

**Centre de national de référence  
des Fièvres Hémorragiques  
Virales**

*Laboratoire coordonnateur :*  
**Unité de Biologie des Infections  
Virales Emergentes, Institut  
Pasteur**

21 avenue Tony Garnier  
69365 Lyon cedex 7

**Laboratoire associé :**  
**Laboratoire P4 Jean Mérieux –  
Inserm, Inserm US003**

21 avenue Tony Garnier  
69365 Lyon cedex 7

*Responsable :*  
**Sylvain Baize**

*Responsable adjoint :*  
**Delphine Pannetier**

**Année d'exercice**  
**2013**

# Résumé analytique

Les Fièvres Hémorragiques Virales (FHV) sont des zoonoses émergentes ou ré-émergentes, potentiellement mortelles, caractérisées chez l'homme par un syndrome fébrile algique évoluant vers un syndrome hémorragique plus ou moins sévère. La mortalité intervient le plus souvent dans un contexte de choc hypoxique et hypovolémique et peut varier de 1 à 90 % selon le virus incriminé. Malgré leur proximité symptomatologique, les FHV appartiennent à plusieurs genres viraux : Arénavirus, Filovirus, Nairovirus, Flavivirus, Phlebovirus et Hantavirus. Ils se transmettent à l'homme par l'intermédiaire de leur réservoir (rongeurs, chauve-souris), par des vecteurs (tiques) ou par contact direct avec des fluides biologiques infectés. La transmission inter-humaine est ensuite fréquente et peut être à l'origine de foyers épidémiques. Il n'existe pas de traitement efficace, même si la ribavirine est utilisée contre les virus Lassa ou CCHF, et aucun vaccin n'est disponible à ce jour. Ce caractère de dangerosité a conduit à classer la plupart de ces virus dans le groupe de risques GR4 entraînant leur manipulation en laboratoire de niveau de sécurité biologique BSL4. La gravité des syndromes provoqués par les virus des FHV, et l'importante capacité de transmission inter-humaine justifie la mise en place d'une surveillance associant InVS et CNR. En effet, les virus zoonotiques ciblés par ce CNR sont actuellement absents de France, mais peuvent être importés à tout moment à l'occasion d'un retour d'une personne ou d'un animal infecté comme cela s'est déjà produit, en Allemagne notamment. CCHFV est le seul de ces virus présent en Europe et son aire de distribution tend à s'étendre, avec des cas réguliers en Europe du Sud-Est. Des virus proches encore inconnus pourraient de la même manière être à l'origine d'infections en France. De plus, les modifications environnementales, démographiques, et sociales sont des facteurs qui favorisent l'émergence et la circulation de ces virus dans les pays d'endémie. La multiplication des échanges, le développement des voyages, ainsi que la rapidité des transports sont autant de facteurs favorisant le retour de cas infectés en Europe. D'ailleurs, une importante recrudescence d'épidémies de FHV a été observée en Afrique de l'Est depuis 2012. Ainsi, l'Ouganda a été l'objet de 3 épidémies successives, 2 causées par le virus Ebola Soudan (total 31 cas, 21 morts) et la troisième par le virus Marburg (18 cas, 9 morts). La République Démocratique du Congo (RDC) a quant à elle subi une épidémie de FHV à virus Ebola Bundibugyo (81 cas, 36 morts). Le virus CCHF a également sévi en août 2013 en Ouganda, en Russie, au Pakistan et en Inde. Le virus Lassa a également été à l'origine d'épidémie au Nigéria et en Sierra Léone au cours de l'année 2013 (zones d'endémie habituelles). Plus inquiétant, un nouveau Paramyxovirus impliqué dans 3 cas de FHV observés en RDC en 2009 a été mis en évidence, le virus Bas-Congo. Enfin, en 2013, le virus Nipah a de nouveau été à l'origine d'une épidémie au Bangladesh (21 morts sur 24 cas à la date du 15/05/2013). Ces pathologies représentent donc toujours une source d'inquiétude et une surveillance étroite est de rigueur.

Même si les suspicions de cas demeurent peu nombreuses à ce jour, la diversité étiologique de ces pathogènes et leur classement dans le GR4 imposent un lourd plateau technique (modes opératoires nombreux, réactifs très variés), une veille scientifique et technologique (émergence constante de nouveaux virus) et l'utilisation d'un laboratoire BSL4. Enfin, les pathologies induites par ces virus nécessitent une coordination avec des services hospitaliers susceptibles de contribuer en amont, à l'évaluation de risque en lien avec le CNR et en aval, à la prise en charge particulière des patients infectés.

Le CNR FHV se doit donc d'être un pôle d'expertise pour ce qui concerne ces différents virus, que ce soit pour la confirmation diagnostique de cas suspects ou l'identification de souches. Il

doit également être capable d'assurer la surveillance épidémiologique de ces virus, en France mais aussi à l'étranger avec l'aide de réseaux internationaux. Il possède également un rôle de conseil très important en matière de santé publique en France et doit en outre associer ses capacités à celles de réseaux plus spécifiquement dédiés aux agents de la menace comme le réseau Biotox-Piratox. Il remplit au quotidien un certain nombre de missions, parmi lesquelles les plus importantes sont :

- l'apport d'une expertise microbiologique dans le domaine des FHV
- la réalisation et la confirmation d'un diagnostic de FHV
- la surveillance épidémiologique des virus responsables de FHV et le suivi de leur circulation dans les pays endémiques
- la contribution à l'alerte via l'InVS pour tout cas de FHV diagnostiqué sur le sol français
- la contribution aux travaux du réseau des laboratoires BiotoxPiratox en apportant son expertise aux instances de santé publique concernées, en participant à l'animation du réseau, et en mettant en place une collection de souche des agents de la menace.

### **Faits marquants, points clefs et résultats 2013**

Lors de la deuxième année de ce mandat 2012-2016, et suite à l'arrivée du Laboratoire P4 et de l'Inserm à la direction adjointe du CNR des FHV, le transfert technique au sein des partenaires du CNR FHV s'est poursuivi. Depuis 2013, l'ensemble des personnels techniques (3 personnes de l'équipe Inserm du Laboratoire P4 et la technicienne de l'Institut Pasteur ayant été recrutée suite au départ de la technicienne présente au début du mandat) affectés au CNR FHV est désormais opérationnel pour les manipulations réalisées dans les différents laboratoires de confinement : tous sont formés au travail en Laboratoire de niveau P1 à P4. L'accent est bien sûr mis sur les formations en Laboratoire P3, y compris sous le PSM de type III, et en Laboratoire P4, car le travail dans ces structures de haut confinement ne peut se faire qu'après avoir subi des formations longues et rigoureuses. De plus, la totalité du personnel technique du CNR FHV est capable d'assurer l'ensemble des tâches dédiées au CNR et notamment les diverses manipulations permettant de rendre en urgence un diagnostic. Un système d'astreinte diagnostic fonctionne en effet 24h/24 et 7j/7 pour le personnel technique, permettant d'assurer en urgence un diagnostic à chaque fois que cela est nécessaire, avec un objectif de rendu des résultats dans un délai maximal de 12h après la réception des prélèvements au laboratoire. En cas de diagnostic ne présentant pas de caractère d'urgence, le délai de rendu des résultats peut être réalisé sous 48h ouvrables. La direction du CNR est également d'astreinte de manière permanente afin de pouvoir conseiller et assister les professionnels de santé ou l'équipe technique.

Au niveau technique, la vérification et la remise à jour des techniques de biologie moléculaire et sérologie débutée en 2012 s'est poursuivie tout au long de l'année 2013 selon les axes d'amélioration et les points faibles qui avaient été définis à la reprise du CNR début 2012. Des tests ont été effectués afin d'améliorer certaines techniques et également de commencer le remplacement des techniques classiques de PCR sur gel par des PCR en temps réel. Enfin, il faut également noter que, de par la diversité des virus à diagnostiquer, les réactifs sont nombreux et variés, qu'il s'agisse de biologie moléculaire ou de sérologie et que la conservation des stocks de réactifs nécessaires à l'établissement d'un diagnostic est particulièrement lourde à gérer. Il est aussi important de signaler qu'un nouveau circuit de PCR a été mis en place (installation de cloisons notamment afin de pouvoir séparer clairement les espaces de pré-PCR, PCR et post-PCR) afin de limiter les risques de contamination des échantillons et de se mettre en totale conformité avec les préconisations de la norme NF 15-189. Une RT-PCR en temps-réel a également été développée

pour la détection du virus de la fièvre hémorragique de Kyasanur (un virus P3 classé P4 aux Etats-Unis).

Une autre activité essentielle au CNR des FHV, réalisée de manière diffuse tout au long de l'année, est représentée par les conseils dispensés aux professionnels de santé. En effet, il est nécessaire de pouvoir conseiller de manière pertinente les médecins, hospitaliers généralement, qui appellent pour une suspicion de FHV dans leur service et de pouvoir évaluer avec eux la pertinence de leur demande et la probabilité que le cas soit réel. En effet, il s'agit à chaque fois d'une urgence en termes de santé publique, pouvant entraîner la contamination d'un nombre important de personnes si les mesures d'isolement ne sont pas mises en œuvre à bon escient. Inversement, étant donné leur coût et leur complexité, elles ne peuvent et ne doivent pas être mises en place sans raison.

Il faut cependant noter qu'en 2013, une grosse partie des efforts consentis pour le CNR des FHV a porté sur la mise en place de la norme NF 15-189 au sein du CNR. Le CNR des FHV s'est en effet engagé dans la démarche d'accréditation à la norme NF 15-189 à la fin de l'année 2012, avec un audit COFRAC d'accréditation prévu à la fin de l'année 2014. Pour mener à bien cette mission, le CNR des FHV bénéficie de l'aide apportée par le service qualité de l'Institut Pasteur, ainsi que d'un consultant de la société Pré-ISO est également en interaction avec nous pour faire évoluer le CNR des FHV dans le sens défini par cette norme, à la fois en ce qui concerne la gestion globale du CNR et sa politique qualité, mais également en ce qui concerne les techniques diagnostiques mises en place. En effet, à l'horizon 2020, toutes les techniques utilisées dans le CNR devront être accréditées par le COFRAC dans le respect de cette norme, comme cela est déjà le cas des laboratoires de biologie médicale. Le logiciel Kalilab® a ainsi été mis en place au sein du CNR afin de répertorier plus facilement les non-conformités pouvant être détectées lors des étapes pré-analytiques, analytiques ou post-analytiques de la mise en œuvre d'un diagnostic, depuis l'arrivée du prélèvement au laboratoire jusqu'au rendu final du résultat au prescripteur.

Enfin, en 2013, un autre axe de travail ayant nécessité un investissement particulièrement important a été la mise en conformité du CNR avec la nouvelle réglementation sur les Micro-Organismes et Toxines (MOT) telle qu'elle est définie dans les arrêtés des 30 juillet 2004 et 30 juin 2010. En effet, l'ensemble des virus sous la responsabilité de ce CNR est concerné par cette réglementation, ce qui impacte fortement les activités du CNR FHV au quotidien avec des très nombreuses contraintes réglementaires. En effet, un listing doit être tenu au jour le jour pour tout ou partie de ces pathogènes dès que leur taille est supérieure à 500 bases. Un inventaire rigoureux de l'ensemble des réactifs du CNR est réalisé annuellement. Chaque mouvement de MOT doit être tracé et archivé et doit répondre aux exigences de l'ANSM. L'autorisation de travailler sur chaque MOT possédé par le CNR a également été demandé à l'ANSM et toutes les autorisations ont été reçues en 2013. Il est important de souligner qu'en septembre 2013, l'UBIVE et donc le CNR des FHV a été inspecté par l'ANSM pour vérifier la conformité avec les textes de lois sur les MOT. 4 écarts ont été relevés, dont 2 majeurs, qui avaient été anticipés avant l'inspection et qui ont donc pu être régularisés. L'inspection s'est globalement très bien déroulée et la gestion des MOT par le CNR des FHV a été positivement jugée par les inspecteurs de l'ANSM.

# 1 Mission et organisation du CNR

Les missions et le mode d'organisation du CNR FHV sont identiques à ce qui avait été décrit dans le précédent rapport d'activité de l'année 2012. Aucun changement n'est intervenu cette année dans la composition de l'équipe.

On peut en revanche noter que les équipes de recherche associées au CNR sont désormais regroupées au sein du CIRI (Centre Internationale de Recherche en Immunologie) qui a vu le jour le 1<sup>er</sup> janvier 2013. Il regroupe une vingtaine d'équipes de recherche dont le but est de mieux comprendre les maladies infectieuses afin de mieux les contrôler. Ses tutelles sont l'Inserm, le CNRS, l'ENS de Lyon et l'Université Claude Bernard de Lyon, et il a comme partenaire l'Institut Pasteur, la Fondation Mérieux et les Hospices Civils de Lyon.

Les missions et l'organisation du CNR FHV sont fournies en Annexe 1.

## 2 Activités d'expertise

Les capacités techniques du CNR FHV sont fournies en Annexe 2.

### **2.1 Evolutions des techniques au cours de l'année 2013**

*-Techniques développées au cours de l'année 2013 :*

Après l'année de transition en 2012, qui a vu la mise en place et la formation au travail en laboratoire P3 et P4 de l'équipe technique du CNR (arrivée de 3 personnels de l'équipe Inserm P4 et d'une nouvelle technicienne de l'Institut Pasteur) et le transfert des techniques au sein des nouvelles équipes, la remise à jour des techniques employées au CNR des FHV a pu débuter en 2013. Une grande partie de l'année 2013 a cependant été consacrée à la préparation de l'accréditation NF 15-189. Dans ce cadre-là, la remise à jour des techniques se fait en coordination avec le planning d'accréditation à la norme 15-189 qui a été défini pour le CNR et qui doit se mettre en place sur plusieurs années.

Une de premières améliorations techniques au cours de l'année 2013 a été la généralisation à l'ensemble de nos PCR de l'usage d'un contrôle d'extraction des ARN. Ce contrôle, basé sur l'utilisation d'un virus de poisson, le virus de la septicémie hémorragique virale (VSHV) (se cultivant à 34°C et non 37°C pour éviter une éventuelle contamination de nos propres cultures virales) titré et rajouté dans l'échantillon à tester, permet d'être sûr que l'étape d'extraction du matériel génétique présent dans un échantillon (facteur limitant lors de l'étape d'amplification du matériel génétique par PCR) était bien réalisée. De plus, ce contrôle permet également de s'affranchir du risque de la présence d'inhibiteurs de PCR dans l'échantillon extrait. L'ARN du VSHV est ainsi amplifié par RT-PCR en temps réel simultanément aux autres RT-PCR.

En 2013, nous avons également validé la méthode de RT-PCR quantitative en temps réel utilisée au laboratoire pour diagnostiquer le virus CCHF. Cette validation a été effectuée selon le

référentiel fourni dans le SH FORM 044 du COFRAC et a permis de déterminer la sensibilité et la spécificité de cette technique, de respectivement 98,7 et 98,3 %. Des contrôles négatifs ont été mis en œuvre, permettant de vérifier l'absence de contamination inter-échantillons au sein des plaques de QPCR. De plus, la robustesse de la technique a été validée pour le changement d'opérateur ainsi que pour l'éventuelle dégradation de l'échantillon biologique au cours du temps. Les témoins positifs ont été réalisés avec de l'ARN de virus CCHF extrait de culture de virus et mélangés avec du sérum humain provenant de patients donateurs de sang auprès de l'EFS.

*-Techniques en développement :*

Les travaux concernant le virus de la fièvre hémorragique de la forêt de Kyasanur, débutés en 2012, se sont poursuivis en 2013. La culture de ce virus est désormais au point, et une RT-PCR en temps-réel est maintenant en place. Ces travaux n'ont pas été jugés prioritaires durant l'année 2013 et ils se poursuivent donc encore aujourd'hui. Des travaux similaires ont débuté avec le virus de la fièvre hémorragique d'Omsk.

Une grande partie des axes d'amélioration de 2013 a porté sur le problème de disponibilité des réactifs pour nos tests ELISA. En effet, la grande diversité des pathogènes à diagnostiquer au CNR des FHV et leur classement dans le groupe de risque 4 implique non seulement la mise en place et le maintien d'un nombre important de techniques différentes, mais également la production maison de l'ensemble des réactifs utilisés, les tests commerciaux n'étant pas actuellement disponibles. Le maintien des stocks de réactifs est donc crucial pour le CNR mais compliqué à mettre en place dans la pratique. Il faut savoir que jusqu'à présent, les antigènes utilisés pour nos tests ELISA devaient être irradiés. Cette irradiation avait lieu dans une société externe, en banlieue lyonnaise. Cependant, depuis la mise en place des textes réglementaires sur les MOT, et notamment les Bonnes Pratiques de Laboratoires applicables, la société ne souhaite pas travailler sur les MOT et nous ne pouvons donc plus irradiés nos réactifs. Des contacts avec le CDC d'Atlanta ont été pris pour récupérer un certain nombre de réactifs avant de trouver une solution, mais cela n'a rien donné. Le CNR des FHV a donc travaillé pour trouver une solution de remplacement au problème, et de nombreux essais ont été effectués en utilisant des réactifs inactivés par la chaleur et non pas irradiés. De nombreux tests ont déjà été menés mais doivent encore se poursuivre, tous les virus et tous les réactifs ne donnant pas les mêmes résultats avec cette technique. La pénurie de réactifs pour les tests ELISA est à relativiser, le CNR gardant la possibilité de réaliser l'ensemble de ses tests ELISA dans le laboratoire P4 avec des réactifs non inactivés. Une solution de remplacement doit cependant être clairement définie avant l'étape de validation de nos méthodes ELISA en vue de l'accréditation 15-189.

*-Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse*

Au cours de l'année 2013 le CNR n'a pas testé de réactifs commerciaux. Les seules techniques testées n'appartenant aux techniques habituelles du CNR l'ont été via la participation à des exercices qualité européens (cf Annexe).

*-Techniques transférées vers d'autres laboratoires*

De par la spécificité des pathogènes de classe 4 manipulés au CNR des FV, aucune technique n'a été transférée en 2013 dans un laboratoire français. Des prises de contact ont eu lieu avec des laboratoires étrangers mais sont préliminaires pour le moment.

## 2.2 Activités d'expertise de l'année 2013 avec évolutions quantitatives et qualitatives

Au cours de l'année 2013, le CNR FHV a été sollicité à 6 reprises et a traité les échantillons issus de 37 patients. Le volume d'activité a donc augmenté par rapport à l'année 2012, notamment à cause des nombreux prélèvements reçus du Cameroun dans le cadre d'une suspicion d'épidémie par un virus de fièvre hémorragique. Les différents cas traités en 2013 ont été les suivants :

*-Juin :* Demande de diagnostic Lassa, Ebola, CCHF chez un patient expatrié présentant un syndrome fébrile avec thrombocytopenie et hépatite + signes hémorragiques sévères. Résultat : absence d'infection par les virus Lassa, Ebola et CCHF

*-Août :* suspicion de FHV sur un patient provenant de l'île de la Réunion. Résultat : absence d'infection par les virus Lassa, Ebola, Marburg, CCHF.

Demande de diagnostic rétrospectif pour un patient de retour d'Angola et qui a présenté un tableau fugace de fièvre/diarrhée sanglante à son retour. Résultat : absence d'infection par les virus Lassa, Ebola, Marburg, CCHF.

Investigation d'une épidémie avec présence de symptômes compatibles FHV survenue au Cameroun. Analyse de 32 échantillons. Résultat : absence d'infection par le virus Lassa.

*-Novembre :* Demande de diagnostic FHV suite à hépatite fulminante avec signes hémorragiques (gynéco et digestifs), fièvre, céphalées, douleurs, vomissements et diarrhée au retour d'un séjour au Burkina Faso. Résultat : absence d'infection par les virus Lassa, Ebola, Marburg, CCHF.

Demande de diagnostic FHV suite à décès brutal personnel MSF en Centrafrique: epistaxis, hémoptysie. Résultat : absence d'infection par les virus Lassa, Ebola, Marburg, CCHF.

Il faut souligner qu'aucune souche ni échantillon issus des collections du CNR FHV n'a été distribuée cette année. Et aucune nouvelle souche n'est venue enrichir la collection.

## 3 Activités de surveillance

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

Comme cela a été décrit dans le résumé analytique, le CNR FHV s'intéresse exclusivement à des virus très particuliers, non endémiques en France. Il vise à pouvoir détecter de manière la plus précoce possible un éventuel cas d'importation sur le sol français d'un agent de classe 4, afin d'éviter tout risque d'épidémie et protéger ainsi la population générale d'une infection par ces virus mortels.

En 2013, et comme en 2012, aucun échantillon diagnostiqué pour l'ensemble des virus de classe 4 ne s'est révélé positif. Aucune souche de classe 4 n'a donc été isolée cette année. En ces sens, il est donc évident que l'analyse de la distribution des différents types d'agents en fonction de certains critères ne peut donc pas être effective en ce qui concerne le CNR FHV. Il n'y a pas non plus d'échanges de données périodiques avec l'InVS au titre de la surveillance nationale. Chaque suspicion d'infection par un virus responsable de FHV est traitée au cas par cas et peut être traitée avec l'aide de l'InVS en cas de besoin. En effet, le CNR FHV contribue de manière forte à la

surveillance nationale en lien avec l'InVS, en avertissant l'InVS dès que possible en cas de forte suspicion pour un prélèvement, comme cela a été le cas lors d'une suspicion de fièvre de Lassa dans le cadre d'un rapatriement sanitaire en provenance du Cameroun.

Si certaines alertes se révèlent plus sensibles que d'autres, la majorité des prélèvements suspects est analysée afin de réaliser un diagnostic d'exclusion pour rassurer le patient et le corps médical au sujet de possibles mesures d'isolement et de contagion.

*-Réseau de partenaires au plan national :*

Le CNR FHV devant travailler sur des pathogènes de classe 4 dans un environnement de haute sécurité biologique avec accès au seul laboratoire P4 de France, il n'existe donc pas de réseau de partenaires au plan national pouvant travailler sur ce types de pathogènes. Il est donc particulièrement important pour le CNR FHV de posséder des partenaires dans les pays endémiques (cf paragraphes suivants).

Néanmoins, le CNR FHV possède des relations avec différents partenaires en France. Il peut ainsi faire appel à la Cellule d'Intervention Biologique d'Urgence (CIBU) de l'Institut Pasteur pour un appui logistique, scientifique et technique, et ceci en cas de situation de crise sanitaire de grande envergure sur le territoire national. Nous développons également des liens privilégiés avec le service d'infectiologie des Hospices Civils de Lyon (Hôpital de la Croix-Rousse). En effet, le Dr Thomas Perpoint, praticien hospitalier infectiologue, est associé au CNR FHV depuis 2009. Il nous permet notamment de nous investir dans la prise en charge des patients requérant un isolement en chambre à pression négative. Sur le plan hospitalier national, le CNR est lié au Groupement de Coordination de la Gestion du Risque Epidémique et Biologique d'Ile de France (COREB) chargé des prises en charge hospitalière dans cette région des suspicions d'infections par un agent biologique de classe 3 ou 4. Enfin, la plateforme de Génotypage des Pathogènes, de l'Institut Pasteur, est chargée de collaborer avec le CNR pour la réalisation prioritaires des séquençages viraux, notamment les séquençages à haut-débit.

Au niveau international, le CNR des FHV essaie de développer des liens privilégiés avec plusieurs pays, afin de faciliter les échanges techniques et scientifiques avec des pays où les virus d'intérêt du CNR des FHV sont endémiques. Des collaborations visent à rapatrier des échantillons cliniques en France afin de surveiller la circulation des virus dans les zones d'endémie, tout en offrant ensuite une aide technique au pays via le transfert technique et la formation du personnel notamment. Il faut cependant souligner la difficulté de mettre en place de telles collaborations dans des pays éloignés, parfois peu stables ou n'ayant que très peu de moyens humains et financiers à consacrer à la santé publique. La mise en place de ces collaborations est donc un travail de longue haleine qui peut facilement être impacté et retardé par des événements sociaux ou politiques par exemple. D'autre part, les collaborations internationales du Laboratoire P4 dans ce domaine ont pâti cette année de la demande de validation des décontaminants utilisés dans le laboratoire P4. Des saisines de l'ANSES et de l'ANSM ont été reçues, et la priorité a été donnée à la biosécurité et à la validation de ces décontaminants pour éviter des conséquences néfastes sur l'ouverture du laboratoire P4 et donc pour les travaux menés au CNR des FHV. Les programmes suivants ont donc été mis en stand-by au cours de l'année 2013 :

*-Surveillance des encéphalites virales au Népal :*

Le projet porte sur la détermination de l'étiologie des encéphalites virales infectieuses touchant annuellement la région de Kathmandou au Népal. Il vise à déterminer l'origine de ces

encéphalites par des techniques de diagnostic différentiel utilisant la biologie moléculaire, la sérologie et la culture de virus sur des prélèvements provenant d'une cohorte de patients infectés ou témoins. L'étude de ces prélèvements devrait permettre de déterminer les virus connus ou non impliqués dans ces encéphalites, parmi lesquels il pourrait y avoir des agents pathogènes de GR4 apparentés au virus Nipah. Une convention a été signée en 2010 entre le Laboratoire P4, les Hospices Civils de Lyon et le Tribhuvan University Teaching Hospital (TUTH) de Kathmandou. En 2013, et comme en 2012, le congé sabbatique de la personne en charge de ce projet au Népal n'a pas permis l'avancement de ce projet dans un contexte difficile pour obtenir des renseignements fiables.

*-Surveillance CCHF et pathogènes de classe 4 au Kirghizistan :*

Une convention a également été signée entre le Laboratoire P4 et l'équipe de Roger Hewson du "Health Protection Agency" (HPA) de Porton Down, en Angleterre, pour une étude portant sur le virus CCHF au Kirghizistan. Cette collaboration pourrait permettre la mise en évidence de nouvelles souches de virus CCHF voire même d'autres agents pathogènes connus ou inconnus via l'analyse de vecteurs du virus CCHF présents dans différentes zones géographiques du pays, les tiques *Hyalomma* Genus. Ces prélèvements recueillis directement au Kirghizistan seront fixés ou dessiqués pour être plus tard analysés et des analyses géospatiales sont également planifiées. Les spécimens ainsi recueillis seront analysés et conservés au Laboratoire P4, rendant leur caractérisation possible et permettant ainsi de mettre en place de nouvelles techniques de diagnostic sur les agents pathogènes découverts de cette manière. Des tiques ont été collectées au Kirghizistan entre 2011 et 2013, mais les premières analyses ont pour l'instant été menées directement sur le terrain par des équipes locales.

*-Surveillance CCHF en Ukraine :*

Lors de l'année 2012, un nouveau projet a vu le jour au Laboratoire P4, qui porte lui aussi sur la surveillance épidémiologique du virus CCHF sur le terrain, cette fois-ci en Ukraine. La convention a été rédigée en 2012 entre les différents partenaires de ce projet : l'INSERM, l'Université de Linköping (à laquelle est rattaché le laboratoire P4 suédois) et l'UAPS (Ukrainian Anti-Plague Station) à Simferopol, une structure dépendante du ministère de la santé ukrainien, et elle est actuellement en cours de signature. Ce projet vise à caractériser la circulation du virus CCHF en Crimée, après analyse des vecteurs tiques recueillis sur le terrain et de petits mammifères ou oiseaux. Des analyses devaient avoir lieu sur sang humain afin de déterminer la séroprévalence de CCHF dans cette région. Cette étude devrait donc permettre également l'amélioration des analyses moléculaires et sérologiques et un transfert de techniques et compétences des P4 européens français et suédois vers l'Ukraine. Cependant le contexte politique particulier de ces derniers mois en Ukraine n'a pas permis au projet de débiter en 2013 comme cela était prévu à l'origine.

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

Le CNR des FHV travaillant avec des virus de classe 4 pour lesquels il n'existe ni vaccin ni traitement, ce point est sans objet.

### 3.3 Contribution aux réseaux de surveillance

#### *- Surveillance nationale.*

Comme cela a été décrit dans le paragraphe 3.1, les pathogènes de classe 4 ne sont pas endémiques en France. Aucune surveillance à proprement parler n'est donc mise en place en routine sur le sol français. Cependant, à chaque suspicion sérieuse de cas d'importation de FHV en France, l'InVS est immédiatement contactée afin d'échanger en temps réel les dernières informations disponibles.

#### *- Surveillance internationale et européenne.*

Le CNR FHV est impliqué dans les réseaux de surveillance européens, notamment l'ENIVD, dont le renouvellement a été officialisé en 2013. Dans ce cadre, le CNR FHV a pour mission d'alerter l'ECDC via le réseau ENIVD en cas de détection d'une infection par un agent pathogène responsable de FHV en France ou lors d'une importation.

Le CNR FHV est également impliqué, via le Laboratoire P4 qui en assure la Direction lors de la phase préparatoire actuellement en cours, dans le réseau européen ERINHA. Ce réseau de partenaires européens est axé sur les agents de classe 4 et vise à favoriser la recherche sur ce type d'agents au sein des différents laboratoires européens. Ce projet vise également à améliorer la détection de ces pathogènes via la standardisation de réactifs et techniques de diagnostic au niveau européen, ce qui permettra également à terme de mieux pouvoir surveiller ces pathogènes dans leurs zones d'endémie. Il est toujours prévu que le laboratoire P4 s'occupe des activités liées au diagnostic des agents pathogènes de classe 4 lors de la phase opérationnelle, avec la mise en œuvre de nouvelles techniques de diagnostic et la standardisation des techniques de diagnostic existantes.

Le CNR FHV, via le Laboratoire P4 et l'UBIVE, est également au niveau mondial partenaire du réseau GOARN piloté par l'OMS et qui a pour objet la détection, le suivi et la participation aux épidémies pouvant avoir lieu de manière internationale.

Enfin, le CNR FHV, via le Laboratoire P4, est également membre du réseau européen QUANDHIP dont le but est l'amélioration de la capacité diagnostique des agents de classe 4 en Europe. Ce réseau organise notamment des exercices de contrôle qualité auxquels participe le CNR des FHV.

### 3.4 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

Contrairement à l'année 2012, le CNR FHV n'a pas été sollicité pour ce type d'activité lors de l'année 2013.

## 4 Alerte

Les cas suspects de fièvres hémorragiques à la charge du CNR FHV représentent tous une menace potentiellement importante en termes de santé publique et doivent donc être impérativement traités en urgence. Une coordination entre le CNR, la DGS et l'InVS est nécessaire pour gérer au mieux chaque étape de crise. La direction du CNR peut être jointe 24h/24 et 7j/7 par les personnels hospitaliers ou toute autre personne qui aurait besoin en urgence des services du CNR. En cas de suspicion très sérieuse d'infection par un virus responsable de fièvre hémorragique virale sur le sol français, le CNR FHV alerte immédiatement l'InVS. Il existe en effet un numéro de téléphone portable de l'épidémiologiste d'astreinte du Département des Maladies Infectieuses, permettant un contact même en dehors des heures ouvrables. Les décisions seront alors prises conjointement par le CNR FHV et l'InVS. La DGS pourra être mise au courant dès cet instant si la suspicion d'infection est très forte, ou pourra être informée immédiatement après les tests de diagnostic réalisés au CNR si ceux-ci s'avèrent positifs.

Dans certains cas, comme cela s'est notamment produit en mai 2012, le CNR FHV peut directement être contacté par l'InVS de l'arrivée en France d'une suspicion de cas de fièvre hémorragique. Cela ne s'est pas produit en 2013. La procédure existante fonctionne parfaitement, comme cela a pu être démontré en 2012, même en cas de stress comme cela est le cas lors de la gestion d'un tel événement.

## **5 Activités d'information, de formation et de conseil**

### **5.1 Enseignements, formations aux professionnels de santé, accueil de stagiaires**

*-Enseignements et formations :*

Le responsable du CNR FHV a dispensé un cours sur la pathogénèse des Arénavirus dans le cadre du *Master 2 Infectiologie* de l'Université Lyon I – Claude Bernard (février 2013) et du *Cours de Virologie Fondamentale* de l'Institut Pasteur (octobre 2013, Institut Pasteur, Paris). Par ailleurs, un enseignement d'1h a été prodigué lors des Journées Post-Master de l'école de l'Inserm Liliane Bettencourt (février 2013). Thème : Pathogénèse et réponses immunes au cours de la fièvre de Lassa.

Le CNR FHV, et plus exactement certains membres de l'équipe P4, forment régulièrement au cours de l'année des nouveaux personnels aux contraintes spécifiques au travail en laboratoires de type P3 et P4 (Delphine Pannetier et Stéphane Mely sont les formateurs habilités en ce qui concerne le travail en laboratoire P4, et Anne Bocquin est habilitée pour la formation en laboratoire P3). La formation P4 est constituée de différents modules de biosécurité, gestion des MOT, procédures de travail, conseils techniques pour les bonnes pratiques de laboratoire, avec une formation de 3 semaines dans le laboratoire sur la base de demi-journées de travail. Ainsi, en 2013, le Laboratoire P4 a dispensé 10 nouvelles formations auprès de stagiaires et a recyclé 3 personnels ayant déjà été formés au cours des années précédentes. En ce qui concerne le Laboratoire P3, deux nouvelles personnes ont été formées au travail dans ce laboratoire et 1 personne précédemment formée a subi un recyclage.

Le CNR FHV, via Delphine Pannetier, a participé en novembre 2012 à un séminaire de préparation pour un projet de référentiel pédagogique pour une formation qualifiante en

biosécurité/biosûreté sous l'égide de l'infrastructure nationale BioBanques – Inserm US013. Ce projet vise à harmoniser les formations et leur contenu dans les laboratoires de haut confinement en France. Le Dr Delphine Pannetier a ensuite été retenu comme rédacteur de certains chapitre de ce futur manuel, en lien avec le comité éditorial. Les contributions des nombreux rédacteurs ont été recueillies au cours de l'année 2013 et doivent être analysées et mises en forme en 2014 afin de permettre l'édition de ce guide.

*-Guides élaborés (contenu, modes de diffusion) :*

Le CNR des FHV, en la personne de Delphine Pannetier, membre suppléant du conseil scientifique du réseau des laboratoires Biotox-Piratox, a participé à l'élaboration d'un guide de recommandations de bonnes pratiques à mettre en œuvre dans le cadre des analyses à réaliser sur un échantillon biologique humain ou un échantillon environnemental suspecté de contenir des agents de la menace. La parution de ce guide, qui devait initialement avoir lieu en 2013 pour les laboratoires indépendants ou les structures hospitalières, a finalement été reportée pour l'année 2014. Ce guide donne de nombreux conseils réglementaires et techniques permettant de gérer les différentes phases d'un diagnostic de ce type : recueil de l'échantillon, phase pré-analytique, phase analytique, analyse des résultats, législations à respecter, contacts avec les laboratoires de référence et les autorités de santé publique... Ces conseils s'appliquent pour la recherche de virus, bactéries ou toxines inscrites sur la liste des MOT.

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

Le site web du CNR FHV, ainsi que différents documents associés (fiche de renseignements cliniques, fiche de prélèvement), sont consultables à l'adresse suivante : <http://www.pasteur.fr/ip/easysite/pasteur/fr/sante/centres-nationaux-de-referance-et-centres-collaborateurs-de-l-oms/cnr-et-ccoms/cnr-ccoms-des-fievres-hemorragiques-virales/identite-et-coordonnees>

Le site web du CNR présente sur la page « Identité et coordonnées » les numéros téléphoniques ainsi que l'adresse email [cnr-fhv@pasteur.fr](mailto:cnr-fhv@pasteur.fr) qui renvoie les messages au personnel du CNR.

En l'absence de diagnostic positif au cours de l'année 2013, aucune donnée n'a été mise en ligne.

*-Activités de conseil aux professionnels*

Trois postes téléphoniques fixes (secrétariat, responsable et responsable adjoint) peuvent être joints pendant les heures ouvrables. En dehors des heures ouvrables, un message donne les numéros de téléphone mobile du responsable et de son adjoint. Le responsable ou son adjoint exerce l'activité de conseil. Ainsi, le CNR FHV est en mesure de répondre à toute heure aux demandes de conseils ou de diagnostic.

Les appels ont été enregistrés sur un cahier. Depuis décembre 2012, un fichier informatique partagé par le personnel permet de noter les appels reçus et les réponses apportées. Ce système a été testé durant toute l'année 2013 et son mode de fonctionnement apparaît tout à fait cohérent avec les besoins et les attentes du CNR des FHV. Ce mode d'organisation sera donc reconduit pour les années à venir. Ainsi, au cours de l'année 2013, le CNR a été sollicité une vingtaine de fois pour délivrer des conseils aux professionnels de santé et juger de la pertinence de l'envoi d'un échantillon au CNR FHV.

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

### 6.1 Pathogénèse et réponse immune au cours de la fièvre de Lassa

La principale thématique de recherche de l'UBIVE concerne l'étude de la pathogénèse et des réponses immunes associées à la fièvre de Lassa. Récemment, nous nous sommes plus particulièrement focalisés sur les points suivants :

*-Rôle des cellules NK au cours de la fièvre de Lassa :*

Au cours des infections virales, les cellules NK sont d'importants médiateurs impliqués dans l'élimination des cellules infectées. Les interactions des cellules NK avec les cellules présentatrices d'antigène (CPA) induisent l'activation et la prolifération des cellules, la production de cytokines et la cytotoxicité. Nous avons développé un système *in vitro* de coculture de cellules NK et de CPA humaines afin d'étudier les interactions entre ces cellules au cours de l'infection par le virus Lassa. Nous avons observé que les macrophages infectés par le virus Lassa, mais pas les cellules dendritiques, activaient fortement les cellules NK et augmentaient leur potentiel cytotoxique, mais n'induisaient pas la production d'IFN $\gamma$ . Ces investigations se poursuivront en 2013.

*-Identification du rôle des facteurs viraux dans la pathogénèse et les réponses immunes au cours de la fièvre de Lassa :*

Nous nous intéressons au rôle des facteurs viraux dans la différence de pathogénicité entre le virus Lassa et le virus Mopeia, très proche mais non pathogène. Nous avons développé un système de génétique inverse permettant de générer des virus recombinants pour les virus Lassa et Mopeia. Nous avons en particulier obtenu un virus Lassa présentant des mutations dans la nucléoprotéine abolissant sa capacité à inhiber la réponse IFN de type I. Ce virus est très atténué et très immunogène dans nos systèmes *in vitro*. Ce type d'approche pourrait permettre le développement de stratégie vaccinale. Par ailleurs, nous nous intéressons également au rôle d'autres protéines virales comme la protéine Z.

### 6.2 Collaborations avec des industriels

*-Développement d'un traitement contre le virus CCHF :*

Le CNR FHV a participé à un projet de recherche sur le virus CCHF mis en place par la société biopharmaceutique Fabentech. Le but de ce projet est de développer une méthode d'immunothérapie passive basée sur l'utilisation d'immunoglobulines polyclonales Fab'2 dans le domaine des maladies infectieuses, et notamment dans le traitement précoce de patients atteints de la fièvre de Crimée-Congo. Comme en 2012, en 2013 le CNR a fourni quelques réactifs permettant d'améliorer des protocoles précédemment mis en place (ELISA, séroneutralisation). Suite au ralentissement de l'investissement du laboratoire P4 dans ce projet lié aux validations des décontaminants imposées par l'ANSES et l'ANSM, un report de financement de ce projet a été

obtenu pour les années 2014-2015. Le CNR devrait donc encore être sollicité de manière ponctuelle pour la suite de ce projet.

### 6.3 Publications de l'année 2013

Pannetier D, Reynard S, Russier M, Carnec X, Baize S. Production of CXC and CC chemokines by human antigen-presenting cells in response to Lassa virus or closely related immunogenic viruses, and in cynomolgus monkeys with lassa fever. PLoS Negl Trop Dis. 2014 Jan 9;8(1):e2637

Les publications suivantes concernent les équipes de recherche associées au CNR :

Ploquin A, Szécsi J, Mathieu C, Guillaume V, Barateau V, Ong KC, Wong KT, Cosset FL, Horvat B, Salvetti A. Protection against henipavirus infection by use of recombinant adeno-associated virus-vector vaccines. J Infect Dis. 2013 Feb 1;207(3):469-78

Dhondt KP, Mathieu C, Chalons M, Reynaud JM, Vallve A, Raoul H, Horvat B. Type I interferon signaling protects mice from lethal henipavirus infection. J Infect Dis. 2013 Jan 1;207(1):142-51

Mathieu C, Guillaume V, Volchkova VA, Pohl C, Jacquot F, Looi RY, Wong KT, Legras-Lachuer C, Volchkov VE, Lachuer J, Horvat B. Nonstructural Nipah virus C protein regulates both the early host proinflammatory response and viral virulence. J Virol. 2012 Oct;86(19):10766-75

Mathieu C, Guillaume V, Sabine A, Ong KC, Wong KT, Legras-Lachuer C, Horvat B. Lethal Nipah virus infection induces rapid overexpression of CXCL10. PLoS One. 2012;7(2):e32157

### 6.4. Conférences et communications de l'année 2013

Pannetier D, Reynard S, Russier M, Carnec X, Baize S. Mopeia virus and recombinant Lassa virus containing mutations into the exonuclease of the nucleoprotein, but not wild type Lassa virus, induce a strong release of CXC and CC chemokines by human antigen presenting cells. 5th European Congress of Virology. Lyon, France, 11-14 septembre 2013. PRESENTATION ORALE (orateur: S Baize)

Baize S. Emergence et réémergence des fièvres hémorragiques causées par des virus de classe 4. Journée IRSI/PP « biorisques-biodéfenses: synergies des protocoles de protection et transversalité. 28 juin 2013, Lyon. ORATEUR INVITE

Baize S. Réponses immunes et pathogénèse au cours de la fièvre de Lassa. Séminaires Internes du Département de Virologie. 18 février 2013. PRESENTATION ORALE

Russier M, Reynard S, Baize S. 15th International Negative Strand Virus Meeting. Grenade, Espagne, 16-21 juin 2013. POSTER

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

Comme nous l'avons déjà explicité, les virus du CNR des FHV ne sont pas endémiques en France et nécessitent d'être manipulés dans un laboratoire de confinement de niveau 4. Aucun lien n'existe donc avec d'autres laboratoires dans ce cadre-là. La mise en place d'activités de surveillance des réservoirs animaux de ces virus dans les zones d'endémie serait un plus, mais ce genre de collaborations n'est pas facile à mettre en œuvre, d'autant plus que d'autres pays européens ont parfois déjà en place des programmes sur le terrain. De telles études s'apparentent plus à de la recherche sur l'écologie des virus des fièvres hémorragiques virales et doivent faire appel à des spécialistes vétérinaires notamment.

## **8 Programme d'activités pour les années 2014 et 2015**

### **8.1 Dépôt du dossier de demande d'accréditation partielle du laboratoire NF EN ISO 15189**

En 2013, une grosse partie de l'activité du personnel du CNR des FHV a été consacré à ce dossier. Les réponses à apporter pour répondre au référentiel représentent une quantité de travail extrêmement importante. En effet, il faut notamment mettre à jour l'ensemble des documents qualité et valider un certain nombre des techniques utilisées pour le diagnostic. Ces activités ont débuté en 2013 et vont se poursuivre jusqu'à ce que toutes les techniques utilisées au CBNR des FHV soient accréditées, à l'horizon 2016 si possible mais peut-être au-delà. La base de données permettant de gérer les examens biologiques exécutés et les données cliniques, biologiques et épidémiologiques de patients, qui devait être mise en place en 2013 n'est pas encore opérationnelle et sa mise en place est désormais prévue en 2014.

### **8.2 Développement des techniques de détection, d'identification et de caractérisation des agents**

En raison de la charge de travail qui a été requise en 2013 par la préparation de l'accréditation ISO 15189 et par les validations de décontaminant demandées par l'ANSM, le travail de développement prévu pour 2013 n'a pas avancé de manière significative. Le programme prévu dans le rapport précédent est donc reconduit quasi à l'identique pour les deux prochaines années.

#### **8.2.1. Production des réactifs de référence**

L'absence de réactifs commerciaux pour les différents agents viraux à expertiser implique que le CNR fabrique les réactifs correspondants et les valide. Il est crucial pour le CNR de disposer en permanence d'un panel exhaustif de réactifs de référence permettant de couvrir la diversité virale à

laquelle il est susceptible d'être confronté. Le maintien de ces stocks implique un travail conséquent de production de virus, d'antigènes et d'anticorps, et de matériel génétique viral (ARN viral, transcrits synthétiques), compte-tenu de la diversité des agents d'intérêt pour le CNR et de la nécessité de les manipuler en confinement de niveau 4. De plus, un certain nombre de réactifs ne sont pour l'instant pas encore disponibles ou pas encore validés.

Les réactifs et techniques qui seront respectivement produits et développés de façon prioritaire au cours des années 2013 et 2014 sont :

*-Sérologie IgM et IgG pour les Arénavirus du nouveau-monde* : production de stock viraux puis production de lysats de cellules Vero E6 infectées. Mise au point et validation des tests de détection ELISA IgM (immuno-capture) et IgG (ELISA direct) : sensibilité par rapport à des sérums de référence, réactions croisées entre des sérums de patients infectés par différents Arénavirus.

*-RT-PCR temps réel pour les Arénavirus du nouveau-monde* : la RT-PCR classique utilisée actuellement pour le diagnostic des infections par les Arénavirus du nouveau-monde n'étant pas spécifique de chacun des virus responsables de FHV, il serait intéressant de non seulement disposer d'une méthode temps-réel consensus, mais aussi spécifique de chacun des 4 virus induisant des FHV. Pour ce faire, des couples d'amorces et de sondes vont donc être choisis et validés à l'aide d'échantillons du CNR.

*-Sérologie IgM et IgG pour les virus Ebola Bundibugyo, Côte d'Ivoire et Reston* : afin de prendre en considération l'émergence récente d'une nouvelle espèce de virus Ebola, des sérologies IgM et IgG spécifiques de ce virus devront être élaborées et validées. Par ailleurs, la spécificité de ces techniques et de celles utilisées pour les autres Filovirus sera déterminée. Enfin, certaines sérologies déjà disponibles ne sont pas encore validées. C'est le cas des infections par les virus Ebola Côte d'Ivoire et Reston. Pour cela, il faudra que le CNR FHV acquière des sérums séropositifs pour ces virus. Cela ne sera pas possible pour le virus Ebola Côte d'Ivoire, pour lequel un seul (un deuxième probable) cas humain a été enregistré. La validation de cette technique ne pourra donc pas être réalisée pour le moment.

### **8.2.2 Optimisation des techniques de diagnostic**

Une des missions notables du CNR FHV sera d'optimiser en fonction des évolutions technologiques les différentes techniques de diagnostic utilisées afin de les rendre le plus sensible et spécifique possible. En effet, certaines techniques ou réactifs actuellement utilisés pourraient être optimisés afin d'obtenir une plus grande sensibilité de détection. Par exemple, les Ag produits dans le cadre du CNR FHV sont à ce jour fabriqués à partir de surnageants de cellules infectées, le plus souvent Vero E6. Cela a pour conséquence des bruits de fond parfois élevés avec certains sérums, ce qui bien entendu diminue d'autant la sensibilité. De fait, des comparaisons seront faites avec des Ag préparés à partir de virus purifiés sur coussin de sucrose afin de déterminer si l'élimination du matériel cellulaire et du sérum de veau permet d'améliorer la technique.

De même, les techniques moléculaires (RT-PCR classique ou temps réel) seront également optimisées en fonction des évolutions technologiques et des publications d'autres équipes ou des collaborations européennes ou internationales.

Le problème rencontré dans le cadre de l'inactivation par irradiation des antigènes nous pousse à essayer d'autres méthodes d'inactivation pour la production de nos réactifs. En particulier,

l'inactivation thermique des antigènes (1h/60°C) sera évaluée en remplacement de l'inactivation par irradiation.

### 8.2.3 Développement de nouvelles techniques de diagnostic

*-Adaptation des outils du CNR aux agents émergents :* La diversité des agents intéressants le CNR est en constante évolution, et de nouvelles espèces pathogènes pour l'homme émergent régulièrement, comme par exemple le virus Ebola Bundibugyo, le virus Lujo ou le virus Bas-Congo. Il est donc de la responsabilité du CNR de mettre à jour son panel de réactifs de référence en fonction de ces émergences. Cela implique l'isolement des souches impliquées, leur caractérisation génotypique, leur adaptation dans un système de culture cellulaire permettant leur production en quantité suffisante, la production d'ascite, de sérums immuns et de mAb spécifiques et, enfin, le développement d'amorces et de sondes permettant la détection de leur matériel génétique ainsi que la préparation d'extraits d'ARN viraux (témoins positifs). Ensuite, il est nécessaire de valider ces nouvelles méthodes afin qu'elles deviennent des méthodes de référence. Là encore, la diversité des espèces virales dépendant du CNR FHV confère une grande importance à cette tâche et implique donc des moyens humains et techniques conséquents.

Les priorités du CNR seront dans ce domaine de développer des réactifs et de valider les techniques de référence pour les virus précédemment cités et qui ont récemment émergé.

*-Optimisation de la détection des virus Ebola par RT-PCR quantitative :* Une collaboration entre le laboratoire P4 et le CEA, liée au programme NRBC piloté par le CEA est en cours. Elle a pour but la détection des Filovirus par PCR quantitative en temps réel. Des sondes et des couples d'amorces, ciblés dans des régions stratégiques des génomes viraux, avaient déjà été modélisées grâce à une étude bio-informatique. La validation de ces sondes et amorces par PCR quantitative en temps réel sur de l'ARN viral purifié a été menée conjointement au CEA et au laboratoire P4 et a permis de déterminer leur spécificité sur les souches de virus Ebola Zaïre, Ebola Soudan et Marburg. L'optimisation de leur utilisation continue à l'heure actuelle en parallèle au CEA et au laboratoire P4. Cette collaboration permettra en outre d'améliorer la fiabilité de la détection des Filovirus déjà en place et, par utilisation d'une méthode similaire sur d'autres familles virales, servira également de base au développement de nouveaux outils de détection et identification d'agents pathogènes de GR4. Ces nouveaux outils pourront ensuite être testés et validés par le CNR.

### 8.2.4 Enrichissement des collections

Une des missions du CNR est de maintenir et enrichir la collection des virus responsables de FHV. Dans ce but, nous continuerons à acquérir les souches qui manquent à la collection du CNR ainsi que les souches ou isolats qui émergent régulièrement. Les nombreuses collaborations instituées par les différentes équipes du CNR au niveau international (réseau des laboratoires P4 européens, CDC d'Atlanta, ECDC de Stockholm, OMS...) permettront d'atteindre cet objectif. Nous souhaitons ainsi, entre autres, acquérir prochainement les Arénavirus Guanarito et Sabia qui ne sont pas détenus par le CNR FHV actuellement. Parmi les virus ayant récemment émergés, il faudra acquérir rapidement le virus Lujo (Arénavirus ayant récemment émergé en Afrique du Sud) et Ebola Bundibugyo. Ces deux derniers virus seront néanmoins difficiles à obtenir, car les laboratoires qui les détiennent actuellement ne souhaitent pas ou ne peuvent pas

les céder. L'acquisition des souches de GR4 sera gérée par l'équipe du laboratoire P4 en respect des procédures en vigueur et grâce aux autorisations qu'elle détient auprès de l'ANSM concernant ces agents.

### **8.3 Mise en place d'une collaboration avec la Guinée pour la surveillance de la fièvre de Lassa**

Les contacts établis entre le CNR FHV et l'Institut National de Santé Publique de Guinée (Dr Loua) afin de mettre en place une collaboration pour la surveillance de la circulation du virus Lassa en Guinée Conakry ont été poursuivis en 2013 afin de développer un programme de surveillance de la fièvre de Lassa chez l'homme, mais aussi de réaliser des études de terrain sur la prévalence de l'infection par le virus Lassa dans les populations de Mastomys. Des contacts ont été également pris en 2013 avec le Centre Pasteur de Yaoundé et l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire afin d'établir un réseau plus vaste. Des actions concrètes seront réalisées en 2014 afin de finaliser la mise en place du réseau et de trouver des sources de financement pour démarrer la collaboration.

### **8.4 Mise en place d'un Centre de Ressource Biologique**

Le Laboratoire P4 ayant été lauréat d'un appel offre du grand emprunt en 2011, il est actuellement en train de s'agrandir, ce qui permettra de doubler la surface de travail disponible. Ce nouveau laboratoire P4 possédera une nouvelle animalerie, ainsi que des zones dédiées à l'expérimentation cellulaire. Une partie de cette zone sera dédiée aux activités de recherche, tandis qu'une autre sera entièrement dédiée aux activités de diagnostic et à la gestion de la collection des microorganismes de classe 4. Les travaux d'extension de ce laboratoire ont cependant pris du retard en 2014, et l'ouverture de cette nouvelle structure est repoussée à 2015, date à laquelle sera également créé un véritable Centre de Ressource Biologique, avec une pièce réservée au diagnostic des agents pathogènes de classe 4, une pièce réservée pour leur stockage et leur mise en culture, amplification, production... Le respect des normes existantes en matière d'infrastructure de ce type, et notamment la norme NF-S 96900 spécifique aux Centres de Ressources Biologique, sera appliquée. Le CNR FHV bénéficiera donc d'un environnement optimal pour stocker et gérer sa collection de pathogènes de classe 4.