

**Plan du rapport d'activité**

**2016**

**Centre de national de référence  
des Orthopoxvirus**

**Années  
d'exercices**

**2012-2015**

## Résumé analytique

Les enjeux de santé publique liés aux orthopoxvirus pathogènes pour l'homme sont de deux ordres : le premier concerne le risque potentiel et gravissime de réémergence du virus de la variole, le deuxième concerne l'émergence d'autres orthopoxviroses comme le monkeypox et le cowpox transmis par contact avec des rongeurs infectés. L'absence d'immunité croisée depuis l'arrêt de la vaccination antivariolique est un contexte potentiellement facilitant ces transmissions à l'homme.

Suite au dernier appel à candidature pour la désignation des CNR couvrant le mandat 2012-2016 et conformément à l'arrêté ministériel en date du 26 décembre 2011 fixant la liste des centres nationaux de référence, l'Institut de Recherche Biomédicale des Armées héberge le centre national de référence des orthopoxvirus.

L'année 2015, nous a conforté sur l'importance du suivi parallèlement aux orthopoxvirus des virus d'importance vétérinaire (parapoxvirus) transmis à l'homme. Sept cas d'infection par un virus du genre parapoxvirus ont ainsi pu être détectés. L'espèce majoritaire reste l'orf virus, cependant deux cas sont reliés à l'espèce pseudocowpox virus.

La question scientifique liée aux orthopoxvirus pathogènes est liée à une meilleure connaissance de ces virus et au développement des moyens de lutte contre les maladies qu'ils provoquent. L'unité a choisi d'étudier une cible spécifique au virus : la polymérase et les protéines du complexe de réplication en tant que cibles de traitement antiviral. En parallèle, l'unité de virologie poursuit l'étude et la validation de candidats vaccins.

Pour répondre aux exigences des autorités sanitaires, le centre national de référence des orthopoxvirus est entré dans une démarche d'accréditation selon la norme ISO 15189.

## 1 Mission & organisation du CNR

### 1.1 Rappel des missions et objectifs majeurs 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, Molluscipoxvirus et Yatapoxvirus.

La description détaillée des missions et objectifs est présentée en annexe 1.

### 1.2 Organisation des équipes du CNR

En réponse à la demande de l'ex-InVS, l'activité du CNR a été stabilisée sur un hôpital : l'hôpital d'instruction des armées Desgenettes, Lyon dont la localisation est proche du P4-INSERM-Jean Mérieux.

Parallèlement, la plateforme de microscopie utilisée par le CNR a été déployée sur le site de Brétigny sur Orge sous la responsabilité d'Anne Laure Favier.

La description détaillée de l'organisation est présentée en annexe 1.

### 1.3 Organisation et description des locaux et des équipements du CNR

La description détaillée de l'organisation est présentée en annexe 1.

### 1.4 Description de la démarche qualité du laboratoire

Le CNR est engagé dans la démarche d'accréditation selon la norme ISO 15189. A ce titre ont été rédigés les processus de management, d'analyses et de support permettant le dépôt de dossier de demande initiale d'accréditation SH-form-05.

La date du premier audit n'est pas encore fixée.

L'audit interne du CNR va être réalisé via le pôle audit de l'ISSA (Inspection du Service de Santé des Armées)

## 2 Activités d'expertise

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

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

### 2.1.1 Techniques développées ou en développement

#### Identification par méthodes de Biologie moléculaire

Dans le cadre de la démarche d'accréditation selon la norme ISO 15189, nous avons décidé de réévaluer l'ensemble de nos techniques de détection par PCR.

Le laboratoire poursuit également sa politique de disposer pour chaque genre ou espèce virale à identifier d'un minimum de deux cibles génomiques. Dans ce but, trois nouvelles PCR ont été développés et renforcent la détection du virus orf, du virus de la vaccine, du virus cowpox.

La liste détaillée des PCR développés ou en cours est présentée en annexe 2.

#### Evaluation de la détection des IgM et IgG par ELISA

Les antigènes sont obtenus in situ, après inactivation de la production virale.

Revalidation des sérums témoins.

### 2.2-Activités d'expertise

#### 2.2.1 Activité exercée de 2012-2015

Activités Diagnostic/confirmation	Nombre de cas	Nombre de Prélèvements
2012	4	5
2013	3	3
2014	16	30
2015	22	33

#### 2.2.2 Résultats des analyses

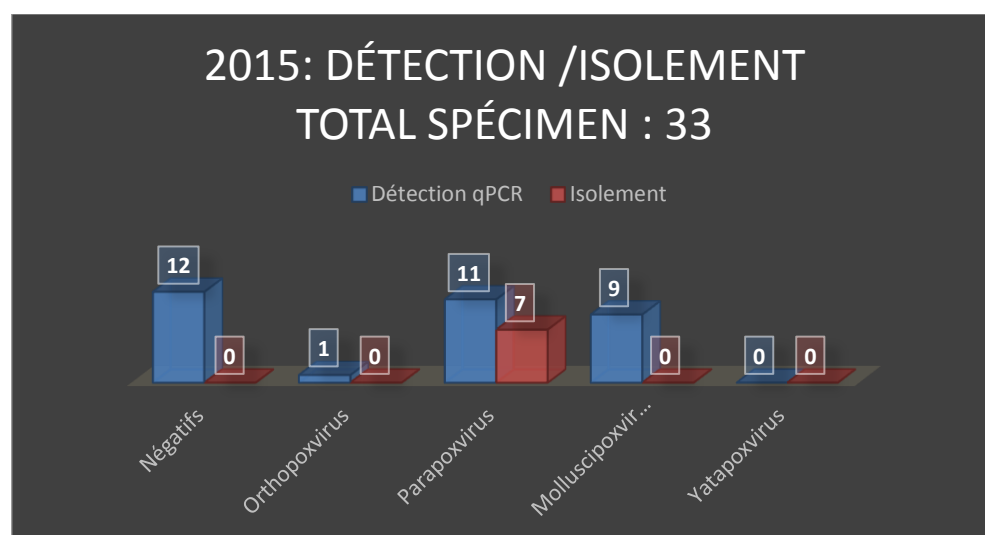
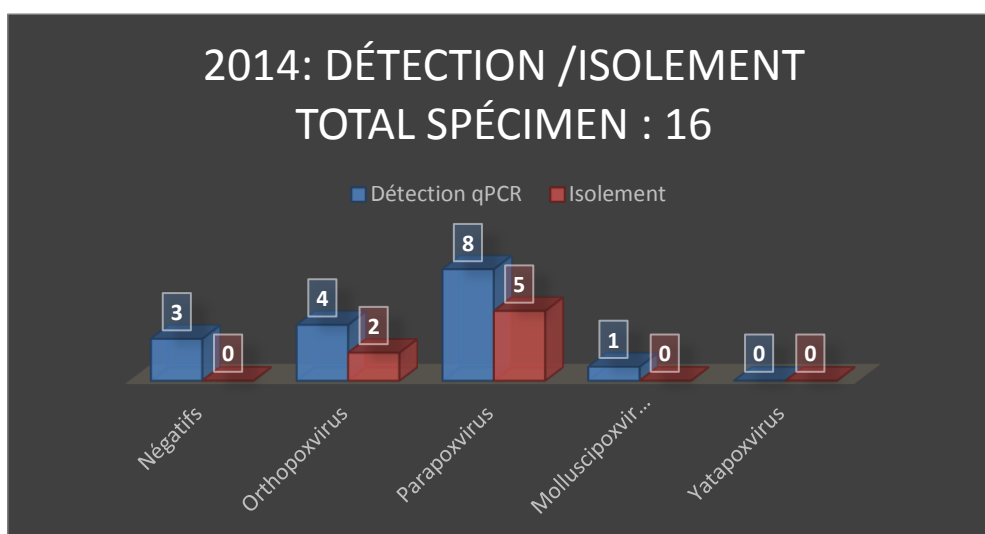
Le tableau ci-dessous représente les détections par PCR en temps réel des cas traités.

Département (Région)	Nombre de cas suspecté					Orthopoxvirus					Parapoxvirus					Molluscipoxvirus				
	2012	2013	2014	2015	Total	2012	2013	2014	2015	Total	2012	2013	2014	2015	Total	2012	2013	2014	2015	Total
02-Aisne (Picardie)	0	0	0	1	1					0					0					0
21-Côte d'or (Bourgogne)	0	0	0	2	2					0					0					0
25- Doubs (Franche Comté)	0	0	2	0	2					0		2		2						0
29- Finistère (Bretagne)	0	0	1	0	1					0				0		1				1
38- Isères (Rhône Alpes)	0	0	2	6	8					0		2		2				5		5
49- Maine-et-Loire (Pays de la Loire)	0	0	2	1	3			1		1		1	1	2						0
54- Meurthe-et-Moselle (Lorraine)	0	0	1	3	4			1		1			1	1						0
57- Moselle (Lorraine)	1	0	0	0	1	1				1				0						0
59- Nord (Nord-Pas-De-Calais)	1	0	0	0	1	1				1				0						0
60- Oise (Picardie)	0	0	1	0	1					0				0						0
67- Bas Rhin (Alsace)	0	0	0	1	1				1	1				0						0
69- Rhône (Rhône Alpes)	0	0	1	1	2					0		1	1	2						0
71- Saône et loire (Bourgogne)	0	0	0	2	2					0			1	1						0
77- Seine et Marne (Ile de France)	0	0	1	2	3					0		1		1						0
80- Somme (Picardie)	0	0	1	2	3					0			1	1						0
84- Vaucluse (Provence Alpes Côte d'Azur)	0	1	0	0	1					0				0						0
85- Vendée (Pays de la loire)	0	0	1	1	2			1		1			1	1						0
86- Poitou-Charentes (Vienne)	1	0	0	1	2					0	1		1	2						0
89- Yonne (Bourgogne)	0	0	1	0	1			1		1				0						0
94- Val de Marne (Ile de France)	1	2	2	1	6					0		1	1	2	1					1
<b>TOTAL</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>16</b>	<b>22</b>	<b>47</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>7</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>8</b>	<b>7</b>	<b>17</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>7</b>

Tout prélèvement positif en PCR est mis en culture pour tenter d'isoler le virus. Le succès de l'isolement est lié à la quantité de virus présent dans le prélèvement initial et au type de prélèvement.

Les graphiques ci-dessous représentent les détections par PCR en temps réel pour chaque prélèvement traités.

Tous les prélèvements ne sont pas utilisés pour réaliser un isolement viral. Les essais sont réalisés sur 1 prélèvement. Pour l'année 2014, 100% de réussite aurait conduit à l'obtention de 16 isolats, pour l'année 2015, 100% de réussite aurait conduit à 22 isolats.



### 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	<b>Diagnostic de première intention ou de confirmation</b>	<b>Santé humaine</b>	<b>Mondial</b>	<b>Mondial</b>	en cas de besoin

Depuis 2012, le CNR s'est attaché à développer son réseau de partenaire et de maintenir le réseau existant actif.

- Définition de l'échantillon de souches isolées de 2009 à 2015

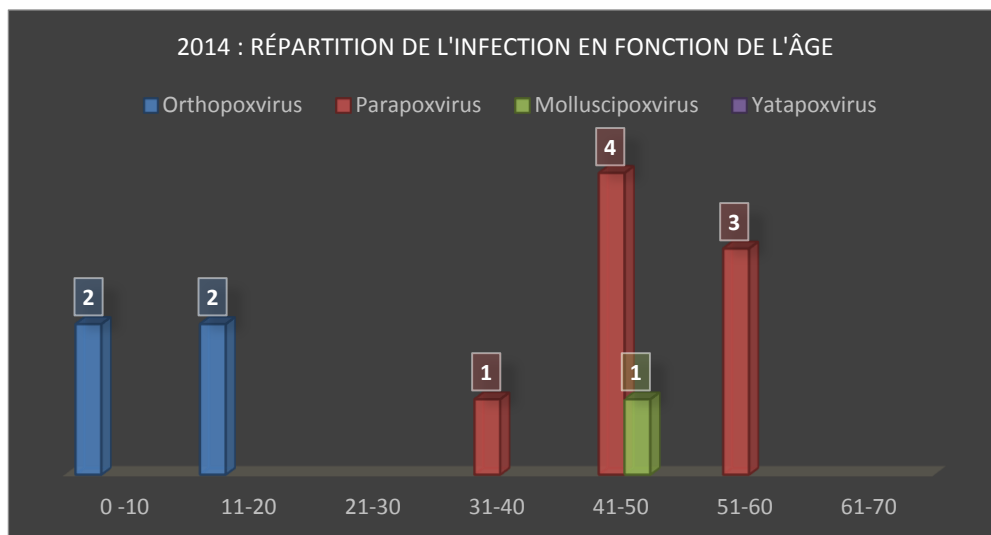
<b>Nom de spécimen</b>	<b>GENRE</b>	<b>Nom d'isolat</b>
Cowpox virus CPXV Calais C09-1	Poxviridae Orthopoxvirus	2009/02
Cowpox virus CPXV Calais C09-2	Poxviridae Orthopoxvirus	2009/02
Cowpox virus CPXV Lille L09-1	Poxviridae Orthopoxvirus	2009/02
Cowpox virus CPXV Lille L09-2	Poxviridae Orthopoxvirus	2009/02
Cowpox virus CPXV Lille L09-3a	Poxviridae Orthopoxvirus	2009/02
Cowpox virus CPXV Lille L09-3b	Poxviridae Orthopoxvirus	2009/02
Cowpox virus CPXV Lille L09-4b	Poxviridae Orthopoxvirus	2009/02
Cowpox virus CPXV Lille R09-1	Poxviridae Orthopoxvirus	2009/02
Cowpox virus CPXV Lille L09-5a	Poxviridae Orthopoxvirus	2009/03
Cowpox virus CPXV Lille L09-5b	Poxviridae Orthopoxvirus	2009/03
Cowpox virus CPXV Nancy N09-1	Poxviridae Orthopoxvirus	2009/03
Cowpox virus CPXV Metz Biopsie cou	Poxviridae Orthopoxvirus	2010/08
Cowpox virus CPXV Poitiers Biopsie oreille	Poxviridae Orthopoxvirus	2010/06
Cowpox virus CPXV Bordeaux CEPAD 327	Poxviridae Orthopoxvirus	2010/10
Cowpox virus CPXV Montbeliard Cepad 331	Poxviridae Orthopoxvirus	2011/06
Cowpox virus CPXV Epinal Cepad 332	Poxviridae Orthopoxvirus	2011/09
Cowpox virus CPXV Epinal Cepad 333	Poxviridae Orthopoxvirus	2011/09
Cowpox virus CPXV Epinal Cepad 335	Poxviridae Orthopoxvirus	2011/10
Cowpox virus CPXV Epinal Cepad 336	Poxviridae Orthopoxvirus	2011/10
Cowpox virus CPXV Tourcoing CNR 023-2012	Poxviridae Orthopoxvirus	2012/09
Cowpox virus CPXV Metz CNR 025-2012	Poxviridae Orthopoxvirus	2012/10
CNR14,05	OPV	CPXV-54-1405
CNR14,07	OPV	CPXV-85-1407
CNR14,09	PPV	ORFV-69-1409
CNR14,10	PPV	ORFV-25-1410

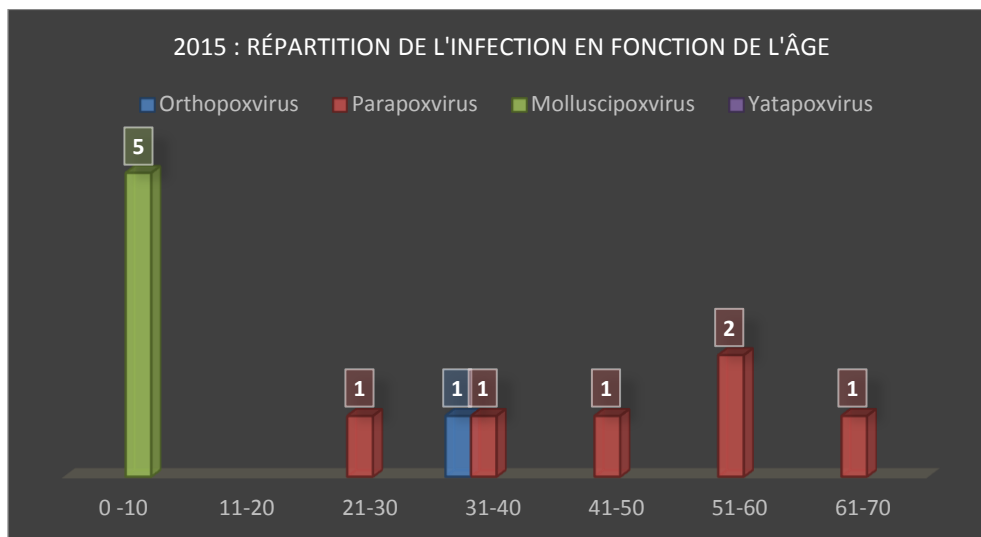


CNR14,11	PPV	ORFV-38-1411
CNR14,12	OPV	CPXV-89-1412
CNR14,13	PPV	ORFV-25-1413
CNR14,14	PPV	ORFV-38-1414
CNR15.02	PPV	ORFV-85,15.02
CNR15.03	PPV	ORFV-71,15.03
CNR15.05	MCV	MCOV-38-15.05
CNR15.06	MCV	MCOV-38-15.06
CNR15.07	MCV	MCOV-38-15.07
CNR15.09	PPV	ORFV-54-15.09
CNR15.10	PPV	PCPV-80-15.10
CNR15.11	PPV	PCPV-49-15.11
CNR15.16	MCV	MCOV-38-15.16
CNR15,17	PPV	ORFV-69-15,17
CNR15-19	MCV	MCOV-38-15-19
CNR15.22	PPV	ORFV-86-15.22

OPV : Orthopoxvirus ; PPV : Parapoxvirus ; MCV : Molluscipoxvirus.

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





Les cas de Molluscipoxvirus :

Le nombre de cas traité ne permet pas de conclure sur la relation âge/infection. Cependant, il est à noter que le patient présente des pustules depuis plus d'un an.

Les cas de Parapoxvirus :

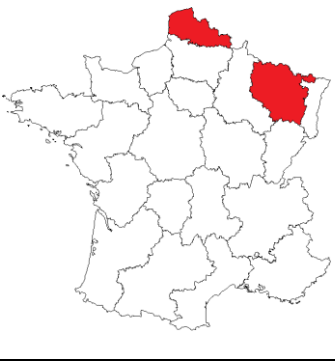



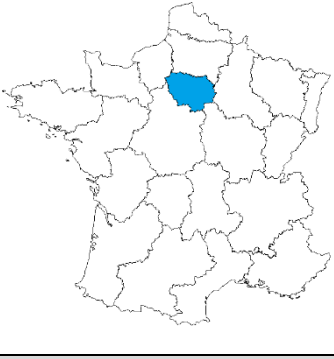

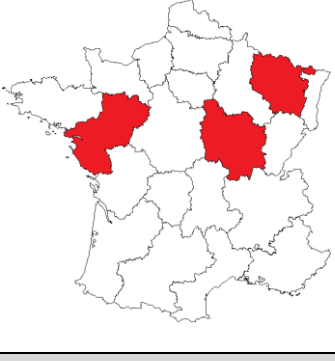
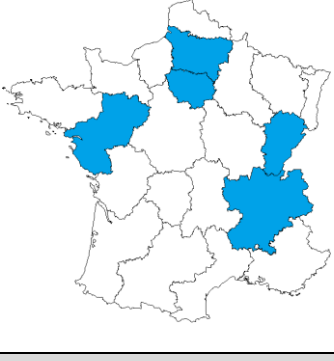


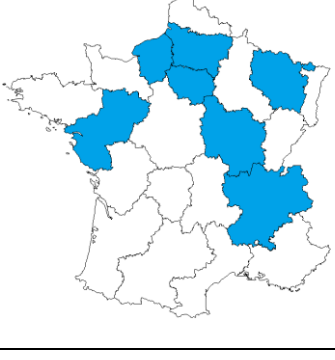
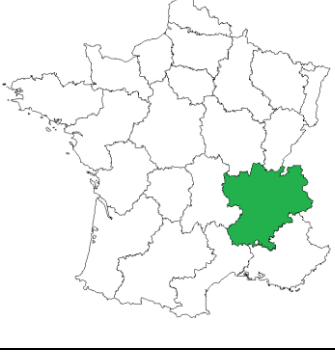
Depuis 2012, les cas d'infections à parapoxvirus sont rapportés uniquement pour des personnes âgées de plus de 18 ans. Les cas d'infections sont majoritairement reliés à des personnes travaillant directement avec des animaux (éleveurs, animaliers..) et en particulier avec des ovins. Quelques cas sont reliés avec les bovins.

Le cas d'orthopoxvirus :

Le mode de contamination à cowpox virus des différents cas traités en 2014 n'a pas été déterminé. Pour un cas, une transmission par le chat domestique sans griffure a été suspectée sans possibilité de vérification.

En 2015, le cas d'orthopoxvirus correspond à un accident de travail, puisqu'il s'agit d'une technicienne qui s'est piqué avec une aiguille infectée par le virus de la vaccine (souche vaccinale atténuée).

- Répartition géographique des cas

Répartition géographique 2012		
Orthopoxvirus	Parapoxvirus	Molluscipoxvirus
		
Répartition géographique 2013		
Orthopoxvirus	Parapoxvirus	Molluscipoxvirus
		
Répartition géographique 2014		
Orthopoxvirus	Parapoxvirus	Molluscipoxvirus
		
Répartition géographique 2015		
Orthopoxvirus	Parapoxvirus	Molluscipoxvirus
		

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

- Définition de l'échantillon de souches testées

Le laboratoire a engagé un programme d'essai pour valider les décontaminants à utiliser pour la décontamination de liquides, de matériels et de surfaces contaminée par un orthopoxviridae.

- 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.
- Partenaire du réseau Biotox/Piratox.

Contribution aux réseaux de surveillance internationaux, en particulier européens :

- 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.
- 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. Le CNR contribue par la mise à disposition des ADN viraux. Cette étude est toujours en cours.
- Mise en place de collaborations permettant la réception d'échantillons pour la détection d'orthopoxvirus avec des laboratoires hors zone Euro, dont le réseau GABRIEL. Une enquête ponctuelle a été réalisée, les échantillons ne contenaient pas d'orthopoxvirus.
- Mise en place d'une coopération avec le Dr. Mathias Büttner de l'Institute for Animal Health and foodstuff Infectious Diseases, afin de disposer d'outils de référence pour la détection du genre Parapoxvirus.

#### 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**
- En cas de suspicion Orthopoxvirus, il est systématiquement indiqué au laboratoire demandeur, la nécessité de compléter le document cerfa\_12218-02.
- Dès 2012 tous les échantillons des cas suspects d'infection par un orthopoxvirus ont fait l'objet d'un signalement à l'InVS. Les résultats sont transmis systématiquement par téléphone au prescripteur ainsi qu'au correspondant de l'InVS.
- Les résultats sont systématiquement transmis en temps réel à notre correspondant de l'InVS. Les délais de rendu des résultats sont très courts après réception par le laboratoire des échantillons biologiques.

- En revanche, lorsqu'il s'agit de virus en dehors de la famille des Orthopoxvirus, l'information est transmise uniquement au prescripteur.
- 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.
- L'exercice 2015
  - 1-Le CNR a traité un d'un d'infection avec un virus orthopoxvirus dans le cadre d'un accident du travail. Le CNR a été contacté pour une confirmation de la séroconversion du patient, ce dernier n'ayant pas été vacciné contre la variole. Ce cas a permis la remise en place des tests de sérologies au sein du CNR.
- **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.**

## 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.

En 2012 le CNR participait aux formations « Biotox-biosécurité » mises en œuvre chaque année. Sa participation consistait 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 organisait des sessions pratiques au cours desquelles les stagiaires réalisaient eux-mêmes les analyses. Les stagiaires étaient également formés à l'utilisation des structures confinées qu'exige la manipulation de ces virus. Depuis 2013, 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)**

Depuis l'exercice 2013, le CNR met 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](http://www.ecole-valdegrace.sante.defense.gouv.fr/.../irba-cnr/Orthopoxvirus), crée en fin 2013, est actualisé annuellement.
- (iii) Rapport Annuel
- (iv) Activité de conseil (doc sur internet)

- **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 téléphone/fax et par courrier. Le CNR s'assure toujours de l'arrivée des résultats définitifs dans le service demandeur par téléphone avant de clore le dossier en question.

Depuis l'exercice 2015, ces activités pré-analytique et post-analytique ont été standardisées afin de répondre aux exigences de la norme EN ISO 15189.

- **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...)**

Participation au groupe de travail du SSA pour la mise à jour du plan variole (choix de la stratégie vaccinale...)

Durant l'exercice 2015, le CNR a participé à la mise à jour de la fiche d'information variole de l'InVS, et en particulier la partie diagnostic du plan.

## 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-variologique en cas d'infection cowpox d'un modèle animal murin et valorisation du candidat vaccin antivariologique MVL**

Objectif : tester l'impact de l'arrêt de la vaccination anti-variologique 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**

### ***Publications nationales,***

Dermatologie infectieuse- chapitre XIV Infections par les pox et Parapoxvirus. CN. Peyrefitte, C. Ducournau. A Ferrier-Rembert. Mourad Mokni. Elsevier Masson. Parution 08/2014

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

Cowpox et Monkeypox. S. Duraffour, O. Ferraris, CN. Peyrefitte. Traité EMC Maladies Infectieuses, 2016

### ***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.

Burmeister WP, Tarbouriech N, Fender P, Contesto-Richefeu C, Peyrefitte CN, Iseni F. Crystal Structure of the Vaccinia Virus Uracil-DNA Glycosylase in Complex with DNA. J Biol Chem. 2015 Jul 17;290(29):17923-34.

Hutin S, Ling WL, Round A, Effantin G, Reich S, Iseni F, Tarbouriech N, Schoehn G, Burmeister WP. Domain Organization of Vaccinia Virus Helicase-Primase D5. J Virol. 2016 Apr 14;90(9):4604-13..

### ***Communications nationales,***

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

### ***Communications internationales,***

Vassaux, G; Lamit, A; Drillien, R; Ducournau, 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.

### ***Communications orales,***

O.Ferraris, A.Ferrier-Rembert, CN Peyrefitte (2015). Journées Dermatologiques de Paris 8-11 décembre 2015. Titre : Surveillance des infections à Orthopoxvirus en France en 2014

G.Vassaux, R.Drillien, C.Compain, N. Nottet, B. Mari, **C.Peyrefitte**, R.Barthel, B. Cambien. XXI International Poxvirus, Asfavirus, Iridovirus Conference, Le Bischenberg, France, 1-5 Juillet 2016. Identification of cellular resistance to oncolytic vaccinia virus using short term primary cell cultures of canine mammary carcinoma.

### ***Posters.***

***Congrès XVIIè Journées Francophone de la Virologie\_9-10 avril 2015.***

***Titre :*** Surveillance des infections à Orthopoxvirus en France en 2014

***Auteurs :*** Olivier Ferraris, Audrey Ferrier-Rembert, Isabelle Drouet, Fanny Jarjaval, Frédéric Iseni, Christophe Peyrefitte.

***Congrès XVIIè Journées Francophone de la Virologie\_9-10 avril 2015.***

***Titre :*** MVL, candidat vaccin antivariolique et vecteur vaccinal prometteur

***Auteurs :*** Audrey Ferrier-Rembert, Olivier Ferraris, Julie Dimier, Anne Laure Favier, Robert Drillien, Jean Marc Crance, Frédéric Iseni, Christophe Peyrefitte.

***Congrès XVIIè Journées Francophone de la Virologie\_9-10 avril 2015.***

***Titre :*** Structure cristallographique de l'uracile-ADN glycosylase (D4) du virus de la vaccine en complexe avec l'ADN.

***Auteurs :*** W. P. Burmeister, N. Tarbouriech, P. Fender, C. Contesto-Richefeu, C.N. Peyrefitte, F. Iseni.

***Congrès XVIII<sup>e</sup> Journées Francophone de la Virologie\_24-25 mars 2016.***

**Titre :** Les chordopoxvirinae en France, bilan de quatre années de surveillance.

**Auteurs :** Olivier Ferraris, Audrey Ferrier-Rembert, Isabelle Drouet, Fanny Jarjaval, Anne Laure Favier, Frédéric Iseni, Christophe Peyrefitte.

***Congrès XXI International Poxvirus, Asfavirus, Iridovirus Conference, Le Bischenberg, France, 1-5 Juillet 2016.***

**Titre :** Modified Vaccinia Lister (MVL), a safe and easy to produce vector for human or veterinary vaccines.

**Auteurs :** Audrey Ferrier-Rembert, Olivier Ferraris, Fanny Jarjaval, Julie Dimier, Anne Laure Favier, Jean Marc Crance, Philippe Marianneau, Sandra Lacote, Danièle Spehner, Robert Drillien, Christophe Peyrefitte.

***Congrès XXI International Poxvirus, Asfavirus, Iridovirus Conference, Le Bischenberg, France, 1-5 Juillet 2016.***

**Titre :** The Chordopoxvirinae in France, a survey of four years of monitoring.

**Auteurs :** Olivier Ferraris, Audrey Ferrier-Rembert, Isabelle Drouet, Fanny Jarjaval, Anne Laure Favier, Frédéric Iseni, Christophe Peyrefitte.

***Congrès XXI International Poxvirus, Asfavirus, Iridovirus Conference, Le Bischenberg, France, 1-5 Juillet 2016.***

**Titre :** Domain Organization of Vaccinia Virus Helicase-Primase D5.

**Auteurs :** S. Hutin, W.L. Ling, A. Round, G. Effantin, S. Reich, F. Iseni, N. Tarbouriech, G. Schoehn, W.P. Burmeister.

## 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.
- Participation Journée InVs CNR / LNR.
- Coopération avec le Dr S. Bertagnoli (Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse) pour développer l'interaction entre le CNR et le réseau vétérinaire.

## 8-Programme d'activité pour les années suivantes

- Programme de séquençage du génome complet de souches de Cowpox virus et Parapoxvirus isolées en France.
- 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.

- 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.

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

## 1- Annexe 1 : Missions & organisation du CNR

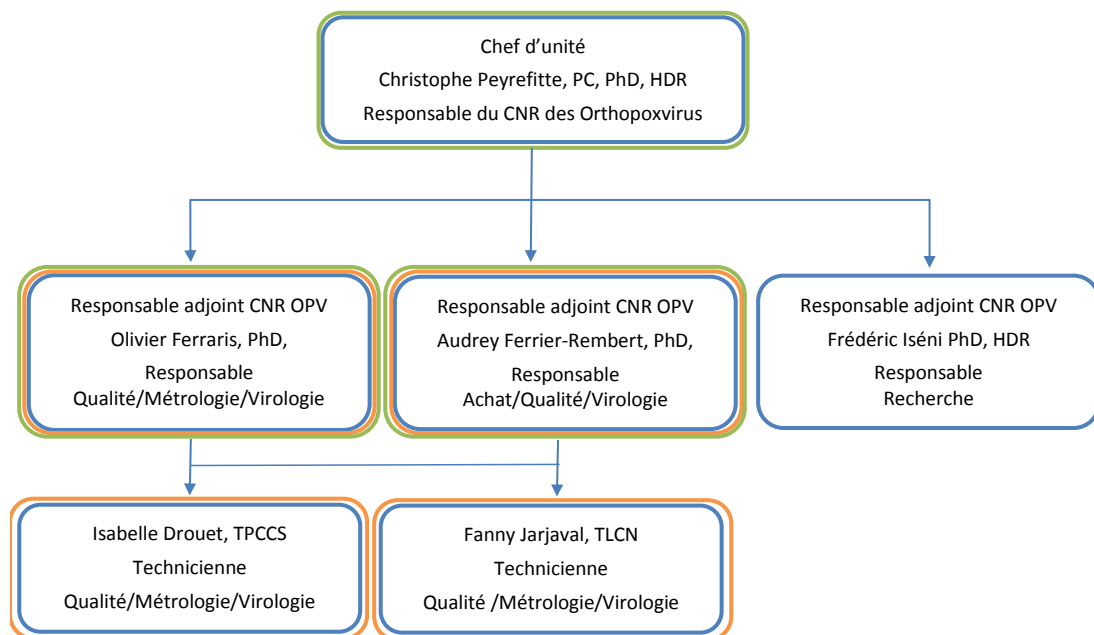
### 1.1 Rappel des missions et objectifs majeurs du CNR et des laboratoires associés

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

#### Organigramme



CNR : Centre National de Référence  
 PhD : Docteur ès Sciences  
 HDR : Habilitation à diriger les Recherches  
 PC : Pharmacien en Chef  
 TPCCS : Technicien Paramédical civil de Classe Supérieur  
 TLCN : Technicien de Laboratoire de Classe Normale

Fonctions : Pré-analytiques / Analytiques

Fonctions : Post-analytiques

### 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
Isabelle Drouet	Technicien	5%	Tech	Permanent	Ministère de la Défense	Brétigny sur Orge
Frédéric Iséni	Chef de projet	5%	PhD	Permanent	Ministère de la Défense	Grenoble
Anne-Laure Favier	Expert référent Microscopie électronique	5%	PhD, PharmD	Permanent	Ministère de la Défense	Brétigny sur Orge
Danièle Spehner	Expert référent Microscopie électronique	30 jours	PhD	Vacataire	Ministère de la Défense	Brétigny sur Orge

### 1.3 Description détaillée des locaux et de l'équipement

L'unité de virologie a accès à des laboratoires de niveau 2 (convention avec l'Hôpital d'Instruction des Armées Desgenettes).

L'unité de virologie a accès à des laboratoires de niveau 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, I. Drouet.

### **Surface locaux**

- Laboratoire NSB4 : 100 m<sup>2</sup> dont 1 Animalerie A4, utilisation de scaphandres
- Laboratoire NSB3 : 20 m<sup>2</sup>
- Laboratoire NSB2 : 29 m<sup>2</sup>
- Laboratoire NSB1 : 90 m<sup>2</sup>, dans lequel on trouve les zones de Biologie Moléculaire.

### **Principaux équipements (NSB2)**

PSM de type II  
Etuves  
Réfrigérateur  
Congélateur  
Surgélateur

### Biologie Moléculaire

Broyeur de tissus  
Centrifugeuses  
Magnapure  
Microscopes  
Thermocyclers  
Lecteur ELISA

#### 1.4 Description de la démarche qualité du laboratoire

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 a été adressé au Cofrac en juillet 2015.

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

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.

## 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
<b>Orthopoxvirus</b>	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
<b>Molluscipoxvirus</b>		
Molluscum contagiosum	Oui	qPCR – Séquençage
<b>Parapoxvirus</b>	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
<b>Yatapoxvirus</b>		
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
<b>Vaccine</b>	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	
<b>Monkeypox virus</b>	MSF#6 MSF#10 Copenhague	3	Numéro ANSM ADE-027872013- 4
<b>Cowpox virus</b>	Brighton red BiberV940/97 Catpox (Genbank AF377885) Épidémie France 2009 (Genbank FJ79031)	2	
<b>Camelpox virus</b>	CP5 Dubaï	2	
<b>Mouse poxvirus</b>	Ectromelie MP1 Ectromelie MP2 Ectromelie MP3 Ectromelie MP4	2	

Ectromelie EMVBUL		
Ectromelie EMVMOS Moscow12/85		
Ectromelie EMVMH Mill Hill12/85		

- Description : Collection de souches issues de prélèvements,

<b>Nom</b>	
<b>Orthopoxvirus</b>	
	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
<b>Parapoxvirus</b>	
	ORFV-2012-016
	ORFV-2014-09
	ORFV-2014-10
	ORFV-2014-11
	ORFV-2014-13
	ORFV-2014-14
	ORFV-85,15,02
	ORFV-71,15,03
	ORFV-54-15.09
	PCPV-80-15.10
	PCPV-49-15.11
	ORFV-69-15,17
	ORFV-86-15.22
<b>Molluscipoxvirus</b>	
	MCOV-2012-031 (P0)
	MCOV-2013-Isère13 (P0)
	MCOV-2014-15 (P0)
	MCOV-38-15.05 (P0)
	MCOV-38-15.06 (P0)
	MCOV-38-15.07 (P0)
	MCOV-38-15.16 (P0)
	MCOV-38-15-19 (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  $-80^{\circ}\text{C}$ , 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'orthopoxvirus 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.