

Rapport annuel d'activité

2013

**Centre national de référence
Des Orthopoxvirus**

**Année d'exercice
2012**

Résumé analytique

L'Unité de Virologie de l'IRBA a pour missions de développer et de mettre en œuvre des contre-mesures médicales face aux risques virologiques naturel et intentionnel. A ce titre, l'unité de virologie possède une expertise biomédicale, contribue au déclenchement de l'alerte, participe aux réseaux de surveillance des infections pour les Orthopoxvirus, 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 2012, première de l'exercice du CNR, a permis de mettre en évidence la recrudescence d'une zoonose due à un Orthopoxvirus : le cowpoxvirus. L'expertise technique mise en œuvre au CNR a également contribué à mettre en évidence la coexistence de différentes souches de cowpoxvirus sur le territoire français.

Le CNR a développé de nouvelles techniques moléculaires de diagnostic afin de répondre à une demande croissante de la part des médecins hospitaliers. Aussi, notre champ d'investigation s'est-il élargi avec la mise au point du diagnostic du genre parapoxvirus et plus spécifiquement de l'espèce Orf ainsi que celui du Molluscipoxvirus (espèce molluscum contagiosum).

Compte tenu de la réorganisation de l'IRBA, le CNR va être relocalisé sur Lyon dans la tour CERVI sur le site de Gerland.

1 Mission & organisation du CNR

1.1 Description de la démarche qualité du laboratoire :

Dans le cadre de son appartenance au réseau Biotox, le CNR OPXV du laboratoire de virologie de l'IRBA participe régulièrement à des exercices d'évaluation nationaux, européens et/ou internationaux. Compte tenu du risque potentiel de la Variole, le diagnostic des Orthopoxvirus est toujours réalisé en première intention au cours de ces exercices. Le tableau ci-dessous décrit les exercices auxquels a participé le CNR pendant l'année 2012.

N°	Date de réception	Nature échantillon	Référence	NOM	Demande	Technique	Résultat
2012-021A	14 septembre 2012	Sang humain	GHSAG 2012			Extraction ADN et ARN,	OPV négatif RVF positif (souche vaccinale MP12)
2012-021B	14 septembre 2012	Sang animal	GHSAG 2012			mise en culture sur cellules Vero qPCR OPXV, qPCR Pan Phlebo et qPCR RVF	Travail réalisé en collaboration avec le CNR Arbovirus
2012-028	11 décembre 2012	flasque	V1	Exercice BIOTOX		Cf résultats définitifs de Virologie	virus influenza de type A/H1N1
2012-029	11 décembre 2012	Acides nucléiques	V2	Exercice BIOTOX			Présence d'acide nucléique correspondant au virus de type A/H1N1pdm et de virus A/H5

Le laboratoire a rédigé des procédures référencées et validées permettant le suivi et le contrôle des modes opératoires. La confidentialité des résultats consignés dans un registre est assurée par son stockage dans une armoire fermée à clef.

2 Activités d'expertise

2.2.1 Activités d'expertise de l'année 2012 et commentaires sur les évolutions quantitatives et qualitatives observées :

Date de réception	Nature échantillon	Date de prélèvement	Référence demande	Origine	Demande	Technique	Résultat	Date de rendu	Commentaire
31/7/2012	croutes prélevées sur lésion cutanée	27/7/12	Pr AGIUS	CHU Poitiers	Recherche parapoxvirus	Qiagen DNA Blood mini kit, LC, ABI Prism 7000 SDS	PCR négative OPV PCR positive PPV : orf	Tel CD le 01/08/2012 ; fax le 02/08/2012	résultats faxés basés sur PCR confirmé par séquençage
21/09/2012 CNR OPXV	écouvillon liquide	18/9/12	Dr Isabelle ALCARAZ	CH Tourcoing	Recherche parapoxvirus	Qiagen DNA Blood mini kit, LC, ABI Prism 7000 SDS	PCR positive OPV PCR positive CPV	25/9/12	résultats confirmés par séquençage
18/10/2012	écouvillon œil, prélèvement cutané	9/10/12	MC Védy	HIA Legouest	Recherche Cowpoxvirus	Qiagen DNA Blood mini kit, LC, ABI Prism 7000 SDS	PCR positive OPV PCR positive CPV		résultats confirmés par séquençage
21/12/2012	écouvillon cutané	20/12/12	GOTTLIEB Jeremy	Hopital Henri Mondor	Recherche et confirmation de Molluscum Contagiosum	Qiagen DNA Blood mini kit, 2 qPCR d'espèces MCV sur 2 genes différents	Positif sur les 2 gènes CMV	18/2/13	séquençage non réalisé

- Le nombre de cas traités reste encore peu élevé mais cela est tout à fait cohérent puisque les

données suggèrent une corrélation entre la recrudescence des zoonoses causées par le Cowpoxvirus et l'arrêt de la vaccination anti-variolique. En effet, tous les cas confirmés ont moins de 40 ans, sont non-vaccinés et ne bénéficient donc pas de protection croisée envers les Orthopoxvirus (due à la vaccination anti-variolique). Une augmentation des cas est donc à craindre.

- Notre champ d'application s'est étendu à d'autres poxvirus : les para- et mollusci-poxvirus. Cette démarche s'est inscrite pour répondre à une demande des biologistes et médecins hospitaliers qui ne savent pas à qui adresser ce type de demandes d'analyses. De plus, les méthodes traditionnelles pour identifier ces virus sont coûteuses à mettre en œuvre et demandent des délais assez longs. Le CNR a donc adapté des méthodes de diagnostic rapide à partir de la littérature (qPCR validées par séquençage du gène d'intérêt).

3. Activités de surveillance

3.1. Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

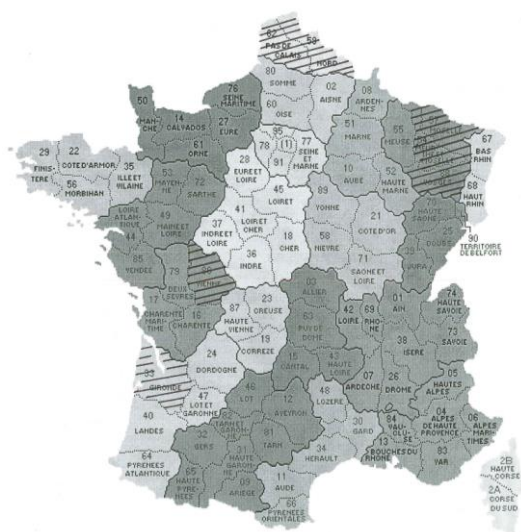
Réseau de partenaires	type d'activités	répartition géographique	couverture du réseau	évolution du réseau	Domaine
CHU	Diagnostic de première intention ou de confirmation	Grandes villes	national	pérenne	Santé humaine
Hôpitaux d'Instruction des Armées	Diagnostic de première intention ou de confirmation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

- Définition de l'échantillon de souches isolées

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 I	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

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



Les souches recueillies par le laboratoire de Virologie depuis 2009 sont réparties en France selon les zones hachurées sur la carte ci-contre. Toutes les personnes touchées sont des jeunes de moins de 30 ans: enfants au contact de rats d'animalerie (provenance Europe de l'Est) et/ou d'animaux « sauvages » et jeunes vétérinaires ayant pris en charge les cadavres d'animaux. Il a été noté que toutes ces personnes n'ont pas été vaccinées contre la variole.

- Contribution à la surveillance nationale en interface avec l'InVS : l'échange des données se fait en temps réel

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

Néant

3.3. Détection et investigation des cas groupés et des phénomènes anormaux

Néant

3.4. Contribution aux réseaux de surveillance internationaux, en particulier européens

- Les réseaux auxquels le CNR est associé : GHSAG (Global Health Security Action Group) du G7, pour des activités d'expertise, envoi de données, participation aux exercices.

3.5. Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

- néant

4. Alerte

- Tous les échantillons des cas suspects nous ont été transmis par les CHU après appel par 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.

5. Activités d'information, de formation et de conseil

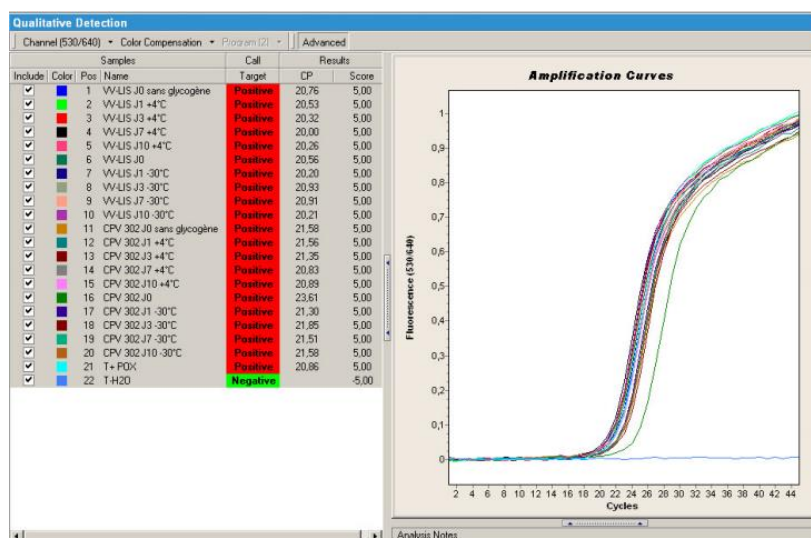
- Le CNR participe aux formations « Biotox-biosécurité » mises en œuvre chaque année au CRSSA. Sa participation consiste à sensibiliser les praticiens et techniciens hospitaliers du SSA au risque que représentent les Orthopoxvirus, ainsi qu'à leur formation à l'utilisation du kit diagnostique par PCR 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.
- Le CNR a rédigé une fiche de présentation de son activité ainsi qu'une fiche d'accompagnement des échantillons, en cas de demande d'analyses, qui sont largement distribués dans les hopitaux militaires et civils.
- Lorsque le CNR est destinataire d'une demande d'analyses, des contacts téléphoniques et par courriel s'en suivent systématiquement avec le demandeur. Ce jusqu'à la diffusion du résultat final par fax. Le CNR s'assure toujours de l'arrivée des résultats définitifs dans le service demandeur par téléphone avant de clore le dossier en question.
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

6a : Activités de recherche en cours ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR.

1- Etude de stabilité des ADN d'Orthopoxvirus (Cowpox et vaccine)

Pour l'année 2012, le CNR a réalisé une étude concernant la stabilité des ADN de différents Orthopoxvirus (absence de pouvoir infectieux vérifiée et validée) dans le but de pouvoir fournir des ADN à ses partenaires du réseau Biotox afin qu'ils puissent mettre en œuvre le diagnostic de première intention POX/VAR.



Ce travail nous a permis d'obtenir de bonnes conditions de conservation de nos ADN sans en affecter la qualité.

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

L'ICT Jean-Marc CRANCE, chercheur dans le laboratoire, a étudié l'hypothèse selon laquelle le vaccin antivariolique historique induirait une protection croisée contre différentes espèces d'Orthopoxvirus.

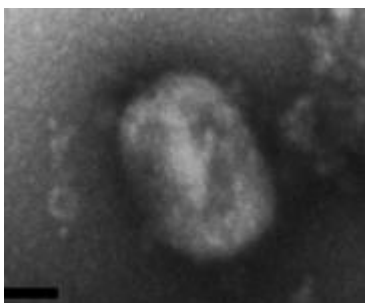
Les résultats obtenus au cours de ces travaux ont montré que la vaccination de la souris immunocompétente (BALB/c ByJ) par scarification avec le vaccin de première génération (virus de la vaccine, souche Lister) ou le candidat vaccin MVL (Modified Vaccinia virus Lister strain – en cours de développement au laboratoire) protège l'animal de l'infection cutanée et induit des réponses immunitaires humorales et cellulaires spécifiques du Cowpoxvirus.

Ces résultats semblent confirmer l'hypothèse selon laquelle l'augmentation des cas de cowpoxvirus, observée en France et à l'étranger, pourrait s'expliquer par l'absence d'immunisation de la population actuelle, suite à l'arrêt de la vaccination antivariolique dans les années 80.

Ce travail va donner lieu à une publication au cours de l'année 2013.

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

En collaboration étroite avec le Dr D.Spehner, le PP Anne-Laure Favier a développé une méthode permettant 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.



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

Ce projet de recherche est conduit par l'ASC F.Iseni :

Pour compléter la seule possibilité thérapeutique antivirale que représente le cidofovir, la recherche de nouveaux inhibiteurs actifs sur les virus du genre Orthopoxvirus (regroupant l'ensemble des virus pathogènes chez l'homme) est nécessaire.

Les enzymes impliquées dans la réplication de l'ADN viral des *Poxvirus* sont des cibles de choix dans le but d'obtenir des inhibiteurs spécifiques de la multiplication virale. Le virus de la vaccine est le prototype de la famille des *Orthopoxvirus* et partage environ 90% de similarité avec le virus de la variole. Il est donc généralement admis qu'un composé inhibant le virus de la vaccine pourrait également inhiber le virus de la variole.

L'obtention de la structure tridimensionnelle des protéines essentielles à la réplication du génome viral facilitera l'identification de nouvelles molécules antivirales par « drug design ».

Nous avons, dans un premier temps, surexprimé l'ADN polymérase viral E9 en cellules d'insecte à l'aide d'un baculovirus recombinant. L'activité polymérase de la protéine recombinante a été mise en évidence tout comme son activité de recombinaison. Nous avons également obtenu des cristaux de cette protéine qui diffractent à 8 Å. Au cours de ce projet nous nous intéressons également au facteur de processivité de l'ADN polymérase formé par les protéines A20/D4. Nous avons surexprimé ce complexe en cellule d'insecte et nous avons montré que ces deux protéines interagissent très fortement. L'étude cristallographique du complexe A20/D4 est en cours. Nous avons reconstitué l'holoenzyme ADN polymérase (complexe E9/A20/D4) et nous avons résolu la structure de ce complexe à basse résolution.

Par ailleurs, nous développons au sein du laboratoire le criblage à haut débit de molécules inhibitrices des interactions protéine-protéine du complexe de réplication.

6b. Les publications et communications réalisées ou prévues en lien avec les activités du CNR

1- Présentation d'un poster

C.Ducournau, A.Ferrier-Rembert, A.Georges, AL.Favier, O.Flusin,S.Vedy, CN.Peyrefitte. **Cowpox virus Outbreak in France**, (XIXth International Poxvirus, Asfarvirus and Iridovirus Conference. Salamanca, Juin 2012)

Cf pièce jointe à la fin des annexes.

2- Communications orales présentées lors d'une manifestation nationale

J. Dimier, A-L. Favier, D. Spehner, M. Hebben, J-M. Crance. Développement d'un nouveau vecteur vaccinia virus répliatif antivariolique et anti-Ebola virus. XIV^{èmes} Journées Francophones de Virologie, (29-30 mars 2012, Paris, France).

3- Communications orales présentées lors d'une manifestation internationale

J. Dimier, A. Ferrier-Rembert, A-L. Favier, D. Spehner, R. Drillien, J-M. Crance. **Development of replicative and attenuated bivalent vaccine candidate against smallpox and Ebola.** XIX International Poxvirus, Asfarvirus and Iridovirus Conference, (24-28 août 2012, Salamanca, Espagne).

C. Sele, F. Gabel, I. Gutsche, I. Ivanov, W. Burmeister. **F. Iseni, N. Tarbouriech. Low-resolution structure of vaccinia virus DNA replication machinery.** (XIX International Poxvirus, Asfarvirus and Iridovirus Conference, Salamanca, Juin 2012).

4- Communications affichées présentées lors d'une manifestation nationale

O.Flusin, C.Contesto-Richefeu, A.Hamdi, C.Bardou, T.Poyot, A.Peinnequin, P.Colas, **F.Iseni. A small molecule screen in yeast identifies inhibitors targeting the vaccinia virus replication complex.** (Advances in Protein-protein Interaction , Analysis and Modulation, Roscoff, France, juin 2012)

5- Rédaction d'un article scientifique

C.Ducournau, A.Ferrier-rembert, O.Ferraris, A.Joffre, AL.Favier, O.Flusin, D.Van Cauteran, K.Kecir, B.Auburtin, S.Vedy, M.Bessaud, CN.Peyrefitte.**Concomitant familial infections by two different cowpox virus strains in France, 2011** soumis en Février 2013 à « Emerging Infectious Diseases ». Manuscrit en cours de révision.

O. Flusin, L. Saccucci, C. Contesto-Richefeu, A. Hamdi, C. Bardou, T. Poyot, A. Peinnequin, J.M. Crance, P. Colas, **F. Iseni.** (2012). **A small molecule screen in yeast identifies inhibitors targeting protein-protein interaction within the vaccinia virus replication complex.** *Antiviral Research*, 96, 187-195. **(IF 2007: 3,358)**

T. Poyot, O. Flusin, M. Diserbo, **F. Iseni**, A. Peinnequin. (2012). **Evaluation of normalization strategies for qPCR quantitation of intracellular viral DNA: the example of vaccinia virus.** *J. Virol. Methods*, 186, 176-183. **(IF 2007: 1,933)**

N. Tarbouriech, O. Flusin, C. Sele, **F. Iseni.** (2012). **La synthèse du genome des poxvirus.** *Virologie*, 16, 210-224.

C. Sele, F. Gabel, I. Gutsche, I. Ivanov, W. Burmeister. **F. Iseni***, N. Tarbouriech*. (2013). **Low-resolution structure of vaccinia virus DNA replication machinery.** *J. Virol.* 87(3) :1679-89 (*corresponding authors) **(IF 2007: 5,332)**

7. Programme d'activité N+1 et N+2

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

Afin d'améliorer nos connaissances en matière de répartition des souches de cowpox virus en France et de vérifier la coexistence de souches différentes, nous avons initié un travail de séquençage sur le génome complet de certaines de nos souches acquises depuis 2009. Ces souches ont été obtenues d'abord en tant que laboratoire expert reconnu dans le domaine des Orthopoxvirus, puis en tant que CNR.

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

Le CNR a été contacté en début d'année pour sa compétence dans le domaine de la quantification des ADN d'orthopoxvirus par une équipe de cancérologues de Nice. Leurs recherches portent sur un projet étudiant les effets de virus de la vaccine génétiquement modifiés sur des cellules de cultures primaires de cancer du sein. Le CNR propose de développer une méthode de titration du virus dans les cellules après infection par PCR quantitative. Des premiers résultats encourageants ont été obtenus.

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

Le CNR a démarré ce programme afin d'obtenir un diagnostic ELISA permettant de distinguer les Orthopoxvirus les uns des autres.

4- Déménagement du CNR Orthopoxvirus du site de La Tronche vers Lyon

Le laboratoire de virologie, dont le CNR Orthopoxvirus fait partie, va être relocalisé sur Lyon, dans la tour CERVI du site de Gerland. Le CNR rejoint une de ses équipes déjà sur le site depuis 2008. Le CNR disposera des infrastructures permettant la poursuite complète de ses activités de diagnostic et de surveillance. Une partie de son activité de recherche de nouveaux antiviraux se poursuivront sur le site de l'université de Grenoble.

Les autorisations permettant la détention et la mise en œuvre des génomes des virus Monkeypox ont été anticipées auprès de l'ANSM. Le site de Lyon a d'ailleurs déjà été inspecté en mars 2013 par l'agence.

ANNEXES

2.1 Rappel des missions et objectifs majeurs du CNR

L'Unité de virologie de l'IRBA, travaille sur les orthopoxvirus depuis 2001 dans le cadre du risque B intentionnel. Une de ses missions principales est le développement et la mise en place de moyens de lutte contre la variole et notamment les méthodes de détection et de diagnostic, les traitements antiviraux et la prophylaxie avec des vaccins antivarioliques moins dangereux.

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).

2.2 Fournir une description détaillée de l'équipe en renseignant notamment les items suivants :

NOM	Fonction	Temps CNR	Pérennité 2013	Localisation géographique
Christophe Peyrefitte, PhD, PharmD	Chef du laboratoire, Chercheur	10%	oui	P4 Jean Mérieux de Lyon et Unité de Virologie CRSSA-IRBA la Tronche.
IEF Corinne Ducournau	Ingénieur, Adjoint expertise	80%	Arrêt fin 2013	Unité de Virologie CRSSA-IRBA la Tronche
Anne-Laure Favier PhD, PharmD	Chercheur,	10%	Oui à 5%	Unité de Virologie CRSSA-IRBA la Tronche
Jean-Marc Crance PhD	Chercheur, chef de projet de recherche	10%	Arrêt fin 2013	Unité de Virologie CRSSA-IRBA la Tronche
Frédéric Iseni PhD	Chercheur, chef de projet de recherche	10%	Oui à 5%	Unité de Virologie CRSSA-IRBA la Tronche
Olivier Flusin PhD, MD	Chercheur, activité expertise	10%	Arrêt fin 2013	CHU Michallon La Tronche
Danièle Spehner PhD	Chercheur, Expert référent Activité Microscopie électronique	5 %	oui	INSERM/IGBMC Illkirch.
Robert Drillien PhD	Chercheur, Expert référent	5 %	oui	INSERM/IGBMC Illkirch.
Olivier Ferraris PhD	Chercheur,	40%	Début fin 2013	P4 Jean Mérieux de Lyon
Audrey Ferrier-Rembert PhD	Chercheur,	40%	Début fin 2013	P4 Jean Mérieux de Lyon

2.3 Description détaillée des locaux et de l'équipement (du CNR et laboratoires associés)

L'unité de virologie possède des laboratoires de niveau 2, niveau 3 (avec scaphandre). Elle a l'accès au P4-Mérieux de Lyon grâce à une convention signée entre le SSA et l'INSERM.

Les personnes suivantes sont habilitées à travailler en laboratoire P4 sur le site de Lyon : Christophe Peyrefitte, Corinne Ducournau, Olivier Flusin Anne-Laure Favier, Olivier Ferraris, Audrey Ferrier-Rembert.

Surface locaux

-P3 : 100m², utilisation de scaphandres : avec 1 Animalerie A3, 1 laboratoire culture cellulaire, 1 laboratoire biologie moléculaire, 1 laboratoire congélateur - Lightcycler

-P2 : 20 m²

-P2 : 20 m²

-Laboratoire de cultures cellulaires : 12 m²

-Salle blanche : 10 m²

-Laboratoire machines (Ultracentrifugeuse, Centrifugeuse grosse capacité, -Lightcycler, Abiprism, Appareils à PCR) : 12 m2
-Laboratoire Biologie moléculaire : 30 m2
-Animalerie A2

Principaux équipements

-Magnapure
-Microscope électronique
-Lightcycler : 2 (dont 1 en P3)
-Abiprism
-Appareils à PCR : 2
-Ultracentrifugeuse
-Centrifugeuses : 5 centrifugeuses de paillasse et 2 centrifugeuses grosse capacité dont une dans P3
-Broyeur de tissus
-Microscope à fluorescence (dans P3)
-PSM : 6
-Congélateurs -80°C sous alarme : 8
-Congélateurs -20°C : 7
-Hotte chimique

2.1 Capacités techniques du CNR:

- **Liste des techniques disponibles pour le diagnostic**

A) Identification par méthodes de Biologie moléculaire

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

Travaux de Scaramozzino et al, 2007, Clin. Chem

Technique de PCR en temps réel.

Technique validée sur light cycler et ABI prism

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

Utilisation d'amorces consensus (en 1 étape)

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

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

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

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

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

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

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

Technique de PCR en temps réel.

Technique validée sur light cycler

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

3-Diagnostic spécifique de l'espèce monkeypox virus

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

Identification de deux gènes N3R et F3L

Technique de PCR en temps réel.

Technique validée sur ABI prism et LC.

4-Séquençage du gène A56R :

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

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

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

Construction d'arbre phylogénétique (Clustalw)

Amorces

A56R-FOR:5'-3' GCTGTCTTTCCTAAACCAG

A56R-REV:5'-3' GGTAACACGTGACCATTATC

5- Diagnostic spécifique de l'espèce cowpox virus:

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

Identification portant sur le gène D11L.

Technique de PCR en temps réel.

Technique validée sur LC et Abi Prism.

○ Techniques développées l'année N: brève description (principes, validation)

1- Diagnostic spécifique du genre Parapoxvirus :

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

Identification portant sur le Gène B2L.

Technique de PCR en temps réel

Technique validée sur ABI Prism.

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

2- Diagnostic spécifique de l'espèce Orf :

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

Identification portant sur le Gène de l'ADN polymérase.

Technique de PCR en temps réel

Technique validée sur LC.

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

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

Identification portant sur les gènes p43K et MC080R.

Techniques de PCR en temps réel.

Technique validée sur LC.

- **Techniques en développement : principes et état d'avancement**

Il reste à construire les témoins positifs plasmidiques pour les deux dernières techniques de PCR en temps réel mises en œuvre au laboratoire cette année soit : -qPCR spécifique OPV et -qPCR spécifique MCV.

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

Virus	Souches	Classe	
Vaccine	Western-reserve IHD-J Lister Lister VACV107 (Genbank DQ121394) Copenhague Lederchorioallantoic LED Ankara Modified Virus Ankara MVA Baxter (delete en gène <i>D4R</i>) Rabbitpox virus	2	
Monkeypox virus	MSF#6 MSF#10 Copenhague	3	Numéro ANSM demande en cours 0113 du 11/01/2013
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	

Le laboratoire détient aussi des acides nucléiques de virus de la variole (classe 4) 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.

1. Conditions de stockage

Les collections sont stockées à -80°C, dans des congélateurs mis sous alarme localisés dans des pièces à accès restreint.

2. Mise à disposition des collections

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

- **Liste des techniques (diagnostic/identification, typage) recommandées par le CNR :**

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

Travaux de Scaramozzino et al, 2007, Clin. Chem

Technique de PCR en temps réelle.

Technique validée sur light cycler et ABI prism

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

Utilisation d'amorces consensus (en 1 étape)

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

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

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

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

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

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

