

**Plan du rapport annuel
d'activité**

2017

Centre de national de référence

Année d'exercice

2016

Résumé analytique

Les enjeux de santé publique liés aux orthopoxvirus pathogènes sont de deux ordres : le premier concerne le risque potentiel de réémergence de la variole, le deuxième concerne l'émergence des autres orthopoxviroses comme le monkeypox et le cowpox causés par le contact avec les rongeurs infectés et facilités par l'absence d'immunité croisée depuis l'arrêt de la vaccination antivariolique.

Le CNR développe ses capacités d'expertise afin d'identifier et de caractériser les souches qui lui sont adressés. **Le CNR s'attache à diagnostiquer en plus des orthopoxvirus, les parapoxvirus, les molluscipoxvirus ainsi que les yatapoxvirus.** L'isolement des souches est réalisé dans les laboratoires de niveau de confinement adéquat, le CNR disposant d'un **accès à des laboratoires de niveau de confinement 2, 3 et 4.**

Afin d'inscrire son activité dans une démarche qualité, **le CNR a fourni un gros travail de mise en œuvre des exigences de la norme ISO EN 15189.**

Parallèlement aux activités d'expertise et de conseil, le CNR mène des recherches finalisées et plus amont, en particulier pour le développement de moyens prophylactiques et thérapeutiques. La polymérase et les protéines du complexe de réplication en tant que cibles de **traitement antiviral** sont étudiées en priorité. Parmi les moyens de lutte, la **validation de vecteurs vaccinaux** se poursuit.

L'année **2016**, conforte l'importance du suivi parallèlement aux orthopoxvirus des virus d'origine vétérinaire ayant un impact sur l'homme (parapoxvirus). **Quatre cas** d'infection par un virus du **genre parapoxvirus** ont ainsi été diagnostiqués. **Deux cas** d'infection par un virus du **genre orthopoxvirus** ont été diagnostiqués.

La candidature du CNR a été acceptée pour le **mandat 2017-2020**. Durant cette période le CNR-LE devra répondre à un cahier des charges restreint de **CNR-Laboratoire Expert** pour répondre aux **missions d'expertises et de conseil.**

1 Missions et organisation du CNR

Le CNR maintient et développe sa capacité de diagnostic des quatre genres d'orthopoxvirinae associés à des infections humaines. Le laboratoire réalise le diagnostic différentiel des genres Orthopoxvirus, Parapoxvirus, Molluscipoxvirus et Yatapoxvirus.

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

2 Activités d'expertise

2.1 Évolutions des techniques au cours de l'année 2016

- *Techniques développées ou en développement*

Revalidation de la technique sérologique.

Pas d'évolution des techniques d'identification par biologie moléculaire. Le CNR maintient sa capacité de diagnostic des orthopoxvirinae, des parapoxvirus, des molluscipoxvirus et des yatapoxvirus. Une différenciation au niveau de l'espèce est réalisée pour les orthopoxvirus et les parapoxvirus.

- *Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse : méthode, état d'avancement, principaux résultats*

Évaluation de l'inactivation des souches d'orthopoxvirus par la solution d'inactivation du kit bioFire.

- *Techniques transférées vers d'autres laboratoires*

Des échanges avec les Hôpitaux Universitaires de la Pitié Salpêtrière et de la Cellule d'Intervention Biologique d'Urgence sur la technique de diagnostic par biologie moléculaire des orthopoxvirus, permettant la détection d'une infection par le virus de la variole, ont été engagés afin de revalider les conditions d'utilisation de cette technique.

Un contrôle de qualité externe croisé est mis en place avec l'unité des virus émergents de l'UMR-190.

2.2 Activités d'expertise de l'année 2016

- *Echantillons de matériel biologique issus des collections du CNR distribués.*

Plasmides témoins positifs distribués à l'Hôpital Universitaire de la Pitié Salpêtrière.

2.2.1 Activité exercée en 2016

Activités	Nombre de fiches de données réceptionnées	Nombre de Prélèvements
Diagnostic/confirmation	18	39

Département	Nombre de cas suspecté	Orthopoxvirus	Parapoxvirus	Molluscipoxvirus
35- Ile et Vilaine	3	1		
54- Meurthe-et-Moselle	3			
60-Oise	1			
69- Rhône	2			
75- Paris	1			
76- Seine Maritime	1			
80- Somme	1	1		
85- Vendée	1		1	
86- Vienne	2		2	
89- Yonne	1		1	
92-Hauts de Seine	1			
93-Seine Saint Denis	1			
TOTAL	18	2	4	0

L'ensemble des échantillons testés proviennent de laboratoires hospitaliers. Sur les 18 patients suspectés d'infection par un orthopoxvinae, le CNR a confirmé la suspicion d'infection à orthopoxvirus pour deux patients et la suspicion d'infection à parapoxvirus pour quatre patients.

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
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

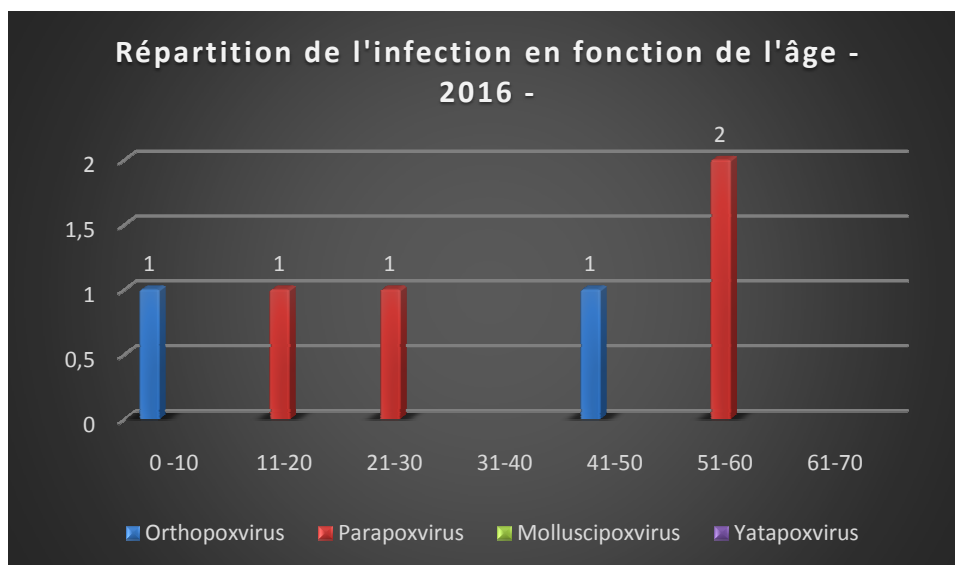
- Définition de l'échantillon de souches isolées

Nom de spécimen	GENRE	Nom d'isolat
CNR16.02	PPV	ORFV-86.16.02
CNR16.05	PPV	ORFV-86.16.05
CNR16.10	PPV	ORFV-85.16.10
CNR16.11	OPV	CPXV-35-16.11
CNR16.15	PPV	ORFV-89-16.15
CNR16.18	OPV	CPXV-80-16.18

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

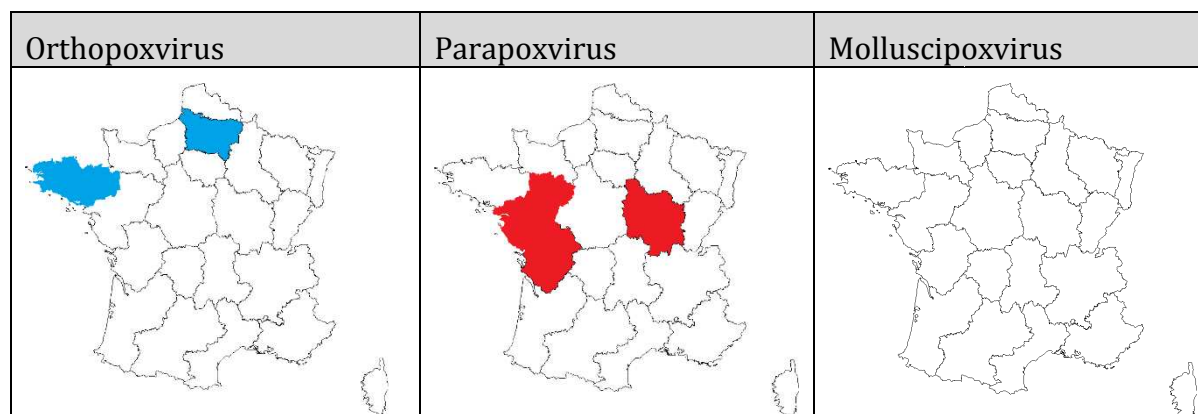
Le spécimen CNR16.02 est le seul à avoir été isolé cette année.

- **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 d'infections par un parapoxvirus ne sont pas spécifiques à une classe d'âge.

- Répartition géographique 2016



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

- NA

3.3 Participation aux réseaux de surveillance

- *Contribution à la surveillance nationale en interface avec Santé publique France*
 - o Contribution à la surveillance nationale en interface avec SPF.
 - o Partenaire du réseau Biotox/Piratox.

- Partenariat avec le réseau Gabriel de la Fondation Mérieux
- Partenariat avec l'UMR 190

3.4 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

- Une proposition de surveillance des élevages de rats de laboratoires avait été discutée. Compte tenu du déménagement sur le site de Brétigny et de la mise en place du COFRAC, ce projet est décalé dans le temps.

4 Alerte

Deux cas d'infection par du cowpox virus ont été mis en évidence par le CNR durant l'exercice 2016 :

Un cas rapporté sur une fille âgée de 4 ans demeurant à St Malos. Le laboratoire prescripteur a pris contact avec le CNR (contact téléphonique) pour définir la virose suspectée. La description du cas correspondait à une infection oculaire avec ulcération péri-oculaire. Quinze jours avant l'apparition de ces symptômes, un traitement anti-herpétique + augmentin avait été mis en place, sans effet. Un diagnostic différentiel a mis en évidence une infection à Staphylocoque doré, (VZV et Chlamydia négatif). Au niveau du mode de contamination, seul un contact avec une chèvre domestique avait été identifié. Une suspicion d'infection à Parapoxvirus avait été proposée.

Le diagnostic du CNR a mis en évidence une infection à Orthopoxvirus.

Un cas a été rapporté sur un homme âgé de 45 ans demeurant à Amiens. La lésion se serait objectivée suite à une blessure de chantier.

5 Activités d'information, de formation et de conseil

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

Le CNR-LR participe aux enseignements suivants Master Pro NRBC de l'Ecole du Val-de-Grâce.

- *Modalités de diffusion des données de surveillance et production du CNR*

Mise en ligne sur le site : www.ecole-valdegrace.sante.defense.gouv.fr/rubriques-complementaires/irba-cnr/orthopoxvirus

- Fiche Patient : Fiche envoyée systématiquement avec tout échantillon.
- Contrat Clinico-Biologique
- Fiche Conseil Prélèvement
- Rapports d'activité 2012, 2013, 2014, 2015.
- Actualisation annuelle des documents.

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

6.1 Activités de recherche en cours.

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 : Evaluation de la mémoire de l'immunisation après vaccination par le candidat vaccin MVL (Modified Vaccinia virus Lister) en modèle murin.

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.

Inactivation des orthopoxvirus par des solutions d'extractions d'acides nucléiques

Objectif : évaluation de la solution de lyse du kit bioFire permettant d'attester de la sécurité biologique

Amélioration de la préparation d'échantillons d'orthopoxvirus en vue de l'utilisation du séquençage NGS directement pour un diagnostic spécifique rapide, Poursuite du programme de séquençage du génome complet de souches de Cowpoxvirus et Parapoxvirus isolées en France

Objectif : l'utilisation directe du NGS confère une précision dans l'identification des souches isolées

Recherche d'épitopes spécifiques ds Orthopoxvirus en vue d'une amélioration de tests sérologiques

Objectif : disposer à terme d'un test sérologique spécifique de genre et d'espèces, 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.

6.2 Publications et communications

(i) Publications nationales,

- *Cowpox et Monkeypox. S. Duraffour, O. Ferraris, CN. Peyrefitte. Traité EMC Maladies Infectieuses, 2016*
- *Chapitre orthopoxvirus, Pilly ECN, 2016*
- *Chapitre orthopoxvirus E-Pilly trop, 2016*

(ii) Publications internationales,

- C. Contesto-Richefeu, N. Tarbouriech, X. Brazzolotto, W. P. Burmeister, CN. Peyrefitte, F. Iseni. Structural analysis of point mutations at the vaccinia virus A20/D4 interface. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun.* 2016 72, 687-91.
- S. Hutin, WL. Ling, A. Round, G. Effantin, S. Reich, F. Iseni, N. Tarbouriech, G. Schoehn, WP. Burmeister. Domain organization of vaccinia virus Helicase-Primase D5. *J.Virol* 2016 90(9) 4604-13.

- (iii) *Communications nationales,*
 - *Poster-JFV XVIII- 24.25 Mars 2016. Les chordopoxvirinae en France, bilan de quatre années de surveillance.*
 - *Poster-congrès pox-2.6 Juillet 2016. Modified Vaccinia Lister (MVL), s safe and easy to produce vector for human or veterinary vaccines.*
 - *Poster-congrès pox-2.6 Juillet 2016. The chordopoxvirinae in France, a survey of four years of monitoring.*
- (iv) *Communications internationales,*
- (v) *Conférences sur invitations.*

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

- Discussion étroite en cours pour la mise en place d'une collaboration avec Mr S.Bertagnoli de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.

8 Programme d'activité pour les années suivantes

- Finalisation du transfert de l'activité du CNR OPV de l'HIA Desgenettes vers le site de l'IRBA à Brétigny sur Orge.
- La nouvelle adresse à compter du 07 Mars 2017 est :
 - CNR-LE –Orthopoxvirus**
 - Institut de Recherche Biomédicale des Armées**
 - Unité Virologie**
 - 1 Place Valérie André**
 - 91220 Brétigny sur Orge**
 - courriel : cnropv.irba@gmail.com**
- Le CNR-LR qui a été audité, poursuit sa démarche d'accréditation Cofrac des examens.
- Poursuite des programmes de recherche.
- Développement des partenariats, en particulier un point de collecte d'échantillon biologique a été crée avec CERBA.

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).

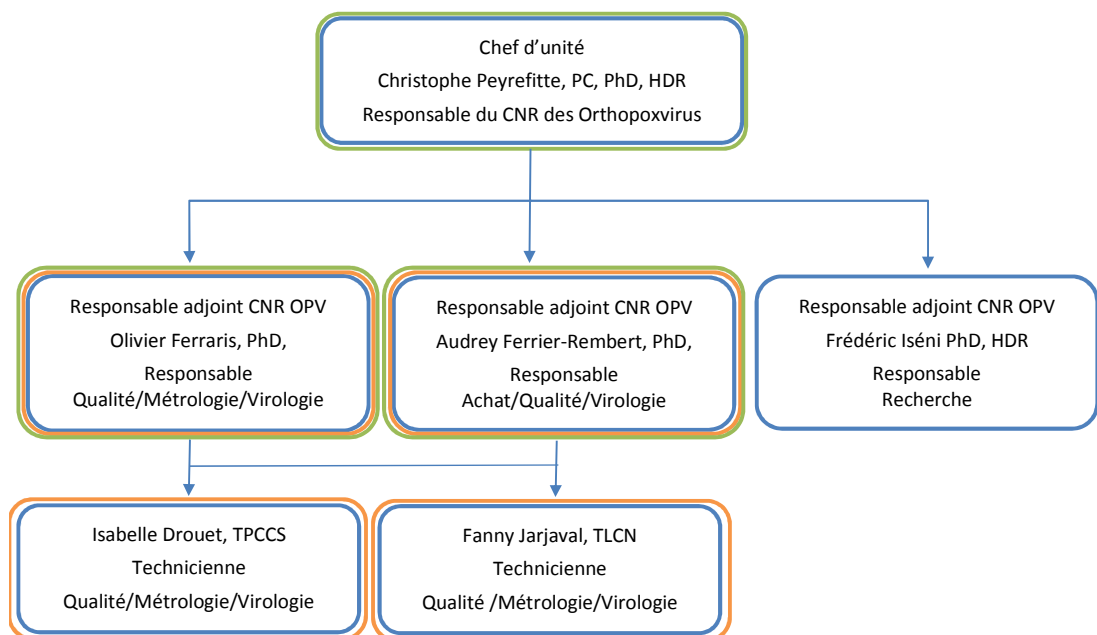
1.2 Description détaillée de l'équipe

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	Brétigny sur Orge
Fanny Jarjaval	Technicien	40%	Tech	Permanent	Ministère de la Défense	Brétigny sur Orge
Isabelle Drouet	Technicien	5%	Tech	Permanent	Ministère de la Défense	Brétigny sur Orge
Frédéric Iseni	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

Nouveaux arrivants depuis le 01 septembre 2016 : Déborah Delaune, Médecin militaire.

o Organigramme 2016



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 Supérieure TLCN : Technicien de Laboratoire de Classe Normale	Fonctions : Pré-analytiques / Analytiques
	Fonctions : Post-analytiques

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 m² dont 1 Animalerie A4, utilisation de scaphandres
- Laboratoire NSB3 : 20 m²
- Laboratoire NSB2 : 29 m²
- Laboratoire NSB1 : 90 m², 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 a été audité en septembre 2016. La demande initiale d'accréditation porte sur le diagnostique différentiel Orthopoxvirus/Variole ainsi que le diagnostic Parapoxvirus.

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.

Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

2.1 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

2.2 Liste des marqueurs épidémiologiques disponibles

Néant

2.3 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	2	

Ectromelie MP3		
Ectromelie MP4		
Ectromelie EMVBUL		
Ectromelie EMVMOS Moscow12/85		
Ectromelie EMVMH Mill Hill12/85		

- o 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
	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
	ORFV-86-16.02
Molluscipoxvirus	
	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°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.