

**Plan du rapport annuel
d'activité**

2014

**Centre de national de
référence
Des Orthopoxvirus**

**Année
d'exercice**

2013

Résumé analytique

L'enjeu majeur de santé publique, pour le CNR, est la surveillance des *Orthopoxvirus*. Cette vigilance effectuée sur une base routinière permet d'être en mesure d'identifier très précocement la survenue éventuelle de poxvirus hautement pathogènes comme le virus de la variole ; il s'agit d'une étape critique pour le déclenchement rapide du plan national Variole. L'occurrence d'épidémies de Cowpoxvirus a constitué l'actualité de ces dernières années.

Dans ce cadre, l'Unité de Virologie de l'Institut de Recherche Biomédicale des Armées a pour missions de développer et de mettre en œuvre des contre-mesures médicales contre les virus hautement pathogènes. A ce titre, l'unité de virologie possède une expertise biomédicale forte dans les domaines de l'identification des virus appartenant à la catégorie des MOT de l'arrêté du 30 avril 2012, contribue au déclenchement de l'alerte, participe aux réseaux de surveillance des infections pour les *Orthopoxvirus* et autres virus hautement pathogènes, au sein du Ministère de la Défense. C'est pour son expérience et ses compétences qu'elle s'est vue confier l'ensemble des missions dévolues au CNR *Orthopoxvirus*.

L'année 2013, conforte l'activité du CNR en matière d'expertise dans le domaine des poxvirus. Si aucun cowpoxvirus n'a été détecté au laboratoire, plusieurs souches virales du genre *Parapoxvirus* et plus spécifiquement de l'espèce *Orf* ainsi que celui du *Molluscipoxvirus* (espèce *Molluscum contagiosum*) ont été isolées ou mis en évidence. Par ailleurs, l'activité de recherche s'est renforcée avec un succès permettant d'ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques dans le domaine des molécules anti-virales.

Compte tenu de la réorganisation de l'IRBA, le CNR a été relocalisé sur Lyon dans la tour CERVI sur le site de Gerland sans rupture d'activité.

1 Missions et organisation du CNR

La mission du CNR est de surveiller la circulation et l'émergence de souches d'Orthopoxvirus. Compte tenu du faible nombre de cas, le laboratoire a étendu sa recherche à d'autres virus apparentés comme les parapoxvirus, Orf.

La description détaillée des missions et organisation est présentée en annexe.

Il y a eu des mouvements de personnels au cours de cette année.

Des personnels sont partis en retraite : Jean_Marc Crance, PhD ; Robert Drillien, PhD ; d'autres ont été mutés : Corinne Ducournau, IEF, Olivier Flusin, MD, PhD.

De nouveaux personnels sont arrivés : Fanny Jarjaval, tech ; Céline Richefeu, PhD.

Il est prévu de déplacer sur Brétigny sur Orges l'activité de microscopie électronique, sous la responsabilité d'Anne-Laure Favier et Danielle Spenher.

2 Activités d'expertise

La description des techniques disponibles est présentée en annexe.

2.1 Évolutions des techniques au cours de l'année N

- Techniques développées ou en développement

Le laboratoire a validé les techniques de détection des Orthopoxvirus dont celui de la variole adaptées de Kulesh et al., 2004 afin de renforcer son panel diagnostique.

Par ailleurs la sérologie spécifique est toujours en cours de développement mais se heurte à des difficultés de spécificités, pour le moment.

La microscopie électronique a été transférée sur le site de la faculté de Pharmacie de Grenoble. Les Dr Anne-Laure Favier et Danielle Spenher poursuivent cette activité.

- Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse : méthode, état d'avancement, principaux résultats
- Techniques transférées vers d'autres laboratoires : qPCR pour le virus de la vaccine au CHU de Nice. Cependant nous faisons toujours les tests.

2.2 Présenter les activités d'expertise de l'année 2013 et commenter les évolutions quantitatives et qualitatives observées en précisant notamment :

- Cinq prélèvements ont été réceptionnés, de CHU ou Hôpitaux, d'Avignon, de Paris et d'Angers. L'identification de trois d'entre eux a conduit à l'isolement d'une souche de virus Orf.

Date de réception	Nature échantillon	Date de prélèvement	Référence demande	Origine	Demande	Technique	Résultat	Date de rendu	Commentaire
19.08.2013	Biopsie peau en milieu de transport	09/08/2013	Dr Sanchez M	CHU d'Avignon	Recherche Orthopoxvirus	Qiagen DNA Blood mini kit, Biorad CFX96.	PCR négatives	28/08/2013 (Fax)	résultats faxés basés sur PCR
08.11.2013	Biopsie nodule	06/11/2013	Dr Bouvier- Alias	Hôpital Henri Mondor	Recherche Parapoxvirus	Qiagen DNA Blood mini kit, Biorad CFX96.	Positif en Parapoxvirus : Orf	21/11/2013 (Fax, Courriel)	Souche non isolée
03.12.2013	Biopsie nodule	29/11/2013	Dr Oro	Hôpital Henri Mondor	Recherche Parapoxvirus	Qiagen DNA Blood mini kit, Biorad CFX96.	PCR négatives	13/12/2013 (Courriel)	
09.01.2014	écouvillon sec + liquide pustule	06/01/2014	Dr Leguillon	CHU Angers	Recherche Parapoxvirus	Qiagen DNA Blood mini kit, Biorad CFX96.	Positif en Parapoxvirus : Orf	31/01/2014 (Courriel)	souche isolée

25/09/2013	culot cellulaire (n=71)		Dr B.Cambien	Laboratoire de Biophysique Equipe TIRO CEA/UNS A/CAL Faculté de Médecine	Recherche Orthopoxvirus	Qiagen DNA Blood mini kit, Biorad CFX96.	Détection de Vaccinia Virus par Q-PCR.		expertise pour projet "virus et cancer"
23/01/2014	culot cellulaire (n=12)		Dr B.Cambien	Laboratoire de Biophysique Equipe TIRO CEA/UNS A/CAL Faculté de Médecine	Recherche Orthopoxvirus	Qiagen DNA Blood mini kit, Biorad CFX96.	Détection de Vaccinia Virus par Q-PCR.		expertise pour projet "virus et cancer"
14/04/2014	culot cellulaire (n=18)		Dr B.Cambien	Laboratoire de Biophysique Equipe TIRO CEA/UNS A/CAL Faculté de Médecine	Recherche Orthopoxvirus	Qiagen DNA Blood mini kit, Biorad CFX96.	Détection de Vaccinia Virus par Q-PCR.		expertise pour projet "virus et cancer"

Le nombre de cas traités reste encore peu élevé. En 2012 les données suggéraient une corrélation entre la recrudescence des zoonoses causées par le Cowpoxvirus et l'arrêt de la vaccination anti-variologique. En effet, tous les cas confirmés avaient moins de 40 ans, étaient non-vaccinés et ne bénéficiaient donc pas de protection croisée envers les Orthopoxvirus (due à la vaccination anti-variologique). En 2013, nous avons traités des prélèvements provenant de personnes de plus de 40 ans, cependant, une augmentation des cas est toujours à craindre.

La démarche d'élargir le champ d'investigation à d'autres poxvirus : les para- et molluscipoxvirus a été payante. Cette démarche pour répondre à une demande des praticiens hospitaliers semble être maintenant logique pour les biologistes. Nous comptons tout de même renforcer la capacité du CNR à détecter avec de nombreuses méthodes par amplifications génique les Orthopoxvirus dont la variole.

- Nombre de souches testées pour leur sensibilité aux anti-infectieux et résultats ;

Néant

- Nombre de souches ou échantillons de matériel biologique issus des collections du CNR distribué.

8 échantillons d'extrait d'ADN des souches Cowpox au réseau EVA pour comparaison de séquençage.

3 Activités de surveillance

3.1 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

- Réseau de partenaires

Notre réseau de partenaires couvre l'ensemble du territoire et nous ouvre sur l'international.

Description des partenaires	Répartition par types d'activités	Domaine	Répartition géographique	couverture du réseau	évolution du réseau
CHU	Diagnostic de première intention ou de confirmation	Santé humaine	Grandes villes	national	pérenne
Hôpitaux d'Instruction des Armées	Diagnostic de première intention ou de confirmation	Santé humaine	Grandes villes	national	pérenne
services vétérinaires militaires	Diagnostic de première intention ou de confirmation	Santé animale	Grandes villes	national	pérenne
laboratoires de l'ANSES	Diagnostic de première intention ou de confirmation	Santé animale	Lyon, Nice	Sud est	pérenne
laboratoires de la Fondation Mérieux	Recherche de pathogènes en troisième intention sur un programme de pathogène discovery	Santé humaine	Lyon et réseau international GABRIEL	Lyon et réseau mondial	pérenne

- Définition de l'échantillon de souches isolées

Cowpox virus CPXV Calais C09-1	<i>Poxviridae</i> <i>Orthopoxvirus</i>	2009/02
Cowpox virus CPXV Calais C09-2	<i>Poxviridae</i> <i>Orthopoxvirus</i>	2009/02
Cowpox virus CPXV Lille L09-1	<i>Poxviridae</i> <i>Orthopoxvirus</i>	2009/02
Cowpox virus CPXV Lille L09-2	<i>Poxviridae</i> <i>Orthopoxvirus</i>	2009/02
Cowpox virus CPXV Lille L09-3a	<i>Poxviridae</i> <i>Orthopoxvirus</i>	2009/02
Cowpox virus CPXV Lille L09-3b	<i>Poxviridae</i> <i>Orthopoxvirus</i>	2009/02
Cowpox virus CPXV Lille L09-4b	<i>Poxviridae</i> <i>Orthopoxvirus</i>	2009/02
Cowpox virus CPXV Lille R09-1	<i>Poxviridae</i> <i>Orthopoxvirus</i>	2009/02
Cowpox virus CPXV Lille L09-5a	<i>Poxviridae</i> <i>Orthopoxvirus</i>	2009/03
Cowpox virus CPXV Lille L09-5b	<i>Poxviridae</i> <i>Orthopoxvirus</i>	2009/03
Cowpox virus CPXV Nancy N09-1	<i>Poxviridae</i> <i>Orthopoxvirus</i>	2009/03
Cowpox virus CPXV Metz Biopsie cou	<i>Poxviridae</i> <i>Orthopoxvirus</i>	2010/08
Cowpox virus CPXV Poitiers Biopsie oreille	<i>Poxviridae</i> <i>Orthopoxvirus</i>	2010/06
Cowpox virus CPXV Bordeaux CEPAD 327	<i>Poxviridae</i> <i>Orthopoxvirus</i>	2010/10
Cowpox virus CPXV Montbéliard Cepad 331	<i>Poxviridae</i> <i>Orthopoxvirus</i>	2011/06
Cowpox virus CPXV Epinal Cepad 332	<i>Poxviridae</i> <i>Orthopoxvirus</i>	2011/09
Cowpox virus CPXV Epinal Cepad 333	<i>Poxviridae</i> <i>Orthopoxvirus</i>	2011/09
Cowpox virus CPXV Epinal Cepad 335	<i>Poxviridae</i> <i>Orthopoxvirus</i>	2011/10
Cowpox virus CPXV Epinal Cepad 336 I	<i>Poxviridae</i> <i>Orthopoxvirus</i>	2011/10
Cowpox virus CPXV Tourcoing CNR 023-2012	<i>Poxviridae</i> <i>Orthopoxvirus</i>	2012/09
Cowpox virus CPXV Metz CNR 025-2012	<i>Poxviridae</i> <i>Orthopoxvirus</i>	2012/10
Orf virus ORFV Angers CNR 14-01	<i>Poxviridae</i> <i>Parapoxvirus</i>	2014/01

- Analyse de la distribution des différents types d'agents caractérisés en fonction des critères pertinents (âge, sexe, géographie) et analyse des tendances



Les souches de Cowpoxvirus isolées par le laboratoire de Virologie depuis 2009 sont réparties en France selon les zones hachurées sur la carte ci-contre.

Toutes les personnes infectées sont des jeunes de moins de 30 ans en particulier des enfants au contact de rats d'animalerie en provenance Europe de l'Est et/ou d'animaux sauvages et jeunes vétérinaires ayant pris en charge les cadavres d'animaux.

Il a été noté que toutes ces personnes n'ont pas été vaccinées contre la variole.

Par ailleurs, les patients infectés par le virus Orf étaient de la région Parisienne et d'Angers (zones hachurées en blanc sur la carte).

3.2 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux

- Définition de l'échantillon de souches testées

Néant

- Définitions utilisées pour exprimer la résistance

Néant

- Résultats : distribution en fonction des critères pertinents

Néant

- Analyse des tendances

Néant

3.3 Participation aux réseaux de surveillance

- Contribution à la surveillance nationale en interface avec l'InVS.

L'échange des données concernant les isolement ou détections d'Orthopoxvirus se fait en temps réel avec l'InVS.

- Contribution aux réseaux de surveillance internationaux, en particulier européens :

Les réseaux auxquels le CNR est associé : GHSAG (Global Health Security Action Group) du G7, le Robert Koch Institut pour des activités d'expertise, envoi de données, participation aux exercices. Le CNR est représenté auprès de l'ENIVD par Isabelle Leparc-Goffart du CNR Arbovirus. Envoi d'ADN viraux au réseau EVA.

3.4 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

- Décrire pour chacune de ces études : (i) les objectifs de l'enquête, (ii) les partenaires, (iii) la contribution du CNR, (iv) l'état d'avancement et (v) principaux résultats le cas échéant ou renvoi à une publication. *Exemples: Étude de la couverture immunitaire et de son évolution, Enquêtes cas-témoins pour identifier des facteurs de risque, Étude pour mesurer des incidences ; Facteurs associés à la survenue d'un sous type particulier, d'un type de résistance*

Néant

4 Alerte

- Décrire la procédure d'alerte de l'InVS et de la DGS en cas de détection de phénomène anormal, les événements ayant fait l'objet d'un signalement ou d'une alerte au cours de l'année

Tous les échantillons des cas suspects nous ont été transmis par les CHU après appel par l'InVS ou contact direct par les biologistes des CHU. Les résultats sont systématiquement transmis en temps réel à notre correspondant de l'InVS. En revanche, lorsqu'il s'agit de virus en dehors de la famille des Orthopoxvirus, la transmission n'est pas faite en temps réel.

Les délais de rendu des résultats sont très courts après réception par le laboratoire des échantillons biologiques.

- Détection et investigation des cas groupés et des phénomènes anormaux Brève description des événements détectés et investigués en décrivant les apports du CNR (détection, comparaison de souches, expertise...)
- Analyser des tendances et le fonctionnement du système lors de l'alerte

Cette année a été calme pour les Orthopoxvirus, donc les contacts directs avec l'InVS ont été espacés. En revanche, le système d'alerte est opérationnel.

5 Activités d'information, de formation et de conseil

- Enseignements, formations aux professionnels de santé, accueil de stagiaires

Le CNR participe aux enseignements suivants Master Pro NRBC de l'Ecole du Val-de-Grâce, Centre de formation civilo-militaire NRBC-E d'Aix en Provence.

Le CNR participe aux formations « Biotox-biosécurité » mises en œuvre chaque année. Sa participation consiste à sensibiliser les praticiens et techniciens hospitaliers du SSA au risque que représentent les Orthopoxvirus, ainsi qu'à leur formation à l'utilisation du kit diagnostique par PCR en temps réel développé au laboratoire. Pour cela, le CNR organise des sessions pratiques au cours desquelles les stagiaires réalisent eux-mêmes les analyses. Les stagiaires sont également formés à l'utilisation des structures confinées qu'exige la manipulation de ces virus. Cette année la formation pratique a été interrompue en raison de la réorganisation de l'IRBA (Institut de Recherche Biomédicale des Armées)

- Lister les guides élaborés (contenu, modes de diffusion)

Le CNR a rédigé une fiche de présentation de son activité ainsi qu'une fiche d'accompagnement des échantillons, en cas de demande d'analyses, qui sont largement distribués dans les hôpitaux militaires et civils. Ils sont accessibles sur l'onglet CNR du site du Val-de-Grâce.

- Décrire les modalités de diffusion des données de surveillance et production du CNR
 - (i) La rétro-information aux partenaires est réalisée dans les plus brefs délais par téléphone, courriel et courrier.
 - (ii) Diffusion aux professionnels : le site internet (www.ecole-valdegrace.sante.defense.gouv.fr/.../irba-cnr/orthopoxvirus, créée en fin 2013, est actualisé annuellement, le dernier rapport d'activité a été mis en ligne le 10/01/2014)

- Décrire les activités de conseil aux professionnels (organisation du CNR pour réceptionner les appels ou emails, volume d'activités...)
Le CNR est disponible 24h/24 et 7j/7 pour tout conseil par courriel, par téléphone, les jours ouvrés. Une permanence est mise en place pour assurer un fonctionnement en cas d'urgence. Lorsque le CNR est destinataire d'une demande d'analyse, des contacts téléphoniques et par courriel s'en suivent systématiquement avec le demandeur. Ce jusqu'à la diffusion du résultat final par fax. Le CNR s'assure toujours de l'arrivée des résultats définitifs dans le service demandeur par téléphone avant de clore le dossier en question.
- Lister les activités d'expertises auprès du ministère chargé de la santé, de l'Institut de veille sanitaire, des agences de sécurité sanitaire, de l'Haute Autorité en Santé ou de structure européenne (ECDC...) ou internationale (OMS...)

Le CNR informe l'InVS par mail à chaque fois qu'il diagnostique un virus à déclaration obligatoire (Orthopoxvirus).

6 Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR

6.1 Décrire les activités de recherche en cours notamment ceux ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR.

1- Mise au point d'une méthode de microscopie électronique permettant de visualiser les particules virales d'Orthopoxvirus

Objectifs : disposer d'une méthode simple et reproductible d'identification d'orthopoxvirus par microscopie.

Les Drs D.Spehner et Anne-Laure Favier ont développé une méthode l'an passé qui a permis la détection des particules virales d'Orthopoxvirus par microscopie électronique dans les échantillons biologiques à expertiser. L'échantillon biologique est inactivé par les UV et un agent intercalant de l'ADN (psoralène). Les grilles sont réalisées à partir de Cuivre+Formvar, l'échantillon est contrasté par coloration négative à l'acétate d'uranyl.

2- Etude de protection du vaccin anti-variolique en cas d'infection cowpox d'un modèle animal murin

Objectif : tester l'impact de l'arrêt de la vaccination anti-variolique sur la protection vis-à-vis des Orthopoxvirus émergents. Le Dr JM CRANCE a montré que la vaccination de la souris immunocompétente (BALB/c ByJ) par scarification avec le vaccin de première génération (virus de la vaccine, souche Lister) ou le candidat vaccin MVL (Modified Vaccinia virus Lister strain – en cours de développement au laboratoire) protège l'animal de l'infection cutanée et induit des réponses immunitaires humorales et cellulaires spécifiques du Cowpoxvirus.

Ce travail démarré en 2012 s'est poursuivi en 2013. Ce travail devrait donner lieu à une publication au cours de l'année 2014.

3- Développement d'une méthode permettant de séquencer un orthopoxvirus directement à partir d'un surnageant de culture.

Objectif : gagner du temps pour l'identification précise de la souche.

Les Drs C Peyrefitte, O Ferraris et M Bessaud, ont testés différentes conditions opératoires afin d'optimiser la préparation de l'échantillon viral afin de séquencer directement le génome viral à l'aide d'un séquenceur de nouvelle génération Ion Torrent. Ce travail n'est pas encore abouti.

4- Etude structurale des protéines du complexe de réplication des orthopoxvirus

Objectifs : comprendre la structure du complexe de réplication du virus de la vaccine, modèle d'étude

du virus de la variole, afin de développer de nouvelles voies antivirales, notamment des molécules inhibant l'interaction protéine/protéine.

Les Dr F Iseni et C Richefeu sont en charge de ce projet.

5- Valorisation du candidat vaccin antivariolique MVL

Objectif : continuer à valider le candidat vaccin MVL et développer de nouvelles applications.

Les Dr A Ferrier-Rembert et C Peyrefitte développent un candidat vaccin multi valent Variole/Ebola ; Variole/Fièvre hémorragique de Crimée-Congo et Variole/Fièvre de la vallée du Rift.

6.2 Les publications et communications réalisées ou prévues en lien avec les activités du CNR

(i) *Publications nationales,*

(ii) *Publications internationales,*

-Crystal structure of the vaccinia virus DNA polymerase holoenzyme subunit d4 in complex with the a20 N-terminal domain. Contesto-Richefeu C, Tarbouriech N, Brazzolotto X, Betzi S, Morelli X, Burmeister WP, Iseni F. PLoS Pathog. 2014 Mar 6;10(3):e1003978. doi: 10.1371/journal.ppat.1003978. eCollection 2014 Mar.

-Low-resolution structure of vaccinia virus DNA replication machinery. Sèle C, Gabel F, Gutsche I, Ivanov I, Burmeister WP, Iseni F, Tarbouriech N. J Virol. 2013 Feb;87(3):1679-89. doi: 10.1128/JVI.01533-12.

-Concomitant human infections with 2 cowpox virus strains in related cases, France, 2011. Ducournau C, Ferrier-Rembert A, Ferraris O, Joffre A, Favier AL, Flusin O, Van Cauteren D, Kecir K, Auburtin B, Védy S, Bessaud M, Peyrefitte CN.

(iii) *Communications nationales,*

(iv) *Communications internationales,*

(v) *Conférences sur invitations.*

7 Coopération avec les laboratoires de santé animale, d'hygiène alimentaire, environnementaux

- Coopération avec les laboratoires de santé animale et d'hygiène alimentaire dont les LNR
- Échanges techniques entre le CNR et le LNR ? (préciser échanges de souches, échanges méthodologiques...)
- Projets partagés (études, comité scientifique, groupe de travail ou d'experts .. ?) où le CNR et le LNR apportent et échangent leur expertise
- Si les collaborations entre le CNR et le LNR ne sont pas effectives, préciser les perspectives et/ou conditions de renforcement des liens

Des contacts avaient été établis avec le LNR, des échanges de techniques ont eu lieu, une réunion est envisagée afin de renforcer les liens.

8 Programme d'activité pour les années suivantes

- 1- **Programme de séquençage du génome complet de souches de Cowpox virus isolées en France.**

Afin d'améliorer nos connaissances en matière de répartition des souches de cowpox virus en

France et de vérifier la coexistence de souches différentes, nous avons initié en 2012 un travail de séquençage sur le génome complet de certaines de nos souches acquises depuis 2009. Ce travail évolue vers le projet décrit plus haut.

2- Programme de recherche d'une nouvelle thérapie anticancéreuse en utilisant un virus dérivé du virus de la vaccine.

Depuis deux ans, le CNR quantifie les ADN d'orthopoxvirus infectant des tumeurs malignes de différents stades, par une équipe de cancérologues de Nice. Leurs recherches portent sur un projet étudiant les effets de virus de la vaccine génétiquement modifiés à des fins thérapeutiques sur des cellules de cultures primaires de cancer du sein. Le CNR propose de développer une méthode de titration du virus dans les cellules après infection par PCR quantitative. Ce projet se poursuivra.

3- Programme de développement d'un outil de diagnostic sérologique permettant de distinguer les Orthopoxvirus entre eux.

Le CNR a démarré ce programme afin d'obtenir un diagnostic ELISA permettant de distinguer les Orthopoxvirus les uns des autres. Les difficultés rencontrées orientent le CNR vers une nouvelle approche dans la production d'anticorps monoclonaux en collaboration avec un laboratoire de biotechnologie au sein même de l'IRBA.

4- Déménagement du CNR Orthopoxvirus du site de Lyon vers Brétigny sur Orges en 2015

Le laboratoire de virologie, dont le CNR Orthopoxvirus fait partie, va être relocalisé sur Brétigny sur Orges. Le CNR disposera des infrastructures permettant la poursuite complète de ses activités de diagnostic et de surveillance. Toutes les activités de recherches seront regroupées sur ce site.

Les autorisations auprès de l'ANSM sont effectives. Par ailleurs les déclarations auprès de l'OMS par le ministère de la défense des plasmides de la variole ont été renouvelées en avril 2014.

Annexe 1 : Missions & organisation du CNR

1.1 Rappel des missions et objectifs majeurs du CNR et des laboratoires associés

L'Unité de virologie de l'IRBA, a développé une recherche sur les Orthopoxvirus depuis 2001 sous l'angle de la prise en compte du risque Biologique intentionnel par la défense. Par ailleurs, l'évolution des menaces a conduit l'unité à élargir sa thématique aux virus hautement pathogènes, en particuliers ceux de classe 4. Actuellement, il s'agit de développer et de mettre en place des moyens de lutte efficaces contre le virus de la variole : la recherche de nouveaux antiviraux et de vaccins antivarioliques dénués d'effets adverse ainsi que d'améliorer les méthodes de détection et de diagnostic.

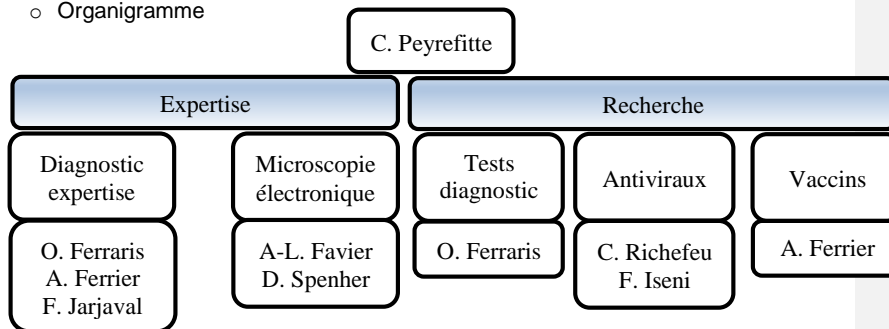
Dans ce cadre, la mission principale du CNR *Orthopoxvirus* est de participer à la protection des forces armées et de la population nationale contre les risques sanitaires qui pourraient être occasionnés par le virus de la variole (risque intentionnel) et par les autres Orthopoxvirus pathogènes (risque naturel).

1.2 Description détaillée de l'équipe:

o Equipe et fonction

NOM	Fonction	ETP-CNR	Qualification	Statut	Organisme payeur	Localisation
Christophe Peyrefitte	Chef du laboratoire	10%	PhD, PharmD, HDR	Permanent	Ministère de la Défense	Lyon
Olivier Ferraris	Chef de projet	50%	PhD	Permanent	Ministère de la Défense	Lyon
Audrey Ferrier-Rembert	Chercheur	40%	PhD	Permanent	Ministère de la Défense	Lyon
Fanny Jarjaval	Technicien	40%	Tech	Permanent	Ministère de la Défense	Lyon
Frédéric Iseni	Chef de projet	5%	PhD	Permanent	Ministère de la Défense	Grenoble
Céline Richefeu	Chercheur	5%	PhD	Permanent	Ministère de la Défense	Grenoble
Anne-Laure Favier	Chercheur	10%	PhD, PharmD	Permanent	Ministère de la Défense	Grenoble/Lyon
Danièle Spohner	Expert référent Microscopie électronique	30 jours	PhD	Vacataire	Ministère de la Défense	Grenoble

o Organigramme



1.3 Description détaillée des locaux et de l'équipement (du CNR et laboratoires associés) en renseignant notamment les items suivants : surface, plan, principaux équipements.

L'unité de virologie a accès à des laboratoires de niveau 2 (convention avec la Fondation Mérieux), 3 et 4 (convention avec l'INSERM).

Les personnes suivantes sont habilitées à travailler en laboratoire P4 sur le site de Lyon : C. Peyrefitte, O. Ferraris, A. Ferrier-Rembert, F. Jarjaval, A-L. Favier.

Surface locaux

- P4 : 100 m² dont 1 Animalerie A4, utilisation de scaphandres
- P3 : 20 m²
- P2 : 10 m²
- Laboratoire de cultures cellulaires : 10 m²
- 1 laboratoire biologie moléculaire : 10 m²
- 1 laboratoire classique : 10 m²
- 1 Laboratoire machines (Ligtcyclser, Abiprism, Appareils à PCR...) : 12 m²
- 1 laboratoire congélateur : 10 m²
- Animalerie A2 :

Principaux équipements

- Magnapure
- Microscope électronique
- Lightcycler : 2
- Abiprism
- Appareils à PCR : 2
- Centrifugeuses : 5 (paillasse), 2 (P3), 1 ultracentrifugeuse (P4)
- Etuves : 4 (P2), 1 (P3), 1(P4)
- Broyeur de tissus 1 (P2), 1 (P4)
- Microscope à fluorescence : 1 (P4), 1 (P2)
- PSM : 2 (P2), 1 (P3), 2 (P4)
- Lecteur ELISA : 1 (P2), 1 (P4)
- Congélateurs -80°C sous alarme : 2
- Congélateurs – 20°C sous alarme : 2
- Pièce froide
- Hotte chimique

1.4 Description de la démarche qualité du laboratoire : GBEA, participation à un contrôle de qualité externe, programmes, accréditation, certification,...

L'unité est contrôlée par l'ANSM, à ce titre sont respectées les normes correspondantes aux MOT et en particulier les BPL en matière de gestion de stock, de procédures de mise en œuvre des techniques et des opérations concourant au diagnostic des Orthopoxvirus. Le laboratoire a rédigé des procédures référencées et validées permettant le suivi et le contrôle des modes opératoires. La confidentialité des résultats consignés dans un registre est assurée par son stockage sécurisé.

Par ailleurs, il reste à mettre en organiser un suivit automatique et informatique de l'ensemble de ces activités.

Le laboratoire participe aux exercices du réseau biotox/piratox, du Robert Koch Institut et du GSHAG. Des échantillons inconnus accompagnés d'un scénario sont adressés aux laboratoires pour identification. Au cours de ces exercices nationaux, européens et internationaux, compte tenu du risque potentiel de la Variole, le diagnostic des Orthopoxvirus est toujours réalisé en première intention. Le tableau ci-dessous décrit les exercices auxquels a participé le CNR pendant l'année 2013.

- GHSAG n°1
- GHSAG n°2

date réception 15/11/2013
date réception 02/12/2013

- RKI 2nd external Quality Assurance

date réception 16/09/2013

Concernant les accréditations et certifications, la direction de l'IRBA a été informée de l'obligation de cette démarche. Le CNR étudie la possibilité d'obtention de moyens afin de démarrer au plus vite.

Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

1.0 Liste des techniques de référence: diagnostic/identification, typage, évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux :

1-Diagnostic de genre orthopoxvirus / Identification de l'espèce variole

Travaux de Scaramozzino et al, 2007, Clin. Chem

Technique de PCR en temps réel.

Technique validée sur light cycler et ABI prism

Identification portant sur le gène A27L (gène de la protéine de fusion)

Utilisation d'amorces consensus (en 1 étape)

Utilisation de 2 sondes pour identification du genre orthopox et de l'espèce variole

Amorces (5'-GCCAGAGATATCATAGCCGCTC-3' ;5' CAACGACTAACTAATTTGGAAAAAAGAT-3')

Sondes consensus orthopoxvirus (5'-TTTTCCAACCTAAATAGAACTTCATCGTTGCGTT-3')

Sondes spécifique variole (5'-TTTTCCAACCTAAATAGAACGTCATCATTGCGTT-3')

2-Diagnostic spécifique de l'espèce virus de la variole

Travaux de Ibrahim et al., 2003, J Clin Microbiol

Identification portant sur le gène A56R (gène de l'hémagglutinine)

Technique de PCR en temps réel.

Technique validée sur light cycler

Les témoins positifs (plasmides contenant le gène A56R) possèdent des sites spécifiques permettant de réaliser un contrôle interne par PCR en temps réelle pour vérifier la non contamination des échantillons cliniques par les témoins positifs.

3-Diagnostic spécifique de l'espèce monkeypox virus

Travaux de Kulesh et al.,2004, Lab. Investigation

Identification de deux gènes N3R et F3L

Technique de PCR en temps réel.

Technique validée sur ABI prism et LC.

4-Séquençage du gène A56R :

Travaux de Garcel et al, 2009, Vaccine (Voir publications)

Amplification du gène A56R, séquençage puis analyse par analogie de séquences pour identifier le genre et l'espèce ainsi que la souche virale.

(www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi.)

Construction d'arbre phylogénétique (Clustalw)

Amorces

A56R-FOR:5'-3' GCTGTCTTTCCTAAACCAG

A56R-REV:5'-3' GGTAACACGTGACCATTATC

5- Diagnostic spécifique de l'espèce cowpox virus:

Travaux de E.V.Gravilova et al, 2010, Journal of Clinical Virology, 49.

Identification portant sur le gène D11L.

Technique de PCR en temps réel.

Technique validée sur LC et Abi Prism.

6- Diagnostic spécifique du genre Parapoxvirus :

Travaux de A. Nitsche et al., 2006, ClinChem 52, n°2.

Identification portant sur le Gène B2L.

Technique de PCR en temps réel

Technique validée sur ABI Prism.

Récupération d'une souche Orf auprès de notre collaborateur R.Drillien et construction d'un plasmide témoin positif pour cette technique de qPCR (clonage de 487 pb du gène B2L) dans pGem-T.

7- Diagnostic spécifique de l'espèce Orf :

Travaux de D.P.Bora et al, 2011, Journal of Virological Methods 178.

Identification portant sur le Gène de l'ADN polymérase.

Technique de PCR en temps réel

Technique validée sur LC.

8- Diagnostic spécifique de l'espèce Molluscum contagiosum (Molluscipoxvirus) :

Travaux de J.P.Trama et al, 2007, Journal of Clinical Virology 40.

Identification portant sur les gènes p43K et MC080R.

Techniques de PCR en temps réel.

Technique validée sur LC.

1.1 Liste des marqueurs épidémiologiques disponibles

néant

1.2 Collections de souches, antigènes ou immun-sérums de référence :

- o Description : nombre de souches, caractérisation

Virus	Souches	Classe	
Vaccine	Western-reserve IHD-J Lister Lister VACV107 (Genbank DQ121394) Copenhague Lederchorioallantoic LED Ankara Modified Virus Ankara MVA Baxter (delete en gène <i>D4R</i>) Rabbitpox virus	2	
Monkeypox virus	MSF#6 MSF#10 Copenhague	3	Numéro ANSM ADE-027872013-4
Cowpox virus	Brighton red BiberV940/97 Catpox (Genbank AF377885) Épidémie France 2009 (Genbank FJ79031)	2	
Camelpox virus	CP5 Dubaï	2	
Mouse poxvirus	Ectromelie MP1 Ectromelie MP2 Ectromelie MP3 Ectromelie MP4 Ectromelie EMVBUL Ectromelie EMVMOS Moscow12/85 Ectromelie EMVMH Mill Hill12/85	2	

Commenté [OF2]: compléter le tableau avec nouvelles souche

Le laboratoire détient aussi des acides nucléiques de virus de la variole comme outils pour le diagnostic (CDC reference : CID-R032937-00). Numéro ANSM : demande en cours 0113 du 11/01/2013) fournis par le Center for Disease control and prevention (CDC, Atlanta, USA). Les gènes détenus sont les suivants : A27L, E9L et A56R du virus de la variole souche minor garcia et du virus de la variole souche Bangladesh.

- o Conditions de stockage

Selon la réglementation des MOT et des BPL, les collections sont stockées à -80°C, dans des

congélateurs mis sous alarme localisés dans des pièces à accès restreint. Compte tenu du déménagement, une partie du stock est sur le site de Gerland, une autre est sur le site de la DGAMNRBC de vert le petit

- o Conditions de mise à disposition de ces collections

Les différentes souches d'orthopox virus seront à la disposition des différents laboratoires dans le cadre d'une autorisation de l'AFSSAPS et de l'InVS ainsi que toute autorité supérieure.

1.3 Liste des techniques (diagnostic/identification, typage, sensibilité aux anti-infectieux...) recommandées par le CNR

Diagnostic de genre orthopoxvirus / Identification de l'espèce variole

Travaux de Scaramozzino et al, 2007, Clin. Chem

Technique de PCR en temps réelle.

Technique validée sur light cycler et ABI prism

Identification portant sur le gène A27L (gène de la protéine de fusion)

Utilisation d'amorces consensus (en 1 étape)

Utilisation de 2 sondes pour identification du genre orthopox et de l'espèce variole

Amorces (5'-GCCAGAGATATCATAGCCGCTC-3' ; 5' CAACGACTAACTAATTTGGAAAAAAGAT-3')

Sondes consensus orthopoxvirus (5'-TTTTCCAACCTAAATAGAAGTTCATCGTTGCGTT-3')

Sondes spécifiques variole (5'-TTTTCCAACCTAAATAGAACGTCATCATTGCGTT-3')

Le kit de détection (Kit de dépistage in vitro d'orthopoxvirus) est produit par la pharmacie centrale des armées et distribué aux hôpitaux du réseau Biotox.

Les témoins positifs (plasmides contenant une partie du gène A27L) possèdent des sites spécifiques permettant de réaliser un contrôle interne par PCR en temps réelle pour vérifier la non contamination des échantillons cliniques par les témoins positifs.

