

Diagnostic en virologie

Jeu 22 mars 2017, 14 h 00-15 h 15

Modérateurs : Nicolas Levêque et Astrid Vabret

Communications orales O11 à O15

Affiches P37 à P45, P85 à P87

O11

Programme mondial d'éradication des poliovirus : quelles conséquences pour le matériel biologique conservé dans les laboratoires de virologie ?

Maël Bessaud^{1,2}, Marie-Line Joffret^{1,2}, Francis Delpeyroux^{1,2}

¹ Unité de biologie des virus entériques, Institut Pasteur de Paris, France

² Centre collaborateur de l'OMS pour les entérovirus et les vaccins viraux, WHO (OMS), France

<mael.bessaud@pasteur.fr>

L'OMS conduit depuis 1988 un programme mondial visant à éradiquer les poliovirus, agents étiologiques de la poliomyélite. Ce programme reposant sur des campagnes de vaccination de masse a permis de diminuer drastiquement le nombre de cas de poliomyélite : en 2017, seuls 20 cas de poliomyélite dus à des souches sauvages ont été recensés à l'échelle mondiale. Tous ces cas ont été causés par des virus appartenant au type 1, les types 2 et 3 n'ayant plus été observés dans la nature depuis 1999 et 2013, respectivement. La circulation de poliovirus sauvages est aujourd'hui circonscrite à trois pays (Nigéria, Afghanistan et Pakistan). Dans le but de préparer l'ère post-éradication, l'OMS a édité en 2015 le Plan d'action mondial visant à réduire au minimum le risque d'exposition aux poliovirus associé aux établissements après l'éradication par type des poliovirus sauvages et l'arrêt progressif de l'utilisation du vaccin antipoliomyélique oral. Ce plan définit des règles concernant le confinement des poliovirus qui, à terme, ne pourront plus être détenus et manipulés que par quelques laboratoires accrédités par l'OMS. Ce plan concerne non seulement les échantillons biologiques contenant du poliovirus mais aussi tout matériel potentiellement infecté par le poliovirus (PIM pour *Potentially Infected Material*). Sont considérés comme PIM les échantillons cliniques ou leurs dérivés (matériel génétique et surnageants de cellules infectées) collectés dans une région et au cours d'une période où circulait du poliovirus ou où le vaccin polio oral était utilisé. Cette définition très large couvre de nombreux types d'échantillons (échantillons cliniques fécaux ou respiratoires, échantillons environnementaux, etc.) y compris ceux détenus par des laboratoires n'ayant jamais travaillé sur le poliovirus : par exemple, les stocks de virus respiratoires, le matériel génétique correspondant et les produits de laboratoires issus de cellules permissives aux poliovirus sont concernés par ce plan. Les laboratoires détenant de tels produits devront démontrer qu'ils sont dépourvus de poliovirus contaminants ou, à défaut, les détruire ou les transférer dans un des rares laboratoires autorisés à détenir des poliovirus. Nous détaillons ici ce plan de confinement qui devrait impacter de nombreuses collections conservées dans les laboratoires de virologie. Nous présentons également les solutions techniques que nous sommes en train de développer pour tester la présence de poliovirus dans ces collections.

O12

La protéine ZEBRA soluble : un nouveau biomarqueur de lymphomagenèse chez le sujet immunodéprimé

Emmanuel Drouet¹, Henri-Jacques Delecluse², Marlyse Buisson¹, Raphaële Germe³, Patrice Morand³, Mohammed Habib³

¹ Institut de biologie structurale (IBS-UMR 5075), CEA DRF/IBS, CNRS UMR5075, Université Grenoble Alpes, Université Joseph Fourier-Grenoble 1, Institut de biologie structurale Jean-Pierre Ebel, CEA-CNRS-UJF, 41, rue Jules Horowitz, F-38027 Grenoble cedex 1, France

² University of Heidelberg, Medical Faculty, Allemagne

³ CHU Grenoble, Université Grenoble Alpes, France

<emmanuel.drouet@ibs.fr>

La protéine ZEBRA (codée par le gène BZLF1), est le principal facteur de transcription de l'EBV, exprimée lors de l'activation du cycle lytique EBV. Plusieurs études ont mis en évidence le rôle critique de l'infection lytique EBV en tant que risque facteur pour les syndromes lymphoprolifératifs comme la maladie lymphoproliférative post-transplantation (PTLD), consistant en un syndrome lymphoprolifératif à lymphocytes B, à l'issue souvent fatale. Parallèlement, il a été démontré que la réactivation de l'EBV pouvait contribuer à la croissance de cellules infectées de manière latente en favorisant la libération des facteurs de croissance des lymphocytes B. Par ailleurs, une série de données provenant de modèles animaux soutiennent l'hypothèse émergente que l'expression du gène BZLF1 est un facteur important dans le développement des lymphomes chez la souris. Ici, nous utilisons un test ELISA de capture d'antigène spécialement conçu pour détecter la protéine ZEBRA soluble circulante (sZEBRA) dans des échantillons de sérum (valeur seuil déterminée à 40 ng/ml). Nous avons étudié rétrospectivement une population de 66 patients transplantés comprenant 35 PTLD. Tous les échantillons d'une population témoin (30 sujets séronégatifs à l'EBV et 25 sujets immunocompétents avec une réactivation sérologique EBV), ont montré de valeurs de sZEBRA 200 copies/mL et sZEBRA était détectable dans 51 % et 60 % des cas, respectivement, sans corrélation entre les deux marqueurs ($p = 0,098$). Chez les patients ayant développé un PTLD pathologiquement confirmé, la valeur moyenne de sZEBRA était de 399 ng/mL \pm 141 contre 53 ng/mL \pm 7 chez les patients sans PTLD ($p < 0,001$). Ces résultats constituent la première description relative à la détection de la protéine ZEBRA soluble circulante au niveau du sérum, ainsi que la première analyse démontrant clairement l'intervention du cycle lytique de EBV chez les patients transplantés (greffe d'organe solide et de cellules souches hématopoïétiques) avec PTLD. Fait intéressant, nous démontrons une corrélation entre la quantité de sZEBRA circulant et la quantité de hIL-10 au niveau du sérum. Des résultats similaires ont été obtenus sur des échantillons de sérums provenant de patients HIV+ avec lymphome, de même que sur du sérum de souris immunodéprimées humanisées infectées par la souche EBV M81 et développant une tumeur. L'ensemble de ces résultats montrent que la protéine ZEBRA est impliquée dans la pathogenèse de l'EBV, non seulement en tant que protéine essentielle dans l'activation de la réplication de l'EBV, mais également en tant que « protéine toxoïde » libérée dans le milieu extracellulaire. La libération de la protéine ZEBRA en dehors de la cellule infectée pourrait conduire à la sécrétion accrue de cytokines immunomodulatrices (aggravant ainsi l'environnement immunosuppresseur) et de facteurs favorisant l'angiogenèse, propice à la progression tumorale.

Habib M. et al. *Nature Sci. Reports* 2017 ; 7 : 10479. DOI :10.1038/s41598-017-09798-7.

O13

Premier cas en France d'un don de sang identifié en phase d'éclipse VIH-1 depuis la mise en place du dépistage du génome viral en test unitaire

Pierre Cappy¹, Valérie Barlet², Xavier Tinard³, Josiane Pillonel⁴, Sylvie Gross⁵, Syria Laperche¹

¹ Institut national de la transfusion sanguine, Département des agents transmissibles par le sang (INTS-DATS), 6, rue Alexandre Cabanel, 75739 Paris cedex 15, France

² Établissement français du Sang, ETS Auvergne Rhône-Alpes, Laboratoire de qualification biologique des dons, Metz-Tessy, France (EFS)

³ ETS Grand Est, Pôle des vigilances, Nancy, France (EFS)

⁴ Santé publique France, Département des maladies infectieuses, Saint-Maurice, France (SPF)

⁵ ETS, Siège, Saint-Denis, France (EFS)

<pcappy@ints.fr>

Contexte. En France, le risque résiduel (RR) d'infection à VIH-1 transmise par transfusion a été réduit par l'introduction du dépistage génomique viral (DGV) en 2001. Néanmoins, le DGV même pratiqué en test unitaire ultrasensible depuis 2010, peut être pris en défaut dans deux situations : la présence de polymorphisme dans la zone-cible de détection, et un don en phase d'éclipse. Nous rapportons ici le premier cas de don de sang identifié en phase précoce, pour lequel le résultat du DGV était négatif en test unitaire.

Méthodes. En France, la qualification biologique des dons (QBD) vis-à-vis de l'infection à VIH repose sur le dépistage des anticorps (Prism, Abbott) et de l'ARN (Ultrio Procleix Tigris, Grifols, LOD 95 % = 23 copies/ml ou 39 UI/ml). La découverte d'une séroconversion VIH chez un donneur régulier fait l'objet d'une recherche d'ARN sur le cryotube archivé du don N-1 par le CNR Risques infectieux transfusionnels (Cobas Taqman, LOD 95 % = 17 copies/ml ou 29 UI/ml).

Observation. En août 2017, un homme de 57 ans, donneur de sang régulier, sans facteur de risque identifié, a été dépisté positif pour le VIH-1 (don N : WB complet, CV = 11599 copies/ml, sous-type B). L'enquête sur le don N-1, réalisé quatre mois auparavant et dépisté négatif lors de la QBD, a révélé la présence d'ARN-VIH-1 à un niveau détectable mais inférieur à la limite de quantification de la trousse Cobas Taqman (34 copies/ml ou 58 UI/mL). Le culot globulaire (CGR) issu du don N-1 (volume plasmatique résiduel 20 mL) avait été transfusé à un homme de 23 ans, allogreffé de moelle osseuse, et décédé 6 jours après la transfusion. La charge virale effectuée sur un prélèvement archivé datant de J5 post-transfusion était négative. Les plaquettes issues du don N-1 (volume plasmatique résiduel 20 mL) ont été transfusées à une patiente de 62 ans atteinte de leucémie aiguë myéloblastique, sous forme d'un mélange de concentrés plaquettaires inactivé par amotosalen/UVA. La sérologie de contrôle réalisée chez cette patiente 7 mois post-transfusion était négative. Enfin, le plasma issu du don N-1 a été fractionné par le LFB. L'analyse de risque du LFB n'a conduit à aucune mesure de retrait de lot au vu de l'efficacité des mesures de réduction des pathogènes mises en œuvre lors des procédés de fabrication des médicaments dérivés du plasma sur de tels niveaux de CV.

Conclusion. L'absence de détection de l'ARN du VIH-1 par les dispositifs ultrasensibles utilisés en QBD reste un phénomène exceptionnel mais démontre que le risque d'être en présence d'un don infecté mais non dépisté comme tel, quoique très faible, existe. Le cas rapporté est compatible avec l'estimation du RR-VIH-1 qui est de 1/4,8 millions de dons (un don tous les 1-2 ans, période 2014-16). L'absence d'infection chez le receveur de CGR n'exclut pas formellement la contamination en raison du décès précoce du patient. La séronégativité de la receveuse des plaquettes peut être due à une trop faible dose de virus transfusée (20 ml x 17-33 copies/ml = 340-660 copies) et/ou à l'efficacité du procédé d'inactivation virale utilisé.

O14

Développement d'un test bioluminescent innovant permettant de mesurer la lyse cellulaire par des cellules NK ou une infection virale lytique

Simon Hayek¹, Nassima Bekkador¹, Nicolas Pietrancosta¹, Laurie Besson², Rodolphe Alves De Sousa¹, Sébastien Viel², Nikaia Smith¹, Yves Jacob³, Sébastien Nisole⁴, Rupasri Mandal⁵, David S. Wishart⁵, Thierry Walzer², Jean-Philippe Herbeuval¹, Pierre-Olivier Vidalain¹

¹ Chimie & biologie, Modélisation et immunologie pour la thérapie (CBMIT), Université Paris Descartes, CNRS UMR8601, 45 rue des Saints-Pères, Paris, France

² Centre international de recherche en infectiologie, CIRI, Inserm, U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, École normale supérieure de Lyon, University of Lyon, Lyon, France

³ UMR 3569, CNRS, Unité de génétique moléculaire des virus à ARN, Institut Pasteur, Université Paris Diderot, Paris, France

⁴ Institut de recherche en infectiologie de Montpellier CNRS UMR 9004, Université de Montpellier, Montpellier, France

⁵ The Metabolomics Innovation Center, Departments of Biological Sciences and Computing Science, University of Alberta, Edmonton, Alberta T6G 2E9, Canada

<simon-k-hayek@hotmail.com>

Les cellules NK (*Natural Killer*) jouent un rôle essentiel dans la réponse immunitaire innée contre les infections virales. Elles expriment en effet un ensemble de récepteurs permettant de détecter les cellules infectées par un virus avant de les lyser. À ce titre, les cellules NK constituent une cible attrayante en immunothérapie. Différents tests fonctionnels existent pour mesurer l'activité cytotoxique des cellules NK, mais le plus utilisé repose sur la cytométrie en flux qui permet de quantifier la mort des cellules cibles après marquage. Cependant, cette technologie nécessite un nombre important de cellules, un équipement relativement lourd, du personnel qualifié et ne permet que difficilement la réalisation de cribles à grande échelle. Pour surmonter ces obstacles, nous avons développé un test bioluminescent original qui repose sur des cellules cibles modifiées à l'aide d'un vecteur lentiviral pour exprimer constitutivement la luciférase NanoLuc. Au moment de la lyse des cellules cibles, l'enzyme NanoLuc est libérée dans le surnageant de culture où son activité peut être quantifiée. Pour mesurer l'activité cytotoxique de cellules NK purifiées ou présentes au sein des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC), celles-ci sont co-incubées avec les cellules cibles pendant 4-8 heures avant de mesurer l'activité de la luciférase dans les surnageants de culture pour déterminer le niveau de lyse. La sensibilité et la robustesse de ce test sont au moins équivalentes à la cytométrie en flux, mais il est cent fois plus rapide à l'étape d'acquisition. Il est ainsi possible de cribler des chimiothèques de plusieurs centaines de composés en une seule journée. Pour établir une preuve de concept, nous avons recherché des modulateurs de l'activité des cellules NK dans une banque de métabolites et de xénobiotiques fournie par le TMIC (The Metabolomics Innovation Centre, Canada). Sur 800 molécules testées, 24 composés ont été sélectionnés et leur activité a été validée dans des expériences réalisées en dose-réponse. Parmi les inhibiteurs identifiés, nous avons isolé différents antihistaminiques et antitussifs fréquemment utilisés dans le traitement des infections virales respiratoires, des inhibiteurs des canaux ioniques, des métabolites endogènes et des xénobiotiques inhibiteurs de kinases cellulaires. Plus récemment, nous avons montré que ce même test basé sur la libération de luciférase dans le surnageant de culture peut être utilisé pour mesurer la réplication d'un virus cytolitique. En conclusion, les résultats obtenus montrent que ce test à haut débit de mesure de la cytolyse peut être utilisé pour quantifier l'activité des cellules NK comme la réplication de virus lytiques, et permet le criblage de chimiothèque pour isoler des antiviraux ou des modulateurs de l'activité NK.

O15

Détection du virus de l'hépatite A par impédancemétrie : applications en virologie alimentaire

Samuel Lebourgeois, Audrey Fraisse, Laurent Guillier, Catherine Hennechart-Collette, Sylvie Perelle, Sandra Latil
Laboratoire de sécurité des aliments, Unité virus entériques, Anses, Maisons-Alfort, France
<sandra.martin-latil@anses.fr>

Le virus de l'hépatite A (VHA) appartenant à la famille des *Picornaviridae* est responsable d'hépatites aiguës. Il est principalement transmis par voie féco-orale directe (contacts interhumains) ou indirecte (ingestion d'eau ou d'aliments contaminés par des matières fécales). À l'heure actuelle, la norme ISO 15216 propose des méthodes d'extraction et de détection du VHA par RT-qPCR dans l'eau, les végétaux et les mollusques bivalves. La détection de génomes viraux dans des échantillons alimentaires ne permet pas de confirmer la présence de virus infectieux ce qui limite l'appréciation du risque dans le domaine de la virologie alimentaire. L'objectif de cette étude est de développer et valider une méthode de détection des particules infectieuses du VHA basée sur la mesure de l'impédance cellulaire ; et d'évaluer son utilisation dans le domaine de la virologie alimentaire. Le système d'analyse cellulaire en temps réel xCELLigence (ACEA) a été utilisé pour mesurer l'impédance des cellules épithéliales FRhK-4. L'impédance mesurée (*index cellulaire*, *CI*) est liée au nombre de cellules, à leur adhérence et leur morphologie. Après avoir déterminé la densité cellulaire optimale à l'ensemencement, les profils

d'impédance des cellules FRhK-4 non infectées et infectées par la souche adaptée du VHA (HM175/18f) ont été établis. Une diminution du CI a été observée dans les cellules infectées 3 jours après l'infection des cellules par le VHA (105 PFU/ml) contrairement aux cellules non infectées où le CI restait stable. La diminution du CI viro-induite est observée plus précocement que la visualisation de l'effet cytopathogène viral au microscope optique. Pour déterminer la sensibilité de la méthode de détection du VHA par impédancemétrie, les cellules ont été infectées avec des dilutions sériées d'inoculum viral. Les profils d'impédance ont montré que le temps auquel la diminution du CI est observée est dépendant de la quantité de l'inoculum viral. Une relation linéaire entre la quantité de VHA infectieux inoculée sur les cellules et le temps nécessaire pour atteindre une diminution de 50 % du CI (CI50) a pu être établie. Les résultats ont montré une quantification linéaire du VHA par impédancemétrie sur 5 logs d'amplitude, avec une sensibilité de 10 PFU. Les méthodes de quantification des particules infectieuses du VHA par impédancemétrie et par titrage infectieux (méthode conventionnelle par plages de lyse) ont ensuite été comparées pour quantifier les particules infectieuses du VHA issues d'échantillons d'eau artificiellement contaminés et pour réaliser des cinétiques d'inactivation thermique du VHA (souche adaptée). Cette méthode de titrage par impédancemétrie présente l'avantage d'être plus rapide, moins laborieuse/fastidieuse (diminution du temps de manipulation, facilité d'analyse) et moins onéreuse que la méthode traditionnelle par plages de lyse. En conclusion, cette nouvelle technologie pourrait être proposée pour évaluer l'efficacité de différents procédés d'inactivation virale utilisés dans l'industrie agroalimentaire.

P37

Automated interpretation of Influenza Hemagglutination Inhibition assays (HAI) with the CypherOne (Indevr)

Marie-Clotilde Bernard¹, Magali Gonnet¹, Sylvie Commandeur¹

¹ Sanofi Recherche (Sanofi Pasteur), Sanofi Recherche, 1541 avenue Marcel Mérieux 69280 Marcy l'Étoile, France

<marie-clotilde.bernard@sanofi.com>

The hemagglutinin of influenza viruses binds to sialic acid sites present on the surface of red blood cells (RBCs). This property is used to titrate the virus by Hemagglutination (HA) and to evaluate specific functional antibodies by Hemagglutination Inhibition (HAI) assay in immune serum samples depleted from non-specific inhibitors. HA and HAI results are determined visually, and interpreted by well-trained experts. However, due to the lack of standardization of data interpretation, a high degree of variability and subjectivity in the results is observed. To improve consistency and traceability of the data, Indevr has developed an automaton (CypherOne), which can analyze and record both HA and HAI results. The aim of the study was to set up the analysis software by defining the optimal Calibration Factor (FC) in our experimental conditions, and to obtain equivalent readings between the visual and the automated procedures. The results showed that with a FC set at 130, the CypherOne offers the possibility to replace a visual reading of HA and HAI results by an automated and more reproducible reading. However, changes in the RDE/RBCs serum pretreatment, used to remove non-specific inhibitors, may limit the use in the HAI reading.

P38

Intérêts et biais du séquençage haut débit avec le système Illumina pour la recherche de résistance aux antirétroviraux du VIH

Sibel Berger¹, Brice Malvé², Thierry May³, Evelyne Schvoerer²

¹ Plateforme de génomique microbienne (Centre hospitalier régional universitaire de Nancy)

² Laboratoire de virologie (Centre hospitalier régional universitaire de Nancy)

³ Service des maladies infectieuses et tropicales (Centre hospitalier régional universitaire de Nancy), CHRU Nancy, Vandœuvre-lès-Nancy, 54500 France

<e.schvoerer@chru-nancy.fr>

Introduction. Le séquençage haut débit (NGS) permet de détecter des mutations de résistance sur des variants viraux minoritaires, en dessous de 20 % admis pour la méthode Sanger. La présence de variants minoritaires X4 peut être associée à un échec virologique chez les patients traités par un antagoniste de CCR5 ; de même pour la transcriptase inverse (TI). Le but du travail présenté est d'évaluer le système Illumina (MiSeq) pour l'étude de la sensibilité du VIH aux antirétroviraux.

Méthode. Deux approches ont été utilisées : séquençage sans fragmentation d'un amplicon de 370 pb (gène de la gp120) et séquençage après fragmentation d'un amplicon de 2.8 kb (gènes de la protéase, de la TI et intégrase). Pour la gp120, huit patients ont été sélectionnés. Les amorces de l'ANRS sont utilisées pour une RT-PCR. Une deuxième PCR nichée est réalisée avec ces amorces « *taguées* » (Nextera XT Index Kit). Pour le gène *pol*, 10 patients ont été étudiés. La région est amplifiée par RT-PCR (Dudley et al., 2014). La fragmentation de chaque produit amplifié est réalisée (Nextera XT DNA Library Preparation Kit). Une puce MiSeq Nano Kit v2 (500 cycles) est utilisée, l'analyse de séquences est réalisée grâce au logiciel Geneious.

Résultats. Pour la région de la gp120, une moyenne de 30 000 *reads* par patient a été obtenue. Avec un seuil à 1 %, nous avons mis en évidence plusieurs séquences de variants minoritaires pour chaque patient sur la région d'intérêt de 35 acides aminés pour la détermination du tropisme R5/X4. Dans sept cas sur huit, le résultat obtenu pour l'interprétation du tropisme était identique au résultat par séquençage Sanger. Pour un patient, nous avons mis en évidence un variant minoritaire représenté à 16,3 % à tropisme X4 qui n'avait pas été observé par séquençage classique. Pour la région *pol* de 2.8 kb séquencée en duplicat après fragmentation chez les 10 patients, l'alignement avec la séquence de référence du VIH a été possible pour trois patients (x2) et pour 1 replicat sur 2 pour deux patients, avec une moyenne de 50 000 *reads* par patient. Pour ces alignements, le profil de mutations obtenu est identique à celui observé après séquençage Sanger. Pour les autres patients, l'analyse par BLAST des *reads* montre que les séquences présentent un pourcentage de similarité de 100 % avec des séquences du génome humain.

Discussion et conclusion. Les premiers résultats confirment que cette méthode peut mettre en évidence des variants minoritaires non détectés par le séquençage Sanger. D'après notre première expérience de séquençage par fragmentation, des biais doivent être discutés. Étant donné que la fragmentation n'est pas spécifique de l'amplicon, il est possible d'analyser des séquences différentes de notre cible. Nos résultats montrent l'importance de la préparation des amplicons et de la mise en place d'actions de maîtrise des risques : matrice à quantité optimale, PCR limitant les produits aspécifiques, consommables *DNA-free* et *low-binding*, sécurisation quant aux risques de la contamination environnementale. Le NGS est une méthode intéressante et très sensible pour la détection de variants viraux minoritaires. Il est nécessaire toutefois de réaliser certaines optimisations.

P39

Latest Zika virus outbreak: lessons learnt from the perspective of the "European Virus Archive goes Global (EVAg)" EU funded consortium

Christine Prat, Jean-Louis Romette

Unité des virus émergents-UMR 190, Institut de recherche pour le développement [IRD] : UMR190, Aix-Marseille université, Marseille, France

<christine.Prat@univ-amu.fr>

Zika virus (ZIKV) has emerged in the Americas in February 2014 on Easter Island, Chile, and has since been causing an unprecedented outbreak in several countries in the Americas. In May 2015, PAHO issued an alert for the first confirmed case of Zika virus infection in Brasil, and on the 1st of February 2016, WHO declared a Public Health Emergency of International Concern (PHEIC). In this context, the "European Virus Archive goes Global", EVAg, a non for profit EU consortium grouping virology laboratories worldwide, distributed more than 300 ZIKV related products. The main mission of EVAg is the development and maintenance of a large biological resource of authenticated viruses and related products in order to

facilitate their access to both academics and industries. Together with this mission, one of the EVAg goals is also to support Public Health response during viral outbreaks. The Zika outbreak EVAg coordinated response was to propose a set of products available *via* its online catalogue, among which WHO recommended its Zika standards for use in molecular detection. A unique web based entrance for the request of viruses and derived products developed by several EVAg members allows a retrospective analysis of the demand. During the ZIKV outbreak, more than 300 products were distributed worldwide, the majority in the first trimester of 2016, with a peak in February, immediately following the WHO PHEIC declaration. We will present a thorough analysis of the EVAg productsend-users, their geographical localization, the type of organization they belong to, their domain of activity, as well as their intended use. This analysis might reflect the concerted worldwide actions or individual initiatives, as well as highlight the most urgent tools needed to face an emergence.

P40

Forme intégrée du génome du sixième herpesvirus humain au génome cellulaire (iciHHV-6) : diagnostic du portage d'iciHHV-6 et estimation du nombre de copies intégrées par PCR quantitative en temps réel et par droplet digital PCR

Philippe Magnier¹, Dimitri Loureiro, Agnès Gautheret-Dejean^{2,3}, Quentin Beaulieu, Stephanie Nguyen-Quoc, Emilie Frobert, Cécile Henquell, Pascale Bonnafous

¹ UMRS CR7, INSERM U1135, *Persistent Viral Infections, CIMI-Paris, Hôpitaux universitaires La Pitié Salpêtrière-Charles Foix, Paris, Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 6, France*

² *Hôpitaux universitaires La Pitié Salpêtrière-Charles Foix, Service de virologie, Centre national de référence des Herpesvirus (Laboratoire associé), Paris, Assistance publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), France*

³ *UFR des sciences pharmaceutiques et biologiques, Laboratoire de microbiologie, Paris, Sorbonne Paris Cité, Université Paris Descartes, France*

<agnes.gautheret@aphp.fr>

Chez 1 % de la population générale, le génome du HHV-6 est présent sous forme intégrée au génome humain (*Inherited Chromosomally Integrated HHV-6*, iciHHV-6), dans toutes les cellules de l'organisme, dans l'une des régions subtélomériques, y compris follicules pileux et ongles. Selon le laboratoire considéré et la méthode utilisée, le nombre de copies de génome intégré varie de 1 à 7/cellule. Les objectifs de notre étude étaient de : (i) déterminer le nombre de copies génomiques de HHV-6 intégrées au génome humain avec deux méthodes d'amplification génique quantitative (PCR en temps réel [RT-PCR], *droplet digital* PCR (ddPCR)) ; (ii) comparer le nombre de copies intégrées en fonction de l'espèce virale, HHV-6A ou HHV-6B ; (iii) analyser la charge virale à partir de différentes matrices provenant d'un même patient. Nous avons analysé 81 prélèvements biologiques provenant de 50 patients porteurs d'iciHHV-6A (n=20), iciHHV-6B (n=29), et un non identifié. Ont été analysés 50 sangs totaux, 16 follicules pileux, 8 ongles, 5 liquides céphalo-rachidien (LCR), 1 liquide de lavage broncho-alvéolaire, et une biopsie colique. Vingt-cinq patients avaient entre 2 et 4 prélèvements. L'extraction de l'ADN (viral et cellulaire) a été effectuée à l'aide de différentes méthodes selon la période et la matrice considérées (MagnaPure, Qiasymphony, EasyMag, QIAamp DNA Blood MiniKit, QIAamp DNA MiniKit). La charge virale (CV), exprimée en nombre de copies d'ADN génomique de HHV-6 par cellule, a été mesurée par : (i) RT-PCR ciblant les gènes U65-66 décrite précédemment (Gautheret-Dejean *et al. J Virol Methods* 2002) ; (ii) ddPCR dans le gène U42 développée par Pascale Bonnafous. Pour les deux méthodes, le nombre de copies génomiques du HHV-6 par cellule a été déterminé grâce à la quantification parallèle du gène codant l'albumine (Laurendeau *et al. ClinChem* 1999). La charge virale du HHV-6 était variable selon la méthode utilisée. Si l'on considère l'ensemble des échantillons, la médiane de CV était 4,7 copies/cellule [1,1-329] par RT-PCR, et 1,0 copie/cellule [0,1-50] par ddPCR. Aucune corrélation n'a pu être mise en évidence entre les deux méthodes ($p = 0,85$; $R^2 = 0,001$). Si l'on considère les deux

espèces de façon séparée, iciHHV-6A et iciHHV-6B, les deux méthodes n'étaient également pas corrélées ($p = 0,8$ pour iciHHV-6A and $p = 0,27$ pour iciHHV-6B). Pour la ddPCR, lorsque les différentes matrices ont été analysées séparément, les CV médianes étaient similaires pour le sang total (1), les follicules pileux (1,1) et les ongles (1), mais inférieures pour le LCR (0,6). Pour la RT-PCR, des résultats analogues ont été observés pour le sang (4,3), les follicules pileux (4,9) et les ongles (5,2), mais pas pour le LCR (0,6). En conclusion, chez les patients porteurs d'iciHHV-6, le nombre médian de copies génomiques d'HHV-6 par cellule est estimé à 1 en utilisant la ddPCR ciblant le gène U42, et à 4 avec la RTPCR ciblant les gènes U65-66. Ce nombre est identique que l'on analyse le sang total, les follicules pileux ou les ongles. Des études sont nécessaires pour identifier l'origine de ces différences.

P41

Validation de différents procédés de désinfection des surfaces par voie aérienne pour l'inactivation de virus influenza A H5N1 hautement pathogène

Pascale Massin, Cecile Guillou-Cloarec, Marie-Odile Lebras, Katell Ogor, Audrey Schmitz, Eric Niqueux, Veronique Jestin, Nicolas Eteradossi

Anses, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, BP53 22440 Ploufragan cedex, France

<pascale.massin@anses.fr>

La désinfection des surfaces par voie aérienne (DSVA) est un procédé très répandu notamment dans les domaines hospitaliers, pharmaceutiques, alimentaires, d'élevages, ou de laboratoires afin de réduire la quantité d'agents pathogènes présents sur les objets et surfaces et de garantir leur non-dissémination dans l'environnement. Le principe de la DSVA est de propulser dans l'air un désinfectant grâce à un système de diffusion. Aujourd'hui, il existe une grande variété de couples appareil/produit et les méthodes d'évaluation de leur efficacité sont décrites dans une norme française (NF T72-281). Les virus influenza A aviaires (VIA) constituent un enjeu majeur en santé animale et publique en raison de leur potentiel zoonotique. Parmi les VIA circulant dans la nature, ceux de sous-type H5N1-HP de lignée "Goose/Guangdong/1/1996-like" ont été transmis à l'homme et font l'objet d'une classification particulière et réglementée en France (arrêté du 11/06/2013 relatif aux règles de bonnes pratiques tendant à garantir la sécurité et la sûreté biologiques mentionnées à l'article R.5139-18 du code de la Santé publique, arrêté du 30/04/2012 fixant la liste des micro-organismes et toxines prévue à l'article L.5139-1 du code de la Santé publique). Ces virus infectieux doivent être manipulés sous poste de sécurité microbiologique de type II (PSM-II), en laboratoire de sécurité biologique de niveau 3, afin de garantir la sécurité du manipulateur et de l'environnement. La mise en œuvre de tels virus nécessite la validation préalable de l'efficacité des procédures de décontamination susceptibles d'être utilisées à titre préventif ou curatif. Dans ce contexte, nous avons évalué l'efficacité de deux couples produit/diffuseur sur l'inactivation du virus A/muteswan/France/06299/2006.H5N1-HP déposé sur un support inerte dans un PSM-II. Le virus est déposé dans les puits de 4 plaques 96 puits, à raison de 10E8,80DIE50/puits pour un total de 10E10,66DIE50 par plaque. Les plaques sont ensuite séchées puis conservées surgelées jusqu'à exposition à la DSVA pour servir d'indicateurs biologiques. La capacité à éliminer ou non un virus viable après exposition à la DSVA est utilisée comme indicatrice de l'efficacité du procédé. Deux indicateurs biologiques sont fixés en deux points distincts dans le PSM : un indicateur biologique est emballé et placé sous le PSM (témoin positif destiné à démontrer la persistance de virus infectieux éluable en l'absence de désinfectant) ; une plaque vide est également placée sous le PSM (témoin négatif destiné à recueillir des résidus de désinfectants pour juger de l'absence d'effet toxique dans notre modèle). Enfin, un indicateur biologique est conservé surgelé durant toute la durée du procédé et permet de vérifier la quantité maximale de virus éluable d'une plaque conservée dans des conditions optimales. Une fois la DSVA réalisée, l'inactivation du virus est évaluée par tentative d'isolement sur œufs embryonnés selon la norme

NF U47-210. Pour chaque DSVa évaluée, l'expérience est répétée deux fois. Pour les deux couples testés, nous n'avons pas pu ré-isoler le virus à partir des plaques exposées à la DSVa. En revanche le virus a pu être ré-isolé de la plaque témoin positif. L'ensemble des résultats obtenus dans ce modèle a permis la validation des différentes DSVa testées.

P42

Quand le diagnostic rencontre l'environnement: adaptation et développement d'une méthode de concentration de particules virales et son application pour la détection de coronavirus humains

Stéphanie Philippot, Mihayl Varbanov
Laboratoire lorrain de chimie moléculaire (L2CM), CNRS UMR7565, Faculté de Pharmacie, Université de Lorraine-FST, boulevard des Aiguillettes 54506 Vandœuvre-lès-Nancy, France
<mihayl.varbanov@univ-lorraine.fr>

Les coronavirus humains (HCoV) sont des virus respiratoires provoquant différentes affections, y compris le rhume et la pneumonie. Ces virus représentent une menace mondiale permanente pour la santé humaine car ils sont également impliqués dans le syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS) et le syndrome respiratoire du Moyen-Orient (MERS), pathologies associées à un taux élevé de mortalité. Ceci illustre la capacité du HCoV à franchir la barrière des espèces et la nécessité d'une surveillance étroite des coronavirus afin de prévenir les événements de maladies émergentes. De plus, la détermination du risque pour la santé publique causé par la transmission du virus par de gouttelettes et aérosols, le contact humain et les surfaces environnementales, ainsi que sa survie dans les eaux du robinet et des eaux usées nécessite des méthodes de détection et d'analyse virales très sensibles. Cependant, les récupérations de particules virales infectieuses provenant de telles sources sont rarement assez élevées et pas toujours faciles. À cette fin, nous avons adapté et développé une série de procédures pour récupérer et concentrer le HCoV. Nous avons utilisé le sous-type HCoV 229E comme virus modèle dans notre étude. Le virus a été produit dans la lignée cellulaire épithéliale humaine L132 (ATCC CCL-5). La méthode de concentration a été appliquée pour détecter le HCoV 229E isolé de la culture de cellules infectées L132 72 h après l'infection. Le surnageant provenant des cellules infectées a été ultrafiltré à travers d'une membrane hydrophile conique, en différentes conditions de force ionique, visant l'optimisation de la rétention et de la récupération des particules virales. La variation des concentrations virales et du titre viral a été déterminée par des tests multi-plaques de cristal violet et par la méthode de dilution limite de Reed et Muench. Nos premiers résultats montrent que la méthode appliquée permet l'augmentation du titre viral et du nombre de particules virales infectieuses dans les échantillons analysés. En effet, la méthode a permis de multiplier par trois le nombre de particules virales, et l'effet cytopathogène (ECP) du HCoV a été augmenté de plus de 10 %. Curieusement, toutes les expériences sont liées à une perte d'un grand nombre de virus dans la maille du filtre, malgré les lavages de la membrane. Nos prochains efforts seront orientés vers l'amélioration de la récupération des particules virales et l'analyse du virus concentré, par PCR et microscopie électronique. Des méthodes fiables pour l'isolement et la concentration de HCoV sont particulièrement importantes pour l'analyse biologique moléculaire en aval, telle que le séquençage métagénomique, qui nécessite des densités de particules virales élevées. Une concentration élevée en particules virales est également essentielle pour la surveillance, l'épidémiologie, le diagnostic et l'évaluation de l'efficacité du traitement antiviral.

P43

Tropisme des virus influenza hautement pathogènes H5N8 de clade 2.3.4.4 dans la pulpe de plumes chez les palmipèdes : applications potentielles pour le dépistage

Charlotte Foret-Lucas¹, Guillaume Croville, Thibaut Vergne, Marie-Noëlle Lucas, Maxime Byl, Vincent Blondel, Thomas Figueroa, Luc Robertet, Marie Souvestre, Maxence Delverdier, Jean-Luc Guerin

¹ UMR 1225 INRA-ENVT Interaction hôte-agent pathogène, Équipe virologie (UMR1225 IHAP), École nationale vétérinaire de Toulouse (ENVT), France

<c.foret@envt.fr>

La pulpe présente à la base des plumes immatures des oiseaux est un tissu très vascularisé. Les virus influenza A hautement pathogènes (IAHP) présentent un tropisme tissulaire très large, suggérant qu'ils puissent également se répliquer dans la pulpe de plume. La détection de virus IAHP dans les plumes a été évaluée pour des virus IAHP asiatiques de sous-type H5N1 et H7N2. Ces rares études ont montré, pour l'essentiel dans un contexte d'infection expérimentale, que les charges virales présentes dans la pulpe de plume immature sont équivalentes voire supérieures à celles détectées dans les écouvillons trachéaux et cloacaux. Nous avons analysé des prélèvements issus de lots de canards et oies du sud-ouest de la France touchés par le virus IAHP H5N8 (clade 2.3.4.4) entre janvier et mars 2017. Sept élevages ont été inclus dans l'étude : 5 élevages de canards mulards (âgés de 5 à 13 semaines), 1 élevage de canards Pékin (âgés de 8 semaines), et 1 élevage d'oies (âgées de 8 semaines). Pour chaque lot confirmé positif par analyse officielle pour le virus H5N8, au moins 10 animaux ne présentant pas de signes cliniques ont été prélevés (écouvillons trachéal et cloacal et plume immature de l'aile). Pour chacun des prélèvements, l'ARN viral a été quantifié par RT-PCR quantitative ciblant les gènes M et H5. La sensibilité et la spécificité des prélèvements ont été comparées pour différents seuils en utilisant un modèle bayésien. Nous avons ainsi montré une meilleure sensibilité des prélèvements de pulpe de plume. En effet, pour tous les lots inclus dans l'étude, la charge virale détectée dans la pulpe de plumes s'est révélée au moins équivalente, voire 103 fois supérieure à celle détectée dans les écouvillons. Des immunomarquages du virus dans des coupes de follicule plumeux ont confirmé une forte accumulation du virus dans la pulpe. Afin de renforcer ces données de terrain, une infection expérimentale a été réalisée sur des canards mulards âgés de 10 semaines : elle a confirmé que le virus est détecté dans la pulpe de plumes, avec des charges virales comparables voire supérieures aux écouvillons. L'ensemble de ces données suggère donc que la pulpe de plumes pourrait être considérée comme un prélèvement adapté pour le dépistage des virus IAHP de clade 2.3.4.4.

P44

Utilisation de la technologie CRISPR-Cas13a pour le diagnostic des infections à orthopoxvirus

Gaëlle Frenois-Veyrat, Olivier Ferraris, Christophe Peyrefitte, Frédéric Iseni

Institut de recherche biomédicale des armées (IRBA), BP73, Brétigny-sur-Orge 91223 cedex, France

<fredericiseni@gmail.com>

Depuis les attentats du 11 septembre 2001 à New York, plusieurs gouvernements occidentaux ont pris en considération le risque d'utilisation du virus de la variole (VARV) comme arme biologique. Le virus a d'ailleurs été classé, par les CDC (Centers for Disease control and prevention), dans la catégorie A des agents potentiellement utilisables dans un contexte de bioterrorisme. Cette catégorie regroupe les pathogènes ayant un fort pouvoir de dissémination à grande échelle. Le VARV est classé en tête de cette liste car il est : i) stable dans l'environnement ; ii) hautement transmissible par voie aérienne entre individus ; et iii) associé à une morbidité et mortalité élevées. Le risque de propagation du virus est, en outre, favorisé par l'arrêt, il y a trente ans, de la vaccination antivariolique entraînant pour la majorité de la population une absence d'immunité contre le virus. En cas de résurgence du virus de la variole, il est impératif de pouvoir détecter le virus sans ambiguïté grâce à une méthodologie sensible, rapide et peu coûteuse. À l'heure actuelle le diagnostic des infections à poxvirus repose essentiellement sur la technique de PCR en temps réel. Récemment, une méthodologie nommée SHERLOCK, basée sur la technologie CRISPR/Cas13 a été développée pour la détection d'acides nucléiques.

Cet outil de détection moléculaire est extrêmement sensible et spécifique permettant la discrimination de séquences différant d'un seul nucléotide. En outre, l'ensemble du processus réactionnel est réalisé dans le même tube et à 37 °C ce qui ne nécessite pas de thermocycleur.

Le système de détection est basé sur l'amplification de l'acide nucléique cible, qui est ensuite transcrit. La reconnaissance de ces ARN par le CRISPR RNA (crRNA) spécifique de l'agent à détecter permet l'activation de la RNase Cas13a qui va cliver l'ARN cible mais également un ARN indicateur couplé à un fluorochrome, permettant ainsi la détection de l'agent infectieux en temps réel. L'objectif du projet est de mettre au point la technologie SHERLOCK dans le but d'identifier différents poxvirus circulant en France. A plus long terme, cette méthodologie pourra être utilisée pour la détection d'autres virus à ARN et à ADN d'intérêts.

P45

Hépatite C aiguë fulminante et transplantation hépatique en urgence

Laurence Ollier¹, Anne De Monte¹, Slim Fourati², Rodolphe Anty³

¹ CHU Nice-Laboratoire de virologie, CHU Nice, France

² Centre national de référence des hépatites B, C et delta, Laboratoire de virologie, France

³ CHU Nice, Service d'hépatologie, CHU Nice, France

<anty.r@chu-nice.fr>

L'infection par le virus de l'hépatite C (VHC) représente un problème majeur de santé publique en raison d'un nombre élevé de personnes touchées par le VHC dans le monde (170 millions) et du risque de passage à la chronicité avec un potentiel évolutif de l'infection vers une maladie sévère du foie (cirrhose, cancer du foie). 3 à 4 millions de personnes sont infectées chaque année mais l'hépatite C aiguë est le plus souvent asymptomatique (environ 90 % des infections aiguës), et lorsqu'il existe des symptômes, les plus courants sont la fatigue et l'ictère.

Alors que l'insuffisance hépatique aiguë causée par le VHC était considérée comme exceptionnelle, 2 cas ont été décrits dans la littérature en 2017 et nous rapportons ici un cas d'hépatite C aiguë fulminante ayant nécessité une transplantation hépatique en urgence. Il s'agit d'une patiente de 48 ans, professionnelle de santé, sans antécédent notable, résidant dans le sud de la France. Elle a présenté une cytolysé hépatique aiguë une dizaine de jours après un épisode d'altération de l'état général associé à un syndrome pseudo-grippal. En raison d'une aggravation clinique brutale avec la survenue d'une hépatite fulminante, la patiente a dû être greffée en toute urgence le surlendemain de son hospitalisation, avant même de connaître l'étiologie de la cytolysé. Les suites opératoires ont été favorables. La patiente, sans facteur de risque pour le VHC, avait à son entrée une sérologie VHC négative. La charge virale élevée (6,8 log) d'emblée associée à une séroconversion VHC observée en cours d'hospitalisation a permis d'établir le diagnostic d'hépatite C aiguë. Un séquençage complet de la souche (génotype 1b) est actuellement en cours au CNR VHC pour une étude moléculaire détaillée afin de rechercher des facteurs de virulence. Notre observation ainsi que les 2 récents cas décrits témoignent du fait que l'infection aiguë par le VHC doit être prise en compte dans le diagnostic différentiel de l'insuffisance hépatique aiguë.

P85

Technique de titrage infectieux basée sur la cytométrie en flux pour titrer le virus Zika (ZIKV)

Nicolas Devard, Victoire Petitcuenot, Erika Navarro Sanchez, Nolwenn Nougarede

Sanofi Pasteur, MLEARD-EU, Marcy-l'Étoile, Lyon, France

<nolwenn.nougarede@sanofi.com>

Les techniques utilisées pour déterminer la charge virale d'échantillons viraux issus de la fabrication des vaccins sont classiquement le titrage infectieux sur culture cellulaire en DICC₅₀/mL et la technique de plaque de lyse en PFU/mL. Ces techniques sont souvent anciennes, fastidieuses

et longues à mettre en œuvre, et répondent difficilement à la quantité d'analyses demandées pour piloter les procédés de fabrication de vaccins viraux. L'objectif de ce travail a été de développer un titrage infectieux plus rapide par cytométrie en flux (FACS). Ici nous décrivons une technique basée sur la mesure du pourcentage de cellules infectées par le virus Zika (ZIKV) par cytométrie en flux. D'abord nous avons montré que l'infection de cellule VERO par le virus Zika pouvait être détectée après un marquage à l'aide d'un anticorps dirigé contre la protéine d'enveloppe ou la protéine NS1 du virus et analyse en cytométrie en flux, puis nous avons déterminé que 24 h post infection, le nombre de cellules infectées représentait le premier cycle d'infection et pouvait donc être utilisé comme une lecture du nombre de particules infectieuses dans l'inoculum. Une relation linéaire entre la quantité de virus inoculé (MOI) et le nombre de cellules infectées et détectées a été établie. Une étude de corrélation entre le titrage réalisé par cytométrie et le titrage DICC₅₀ est en cours de réalisation. Cette nouvelle méthode de titrage permettra de réduire la durée du titrage de 7 jours à 24 h et d'augmenter le débit d'analyse tout en augmentant la précision du résultat.

P86

Amplification isotherme pan-génotypique du virus de l'hépatite B (VHB) par LAMP : un test simple, rapide et abordable pour semi-quantifier l'ADN du VHB dans les centres de soins

Jessica Vanhomwegen¹, Aurélie Kwasiborski¹, Virginie Sauvage²,

Laure Boizeau², Damien Hoinard¹, Daniel Candotti², Syria Laperche², Yusuke Shimakawa¹

¹ Environnement et risques infectieux (ERI), Institut Pasteur de Paris, 25-28, rue du docteur Roux, 75724 Paris cedex 15, France

² Département des agents transmissibles par le sang, Centre national de référence Risques infectieux transfusionnels, Institut national de la transfusion sanguine, Paris

<jvhomweg@pasteur.fr>

Contexte et objectifs. Pour parvenir à l'élimination globale du VHB, il est essentiel d'intensifier la thérapie antivirale à travers des services décentralisés dans les pays à revenu faible et moyen (PRFM). Malheureusement, l'accès au test d'amplification des acides nucléiques permettant de quantifier l'ADN du VHB, un marqueur clé pour déterminer l'admissibilité au traitement, reste limité et trop coûteux dans ces pays. Le test d'amplification isotherme (LAMP) est une technique simple, rapide et peu coûteuse pour amplifier efficacement l'ADN à une température constante. Nous avons conçu un test LAMP pan-génotypique pour la semi-quantification de la charge virale (CV) du VHB et évalué sa performance.

Méthode. Le jeu d'amorces pan-génotypiques a été conçu sur des régions génomiques conservées du VHB. La capacité de la méthode LAMP à discriminer deux niveaux de CV, importants du point de vue clinique (2000 et 200 000 UI/mL), a été évaluée à l'aide de 400 échantillons de plasma caractérisés par le test PCR de référence Roche COBAS [génotype A (n = 87), B (66), C (72), D (84), E (76) et F (15)] et 50 contrôles HBV-négatifs. L'ADN du VHB a été extrait du plasma en utilisant une méthode d'extraction simplifiée à base de microbilles magnétiques (Dynabeads SILANE) et amplifié à 65°C pendant 60 minutes en utilisant un turbidimètre en temps réel (Loopamp EXIA, Eiken Chemicals, Japon).

Résultats. Le spectre de détection de la méthode LAMP a été confirmée par la détection d'ADN synthétiques de 8 sous-génotypes principaux du VHB (A1/2/3, B, C, D, E et F) avec des limites de détection allant de 10 à 100 copies du génome/μL. Les résultats obtenus à partir d'échantillons de donneurs ont montré une corrélation linéaire entre le temps de résultat (minutes) de la réaction LAMP et la quantité d'ADN de HBV. L'aire sous la courbe ROC est de 0,98 (0,95-0,99) avec une sensibilité de 98,0 % et une spécificité de 91,6 % pour le diagnostic des charges virales très élevées (200 000 UI/ml) et de 0,76 (IC à 95 % : 0,70-0,80) avec une sensibilité de 68,2 % et une spécificité de 79,8 % pour le diagnostic des charges virales élevées (2000 UI/mL). La performance ne varie pas selon les génotypes. Aucune réactivité croisée n'a été observée avec le VHC, le VIH ou le

CMV dans 37 échantillons testés. Le coût par test est inférieur à 10 € et le temps de réalisation du test (extraction et amplification) est de 90 minutes. **Conclusion.** Nous avons développé un test LAMP pan-génotypique pour la semi-quantification des charges virales du VHB. Une excellente performance pour le diagnostic des charges virales très élevées renforce son utilité pour identifier les femmes présentant un risque élevé de transmission mère-enfant dans les cliniques prénatales périphériques des PRFM. L'évaluation sur le terrain du test HBV-LAMP est en cours en Afrique.

P87

Transmission interspécifique de l'herpèsvirus bovin de type 1 et conséquence diagnostique

Stephen Valas¹, Benoît Croisé¹, Isabelle Brémaud¹, Sophie Stourm¹, Eric Dubois², Jaqueline Vialard¹

¹ Laboratoire national de référence pour l'IBR, Laboratoire de Niort, Anses, 60 rue de Pied de Fond, CS28440, 79024 Niort cedex, France

² Laboratoire de Sophia-Antipolis, Anses Les Templiers 105, route des Chappes, BP111, 06902 Sophia-Antipolis, France
<stephen.valas@anses.fr>

Introduction. Les herpèsvirus ont évolué par co-spéciation avec leurs espèces hôtes et présentent pour la plupart un tropisme d'espèce limité à leur hôte naturel. Toutefois, certains alphaherpèsvirus de ruminants peuvent franchir la barrière de l'espèce, tel l'herpèsvirus bovin de type 1 (BoHV1), capable d'infecter les petits ruminants domestiques et le buffle d'eau. En France, la rhinotrachéite infectieuse bovine (IBR), dont le BoHV1 est l'agent étiologique, est une maladie réglementée faisant l'objet d'un plan national d'éradication. Le risque de transmissions interspécifiques et de constitution d'un réservoir BoHV1 chez les caprins est favorisé par une proportion importante de cheptels mixtes caprin-bovin dans les régions d'élevage à forte orientation caprine. Le dépistage d'une infection à BoHV1 chez les caprins est laborieux en raison des propriétés biologiques et antigéniques que partage ce virus avec son homologue caprin,

l'herpèsvirus caprin de type 1 (CpHV1), et des connaissances trop parcellaires sur les interactions hôte-virus associées aux transmissions interspécifiques, susceptibles d'impacter l'efficacité des tests de diagnostic. **Méthodes.** Une cinétique comparative de paramètres cliniques, virologiques et sérologiques a été réalisée chez des chèvres non gestantes (n = 6) et à 90 jours de gestation (n = 12), infectées expérimentalement par voie intranasale avec des doses infectieuses identiques des souches virales de référence BoHV1 et CpHV1. **Résultats.** L'infection de tous les animaux a été confirmée par sérologie et par PCR sur écouvillon nasal. Sur le plan clinique, tous les animaux infectés par CpHV1 présentent un pic d'hyperthermie à 5 jours post-infection (dpi), associé à une rhinite chez certains animaux. Des avortements ont été constatés chez 5 des 6 chèvres gestantes. L'infection par BoHV1 demeure subclinique sur toute la période d'observation (56 dpi). Une excrétion continue de CpHV1 caractérisée par un pic à 4-6 dpi suivi d'une décroissance progressive est détectée dans les sécrétions nasales chez 100 % des animaux infectés par CpHV1. L'excrétion de BoHV1 dans les sécrétions nasales est discontinuée et plus discrète que celle de CpHV1 (écart minimum de 3 log₁₀). Elle se limite au point d'inoculation alors que le CpHV1 est détecté par intermittence dans les sécrétions vaginales de tous les animaux, avec un pic de sécrétion précédant l'avortement. La fenêtre de séroconversion contre la glycoprotéine conservée gB est comparable entre l'infection par CpHV1 (8 à 17 dpi) et celle par BoHV1 (10 à 19 dpi). En revanche, les résultats des tests ELISA IBR gE varient selon le kit et le type d'infection. Tous les animaux infectés par CpHV1 sont positifs à 2 tests et négatifs avec le troisième. Sur les 9 animaux infectés par BoHV1, seulement 5 sont positifs, dont 3 positifs à un seul kit. **Conclusions.** Nos données confirment la susceptibilité naturelle des caprins à l'infection par le BoHV1 et l'adaptation des alphaherpèsvirus chez leur hôte respectif. Elles montrent par ailleurs la variabilité du spectre d'activité de la réponse immune humorale entre les espèces animales et, par voie de conséquence, les limites des tests sérologiques couramment utilisés dans les enquêtes épidémiologiques pour la différenciation des alphaherpèsvirus de ruminants.