

**Plan du rapport annuel
d'activité**

2015

**Centre de national de
référence
Des Orthopoxvirus**

**Année
d'exercice**

2014

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. Le faux cas positif variole ainsi que l'organisation de l'exercice du réseau Biotox/Piratox ont constitué l'actualité de cette année d'exercice.

Dans ce cadre, l'Unité de Virologie de l'Institut de Recherche Biomédicale des Armées 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 2014, conforte l'activité du CNR en matière d'expertise dans le domaine des poxvirus : Quatre *Orthopoxvirus* non variole dont trois *cowpoxvirus* ont été détectés au laboratoire, huit souches virales du genre *Parapoxvirus* et plus spécifiquement de l'espèce *Orf* ainsi que celui d'un *Molluscipoxvirus* (espèce *Molluscum contagiosum*) ont été isolées ou mis en évidences. 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 demande d'une plus grande intégration du CNR vis-à-vis du monde hospitalier, le CNR a été relocalisé sur Lyon dans l'hôpital d'Instruction des Armées Desgenettes 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 et de la demande croissante de diagnostic différentiel, le laboratoire a étendu sa recherche à d'autres virus apparentés comme les *Parapoxvirus*, *Yatapox*.

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

Il y a eu des mouvements de personnels au cours de cette année, départ du CNR de Céline Richefeu, PhD.

Recrutement d'un personnel de statut ingénieur en cours.

Il est toujours prévu de déplacer sur Brétigny sur Orge l'activité de microscopie électronique, sous la responsabilité d'Anne-Laure Favier et Danielle Spenser, cette activité a été maintenue pour l'exercice 2014 sur Grenoble.

2-Activités d'expertise

Le CNR utilise plusieurs méthodes d'identification par amplification génique, microscopie électronique. La description des nouvelles techniques disponibles est présentée en annexe.

2.1-Évolutions des techniques au cours de l'année N

- Techniques développées ou en développement

Le laboratoire s'est doté de nouvelles techniques de détection des *Orthopoxvirus* et des poxvirus dans le but de renforcer sa capacité diagnostique et son panel apparentés : Sept PCR en temps réel pour la détection du genre *Orthopoxvirus* dont 4 pour la variole, 1 pour camelpoxvirus et 1 pour les *Orthopoxvirus* du nouveau monde.

Par ailleurs la sérologie du genre *Orthopoxvirus* a été remise en route avec succès. Celle spécifique est toujours en cours de développement par l'identification de nouveaux épitopes spécifiques.

La microscopie électronique a été maintenue sur le site de la faculté de Pharmacie de Grenoble, en attendant son transfert sur le site de Brétigny sur Orge. Les Dr Anne-Laure Favier et Danielle Spenser poursuivent cette activité, en cas de besoin.

- Techniques transférées vers d'autres laboratoires :
 - Institut Pasteur Cameroun : qPCR *Orthopoxvirus* et Monkeypoxvirus.
 - CHU de Rennes : Témoin positif qPCR ORFV.

2.2-Présenter les activités d'expertise de l'année 2014 et commenter les évolutions quantitatives et qualitatives observées en précisant notamment :

Evaluation quantitative :

- 24 prélèvements correspondant à 17 patients ont été réceptionnés, de CHU ou Hôpitaux.
- L'identification de 13 d'entre eux a conduit à l'isolement de 2 isolats de cowpox virus et de 5 souches de virus Orf.

cf : **Tableau n°1**

Evaluation qualitative :

-53% des résultats ont été rendus en moins de trois jours, 17% en moins de cinq jours et 29% en plus de 5 jours week-end et jours fériés inclus.

-Le nombre de cas traités est en augmentation par rapport à l'exercice 2013. Le recrutement est beaucoup plus large à travers la France métropolitaine, suite à des contacts téléphoniques et une meilleure visibilité du CNR via le site internet hébergé par celui de l'Ecole du Val de Grâce. Nous touchons maintenant 13 hôpitaux, c'est-à-dire la majorité du territoire métropolitain à l'exception du sud-ouest.

-Le premier cas d'infection par le virus cowpox est lié à un contact avec un chat domestique, sans griffure ni morsure. Le second précise qu'il n'y a ni contact ni morsure avec chats ou rats domestiques, le troisième cas n'a pas voulu donner d'information complémentaire.

-Les cas d'infection par le virus Orf sont liés à des contacts avec moutons lors de sacrifices liés à la fête religieuse de l'Aïd El Kebir.

-La démarche de poursuivre l'élargissement du champ d'investigation à d'autres poxvirus : les para- et mollusci-poxvirus est toujours payante. Parallèlement, nous avons tout de même renforcé 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 :

Nous venons d'obtenir un financement ANR pour le projet Replipox et avons identifié quelques molécules d'intérêt. Nous comptons donc tester certaines de ces nouvelles molécules au cours de l'année 2015-2016.

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

3 échantillons d'extrait d'ADN des souches Cowpox au laboratoire du Pr Herman Mayer pour comparaison de séquençage.

1 échantillon d'extrait d'ADN de souche Orf virus au laboratoire du Dr Lagathu pour réaliser des témoins positifs quantifiés.

Tableau n°1

Centre demandeur	Région	Date Prélèvement	Date Réception	Date Envoi Résultat	Ech_Type	Ech_CodeBarre	Résultats PCR
CH Universitaire d'Angers	(49) Pays de la Loire	06/01/2014	09/01/2014	15/01/2014	Ecouvillon sec / Liquide pustule	CNR 14,01	ORFV
Laboratoire du Chemin de fer,Lagny sur Marne	(77) Ile de France	14/04/2014	14/04/2014	18/04/2014	Ecouvillon exprimé	CNR14.02	Négatif
CH Universitaire d'Angers	(49) Pays de la Loire	18/04/2014	18/04/2014	25/04/2014	Ecouvillon exprimé	CNR14.03	OPXV
Hopital H Mondor	(94) Ile de France	09/07/2014	11/07/2014	11/07/2014	Plasma+Biopsie	CNR14,04	ORFV
CH Universitaire de Nancy	(54) Lorraine	04/07/2014	17/07/2014	24/07/2014	Biopsie cutanée	CNR14,05	CPXV
Hopital H Mondor	(94) Ile de France	07/08/2014	08/08/2014	12/08/2014	Sérum+plasma	CNR14,06	Négatif
CHD Vendée	(85) Pays de la Loire	20/08/2014	21/08/2014	22/08/2014	Biopsie+sérum	CNR14,07	CPXV
CHU Amiens	(80) Picardie	09/10/2014	15/10/2014	17/10/2014	Sérum+virocult	CNR14,08	PAPV (ORFVneg/BPSVneg)
HIA Desgenettes	(69) Rhône Alpes	25/10/2014	25/10/2014	28/10/2014	virocult gélosé	CNR14,09	ORFV
CHU St Jacques - Laboratoire de Virologie	(25) Franche-Comté	29/10/2014	30/10/2014	04/11/2014	Ecouvillon sec	CNR14,10	ORFV
CHU Grenoble - Laboratoire de Virologie	(38) Rhône Alpes	28/10/2014	03/11/2014	04/11/2014	Biopsie + Sérum	CNR14,11	ORFV
CHU Auxerre-laboratoire de biologie	(89) Bourgogne	27/10/2014	05/11/2014	05/11/2014	Ecouvillon gélosé	CNR14,12	CPXV
CHU St Jacques - Laboratoire de Virologie	(25) Franche-Comté	29/10/2014	30/10/2014	04/11/2014	Biopsie + Ecouvillon sec	CNR14,13	ORFV
CHU Grenoble - Laboratoire de Virologie	(38) Rhône Alpes	06/11/2014	10/11/2014	12/11/2014	liquide pustule	CNR14,14	ORFV
CHRU Brest - Laboratoire de Microbiologie	(29) Bretagne	14/11/2014	19/11/2014	20/11/2014	Biopsie	CNR14,15	MCOV
GHP SO site de Creil	(60) Picardie	26/11/2014	02/12/2014	03/12/2014	Biopsie+Ecouvillon	CNR14,16	Négatif
GHP SO site de Creil	(60) Picardie	09/12/2014	12/12/2014	17/12/2014	Biopsie	CNR14,17	Négatif

3-Activités de surveillance

3.2-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
Institut Pasteur du Cameroun	Transfert de technologie diagnostique	Santé humaine	Cameroun	Afrique	pérenne
Médecin Sans Frontières	Diagnostic de première intention ou de confirmation	Santé humaine	Mondial	Mondial	en cas de besoin

- Définition de l'échantillon de souches isolées

Nom de spécimen	Espèce	Nom d'isolat
CNR14,05	CPXV	CPXV-54-1405
CNR14,07	CPXV	CPXV-85-1407
CNR14,09	ORFV	ORFV-69-1409
CNR14,10	ORFV	ORFV-25-1410
CNR14,11	ORFV	ORFV-38-1411
CNR14,12	CPXV	CPXV-89-1412
CNR14,13	ORFV	ORFV-25-1413
CNR14,14	ORFV	ORFV-38-1414

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

- Infection par un *Orthopoxvirus*

- Par âge : Tous les cas ont un âge inférieur à 20 ans.

- Par sexe : 1 femme / 3 hommes.

- Infection par un *Parapoxvirus*

- Par âge : Tous les cas ont un âge supérieur à 40 ans.

- Par sexe : 4 femmes / 4 hommes.

- Répartition géographique des cas :

- Légende : Bleu : *cowpox virus* ; Rouge : *Orf virus* ; Violet : *molluscipoxvirus*.



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.

Cette année a été l'occasion d'organiser l'exercice virologique du réseau Biotox/Piratox. 24 laboratoires ont participé à cet exercice national. Des échantillons contenant des extraits d'ADN d'*Orthopoxvirus* ont ainsi pu être évalués par les laboratoires. 16 sur 24 laboratoires ont pu identifier sans erreur le genre *Orthopoxvirus*, 1 laboratoire a rendu un faux négatif, 3 laboratoires ont fait une erreur d'identification d'espèce et 4 laboratoires ne disposaient pas d'outils de diagnostic spécifique. Lors de la réunion plénière nous proposerons une méthode qui a donné les meilleurs résultats.

Il est apparu que des échantillons de milieu de culture commerciaux nouvellement achetés pour l'exercice et ne contenant pas de virus, testés négatifs par toutes nos méthodes ont été trouvés positifs par deux laboratoires utilisant les méthodes NGS. Il n'y a pas pu avoir de contaminations croisées lors de la préparation de l'échantillon car la répartition des milieux a été réalisée sous un PSM en dehors de toute manipulation d'*Orthopoxvirus*. Par ailleurs les méthodes de PCR très sensibles n'ont pas mis en évidence de traces d'ADN viral. Par ailleurs les virus identifiés ne correspondaient pas à ceux testés lors de l'exercice.

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.

Nous avons pris des contacts avec le Dr Herman Meyer de l'Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr de Munich en Allemagne, afin d'échanger des ADN viraux et d'améliorer la surveillance des *Cowpoxvirus* en Europe.

Le CNR *Orthopoxvirus* a développé un partenariat privilégié avec les laboratoires des CHU de Grenoble et de Marseille, et participe régulièrement aux réunions inter-CNR du Service de Santé des Armées afin de bénéficier de leurs réseaux.

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*

-Nous préparons une étude dans les bases militaires, utilisant les chiens militaires ainsi que les rongeurs piégés par les vétérinaires militaires comme animaux sentinelles pour les Cowpoxvirus.

-Une étude rétrospective à travers l'Europe occidentale a débuté afin d'étudier la diversité génétique des Cowpoxvirus. Il s'agit d'une coopération avec le Dr Herman Meyer de l'Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr de Munich. Une publication devrait voir le jour fin 2015.

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

Suspicion *Orthopoxvirus*

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 des résultats n'est pas faite en temps réel.

En cas de suspicion *Orthopoxvirus*, il est systématiquement indiqué au laboratoire demandeur, la nécessité de compléter le document cerfa_12218-02.

Les délais de rendu des résultats sont inférieurs à 3 jours (sans prise en compte des week-ends et jours fériés) 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.

L'exercice 2014 a vu le retour des *Orthopoxvirus* de façon sporadique.

Le système d'alerte a été mis à l'épreuve principalement dans deux configurations :

1- Le laboratoire demandeur a contacté le CNR OPXV pour connaître la procédure à mettre en œuvre lors d'une suspicion variole. Il a été constaté que l'envoi pour le diagnostic de confirmation n'est pas parvenu au CNR malgré une astreinte de week-end. L'intervention de l'InVS a permis l'envoi de l'échantillon.

Vue la sensibilité du pathogène il est important qu'un laboratoire puisse avoir toute latitude pour pouvoir envoyer un échantillon sécurisé dans les meilleurs délais au CNR.

2- La demande de réexpédition par l'InVS d'un échantillon en provenance d'un autre CNR a permis de lever une suspicion à *Orthopoxvirus*.

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 mis à jour la fiche de présentation de son activité ainsi que la fiche d'accompagnement des échantillons, en cas de demande d'analyses, qui sont largement distribués dans les hôpitaux français. 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, crée 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 et par courriel. 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 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. La méthode est au point, cependant le déménagement de cette activité sur Brétigny n'est pas encore fait en raison des retards d'avancement dans la réalisation des travaux d'infrastructure, les examens sont donc encore réalisés sur Grenoble.

2- Etude de protection du vaccin anti-variolique en cas d'infection cowpox d'un modèle animal murin et valorisation du candidat vaccin antivariolique MVL

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 avait montré que la vaccination de la souris immunocompétente (BALB/c ByJ) par le candidat vaccin MVL (Modified Vaccinia virus Lister) protégeait l'animal de l'infection cutanée par le Cowpoxvirus. La crise Ebola a réorienté ce projet vers l'utilisation du MVL comme vecteur vaccinal. Le candidat vaccin bivalent Ebola Variole a donc été avancé.

Cependant, le délai d'obtention des autorisations de l'ANSM pour l'animalerie A2 ne nous a pas permis de mettre nos protocoles durant l'exercice 2014. Nous les reconduiront soit fin 2015 soit en 2016 selon les disponibilités du laboratoire INSERM-P4 Jean Mérieux.

3- Développement d'une méthode permettant de séquencer avec la technologie NGS, un *Orthopoxvirus* directement à partir d'un surnageant de culture.

Objectif : gagner du temps pour l'identification génétique 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. Actuellement, 95% du génome peut être séquencé en un run mais pas la totalité. Cette méthode reste donc intéressante mais un peu longue. Il faut continuer à améliorer cette méthodologie.

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.

Le Dr F Iseni a fait aboutir ce projet par des publications.

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, O Ferraris 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,

- *Dermatologie infectieuse- chapitre XIV Infections par les pox et Parapoxvirus. CN. Peyrefitte, C. Ducourneau, A Ferrier-Rembert. Mourad Mokni. Elsevier Masson. Parution 08/2014*
- *Cowpox et Monkeypox. S. Duraffour, O. Ferraris, CN. Peyrefitte. Traité EMC Maladies Infectieuses, 2014*
- *Manuel de sécurité et de sûreté biologique. Rédaction d'un chapitre. Première édition 2014, SFM*
- *An atypical necrotic wound]. Brochard J, Guimard T, De Bataille S, Poiraud C, Ferraris O. Med Mal Infect. 2015 Mar;45(3):98-100*

(ii) Publications internationales,

- *C. Contesto-Richefeu, N. Tarbouriech, X. Brazzolotto, S. Betzi, X. Morelli, W. P. Burmeister, F. Iseni. (2014). Crystal structure of the Vaccinia virus DNA polymerase holoenzyme subunit D4 in complex with the A20 N-terminal domain. PLoS Pathog. 6;10(3):e1003978.*

(iii) Communications nationales,

- *W. P. Burmeister, F. Iseni. (2014). Zooming into the heart of a killer. PSB et al, 13, 1-2.*

(iv) Communications internationales,

- *Vassaux, G; Lamit, A; Drillien, R; Ducourneau, C; Peyrefitte, CN; Barthel, R; Cambien, B, Evaluation of the efficacy of different oncolytic vaccinia viruses on primary canine mammary tumour cells HUMAN GENE THERAPY Volume: 24 Issue: 12 Pages: A156-A156.*

(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

Dans le cadre de l'exercice biotox/Piratox, 2 laboratoires d'analyse des eaux ont coopéré avec le CNR.

- 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 avaient eu lieu. Nous sommes en contact avec le LNR sans avoir échangé de souche ou de méthode diagnostique.

8-Programme d'activité pour les années suivantes

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

Ce travail se poursuit en collaboration notamment avec le laboratoire de Munich.

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

Ce projet se poursuit encore actuellement avec l'Hôpital de Nice.

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

Le CNR est en mesure de diagnostiquer par sérologie les *Orthopoxvirus* sans les distinguer les uns des autres. Il a été identifié des épitopes qui vont permettre au CNR de générer des anticorps monoclonaux et seront testés pour leur spécificité.

4. Programme d'évaluation de l'outil diagnostique BioFire (filiale de bioMérieux) et en particulier du panel BioThreat.

5. Déménagement du CNR *Orthopoxvirus* du site de Lyon Gerland vers Brétigny sur Orges en 2015

Ce déménagement n'a pas eu lieu en raison des retards liés à la construction des infrastructures. Le CNR quant à lui a déménagé sur l'Hôpital d'Instruction des Armées Desgenettes afin d'améliorer sa visibilité hospitalière et sa lisibilité sur les HCL. Ce qui est le cas désormais.

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.

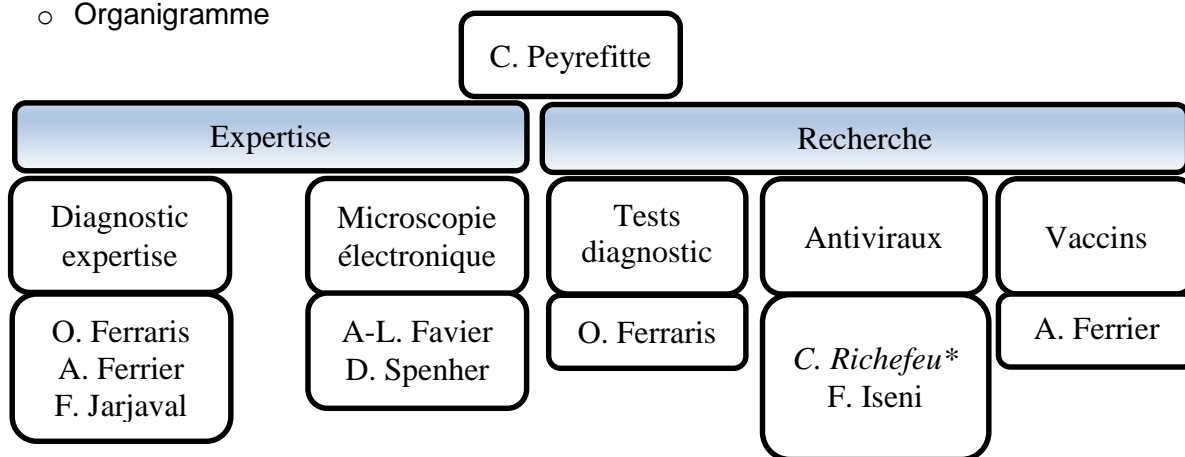
Dans ce cadre, la mission principale du CNR *Orthopoxvirus* est de participer à la protection des forces armées et de la population nationale contre les risques sanitaires qui pourraient être occasionnés par le virus de la variole (risque intentionnel) et par les autres *Orthopoxvirus* pathogènes (risque 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
<i>Céline Richefeu*</i>	<i>Chercheur</i>	<i>5%</i>	<i>PhD</i>	<i>Permanent</i>	<i>Ministère de la Défense</i>	<i>Grenoble</i>
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 (Ligtcycler, CFX96 Biorad, Appareils à PCR...) : 12 m²
- 1 laboratoire congélateur : 10 m²
- Animalerie A2 :

Principaux équipements

- Magnapure
- Microscope électronique
- Lightcycler : 2
- CFX 96 Biorad
- 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,...

Le CNR est engagé dans la démarche d'accréditation Cofrac, à ce titre il a été rédigé les processus de management, d'analyses et de support permettant le dépôt de dossier de demande initiale d'accréditation SH-form-05. Celui-ci sera adressé au Cofrac avant le 30 avril 2015.

Il comprendra notamment la soumission à l'accréditation de la technique de diagnostic différentiel Orthopoxvirus/Varirole qui représente 100% du diagnostic de première intention réalisé par le CNR Orthopoxvirus.

Nous avons une réunion d'harmonisation avec le CNR Arbovirus (de l'IRBA comme notre CNR) afin de potentialiser nos efforts.

Par ailleurs, l'unité est contrôlée par l'ANSM, dont les normes MOT et BPL sont respectées en matière de gestion de stock, de procédures de mise en œuvre des techniques et des opérations concourant au diagnostic des *Orthopoxvirus*.

Le CNR *Orthopoxvirus* participe aux exercices du réseau biotox/piratox, et internationaux du Robert Koch Institut et du GSHAG. Cette année le CNR *Orthopoxvirus* a organisé la partie virologie de l'exercice du réseau Biotox/Piratox.

Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

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

Genre/Espèce	Capacité de détection	Méthode de détection
Orthopoxvirus	Oui	qPCR – Séquençage –Isolement –Microscopie Electronique
Variola virus	Oui	qPCR – Séquençage -Isolement
Monkeypox virus	Oui	qPCR – Séquençage -Isolement
Cowpox virus	Oui	qPCR – Séquençage -Isolement
Vaccinia virus	Oui	qPCR – Séquençage -Isolement
Ectromelia virus	Oui	qPCR – Séquençage -Isolement
Molluscipoxvirus		
Molluscum contagiosum	Oui	qPCR – Séquençage
Parapoxvirus	Oui	qPCR – Séquençage –Isolement - Microscopie Electronique
Orf virus	Oui	qPCR – Séquençage -Isolement
Pseudocowpox virus	Oui	qPCR – Séquençage -Isolement
Bovine Papular Stomatitis virus	Oui	qPCR – Séquençage -Isolement
Yatapoxvirus		
Tanapoxvirus	Oui	qPCR – Séquençage -Isolement
Yaba-like disease virus	Oui	qPCR – Séquençage -Isolement

1.1 Liste des marqueurs épidémiologiques disponibles
néant

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

- Description : nombre de souches, caractérisation,

Virus	Souches	Classe	Agrément
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	

- Description : Collection de souches issues de prélèvements,

Nom	
Orthopoxvirus	
	CPXV-L09-1 Lille02/2009
	CPXV-L09-2 Lille02/2009
	CPXV-L09-3 Lille02/2009
	CPXV-L09-4 Lille02/2009
	CPXV-L09-5 Lille02/2009
	CPXV-C09-1 Calais02/2009
	CPXV-C09-2 Calais02/2009
	CPXV-N09-1 Nancy02/2009
	CPXV-R09-1 Rouvroy02/2009
	CPXV-COH2 Metz
	CPXV-Metz COSP
	CPXV-302
	CPXV-Cepad327
	CPXV-Cepad331
	CPXV-Cepad332
	CPXV-Cepad333
	CPXV-Cepad335
	CPXV-Cepad336
	CPXV-2012-023
	CPXV-2012-025
	CPXV-2014-05
	CPXV-2014-07
Parapoxvirus	
	ORFV-2012-016
	ORFV-2014-09
	ORFV-2014-10
	ORFV-2014-11
	ORFV-2014-13
	ORFV-2014-14
Molluscipoxvirus	
	MCOV-2012-031 (P0)
	MCOV-2013-Isère13 (P0)
	MCOV-2014-15 (P0)

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.

- 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.

- 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'ANSES et de l'InVS ainsi que toute autorité supérieure.