction de PCR les étapes ont été les suivantes : 9 minutes d'incubation à 95°C suivi d'une répétition de 30 cycles identiques : dénaturation de l'ADN à 94°C pendant une minute ; hybridation des amorces à 45°C pendant une minute ; activation de la Taq polymérase à 72°C pendant une minute. La réaction se terminait par une extension finale à 72°C pendant 10 minutes.

2,5µL d'eau ultrapure ont été utilisés comme témoin négatif de la PCR. Ils ne contenaient aucun matériel génétique et témoignaient de la non-contamination de la réaction. Le témoin positif de la PCR était constitué d'ADN viral extrait de poumon d'une souris inoculée expérimentalement avec la souche Western Reserve par l'équipe de Peres M. *et al* (données non publiées).

Annexe 5. Electrophorèse

Le gel d'électrophorèse utilisé dans ce travail était constitué d'agarose « AGR-LE-100 » de Uniscience, du tampon TBE (Tris, Borate, EDTA) et d'un agent intercalant « Nancy-520 DNA Gel Stain » de Sigma. Des gels de 7 ou 20 puits étaient fabriqués selon la quantité d'échantillons analysés.

Chaque produit de PCR nichée était mélangé à un « loading 5% », solution teintée sucrée permettant de faire tomber les molécules d'ADN au fond du puits et de les faire pénétrer dans le gel. L'échelle de migration était indiquée par un produit « ladder 100 » constitué de plusieurs fragments d'ADN de tailles connues (100pb, 200pb, 300pb, *etc.*). Le gel baignait dans une solution de TBE, possédant une bonne capacité de séparation des fragments d'ADN. Une tension comprise entre 80 et 120V et un courant de 150mA étaient appliqués pour une durée de 25 à 60 minutes.

Deux lignes de puits pouvaient être constituées par gel. Sur un grand gel, les puits de chaque extrémité de ligne étaient dédiés à l'échelle, un témoin positif était utilisé par ligne et un témoin négatif était inséré tous les trois échantillons. Sur un petit gel, seul un puits était réservé à l'échelle, le reste était identique.

Annexe 6. Séquence des fragments amplifiés lors des différentes réactions de PCR. D'après le logiciel in silico

Réaction de PCR1 de PCR nichée :

Séquence des amorces :

vgfF : CGCAGGATCC**ATAATCAGATCATT**
vgfR : **ATAAAAATTATGGCACAACCATATC**

| En orange la partie
| se fixant à l'ADN

Séquence des amplicons obtenus : En gras et en orange les séquences complémentaires des amorces. En gris la séquence visée lors de la seconde réaction de PCR. Taille : 391 pb.

ATAATCAGATCATTCGCCGATAGTGGTAACGCTATCGAAACGACATCGCCAGAAATTAC
AAACGCTACAACAGATATTCCAGCTATCAGATTATGCGGTCCAGAGGGAGATGGATATT
GTTT**ACACGGTGACTGTATCCACGCTAGAGATATTGACGGTATGTATTGTAGATGCTCT**
CATGGTTATACAGGCATTAGATGTCAGCATGTAGTATTAGTAGACTATCAACGTTCCAGAA
AACCCAAACACTACAACGTCATATATCCCATCTCCCG**GTATTATGCTTGATTAGTAGGC**
ATTATTATTATTACGTGTTGTCTATTATCTGTTTATAGGTTCACTCGACGAACATAACTAC
CTATACAA**GATATGGTTGTGCCATAATTTTTAT**

Réaction de PCR2 de PCR nichée :

Séquence des amorces :

vgfF2 : ACACGGTGACTGTATCCA
vgfR2 : CTAATACAAGCATAATAC

Séquence des amplicons obtenus : En gras les séquences complémentaires des amorces. Taille : 170pb

ACACGGTGACTGTATCCACGCTAGAGATATTGACGGTATGTATTGTAGATGCTCTCATG
GTTATACAGGCATTAGATGTCAGCATGTAGTATTAGTAGACTATCAACGTTCCAGAAAACC
CAAACACTACAACGTCATATATCCCATCTCCCG**GTATTATGCTTGATTAG**

Réaction de PCR quantitative du gène C11R :

Séquence des amorces :

vgfF : CGCTACAACAGATATTCCAGCTATCAG
vgfR : AGCGTGGATACAGTCACCGTGTA

Séquence des amplicons obtenus : En gras les séquences complémentaires des amorces. Tm= °C.

CGCTACAACAGATATTCCAGCTATCAGATTATGCGGTCCAGAGGGAGATGGATATTGTT
TACACGGTGACTGTATCCACGCT

Réaction de PCR quantitative du gène A56R :

Séquence des amorces :

haF : CGCTACAACAGATATTCCAGCTATCAG
haR : AGCGTGGATACAGTCACCGTGTA

Séquence des amplicons obtenus : En gras les séquences complémentaires des amorces. Groupe 1 : Tm= 75,8°C ; Groupe 2 : Tm= 76,3°C.

CATCATCTGGAATTGTCACTACTAAATCAACCACCGATGATGCGGATCTTTATGATACG
TACAATGATAATGATACAGTACCACCACTACTGTAGGCGGTAGTACAACCTCTATTAGC
AATTATAAAACCAAGGACTTTGTAGAAATATTTGGTATTACCG**CATTAATTATATTGTCGG**
CCGT

Annexe 7. Principe de la PCR quantitative ou PCR en temps réel avec la technique SYBR Green®

La PCR en temps réel avec la technique de SYBR Green® requiert les éléments suivants :

- L'échantillon à analyser contenant un ensemble de séquence ou un génome complet appelé ADN matrice
- Une ADN polymérase thermo résistante
- Des désoxyribonucléotides (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)
- Deux amorces limitant le segment à amplifier, une « forward » et une « reverse »
- Un agent intercalant ou fluorophore SYBR Green®

L'échantillon à analyser subit les cycles classiques de PCR avec une phase de dénaturation de l'ADN matrice, une phase d'hybridation avec les amorces et une phase d'élongation par activation de l'ADN polymérase.

Au cours de la dénaturation de l'ADN, le fluorophore SYBR Green® se détache et se retrouve sous sa forme libre. Aucune fluorescence n'est alors émise. A partir de la phase d'hybridation, l'agent intercalant se fixe à l'ADN double brin néoformé et émet une fluorescence (Figure 22), augmentant encore au cours de l'élongation. La fluorescence est mesurée à chaque fin de cycle. Plus la réaction de PCR quantitative avance dans le temps, plus le fragment recherché est amplifié et plus la fluorescence est forte.

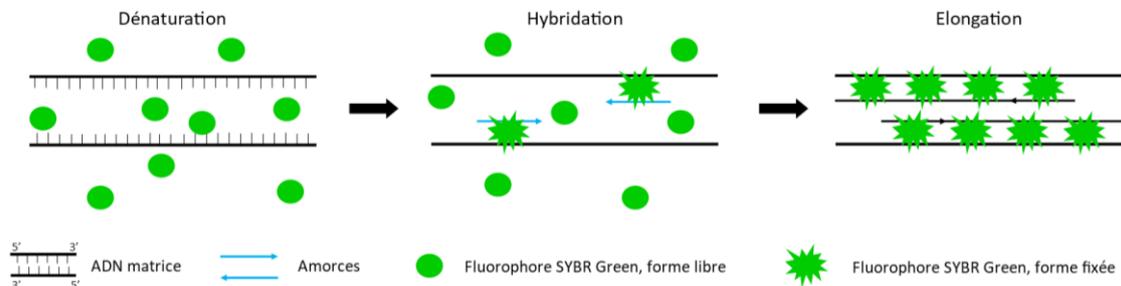
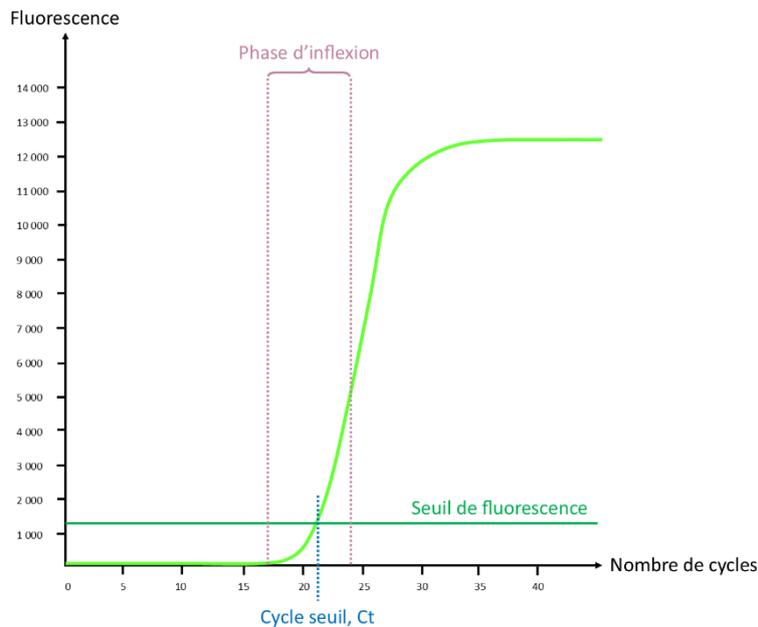


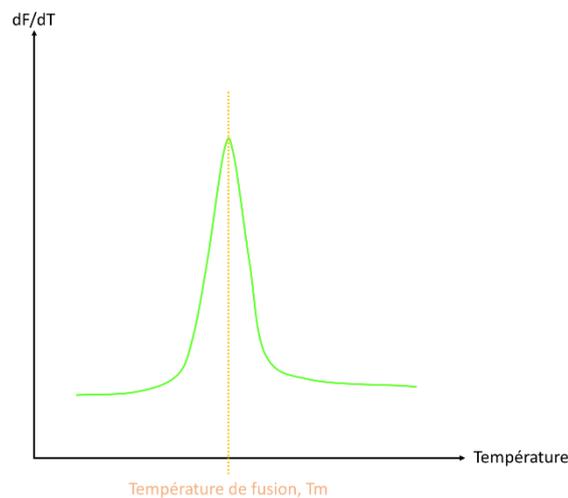
Figure 22. Fluorescence de l'agent intercalant SYBR Green au cours d'un cycle de réaction de PCR. Crédit illustration : C. Peltier

L'évolution de la fluorescence est retranscrite sur ordinateur sous la forme d'une courbe (Figure 23). Au début de la réaction, la quantité d'ADN présente est trop faible pour que la mesure de fluorescence soit significative. Après un certain nombre de cycle, la quantité d'ADN augmente exponentiellement et se traduit sur la courbe par une phase d'inflexion. L'amplification est considérée comme significative lorsque la fluorescence mesurée dépasse un seuil préalablement fixé. Le cycle à partir duquel ce seuil est atteint constitue le cycle seuil ou Ct (cycle threshold). La valeur du Ct est inversement proportionnelle à la quantité initiale de matrice. En effet, plus la quantité d'ADN matrice initiale présente est importante, plus l'amplification a lieu tôt, donc plus ce Ct est faible.



[Figure 23.](#) [Courbe de fluorescence en fonction du nombre de cycles.](#) Crédit illustration : C. Peltier

Bien que très sensible, cette méthode n'est pas toujours très spécifique. La correspondance de l'amplicon obtenu avec celui attendu passe par le tracé de la courbe de dissociation (Figure 24) de la réaction. Celle-ci est représentée par la dérivée première de la fluorescence en fonction de la température (Figure 25). Cette courbe permet de déterminer la température de fusion T_m de la séquence obtenue, visualisable par un pic. Cette température T_m correspond à la température pour laquelle 50% de l'ADN double brin est dissocié. Elle est spécifique d'un fragment donné et est donc préalablement connue. Une valeur de T_m différente ou la présence de pics surnuméraires signe l'amplification de fragments non désirés ou la formation de dimères d'amorces au cours de la réaction.



[Figure 24.](#) [Courbe de dissociation. La courbe présente un pic à la température \$T_m\$.](#) Crédit illustration C. Peltier

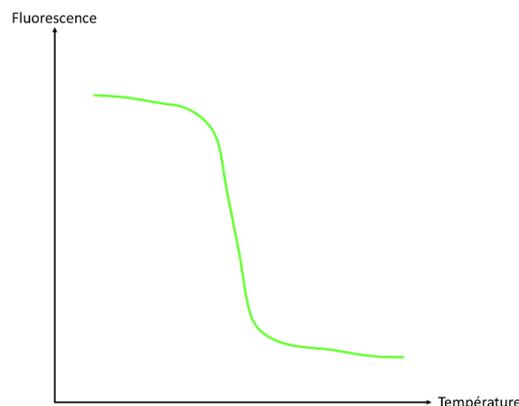


Figure 25. [Courbe de la fluorescence en fonction de la température.](#) Crédit illustration C. Peltier

De même que pour une PCR classique, la PCR en temps réel permet de mettre en évidence une séquence génétique particulière au sein d'un échantillon. Elle est cependant beaucoup plus rapide, plus sensible et détecte des quantités plus faibles d'ADN. Elle permet également de déterminer la quantité initiale d'ADN matrice. En effet, la mesure de l'amplification de l'ADN se fait en temps réel au cours de la réaction et non à la fin de celle-ci. Cette mesure passe par l'utilisation de sondes d'hydrolyse, de sondes d'hybridation ou d'agents intercalants tels que le SYBR Green® utilisé dans ce travail. Cet agent émet une fluorescence lorsqu'il se fixe au petit sillon de l'ADN double brin et n'en émet aucune lorsqu'il est sous sa forme libre. La mesure de fluorescence au cours de la réaction est ainsi directement fonction de l'amplification du fragment. Plus l'amplification a lieu tôt, plus il y avait de matrice d'ADN initialement.

Protocole expérimentale réalisé dans ce travail : d'après Geessien Kroon et al. 2016.

Les mélanges réactionnels de chaque réaction étaient constitués d'eau ultrapure, des amorces, du matériel à analyser et d'une solution commerciale « Power SYBR Green PCR Master Mix » de ThermoFisher Scientific ([Tableau 13](#)). Cette solution contient l'agent intercalant SYBR Green I Dye, l'ADN polymérase AmpliTaq Gold®, les quatre désoxyribonucléotides additionnés de dUTP et dTTP pour optimiser la réaction de PCR, un élément référence passive permettant de normaliser la fluorescence mesurée et un tampon réactionnel.

**Mélanges réactionnels
Pour un échantillon
Volume total : 10µL**

Réaction qPCR gène C11R	Réaction qPCR gène A56R
1,4µL d'eau ultrapure	3,6µL d'eau ultrapure
5,0µL Power SYBR Green PCR Master Mix	
0,8µL de vgf F (à 10µmol/L)	0,2µL de ha F (à 0,2µmol/L)
0,8µL de vgf R (à 10µmol/L)	0,2µL de ha R (à 0,2µmol/L)
2µL d'ADN matrice	1µL d'ADN matrice

Tableau 13. [Composition des mélanges réactionnels à base de « Power SYBR Green PCR Master Mix ».](#) Selon les expériences de Trindade et al.,2016

Les mêmes auteurs ont validé la séquence des amorces utilisées dans ces réactions de PCR quantitatives ([Tableau 14](#)). Leur alignement avec le génome du virus de la vaccine a été vérifiée par l'utilisation du logiciel *in silico* (http://insilico.ehu.es/PCR_virus/). Le logiciel BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) a permis de montrer la correspondance des amplicons avec une partie du génome du VACV et particulièrement des gène C11R et A56R à 100%.

Réaction	Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce	Température de fusion (Tm) des amplicons obtenus
qPCR vgf	vgf F	CGCTACAACAGATATTCCAGCTA TCAG	Tm= 78,6°C
	vgf R	AGCGTGGATACAGTCACCGTGTA A	
qPCR ha	ha F	CATCATCTGGAATTGTCACTACT AAA	Groupe 1 : Tm=75,8°C Groupe 2 : Tm=76,3°C
	ha R	ACGGCCGACAATATAATTAATGC	

[Tableau 14.](#) [Séquences des amorces utilisées au cours des réactions de PCR en temps réel.](#) Les températures de fusion des amplicons obtenus sont issus de Geessien Kroon et al.2016.

Le laboratoire de virologie de l'UFMG a isolé puis cultivé le virus de la vaccine VACV de la souche Western Reserve. L'ADN de ce virus a été extrait et purifié afin d'être utilisé comme témoin positif des deux réactions de PCR en temps réel. Le témoin négatif était constitué par de l'eau ultrapure. Ces témoins étaient également testés en duplicata.

Les deux réactions ont été menées dans des thermocycleurs « StepOne System » de ThermoFisher et ont subi le protocole suivant : un cycle de 10 minutes à 95°C, suivi d'une répétition de 40 cycles identiques : 10 secondes à 95°C puis 40 secondes à 58°C. Une fois ces cycles terminés, les plaques subissent les variations de température suivantes : 15 secondes à 95°C, 15 secondes à 58°C puis augmentation de 1°C toutes les deux secondes jusqu'à atteindre 95°C. La fluorescence est toujours mesurée au cours de cette dernière étape et permet de tracer la courbe de dissociation.

Annexe 8. Table des mélanges des 126 échantillons négatifs à la PCR nichée et testés en qPCR C11R

Mélange	Echantillon		Mélange	Echantillon		Mélange	Echantillon	
1	F37	F39	23	F124	F126	45	F247	F248
2	F40	F44	24	F128	F129	46	F250	
3	F45		25	F131	F132	47	F252	F253
4	F47		26	F133	F134	48	F255	F258
5	F49	F50	27	F137	F139	49	F259	F261
6	F52	F53	28	F140	F142	50	F263	F264
7	F55	F59	29	F143	F146	51	F267	F270
8	F62	F64	30	F147	F150	52	F273	F278
9	F65	F66	31	F151	F152	53	F280	F281
10	F67	F69	32	F153	F155	54	F286	F287
11	F70	F71	33	F160	F162	55	F293	F295
12	F75	F78	34	F176	F178	56	F296	F297
13	F80	F84	35	F180	F182	57	F302	F303
14	F87	F89	36	F185	F188	58	F305	F306
15	F90	F91	37	F189	F198	59	F307	F308
16	F93	F94	38	F199	F200	60	F310	F312
17	F95	F97	39	F204	F210	61	F315	F316
18	F98	F105	40	F215	F225	62	F318	F319
19	F107	F109	41	F229	F231	63	F323	F327
20	F112	F211	42	F236	F237	64	F328	F330
21	F116	F118	43	F238	F240			
22	F119	F122	44	F244	F246			

Annexe 9. Tableau simplifié des résultats des analyses sérologiques et moléculaires

Les cases bleues NE signifient "Non évaluable", D. Tasmanie signifie "Diable de Tasmanie", NA signifie "Non analysable", les échantillons positifs à la PCR nichée sont en vert

ID	PRNT	PCR nichée	Séquençage	qPCR C11R	qPCR A56R	ID	PRNT	PCR nichée	Séquençage	qPCR C11R	qPCR A56R
F01	Négatif					F168	Négatif				
F02	Négatif					F169	Négatif				
F03	Négatif					F170	Négatif				
F04	Négatif					F171	Négatif				
F05	Négatif					F172	Négatif				
F06	Négatif					F173	Négatif	Positif		Négatif	Négatif
F07	Négatif					F174	Négatif				
F08	Négatif					F175	Négatif				
F09	Négatif					F176	Négatif	Négatif		Négatif	
F10	Négatif					F177	Négatif				
F11	Négatif					F178	Négatif	Négatif		Négatif	
F12	Négatif					F179	NE				
F13	Négatif					F180	Négatif	Négatif		Négatif	
F14	Négatif					F181	Négatif	Positif	NA	Négatif	Négatif
F15	Négatif					F182	Négatif	Négatif		Négatif	
F16	Négatif					F183	NE				
F17	NE					F184	NE				
F18	Négatif					F185	Négatif	Négatif		Négatif	
F19	Négatif					F186	Négatif				
F20	Négatif					F187	NE				
F21	Négatif					F188	Négatif	Négatif		Négatif	
F22	Négatif					F189	Négatif	Négatif		Négatif	
F23	Négatif					F190	Négatif	Positif		Négatif	Négatif
F24	NE					F191	Négatif				
F25	Négatif					F192	NE				
F26	Négatif					F193	NE				
F27	Négatif					F194	NE				
F28	Négatif					F195	NE				
F29	Négatif					F196	NE				
F30	NE					F197	Négatif				
F31	Négatif					F198	Négatif	Négatif		Négatif	
F32	Négatif					F199	Négatif	Négatif		Négatif	
F33	Négatif					F200	Négatif	Négatif		Négatif	
F34	Négatif					F201	NE				
F35	Négatif					F202	NE				
F36	Négatif					F203	NE				
F37	Négatif	Négatif		Négatif		F204	Négatif	Négatif		Négatif	
F38	Négatif	Positif	NA	Négatif	Négatif	F205	NE				
F39	Négatif	Négatif		Négatif		F206	NE				
F40	Négatif	Négatif		Négatif		F207	NE				
F41	Négatif	Négatif		Vide		F208	Négatif	Positif		Négatif	Négatif
F42	Négatif					F209	NE				
F43	Négatif					F210	Négatif	Négatif		Négatif	
F44	Négatif	Négatif		Négatif		F211	Négatif	Négatif		Négatif	
F45	Négatif	Négatif		Négatif		F212	NE				
F46	Négatif					F213	NE				
F47	Négatif	Négatif		Négatif		F214	Négatif				
F48	Négatif					F215	Négatif	Négatif		Négatif	
F49	Négatif	Négatif		Négatif		F216	Négatif				
F50	Négatif	Négatif		Négatif		F217	NE				
F51	NE					F218	Négatif				
F52	Négatif	Négatif		Négatif		F219	NE				
F53	Négatif	Négatif		Négatif		F220	NE				
F54	Négatif					F221	Négatif				
F55	Négatif	Négatif		Négatif		F222	NE				

F56	Négatif					F223	Négatif				
F57	Négatif					F224	Négatif	Positif		Négatif	Négatif
F58	Négatif					F225	Négatif	Négatif		Négatif	
F59	Négatif	Négatif		Négatif		F226	Négatif	Positif		Négatif	Négatif
F60	Négatif					F227	Négatif				
F61	Négatif					F228	Négatif	Positif		Négatif	Négatif
F62	Négatif	Négatif		Négatif		F229	Négatif	Négatif		Négatif	
F63	Négatif					F230	Négatif	Positif		Négatif	Négatif
F64	Négatif	Négatif		Négatif		F231	Négatif	Négatif		Négatif	
F65	Négatif	Négatif		Négatif		F232	Négatif				
F66	Négatif	Négatif		Négatif		F233	Négatif	Positif		Négatif	Négatif
F67	Négatif	Négatif		Négatif		F234	Négatif				
F68	Négatif					F235	NE				
F69	Négatif	Négatif		Négatif		F236	Négatif	Négatif		Négatif	
F70	Négatif	Négatif		Négatif		F237	Négatif	Négatif		Négatif	
F71	Négatif	Négatif		Négatif		F238	Négatif	Négatif		Négatif	
F72	NE					F239	Négatif				
F73	Négatif	Positif		Négatif	Négatif	F240	Négatif	Négatif		Négatif	
F74	Négatif					F241	Négatif	Positif		Négatif	Négatif
F75	Négatif	Négatif		Négatif		F242	Négatif				
F76	NE					F243	NE				
F77	Négatif					F244	Négatif	Négatif		Négatif	
F78	Négatif	Négatif		Négatif		F245	NE				
F79	NE					F246	Négatif	Négatif		Négatif	
F80	Négatif	Négatif		Négatif		F247	Négatif	Négatif		Négatif	
F81	Négatif					F248	Négatif	Négatif		Négatif	
F82	Négatif					F249	Négatif				
F83	Négatif					F250	Négatif	Négatif		Négatif	
F84	Négatif	Négatif		Négatif		F251	NE				
F85	Négatif					F252	Négatif	Négatif		Négatif	
F86	Négatif					F253	Négatif	Négatif		Négatif	
F87	Négatif	Négatif		Négatif		F254	Négatif				
F88	Négatif					F255	Négatif	Négatif		Négatif	
F89	Négatif	Négatif		Négatif		F256	Négatif				
F90	Négatif	Négatif		Négatif		F257	Négatif	Positif		Négatif	Négatif
F91	Négatif	Négatif		Négatif		F258	Négatif	Négatif		Négatif	
F92	NE					F259	Négatif	Négatif		Négatif	
F93	Négatif	Négatif		Négatif		F260	Négatif				
F94	Négatif	Négatif		Négatif		F261	Négatif	Négatif		Négatif	
F95	Négatif	Négatif		Négatif		F262	Négatif				
F96	Négatif					F263	Négatif	Négatif		Négatif	
F97	Négatif	Négatif		Négatif		F264	Négatif	Négatif		Négatif	
F98	Négatif	Négatif		Négatif		F265	NE				
F99	Négatif	Positif	D. Tasmanie	Négatif	Négatif	F266	Négatif				
F100	Négatif					F267	Négatif	Négatif		Négatif	
F101	NE					F268	Négatif	Positif		Négatif	Négatif
F102	NE					F269	Négatif				
F103	NE					F270	Négatif	Négatif		Négatif	
F104	NE					F271	Négatif	Positif		Négatif	Négatif
F105	Négatif	Négatif		Négatif		F272	Négatif				
F106	Négatif	Positif	NA	Négatif	Négatif	F273	Négatif	Négatif		Négatif	
F107	Négatif	Négatif		Négatif		F274	NE				
F108	Négatif					F275	NE				
F109	Négatif	Négatif		Négatif		F276	Négatif				
F110	Négatif					F277	Négatif				
F111	Négatif					F278	Négatif	Négatif		Négatif	
F112	Négatif	Négatif		Négatif		F279	NE				
F113	Négatif	Positif		Négatif	Négatif	F280	Négatif	Négatif		Négatif	
F114	Négatif	Positif		Négatif	Négatif	F281	Négatif	Négatif		Négatif	
F115	NE					F282	NE				
F116	Négatif	Négatif		Négatif		F283	NE				
F117	Négatif					F284	Négatif				

F118	Négatif	Négatif		Négatif		F285	Négatif				
F119	Négatif	Négatif		Négatif		F286	Négatif	Négatif		Négatif	
F120	Négatif					F287	Négatif	Négatif		Négatif	
F121	Négatif	Positif		Négatif	Négatif	F288	Négatif				
F122	Négatif	Négatif		Négatif		F289	Négatif	Positif		Négatif	Négatif
F123	Négatif					F290	Négatif	Positif		Négatif	Négatif
F124	Négatif	Négatif		Négatif		F291	Négatif	Positif		Négatif	Négatif
F125	Négatif	Positif		Négatif	Négatif	F292	Négatif				
F126	Négatif	Négatif		Négatif		F293	Négatif	Négatif		Négatif	
F127	Négatif					F294	NE				
F128	Négatif	Négatif		Négatif		F295	Négatif	Négatif		Négatif	
F129	Négatif	Négatif		Négatif		F296	Négatif	Négatif		Négatif	
F130	Négatif					F297	Négatif	Négatif		Négatif	
F131	Négatif	Négatif		Négatif		F298	NE				
F132	Négatif	Négatif		Négatif		F299	NE				
F133	Négatif	Négatif		Négatif		F300	Négatif				
F134	Négatif	Négatif		Négatif		F301	NE				
F135	Négatif					F302	Négatif	Négatif		Négatif	
F136	Négatif	Douteux		Négatif	Négatif	F303	Négatif	Négatif		Négatif	
F137	Négatif	Négatif		Négatif		F304	Négatif	Positif		Négatif	Négatif
F138	Négatif	Positif		Négatif	Négatif	F305	Négatif	Négatif		Négatif	
F139	Négatif	Négatif		Négatif		F306	Négatif	Négatif		Négatif	
F140	Négatif	Négatif		Négatif		F307	Négatif	Négatif		Négatif	
F141	Négatif					F308	Négatif	Négatif		Négatif	
F142	Négatif	Négatif		Négatif		F309	Négatif				
F143	Négatif	Négatif		Négatif		F310	Négatif	Négatif		Négatif	
F144	Négatif					F311	NE				
F145	Négatif	Positif		Négatif	Négatif	F312	Négatif	Négatif		Négatif	
F146	Négatif	Négatif		Négatif		F313	Négatif				
F147	Négatif	Négatif		Négatif		F314	Négatif				
F148	Négatif					F315	Négatif	Négatif		Négatif	
F149	Négatif					F316	Négatif	Négatif		Négatif	
F150	Négatif	Négatif		Négatif		F317	Négatif				
F151	Négatif	Négatif		Négatif		F318	Négatif	Négatif		Négatif	
F152	Négatif	Négatif		Négatif		F319	Négatif	Négatif		Négatif	
F153	Négatif	Négatif		Négatif		F320	NE				
F154	Négatif					F321	Négatif				
F155	Négatif	Négatif		Négatif		F322	Négatif				
F156	Négatif					F323	Négatif	Négatif		Négatif	
F157	Négatif					F324	Négatif				
F158	Négatif					F325	Négatif				
F159	Négatif					F326	NE				
F160	Négatif	Négatif		Négatif		F327	Négatif	Négatif		Négatif	
F161	Négatif	Positif		Négatif	Négatif	F328	Négatif	Négatif		Négatif	
F162	Négatif	Négatif		Négatif		F329	NE				
F163	Négatif					F330	Négatif	Négatif		Négatif	
F164	Négatif					F 331	NE				
F165	Négatif	Positif		Négatif	Négatif	F 332	NE				
F166	Négatif	Positif	D. Tasmanie	Négatif	Négatif	F 333	Négatif				
F167	Négatif					F 334	Négatif				

Annexe 10. Tableau des résultats des analyses sérologiques par PRNT

NE signifie "Non évaluable", les lignes en bleu clair correspondent aux échantillons où le défaut de comptage s'est porté sur le puits de l'échantillon et du témoin positif, les lignes en bleu foncé correspondent aux échantillons où le défaut de comptage s'est porté sur le puits du témoin positif seulement.

ID	PFU	CV	PFU (%)	Réduction (%)	Résultat	ID	PFU	CV	PFU (%)	Réduction (%)	Résultat
F01	152	180	84,44	15,56	Négatif	F168	88	83	106,02	-6,02	Négatif
F02	177	180	98,33	1,67	Négatif	F169	80	83	96,39	3,61	Négatif
F03	116	158	73,42	26,58	Négatif	F170	128	83	154,22	-54,22	Négatif
F04	157	158	99,37	0,63	Négatif	F171	90	83	108,43	-8,43	Négatif
F05	129	157	82,17	17,83	Négatif	F172	59	52	113,46	-13,46	Négatif
F06	154	157	98,09	1,91	Négatif	F173	58	52	111,54	-11,54	Négatif
F07	129	157	82,17	17,83	Négatif	F174	213	189	112,70	-12,70	Négatif
F08	154	157	98,09	1,91	Négatif	F175	198	189	104,76	-4,76	Négatif
F09	166	162	102,47	-2,47	Négatif	F176	210	178	117,98	-17,98	Négatif
F10	158	162	97,53	2,47	Négatif	F177	188	178	105,62	-5,62	Négatif
F11	150	145	103,45	-3,45	Négatif	F178	213	215	99,07	0,93	Négatif
F12	159	145	109,66	-9,66	Négatif	F179	NE	NE	NE	NE	NE
F13	121	160	75,63	24,38	Négatif	F180	245	215	113,95	-13,95	Négatif
F14	124	160	77,50	22,50	Négatif	F181	186	122	152,46	-52,46	Négatif
F15	151	144	104,86	-4,86	Négatif	F182	152	122	124,59	-24,59	Négatif
F16	171	144	118,75	-18,75	Négatif	F183	NE	NE	NE	NE	NE
F17	NE	NE	NE	NE	NE	F184	NE	NE	NE	NE	NE
F18	143	150	95,33	4,67	Négatif	F185	266	302	88,08	11,92	Négatif
F19	120	150	80,00	20,00	Négatif	F186	244	302	80,79	19,21	Négatif
F20	84	136	61,76	38,24	Négatif	F187	NE	NE	NE	NE	NE
F21	114	136	83,82	16,18	Négatif	F188	216	221	97,74	2,26	Négatif
F22	144	170	84,71	15,29	Négatif	F189	224	221	101,36	-1,36	Négatif
F23	143	170	84,12	15,88	Négatif	F190	218	270	80,74	19,26	Négatif
F24	NE	NE	NE	NE	NE	F191	230	270	85,19	14,81	Négatif
F25	139	148	93,92	6,08	Négatif	F192	216	NE	NE	NE	NE
F26	168	148	113,51	-13,51	Négatif	F193	NE	NE	NE	NE	NE
F27	111	150	74,00	26,00	Négatif	F194	196	NE	NE	NE	NE
F28	90	150	60,00	40,00	Négatif	F195	135	NE	NE	NE	NE
F29	134	154	87,01	12,99	Négatif	F196	199	NE	NE	NE	NE
F30	NE	NE	NE	NE	NE	F197	50	61	81,97	18,03	Négatif
F31	153	154	99,35	0,65	Négatif	F198	52	61	85,25	14,75	Négatif
F32	148	123	120,33	-20,33	Négatif	F199	49	50	98,00	2,00	Négatif
F33	139	123	113,01	-13,01	Négatif	F200	43	50	86,00	14,00	Négatif
F34	135	156	86,54	13,46	Négatif	F201	NE	NE	NE	NE	NE
F35	138	156	88,46	11,54	Négatif	F202	NE	NE	NE	NE	NE
F36	123	146	84,25	15,75	Négatif	F203	NE	NE	NE	NE	NE
F37	130	146	89,04	10,96	Négatif	F204	45	58	77,59	22,41	Négatif
F38	140	143	97,90	2,10	Négatif	F205	NE	NE	NE	NE	NE
F39	143	143	100,00	0,00	Négatif	F206	132	NE	NE	NE	NE
F40	151	150	100,67	-0,67	Négatif	F207	217	NE	NE	NE	NE
F41	151	150	100,67	-0,67	Négatif	F208	293	351	83,48	16,52	Négatif
F42	128	141	90,78	9,22	Négatif	F209	NE	NE	NE	NE	NE
F43	94	141	66,67	33,33	Négatif	F210	349	351	99,43	0,57	Négatif
F44	116	115	100,87	-0,87	Négatif	F211	206	221	93,21	6,79	Négatif
F45	110	115	95,65	4,35	Négatif	F212	NE	NE	NE	NE	NE
F46	135	139	97,12	2,88	Négatif	F213	NE	NE	NE	NE	NE
F47	144	139	103,60	-3,60	Négatif	F214	250	221	113,12	-13,12	Négatif
F48	129	154	83,77	16,23	Négatif	F215	47	58	81,03	18,97	Négatif
F49	146	154	94,81	5,19	Négatif	F216	48	54	88,89	11,11	Négatif
F50	130	140	92,86	7,14	Négatif	F217	NE	NE	NE	NE	NE
F51	NE	NE	NE	NE	NE	F218	210	258	81,40	18,60	Négatif
F52	116	140	82,86	17,14	Négatif	F219	NE	NE	NE	NE	NE
F53	124	124	100,00	0,00	Négatif	F220	NE	NE	NE	NE	NE
F54	118	124	95,16	4,84	Négatif	F221	210	258	81,40	18,60	Négatif
F55	111	98	113,27	-13,27	Négatif	F222	NE	NE	NE	NE	NE
F56	136	98	138,78	-38,78	Négatif	F223	218	138	157,97	-57,97	Négatif

F57	122	143	85,31	14,69	Négatif	F224	98	138	71,01	28,99	Négatif
F58	85	143	59,44	40,56	Négatif	F225	103	128	80,47	19,53	Négatif
F59	109	138	78,99	21,01	Négatif	F226	144	128	112,50	-12,50	Négatif
F60	150	138	108,70	-8,70	Négatif	F227	234	249	93,98	6,02	Négatif
F61	120	150	80,00	20,00	Négatif	F228	56	54	103,70	-3,70	Négatif
F62	125	150	83,33	16,67	Négatif	F229	224	249	89,96	10,04	Négatif
F63	65	110	59,09	40,91	Négatif	F230	230	249	92,37	7,63	Négatif
F64	95	110	86,36	13,64	Négatif	F231	173	218	79,36	20,64	Négatif
F65	108	95	113,68	-13,68	Négatif	F232	204	218	93,58	6,42	Négatif
F66	100	95	105,26	-5,26	Négatif	F233	101	125	80,80	19,20	Négatif
F67	138	152	90,79	9,21	Négatif	F234	136	125	108,80	-8,80	Négatif
F68	155	152	101,97	-1,97	Négatif	F235	NE	NE	NE	NE	NE
F69	127	124	102,42	-2,42	Négatif	F236	115	123	93,50	6,50	Négatif
F70	119	124	95,97	4,03	Négatif	F237	78	123	63,41	36,59	Négatif
F71	115	110	104,55	-4,55	Négatif	F238	235	283	83,04	16,96	Négatif
F72	NE	NE	NE	NE	NE	F239	196	283	69,26	30,74	Négatif
F73	108	110	98,18	1,82	Négatif	F240	182	209	87,08	12,92	Négatif
F74	168	158	106,33	-6,33	Négatif	F241	226	209	108,13	-8,13	Négatif
F75	164	158	103,80	-3,80	Négatif	F242	192	273	70,33	29,67	Négatif
F76	NE	NE	NE	NE	NE	F243	NE	NE	NE	NE	NE
F77	84	94	89,36	10,64	Négatif	F244	260	273	95,24	4,76	Négatif
F78	76	94	80,85	19,15	Négatif	F245	NE	NE	NE	NE	NE
F79	NE	NE	NE	NE	NE	F246	179	253	70,75	29,25	Négatif
F80	112	153	73,20	26,80	Négatif	F247	233	253	92,09	7,91	Négatif
F81	120	153	78,43	21,57	Négatif	F248	146	181	80,66	19,34	Négatif
F82	127	121	104,96	-4,96	Négatif	F249	203	181	112,15	-12,15	Négatif
F83	126	121	104,13	-4,13	Négatif	F250	37	67	55,22	44,78	Négatif
F84	238	247	96,36	3,64	Négatif	F251	NE	NE	NE	NE	NE
F85	215	247	87,04	12,96	Négatif	F252	44	67	65,67	34,33	Négatif
F86	105	129	81,40	18,60	Négatif	F253	107	105	101,90	-1,90	Négatif
F87	120	129	93,02	6,98	Négatif	F254	100	105	95,24	4,76	Négatif
F88	94	104	90,38	9,62	Négatif	F255	104	105	99,05	0,95	Négatif
F89	115	104	110,58	-10,58	Négatif	F256	49	50	98,00	2,00	Négatif
F90	113	144	78,47	21,53	Négatif	F257	109	117	93,16	6,84	Négatif
F91	136	144	94,44	5,56	Négatif	F258	45	50	90,00	10,00	Négatif
F92	NE	NE	NE	NE	NE	F259	53	50	106,00	-6,00	Négatif
F93	100	134	74,63	25,37	Négatif	F260	49	50	98,00	2,00	Négatif
F94	98	134	73,13	26,87	Négatif	F261	48	62	77,42	22,58	Négatif
F95	125	119	105,04	-5,04	Négatif	F262	48	62	77,42	22,58	Négatif
F96	143	119	120,17	-20,17	Négatif	F263	50	63	79,37	20,63	Négatif
F97	83	100	83,00	17,00	Négatif	F264	48	63	76,19	23,81	Négatif
F98	60	100	60,00	40,00	Négatif	F265	NE	NE	NE	NE	NE
F99	115	122	94,26	5,74	Négatif	F266	40	46	86,96	13,04	Négatif
F100	112	122	91,80	8,20	Négatif	F267	26	46	56,52	43,48	Négatif
F101	NE	NE	NE	NE	NE	F268	37	36	102,78	-2,78	Négatif
F102	NE	NE	NE	NE	NE	F269	38	36	105,56	-5,56	Négatif
F103	NE	NE	NE	NE	NE	F270	42	43	97,67	2,33	Négatif
F104	NE	NE	NE	NE	NE	F271	41	43	95,35	4,65	Négatif
F105	109	134	81,34	18,66	Négatif	F272	49	60	81,67	18,33	Négatif
F106	117	134	87,31	12,69	Négatif	F273	35	60	58,33	41,67	Négatif
F107	141	110	128,18	-28,18	Négatif	F274	NE	NE	NE	NE	NE
F108	144	110	130,91	-30,91	Négatif	F275	NE	NE	NE	NE	NE
F109	115	112	102,68	-2,68	Négatif	F276	54	47	114,89	-14,89	Négatif
F110	106	112	94,64	5,36	Négatif	F277	44	47	93,62	6,38	Négatif
F111	128	138	92,75	7,25	Négatif	F278	33	46	71,74	28,26	Négatif
F112	134	138	97,10	2,90	Négatif	F279	NE	NE	NE	NE	NE
F113	122	135	90,37	9,63	Négatif	F280	37	46	80,43	19,57	Négatif
F114	102	135	75,56	24,44	Négatif	F281	46	41	112,20	-12,20	Négatif
F115	NE	NE	NE	NE	NE	F282	NE	NE	NE	NE	NE
F116	98	119	82,35	17,65	Négatif	F283	NE	NE	NE	NE	NE
F117	139	119	116,81	-16,81	Négatif	F284	53	52	101,92	-1,92	Négatif
F118	134	127	105,51	-5,51	Négatif	F285	59	52	113,46	-13,46	Négatif
F119	150	127	118,11	-18,11	Négatif	F286	52	49	106,12	-6,12	Négatif

F120	126	152	82,89	17,11	Négatif	F287	51	49	104,08	-4,08	Négatif
F121	148	152	97,37	2,63	Négatif	F288	69	65	106,15	-6,15	Négatif
F122	102	106	96,23	3,77	Négatif	F289	75	65	115,38	-15,38	Négatif
F123	113	106	106,60	-6,60	Négatif	F290	37	57	64,91	35,09	Négatif
F124	101	111	90,99	9,01	Négatif	F291	49	57	85,96	14,04	Négatif
F125	127	111	114,41	-14,41	Négatif	F292	55	46	119,57	-19,57	Négatif
F126	161	142	113,38	-13,38	Négatif	F293	50	46	108,70	-8,70	Négatif
F127	123	142	86,62	13,38	Négatif	F294	NE	NE	NE	NE	NE
F128	128	160	80,00	20,00	Négatif	F295	81	105	77,14	22,86	Négatif
F129	139	160	86,88	13,13	Négatif	F296	76	105	72,38	27,62	Négatif
F130	105	124	84,68	15,32	Négatif	F297	94	44	213,64	-113,64	Négatif
F131	136	124	109,68	-9,68	Négatif	F298	NE	NE	NE	NE	NE
F132	137	141	97,16	2,84	Négatif	F299	NE	NE	NE	NE	NE
F133	148	141	104,96	-4,96	Négatif	F300	72	44	163,64	-63,64	Négatif
F134	144	150	96,00	4,00	Négatif	F301	NE	NE	NE	NE	NE
F135	141	150	94,00	6,00	Négatif	F302	92	115	80,00	20,00	Négatif
F136	147	144	102,08	-2,08	Négatif	F303	98	115	85,22	14,78	Négatif
F137	153	144	106,25	-6,25	Négatif	F304	120	114	105,26	-5,26	Négatif
F138	197	183	107,65	-7,65	Négatif	F305	125	114	109,65	-9,65	Négatif
F139	188	183	102,73	-2,73	Négatif	F306	63	92	68,48	31,52	Négatif
F140	150	135	111,11	-11,11	Négatif	F307	56	45	124,44	-24,44	Négatif
F141	148	135	109,63	-9,63	Négatif	F308	45	45	100,00	0,00	Négatif
F142	116	140	82,86	17,14	Négatif	F309	47	45	104,44	-4,44	Négatif
F143	145	140	103,57	-3,57	Négatif	F310	44	45	97,78	2,22	Négatif
F144	127	137	92,70	7,30	Négatif	F311	NE	NE	NE	NE	NE
F145	146	137	106,57	-6,57	Négatif	F312	46	56	82,14	17,86	Négatif
F146	122	187	65,24	34,76	Négatif	F313	62	56	110,71	-10,71	Négatif
F147	140	187	74,87	25,13	Négatif	F314	57	51	111,76	-11,76	Négatif
F148	148	146	101,37	-1,37	Négatif	F315	43	51	84,31	15,69	Négatif
F149	166	146	113,70	-13,70	Négatif	F316	37	57	64,91	35,09	Négatif
F150	84	111	75,68	24,32	Négatif	F317	60	57	105,26	-5,26	Négatif
F151	110	111	99,10	0,90	Négatif	F318	47	48	97,92	2,08	Négatif
F152	96	112	85,71	14,29	Négatif	F319	54	48	112,50	-12,50	Négatif
F153	112	112	100,00	0,00	Négatif	F320	NE	NE	NE	NE	NE
F154	108	122	88,52	11,48	Négatif	F321	63	44	143,18	-43,18	Négatif
F155	117	122	95,90	4,10	Négatif	F322	56	44	127,27	-27,27	Négatif
F156	146	143	102,10	-2,10	Négatif	F323	42	59	71,19	28,81	Négatif
F157	162	143	113,29	-13,29	Négatif	F324	38	59	64,41	35,59	Négatif
F158	119	117	101,71	-1,71	Négatif	F325	37	38	97,37	2,63	Négatif
F159	109	117	93,16	6,84	Négatif	F326	NE	NE	NE	NE	NE
F160	132	140	94,29	5,71	Négatif	F327	63	44	143,18	-43,18	Négatif
F161	154	140	110,00	-10,00	Négatif	F328	35	44	79,55	20,45	Négatif
F162	172	140	122,86	-22,86	Négatif	F329	NE	NE	NE	NE	NE
F163	60	55	109,09	-9,09	Négatif	F330	36	38	94,74	5,26	Négatif
F164	251	177	141,81	-41,81	Négatif	F331	NE	NE	NE	NE	NE
F165	170	177	96,05	3,95	Négatif	F332	NE	NE	NE	NE	NE
F166	97	83	116,87	-16,87	Négatif	F333	50	69	72,46	27,54	Négatif
F167	53	55	96,36	3,64	Négatif	F334	38	69	55,07	44,93	Négatif

Annexe 11. Tableau des résultats des analyses moléculaires par PCR nichée

NA signifie « Non analysable », les cases grisées correspondent aux échantillons non analysés, les cases vertes correspondent aux échantillons positifs.

ID	ADN sang	Séquençage	ADN urine	Séquençage	ID	ADN sang	Séquençage	ADN urine	Séquençage
F37	Positif		Négatif		F176			Négatif	
F38	Positif		Positif	NA	F178			Négatif	
F39	Positif		Négatif		F180			Négatif	
F40	Négatif		Négatif		F181			Positif	NA
F41	Positif		Négatif		F182			Négatif	
F44	Positif	NA	Négatif		F185			Négatif	
F45	Positif	NA	Négatif		F188			Négatif	
F47	Positif		Négatif		F189			Négatif	
F49	Positif		Négatif		F190			Positif	
F50	Négatif		Négatif		F198			Négatif	
F52	Négatif		Négatif		F199			Négatif	
F53	Négatif		Négatif		F200			Négatif	
F55	Négatif		Négatif		F204			Négatif	
F59	Négatif		Négatif		F208			Positif	
F62	Négatif		Négatif		F210			Négatif	
F64	Positif		Négatif		F211			Négatif	
F65	Négatif		Négatif		F215			Négatif	
F66	Négatif		Négatif		F224			Positif	
F67	Positif		Négatif		F225			Négatif	
F69	Positif		Négatif		F226			Positif	
F70	Positif		Négatif		F228			Positif	
F71	Négatif		Négatif		F229			Négatif	
F73	Négatif		Positif		F230			Positif	
F75	Négatif		Négatif		F231			Négatif	
F78	Négatif		Négatif		F233			Positif	
F80	Négatif		Négatif		F236			Négatif	
F84	Négatif		Négatif		F237			Négatif	
F87	Négatif		Négatif		F238			Négatif	
F89	Négatif		Négatif		F240			Négatif	
F90	Négatif		Négatif		F241			Positif	
F91	Positif		Négatif		F244			Négatif	
F93	Positif		Négatif		F246			Négatif	
F94	Négatif		Négatif		F247			Négatif	
F95	Positif	NA	Négatif		F248			Négatif	
F97	Positif		Négatif		F250			Négatif	
F98	Négatif		Négatif		F252			Négatif	
F99	Négatif		Positif	D. Tasmanie	F253			Négatif	
F105	Positif		Négatif		F255			Négatif	
F106	Positif		Positif	NA	F257			Positif	
F107	Négatif		Négatif		F258			Négatif	
F109	Positif		Négatif		F259			Négatif	
F112	Positif		Négatif		F261			Négatif	
F113			Positif		F263			Négatif	
F114			Positif		F264			Négatif	
F116			Négatif		F267			Négatif	
F118			Négatif		F268			Positif	
F119			Négatif		F270			Négatif	
F121			Positif		F271			Positif	
F122			Négatif		F273			Négatif	
F124			Négatif		F278			Négatif	
F125			Positif		F280			Négatif	
F126			Négatif		F281			Négatif	
F128			Négatif		F286			Négatif	
F129			Négatif		F287			Négatif	
F131			Négatif		F289			Positif	
F132			Négatif		F290			Positif	
F133			Négatif		F291			Positif	
F134			Négatif		F293			Négatif	

F136			Douteux		F295			Négatif	
F137			Négatif		F296			Négatif	
F138			Positif		F297			Négatif	
F139			Négatif		F302			Négatif	
F140			Négatif		F303			Négatif	
F142			Négatif		F304			Positif	
F143			Négatif		F305			Négatif	
F145			Positif		F306			Négatif	
F146			Négatif		F307			Négatif	
F147			Négatif		F308			Négatif	
F150			Négatif		F310			Négatif	
F151			Négatif		F312			Négatif	
F152			Négatif		F315			Négatif	
F153			Négatif		F316			Négatif	
F155			Négatif		F318			Négatif	
F160			Négatif		F319			Négatif	
F161			Positif		F323			Négatif	
F162			Négatif		F327			Négatif	
F165			Positif		F328			Négatif	
F166			Positif	D.Tasmanie	F330			Négatif	
F173			Positif						

AGREMENT SCIENTIFIQUE
En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussigné(e), **Timothée VERGNE**, Enseignant-chercheur, de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **Claire PELTIER** intitulée « **Etude de la faune sauvage brésilienne comme potentiel réservoir de virus de la vaccine** » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 07/09/2020
Enseignant-chercheur de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse
Dr **Timothée VERGNE**

Vu :
Le Directeur de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse
M. Pierre SANS



Vu :
Le Président du jury
Professeur **Christophe PASQUIER**

Vu et autorisation de l'impression :
Le Président de l'Université Paul Sabatier
M. Jean-Marc BROTO



Mme **Claire PELTIER**
a été admis(e) sur concours en : 2015
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 09/07/2019
a validé son année d'approfondissement le : 16/07/2020
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.



Université de Toulouse

Nom : PELTIER Claire

Toulouse 2020

Titre : Etude de la faune sauvage brésilienne comme potentiel réservoir du virus de la vaccine

Résumé :

Le virus de la vaccine (VACV) cause la maladie de la vaccine chez le bovin et l'homme. Il a grandement été utilisé dans la campagne de vaccination contre la variole jusqu'en 1980. Depuis 40 ans les populations ne sont plus vaccinées contre la variole, et ne sont plus exposées au VACV qui ne circulerait donc plus dans le monde. Cependant, des cas de vaccine sont aujourd'hui rapportés en particulier en Inde et au Brésil. Une des hypothèses formulées quant à l'émergence de ce virus suggère l'adaptation d'une souche virale à un hôte naturel sauvage. Plusieurs études brésiliennes ont montré le portage asymptomatique du VACV par la faune sauvage dans des régions indemnes ou non. Ce travail a montré l'absence de réservoir sauvage entre 2012 et 2014 à Botucatu, région indemne de VACV. L'hypothèse n'a pu être vérifiée ici. Cependant, des publications récentes indiquent qu'une nouvelle étude de la région pourrait donner de tous autres résultats.

Mots-clés : virus de la vaccine, Brésil, faune sauvage, réservoir

Name: PELTIER Claire

Toulouse 2020

Title: Study of brazilian wildlife as a potential vaccinia virus reservoir

Abstract:

The vaccinia virus (VACV) causes vaccinia in cattle and humans. It was widely used in vaccination campaigns against smallpox until 1980. For the last forty years people have not been vaccinated against smallpox, thus have not been exposed to VACV, which, supposedly, is not circulating around the world anymore. However, cases of vaccinia are still reported today, particularly in India and Brazil. One of the hypotheses to explain its re-emergence, implies the adaptation of a viral strain to a natural wildlife host. Several brazilian studies have shown the asymptomatic carriage of VACV by wildlife in regions free or not of VACV. This study proved the absence of a wildlife reservoir in Botucatu, VACV-free region, between 2012 and 2014. The hypothesis has not been verified here. Nevertheless, recent works suggest that totally different results could be obtained with a new survey of the region.

Key words: vaccinia virus, Brazil, wildlife, reservoir