

Institut Pasteur du Cambodge

Rapport 2016 et programmation scientifique 2017



Dr Didier Fontenille, DRCE, HDR

Directeur, Institut Pasteur du Cambodge

SOMMAIRE

1 RESUME	6
2 ENJEUX DE L'INSTITUT PASTEUR DU CAMBODGE	7
2.1 OBJECTIFS A COURT TERME	8
2.1.1 ENJEUX INSTITUTIONNELS	8
2.1.2 ENJEUX SCIENTIFIQUES	8
2.2 OBJECTIFS A MOYEN TERME	9
2.2.1 ENJEUX INSTITUTIONNELS	9
2.2.2 ENJEUX SCIENTIFIQUES	10
2.3 AUTRE SPECIFICITE	11
2.3.1 DEVELOPPER LA PLATE-FORME REGIONALE DE RECHERCHE ASIE	11
3 BILAN DES ACTIVITES REALISEES EN 2016 A L'INSTITUT PASTEUR DU CAMBODGE	11
3.1 EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE DU PALUDISME	11
3.1.1 STRUCTURE FONCTIONNELLE DE L'UNITÉ	11
3.1.2 PROGRAMMES DE RECHERCHE – PRINCIPALES REALISATIONS EN 2016	12
3.1.3 PROGRAMMES DE RECHERCHE – PROGRAMMATION SCIENTIFIQUE 2017	18
3.1.4 SOUTIEN AUX AUTORITÉS NATIONALES	20
3.1.5 ENSEIGNEMENT ET FORMATIONS	20
3.1.6 LISTE DES PUBLICATIONS (2016)	21
3.2 EPIDEMIOLOGIE & SANTE PUBLIQUE	23
3.2.1 STRUCTURE FONCTIONNELLE DE L'UNITÉ	23
3.2.2 PROGRAMMES DE RECHERCHE – PRINCIPALES REALISATIONS EN 2016	24
3.2.3 PROGRAMMES DE RECHERCHE – PROGRAMMATION SCIENTIFIQUE 2017	28
3.2.4 SOUTIEN AUX AUTORITÉS NATIONALES	30
3.2.5 ENSEIGNEMENT ET FORMATIONS	31
3.2.6 LISTE DES PUBLICATIONS (2016)	31
3.3 VIH HEPATITES	33
3.3.1 STRUCTURE FONCTIONNELLE DE L'UNITÉ	33
3.3.2 PROGRAMMES DE RECHERCHE – PRINCIPALES RÉALISATIONS EN 2016	33

3.3.3	PROGRAMMES DE RECHERCHE – PROGRAMMATION SCIENTIFIQUE 2017	35
3.3.4	SOUTIEN AUX AUTORITÉS NATIONALES	36
3.3.5	ENSEIGNEMENT ET FORMATIONS	37
3.3.6	LISTE DES PUBLICATIONS (2016)	37
3.4	PLATEFORME D'IMMUNOLOGIE	38
3.4.1	STRUCTURE FONCTIONNELLE DE L'UNITÉ	38
3.4.2	PROGRAMMES DE RECHERCHE – PRINCIPALES RÉALISATIONS EN 2016.....	38
3.4.3	PROGRAMMATION SCIENTIFIQUE EN 2017	39
3.4.4	SOUTIEN AUX AUTORITÉS NATIONALES	40
3.4.5	ENSEIGNEMENT ET FORMATIONS	40
3.4.6	LISTE DES PUBLICATIONS (2016)	40
3.5	IMMUNOLOGIE G4 (GROUPE À 4 ANS).....	41
3.5.1	STRUCTURE FONCTIONNELLE DE L'UNITÉ	41
3.5.2	PROGRAMMES DE RECHERCHE - PRINCIPALES RÉALISATIONS EN 2016	41
3.5.3	PROGRAMMATION SCIENTIFIQUE 2017	43
3.5.4	SOUTIEN AUX AUTORITÉS NATIONALES	44
3.5.5	ENSEIGNEMENT ET FORMATIONS	45
3.5.6	LISTE DES PUBLICATIONS (2016)	45
3.6	VIROLOGIE	46
3.6.1	STRUCTURE FONCTIONNELLE DE L'UNITÉ	46
3.6.2	PROGRAMMES DE RECHERCHE - PRINCIPALES RÉALISATIONS EN 2016	46
3.6.3	PROGRAMMATION SCIENTIFIQUE 2017	52
3.6.4	SOUTIEN AUX AUTORITES NATIONALES	55
3.6.5	ENSEIGNEMENT ET FORMATIONS	57
3.6.6	LISTE DES PUBLICATIONS (2016)	57
3.7	ENTOMOLOGIE MEDICALE	59
3.7.1	STRUCTURE FONCTIONNELLE DE L'UNITÉ	59
3.7.2	PROGRAMMES DE RECHERCHE – PRINCIPALES RÉALISATIONS EN 2016.....	59
3.7.3	PROGRAMMATION SCIENTIFIQUE 2017	60
3.7.4	SOUTIEN AUX AUTORITES NATIONALES	61
3.7.5	ENSEIGNEMENT ET FORMATIONS	61
3.7.6	LISTE DES PUBLICATIONS (2016)	62
3.8	LABORATOIRE DE SECURITE ALIMENTAIRE ET ENVIRONNEMENT	63

3.8.1	STRUCTURE FONCTIONNELLE DE L'UNITÉ	63
3.8.2	ACTIVITÉS COURANTES EN 2016	63
3.8.3	PRINCIPALES RÉALISATIONS EN 2016	64
3.8.4	PROGRAMMATION SCIENTIFIQUE 2017	67
3.8.5	SOUTIEN AUX AUTORITES NATIONALES	68
3.8.6	ENSEIGNEMENT ET FORMATIONS	68
3.8.7	LISTE DES PUBLICATIONS (2016)	69
3.9	UNITÉ DE LABORATOIRE DE BIOLOGIE MÉDICALE (INCLUANT LE COMPOSANT DE RECHERCHE : TUBERCULOSE ET RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES).....	70
3.9.1	STRUCTURE FONCTIONNELLE DE L'UNITÉ	70
3.9.2	ACTIVITÉS COURANTES - PRINCIPALES RÉALISATIONS EN 2016.....	70
3.9.3	PROGRAMMES DE RECHERCHE – PRINCIPALES RÉALISATIONS EN 2016.....	72
3.9.4	PROGRAMMATION SCIENTIFIQUE 2017	72
3.9.5	SOUTIEN AUX AUTORITES NATIONALES	73
3.9.6	ENSEIGNEMENT ET FORMATIONS	73
3.9.7	LISTE DES PUBLICATIONS (2016)	75
3.10	PLATFORME REGIONALE DE RECHERCHE EN ASIE (PRR-ASIA).....	76
3.10.1	COMPOSITION DE LA PLATFORME	76
3.10.2	STATUT DE LA PRR ASIE.....	76
3.10.3	PRINCIPALES RÉALISATIONS EN 2016.....	76
3.11	AUTRE SERVICE DE L'INSTITUT PASTEUR DU CAMBODGE.....	76
3.11.1	PRINCIPALES ACTIVITES DU CENTRE DE PREVENTION DE LA RAGE EN 2016.....	76
3.11.2	PRINCIPALES ACTIVITES DU CENTRE DE VACCINATION INTERNATIONALES EN 2016.....	77
3.11.3	PRINCIPALES ACTIVITES DU CENTRE DE DEPISTAGE ANONYME ET GRATUIT (CDAG) EN 2016	77
4	LA PROGRAMMATION SCIENTIFIQUE 2017	78
4.1	GRANDES CAUSES DE MALADIES / MORBIDITE	78
4.1.1	PALUDISMES A PLASMODIUM VIVAX ET A P. FALCIPARUM	78
4.1.2	TUBERCULOSE : DE NOUVELLES STRATEGIES DE DIAGNOSTIC ET DE TRAITEMENT	78
4.1.3	ESSAIS CLINIQUES ET EPIDEMIOLOGIE DES VIRUS DES HEPATITES B, C ET E.....	78
4.1.4	EPIDEMIOLOGIE DES VIRUS GRIPPAX ET AUTRES VIRUS RESPIRATOIRES.....	78
4.1.5	EPIDEMIOLOGIE DES ENCEPHALITES	79
4.1.6	EPIDEMIOLOGIE ET PRISE EN CHARGE DE PATHOLOGIES NON INFECTIEUSES.....	79
4.2	RECHERCHE LIEES AUX EPIDEMIES.....	79

4.2.1	LABORATOIRES DE SECURITE DE NIVEAU 2 ET 3	79
4.2.2	RESEAU DE SURVEILLANCE SENTINELLE DES MALADIES FEBRILES A POTENTIEL EPIDEMIQUE.	79
4.3	MALADIES INFECTIEUSES NEGLIGÉES	79
4.3.1	LA RAGE	79
4.3.2	LES INFECTIONS FUNGIQUES.....	79
4.4	MALADIES EMERGENTES ET VECTORIELLES.....	80
4.4.1	NIPAH	80
4.4.2	ARENAVIRUS	80
4.4.3	DENGUE	80
4.4.4	ZIKA	80
4.5	RESISTANCE AUX ANTI-INFECTIEUX.....	80
4.5.1	BACTERIES MULTI-RESISTANTES : DYNAMIQUE DE TRANSMISSION ET IMPACT SANITAIRE.....	81
4.5.2	PALUDISME: RESISTANCES DE <i>PLASMODIUM FALCIPARUM</i> ET <i>P. VIVAX</i> AUX ANTIPALUDIQUES.	81
4.5.3	VECTEURS (MOUSTIQUES): BIOLOGIE ET RESISTANCES AUX INSECTICIDES	81
4.6	DEVELOPPEMENT DE NOUVEAUX OUTILS DE DIAGNOSTIC	81
4.6.1	DEVELOPPEMENT DE TESTS.....	81
4.7	FORMATIONS.....	81
4.7.1	FORMATION CONTINUE AUX BONNES PRATIQUES.....	81
4.7.2	RENFORCEMENT DES CAPACITES.....	82
4.7.3	CREATION D'UN MASTER INTERNATIONAL D'INFECTIOLOGIE.....	82
5	CONCLUSION.....	83

1 RESUME

L'institut Pasteur du Cambodge (IPC) a connu plusieurs événements marquant en 2016.

- De nombreux projets de recherche ambitieux (Ecomore, SEAE, Lacanet, ComAcross, DHHS, Defeat Dengue, DVI, résistance aux antipaludéens, Birdy,...) ont connu un grand développement, et donné des résultats applicables dans des recommandations de santé publique.
- De nouvelles activités de recherche, nécessaires pour la santé publique du Cambodge, ont été initiées et développées en partenariat: hépatites, antibiorésistance, tuberculose, coqueluche, entomologie médicale, infections fongiques.
- La formation scientifique continue a été encouragée à travers de nombreux stages, y compris à l'étranger.
- Le Ministère de l'éducation de la Jeunesse et des Sport a soutenu les activités de recherche et de formation de 5 chercheurs Cambodgiens de l'IPC.
- Le laboratoire de microbiologie alimentaire et des eaux a continué à se développer.
- Les laboratoires ont été réaménagés : 2 laboratoires BSL2 ont été rénovés.
- Les collaborations régionales ont été renforcées : Vietnam, Chine, Thaïlande, Myanmar, Laos, en particulier.
- L'IPC a augmenté significativement ses liens avec les Universités du Cambodge et son activité d'encadrement et de formation d'étudiants et de cadres scientifiques cambodgiens et internationaux.
- La communication scientifique a été renforcée, avec des séminaires hebdomadaires ouverts à toute la communauté scientifique du Cambodge, la publication de fiches projet ou maladie, une refonte des sites web et Facebook.
- Les évolutions de carrières pour les cadres scientifiques et administratifs ont été renforcées.

L'institut Pasteur du Cambodge, membre du Réseau International des Instituts Pasteur (RIIP), est un établissement reconnu d'utilité publique à but non lucratif. L'Institut, qui a signé en 1992 une convention avec le Gouvernement Royal du Cambodge, renouvelée par avenant en 2013, est placé sous le haut patronage du Ministère cambodgien de la Santé pour lequel il réalise des activités de santé publique, d'expertise, de recherche et de formation. L'IPC est une des composantes du réseau d'instituts et d'universités du Ministère de la Santé du Cambodge. L'Institut a développé depuis plus de 10 ans ces missions dans les domaines académiques et appliqués. Il contribue au diagnostic, à la recherche et à la prévention des maladies infectieuses prioritaires au Cambodge et dans la région. Il joue un rôle majeur dans la veille et la recherche microbiologique et épidémiologique en collaboration avec des partenaires nationaux et internationaux, et avec plusieurs Instituts du RIIP, dont en premier lieu l'Institut Pasteur à Paris.

A la pointe de la recherche biomédicale en microbiologie (bactériologie, virologie, paludisme, immunologie, épidémiologie) ses laboratoires sont parmi les plus performants au Cambodge et dans le sud-est asiatique, dans le domaine du diagnostic et de l'étude de la transmission des agents pathogènes, dans l'analyse des marqueurs biologiques et génétiques de sévérité ou de résistance des microorganismes aux antimicrobiens, dans la prévention et dans la recherche clinique. Des avancées scientifiques majeures, ayant fait l'objet de communications et plus de 55 publications dans de grandes revues scientifiques, ont été obtenues en 2016 grâce à la fois à la sagacité et à la persévérance des chercheurs dans l'obtention de contrats et la réalisation des recherches, à l'implication forte des personnels techniques et administratifs de l'IPC, au soutien du Ministère de la Santé du Cambodge, et grâce à la confiance et à l'aide indispensable du MESR et du MAEDI de France.

Les résultats des recherches et expertises ont fait l'objet de recommandations, ou notes d'information, à l'adresse du Ministère de la Santé et de l'OMS.

Les résultats scientifiques, la formation, les recommandations issues des résultats sont présentés dans les chapitres de chaque unité.

L'Institut est maintenant très impliqué dans la formation des étudiants de niveau universitaire. En 2016, 117 étudiants (95 Cambodgiens, 22 étrangers) ont bénéficié d'une formation à l'IPC, incluant des étudiants en DES de biologie, de futurs ingénieurs biomédicaux, des étudiants en Master et en PhD de différentes universités du Cambodge, de France et internationales et ont été accueillis à l'IPC pour des

périodes de 6 à 36 mois. La stratégie de l'IPC comporte une promotion des carrières des jeunes scientifiques cambodgiens en leur procurant un environnement scientifique compétitif de niveau international. Des MoU avaient été signés avec l'UHS et l'ITC. Les relations avec RUA et RUPP ont été renforcées en 2016.

L'IPC compte plus de 220 personnes, dont 23 expatriés sur contrats longs (ainsi que deux chercheurs du CIRAD), et environ 80 personnels scientifiques et techniques, et stagiaires de recherche. En plus du département administratif et financier, ses structures de recherche et de services sont composées de trois laboratoires de microbiologie (bactériologie, mycobactériologie, microbiologie alimentaire et analyse des eaux), d'une plateforme d'immunologie (incluant un groupe à 4 ans), d'une plateforme d'entomologie médicale, et de quatre unités de recherche : virologie, HIV/Hépatites, paludisme, et épidémiologie / santé publique. Son budget de fonctionnement est abondé par des conventions de recherche, des ventes et prestations de services, par la subvention d'état du MESR et l'aide du MAEDI, et d'autres ressources (la part respective des 3 principales composantes était : 2012 : conventions, prestations, MESR : 40%, 30%, 20% ; 2013 : conventions, prestations, MESR : 48%, 27%, 17% ; 2014 : conventions, prestations, MESR : 57%, 21%, 14%, 2015 : conventions, prestations, MESR : 58%, 25%, 12%. 2016 : conventions, prestations, MESR : 60%, 29%, 12%). Le Gouvernement Royal du Cambodge contribue en exonérant l'IPC des taxes.

Les activités de l'année écoulée et les perspectives de l'IPC sont présentées chaque année devant le Conseil de liaison présidé par SE M. le Ministre de la Santé, en présence de SE M. l'Ambassadeur de France, du Directeur de l'IP Paris et de plusieurs autorités nationales (Ministères des Finances, de l'Agriculture et de l'Education) et internationales (OMS, UNICEF, ...). Les activités scientifiques sont évaluées tous les 18 mois par un Conseil scientifique. Le dernier Conseil scientifique s'est tenu les 11 et 12 novembre 2015. La politique scientifique est ajustée en fonction des recommandations de ce conseil, concernant notamment le périmètre scientifique et l'aménagement des laboratoires, le développement, la réduction et la pérennisation d'activités ou de compétences, le transfert de technologies et de compétences vers les institutions cambodgiennes de la santé, les liens avec les partenaires en Asie et dans le monde.

En conclusion, l'IPC, qui réalise des recherches d'intérêt international, est une tête de pont de la recherche d'inspiration pasteurienne en santé au Cambodge et en Asie du sud-est. Tout n'est cependant pas parfait, il y reste de très nombreuses voies d'amélioration possibles, avec le soutien des tutelles. Le directeur de l'IPC est résolument engagé sur cette voie.

2 ENJEUX DE L'INSTITUT PASTEUR DU CAMBODGE

Les enjeux et perspectives relèvent des trois missions de l'IPC : (1) les activités de services et de santé publique aux particuliers et aux institutions, (2) les activités de recherche, (3) les activités d'encadrement et de formation. Les objectifs tiennent compte des recommandations du conseil de liaison et du conseil scientifique de l'année précédente.

A. Commentaires majeurs du précédent conseil de liaison (26 mars 2015)

- Développer davantage la formation professionnelle, accepter des jeunes étudiants, professeurs et chercheurs de l'USS et partager les expériences professionnelles. Augmenter le nombre d'étudiants et professionnels de haut niveau en accueil à l'IPC.
- Poursuivre la formation en sciences médicales tournées vers la recherche.
- Etre prêt à réagir à l'apparition de maladies infectieuses nouvelles au Cambodge.
- Poursuivre la mise à disposition d'expertises de l'IPC pour le Ministère de la Santé.

B. Commentaires majeurs du précédent conseil scientifique (11-12 novembre 2015)

- Améliorer les efforts de diffusion des résultats et des recommandations issus des travaux de recherche, à l'attention des parties prenantes. Intégrer les groupes de travail du Ministère de la Santé.
- Développer la recherche sur les résistances aux antimicrobiens.

- Développer le laboratoire de microbiologie alimentaire.
- Etre plus souvent coordinateur de grands projets internationaux.
- Développer les activités et compétences de bio-banking et de bio-statistique.
- Poursuivre la formation de scientifiques cambodgiens.
- Donner plus de responsabilités scientifique et managériale aux jeunes scientifiques cambodgiens prometteurs.

2.1 OBJECTIFS A COURT TERME

Les objectifs à court et moyen terme de l'IPC suivent les recommandations présentées par SE M. le Ministre de la Santé du Cambodge durant le 38ième congrès national de la Santé les 15 et 16 mars 2017, et concernant les structures sous sa supervision

2.1.1 ENJEUX INSTITUTIONNELS

MAINTENIR L'IPC DANS SON CONTEXTE SCIENTIFIQUE ET MEDICAL NATIONAL ET REGIONAL

L'IPC, sous tutelle du Ministère de la Santé du Cambodge et de l'Institut Pasteur Paris est au cœur du dispositif de recherche et d'expertise du Cambodge en santé (universités, centres de recherche, hôpitaux, secteur privé), avec une dimension régionale et internationale. Plus de 90% du personnel, incluant les cadres, est cambodgien. L'IPC a vocation à être mobilisé, et soutenu, par ces différents partenaires, cambodgiens et étrangers, conjointement, afin qu'il continue à remplir ses missions efficacement.

DEVELOPPER LES CAPACITES

Contribuer encore plus intensivement à la formation et à l'encadrement d'étudiants de masters, d'école d'ingénieurs et de doctorats (PhD, Docteur Pharm, Med, Vet), inscrits dans les universités au Cambodge et en France. Rendre plus visible cette offre de formation et d'encadrement.

Développer les séminaires hebdomadaires ouverts sur la communauté scientifique et universitaire au Cambodge.

DEVELOPPER LES INFRASTRUCTURES

Créer un nouveau laboratoire du paludisme de 450 m2, au premier étage de la PRR Asie. Offrir sur l'espace libéré 2 pièces supplémentaires aux unités d'épidémiologie, de virologie, au LBM et au LMA.

RENDRE LES CARRIERES A L'IPC ATTRACTIVES

Développer les conditions d'attractivité des emplois, en particulier des cadres, à l'IPC, par la mise en place de plans de carrières, de motivations financières, et de reconnaissance sociale. Donner des responsabilités scientifiques et managériales aux jeunes chercheurs cambodgiens prometteurs.

ASSURER L'EQUILIBRE BUDGETAIRE

L'IPC est un institut sans but lucratif. La recherche et l'obtention de financements et de ressources, par des projets de recherche et des activités de services, sont essentielles et doivent être développées.

2.1.2 ENJEUX SCIENTIFIQUES

INNOVER ET VISER L'EXCELLENCE SCIENTIFIQUE

Soutenir et favoriser l'émergence de nouveaux projets de recherche ambitieux et innovants issus des unités de recherche et des services de santé publique, en particulier dans le domaine de la santé-environnement, des interactions hôtes-pathogènes, de la résistance aux médicaments, des infections fongiques, des hépatites, de l'entomologie médicale. Poursuivre la dynamique d'excellence scientifique sur les thèmes majeurs de santé publique en infectiologie : paludisme, encéphalites, dengue, VIH, hépatites, gripes, rage, tuberculose, vecteurs, etc.

Encourager les équipes à publier dans les meilleurs journaux scientifiques, et à diffuser les résultats de la recherche vers les services concernés du Ministère de la Santé et vers le grand public.

DEVELOPPER LES ACTIVITES POUR LUTTER CONTRE LA RAGE

En accord avec le Ministère de la Santé du Cambodge et le MoH CDC, en partenariat avec l'OMS, renforcer les recherches sur la rage, développer un plan de communication et d'éducation contre la rage, évaluer la faisabilité de création de deux centres de vaccination en province.

ETUDIER LES RESISTANCES

L'étude, le diagnostic et la gestion des résistances aux médicaments : bactéries, mycobactéries, paludisme, HIV, autres viroses, infections fongiques et aux insecticides pour les vecteurs de dengue et de paludisme, seront développés, soutenus et renforcés.

ESTIMER LA TRANSMISSION

La connaissance des mécanismes de transmission, vectorielle, directe, nosocomiale, à partir de sources, réservoirs ou foyers, symptomatiques ou asymptomatiques, anthropiques ou sauvages, est un point critique pour le contrôle de maladies (paludisme, dengue, encéphalite japonaise, autres encéphalites, virus influenza, rage, champignons...). L'IPC doit poursuivre son engagement dans cette voie, y compris par des approches de modélisation.

DEVELOPPER LES PLATES-FORMES

Permettre le développement de technologies modernes de diagnostics, d'expérimentations, et d'analyses épidémiologiques en développant et équipant les laboratoires et en favorisant la mutualisation et le développement des compétences, en particulier en entomologie, immunologie, bio-banking, modélisation, statistique, génomique et pour l'accès à des équipements lourds partagés (séquenceurs, cytomètres de flux...).

COMBLER LES POINTS FAIBLES / ADDRESSING THE WEAKNESSES

Renforcer l'IPC dans le domaine de la modélisation, des biostatistiques, de l'entomologie médicale, de la génomique, de la chimie, de la bioinformatique et de la gestion des biobanques, par la formation et le recrutement. S'appuyer sur les collaborations internationales, en particulier l'IP à Paris, pour combler ces lacunes.

2.2 OBJECTIFS A MOYEN TERME

2.2.1 ENJEUX INSTITUTIONNELS

RENFORCER LE PARTENARIAT

L'IPC seul, n'est rien. Seul un partenariat bien compris, à bénéfice mutuel, en premier lieu avec les institutions au Cambodge du Ministère de la Santé et d'autres Ministères (éducation, agriculture, environnement, ...) telles que les Universités, les centres de recherche, les hôpitaux, le secteur privé ; avec les Instituts Pasteur du réseau Pasteur international ; et avec les partenaires internationaux de la sous-région ASE, et du reste du monde, permettra à l'IPC de remplir ses missions.

Des unités mixtes de recherche (IPC – Université – autres centre Cambodgien de recherche) pourraient être développées, par exemple en bactériologie, virologie, sur les hépatites ou en entomologie médicale.

DEVELOPPER LES CAPACITES ET LES COMPETENCES

Participer à des masters nationaux (au Cambodge), et internationaux, et à des formations spécifiques thématiques (immunologie, entomologie, biostatistiques, essais cliniques...).

Contribuer à la création d'un master sur les maladies infectieuses avec l'USS et une université parisienne, si possible avec un cursus dès 2017.

Intervenir dans les formations des établissements d'enseignement supérieur au Cambodge (voire dans la sous-région) : USS, URA, URPP, ITC, en particulier. Attirer des étudiants cambodgiens et étrangers et les accueillir en formation et stage à l'IPC. Faire connaître les possibilités d'encadrement de l'IPC.

Reformuler l'offre de formation continue de l'IPC pour ses agents, afin de mieux répondre aux besoins conceptuels et techniques immédiats et à long terme.

AUGMENTER LA VISIBILITE DE L'IPC

Rendre l'IPC encore plus visible, utile et nécessaire au niveau national, régional et international, à travers une meilleure communication sur les activités scientifiques et les services rendus. Développer l'animation scientifique, dans et hors les murs. Développer les liens avec les médias. Améliorer les sites Web et Facebook.

FORMALISER LE MANAGEMENT DE L'IPC

Faire vivre et valoriser le comité Hygiène, Sécurité et Qualité (réactivé en 2015).

Faire vivre et valoriser le bio-banque.

Faire évoluer la qualité de vie et l'esprit d'entreprise dans l'IPC en s'appuyant sur le dialogue avec le personnel et les délégués du personnel.

Maintenir la consultation régulière avec les responsables d'unités et de services et les cadres de l'IPC.

Rappeler régulièrement les missions et les valeurs de l'IPC.

AUGMENTER NOS CAPACITES D'ACCUEIL

Continuer à aménager les laboratoires, et les services de soutien et support, ainsi que les services de santé publique (rage, microbiologie alimentaire, unité de biologie médicale), pour permettre le développement de nos activités de recherche et de services, à travers l'accueil de nouveaux jeunes chercheurs et étudiants cambodgiens, de la sous-région ASE, français et internationaux.

ACCREDITER ET LABELISER DES SERVICES DE L'IPC

L'IPC est engagé dans une démarche d'accréditation ISO, dans un premier temps pour l'unité de biologie médicale, devant aboutir fin 2017. L'objectif est d'étendre progressivement (en 4- 5 ans) cette labélisation à d'autres services, dont la microbiologie alimentaire. D'autres laboratoires sont des références nationales ou internationales (dengue, grippe aviaire, tests diagnostic rapide paludisme (sera transféré au CNM), rage).

2.2.2 ENJEUX SCIENTIFIQUES

POURSUIVRE LE DEVELOPPEMENT DU LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE ALIMENTAIRE

Le Cambodge, pays en grand développement économique, compte sur son industrie touristique et agro-alimentaire pour augmenter ses ressources. Dans ces deux secteurs, la qualité microbiologique et chimique des produits (produits agro-alimentaires bruts ou transformés, eaux de piscine, eaux de traitement, repas) doit être vérifiée et certifiée. L'IPC grâce à son expérience et à ses capacités doit proposer ce service au Cambodge, et pour ce faire un plan de développement du laboratoire de microbiologie et de chimie des eaux et des aliments est en cours.

ANTICIPER LES EMERGENCES DE MALADIES INFECTIEUSES

De nombreux agents pathogènes pour l'homme ou les animaux domestiques vont ré-émerger ou émerger dans les années à venir (EV71, virus grippaux, Chikungunya, Zika, arenavirus, coronavirus...). Les résistances aux traitements vont se développer (tuberculose, entérobactéries, coqueluche, paludisme, grippe, VIH, hépatites, etc.). La possible éradication de *Plasmodium falciparum*, va conduire à une contribution plus importante de *Plasmodium vivax* dans le paludisme au Cambodge. Les hépatites B et C sont devenues un problème majeur de santé publique. L'hépatite E est un problème sous-estimé. Zika, Chikungunya, Nipah, Coronaviruses restent une menace. Les infections fongiques

sont un problème en devenir. L'IPC grâce à son expertise, son expérience et ses infrastructures (dont son laboratoire de sécurité P3), a un rôle majeur à jouer dans la détection et la mesure du risque, le suivi de l'émergence et les mesures de contrôle, non seulement pour le Cambodge, mais pour l'Asie.

AMELIORER LES DIAGNOSTICS

Les efforts déjà initiés dans la mise au point de nouveaux tests de diagnostic rapide (virus, bactéries et mycobactéries, paludisme, etc.) seront poursuivis.

TESTER DE NOUVEAUX MEDICAMENTS, DE NOUVEAUX VACCINS ET DE NOUVELLES STRATEGIES

Plusieurs nouvelles approches thérapeutiques voient le jour (nouvelles stratégies d'utilisation de médicaments, nouveaux médicaments, nouveaux vaccins). L'IPC prendra toute sa place dans ces recherches depuis les phases 2, jusqu'aux essais cliniques en phase 3 (paludisme, dengue, tuberculose, hépatites, rage, EV71, lutte antivectorielle, etc.)

DEVELOPPER L'APPROCHE "UNE SEULE SANTE"

L'émergence des maladies relève d'un concept « One Health ». Plus de 80 % des maladies humaines ont une origine animale. Par ailleurs, biodiversité, agriculture et santé, y compris pour les maladies infectieuses, sont liées. L'IPC a initié des recherches dans ces domaines (programmes Lacanet, ComAcross, Ecomore, Predict) et va poursuivre cet engagement en collaboration avec des partenaires des secteurs vétérinaire, agronomique, économique et des sciences humaines.

2.3 AUTRE SPECIFICITE

2.3.1 DEVELOPPER LA PLATE-FORME REGIONALE DE RECHERCHE ASIE

Les institutions membres d'AVIESAN (Institut Pasteur, INSERM, IMMI, ANRS, IRD, Fondation Mérieux, CIRAD) et l'IPC ont construit une plate-forme régionale de recherche (PRR-Asie) sur le campus de l'Institut Pasteur du Cambodge, dont l'objectif est d'accueillir des projets transdisciplinaires et interinstitutionnels autour des maladies infectieuses, impliquant différents partenaires. Le directeur de l'IPC poursuivra ses efforts pour rendre la PRR attractive et efficiente.

3 BILAN DES ACTIVITES REALISEES EN 2016 A L'INSTITUT PASTEUR DU CAMBODGE

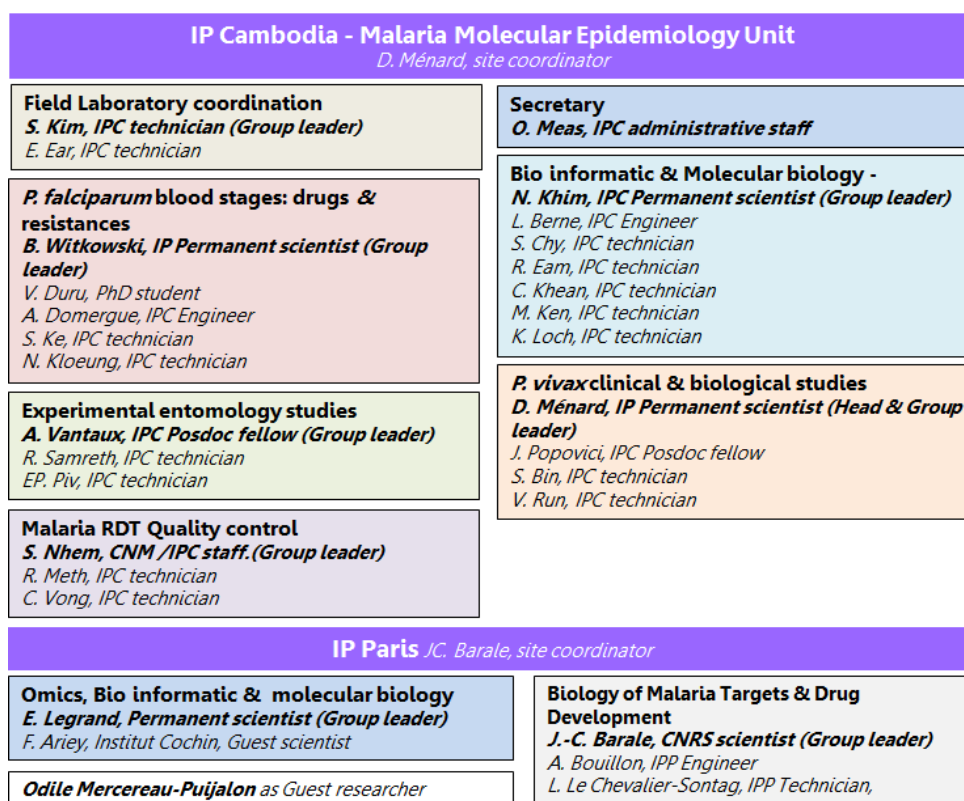
3.1 EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE DU PALUDISME

3.1.1 STRUCTURE FONCTIONNELLE DE L'UNITÉ

De par sa situation géographique unique en Asie du Sud-Est (épicerie de la multi-résistance de *P. falciparum* aux traitements, endémie élevée de *P. vivax*), forte de ses expériences en recherche sur le paludisme et de la qualité de son environnement scientifique, l'Unité d'Epidémiologie moléculaire du Paludisme de l'IP Cambodge est reconnue au niveau international comme étant un groupe scientifique performant, et est impliquée dans de nombreux programmes de recherche de haut niveau. Ses rôles principaux sont de proposer une expertise technique de haut niveau aux Programmes nationaux de Lutte contre le Paludisme (**projets de santé publique et formations**), pour explorer de nouveaux outils ou stratégies permettant la prévention/l'élimination du paludisme (**projets de recherche opérationnelle**), et de développer des concepts scientifiques novateurs (**projets de recherche**). La plupart des projets sont menés en étroite collaboration avec les Programmes nationaux de Lutte contre le Paludisme, l'Organisation mondiale de la Santé, ainsi que d'autres partenaires scientifiques régionaux/internationaux. En 2015-2017, plus de 20 projets ont été menés avec plusieurs réussites majeures, et 25 manuscrits ont été publiés dans des revues internationales avec comité de lecture en 2016-2017.

En janvier 2016, une unité de recherche internationale mixte appelée "**Unité de Recherche translationnelle sur le paludisme - MTRU**" a été créée entre l'Unité d'Epidémiologie moléculaire du Paludisme de l'IP Cambodge et le groupe de "Biologie de Cibles du Paludisme et Antipaludiques", dirigé par Jean-Christophe Barale à l'IP Paris. L'objectif du MTRU est de répondre aux défis engendrés par l'évolution de l'épidémiologie du paludisme dans différents contextes. Le MTRU s'inscrit dans la tradition historique pasteurienne, en adoptant une approche translationnelle pour résoudre de manière efficace les problèmes scientifiques émanant du réseau (IPIN), avec des avancées scientifiques et technologiques disponibles à l'IP Paris, tout en établissant un continuum entre recherche "basique" et recherche "appliquée".

Organigramme 2015-17



3.1.2 PROGRAMMES DE RECHERCHE – PRINCIPALES REALISATIONS EN 2016

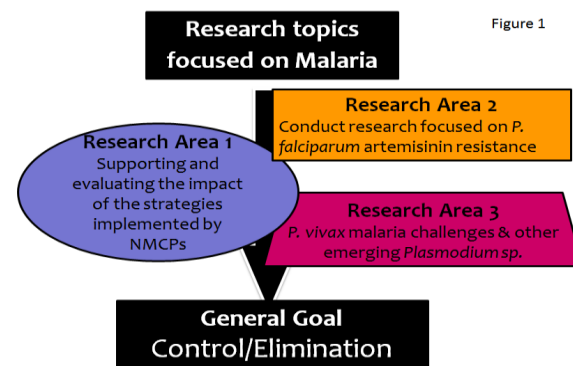
Contexte. Au Cambodge, le paludisme continue de peser sur la santé publique et l'économie du pays. Le gouvernement et les partenaires du développement accordent une priorité aux mesures de lutte contre la maladie. Les travailleurs forestiers, les habitants nouvellement installés et les populations mobiles/migrantes qui peuplent les zones forestières, ainsi que les soldats et leurs familles, qui exercent dans les forêts, sont exposés à un risque élevé de paludisme, quelques soient les groupes d'âges.

Les cinq espèces de *Plasmodium* connues pour causer le paludisme chez l'Homme (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* and *P. knowlesi*) sont présentes au Cambodge. Actuellement, le *P. falciparum* reste la principale cause d'infections palustres (prévalence de 52.4% en 2016). Toutefois, la distribution des espèces de *Plasmodium* évolue depuis plusieurs années, avec une augmentation

particulière des cas de paludisme à *P. vivax* (de 8% en 2000 à 41.7% en 2016). En outre, des zones de faible transmission rapportent fréquemment une proportion de 50% d'infections palustres à *P. vivax*. Cette tendance, probablement liée aux diverses stratégies efficaces mises en place au Cambodge contre le paludisme à *P. falciparum*, montre clairement combien nous avons sous-estimé le poids des autres espèces de *Plasmodium* simiens. Bien que nous ayons assisté à une diminution constante du nombre d'infections cliniquement diagnostiquées de cas de paludisme traités (23,627 cas de paludisme ont été reportés dans le secteur public en 2016), ainsi que de cas de mortalités durant ces quinze dernières années (un cas mortel en 2016), le paludisme au Cambodge reste un des principaux facteurs d'anémie. Les souches résistantes au traitement combiné de *Plasmodium falciparum* sont fréquentes, surtout dans l'Ouest du Cambodge, aussi connu pour être l'épicentre de l'émergence de résistances aux traitements antipaludiques contre le *P. falciparum*. Tout comme pour les précédents antipaludéens, nous sommes maintenant confrontés à l'émergence de résistances à l'artémisinine et à la pipéraquine, alors qu'aucune autre alternative acceptable n'existe pour le moment comme traitements de première intention. Comme nous l'avions précédemment observé le siècle dernier dans les résistances à la chloroquine, les parasites résistants à l'artémisinine et à ses dérivés représentent une menace majeure pour les objectifs mondiaux d'éradication du paludisme, et pourrait aussi se révéler dévastateurs en Afrique sub-saharienne de par une augmentation de la mortalité infantile.

Principaux Axes de Recherches. Les projets scientifiques menés sont élaborés autour du concept de l'élimination du paludisme en Asie du Sud-Est. Ils se concentrent sur trois principaux axes de recherche (Cf. figure ci-contre):

1. Encourager et évaluer l'impact des stratégies mises en place contre le paludisme par les Programmes nationaux de Lutte contre le Paludisme.
2. Mener des recherches focalisées sur les résistances de *P. falciparum* à l'artémisinine et autres combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA).
3. Mener des recherches sur le paludisme à *P. vivax* et sur les autres espèces de *Plasmodium* émergentes.



AXE DE RECHERCHE 1: ENCOURAGER ET ÉVALUER L'IMPACT DES STRATÉGIES MISES EN PLACE PAR LES PROGRAMMES NATIONAUX DE LUTTE CONTRE LE PALUDISME

RA.1.1. L'initiative T3: Track, Test and Treat: Détection/Traitement du réservoir asymptomatique

L'efficacité des répulsifs à moustiques topiques (picaridine) ajoutés aux moustiquaires imprégnées d'insecticides de longue durée versus des moustiquaires imprégnées d'insecticide de longue durée seules pour lutter contre le paludisme: un groupe d'essai randomisé contrôlé.

Cette étude présente les résultats d'un grand groupe d'essai randomisé contrôlé conçu pour évaluer l'efficacité de l'utilisation généralisée des répulsifs à moustiques topiques en plus des moustiquaires imprégnées d'insecticide, à l'échelle des communautés. Aucune différence post-intervention n'a été observée entre les groupes de traitement du paludisme à *Plasmodium falciparum* et celui du paludisme à *Plasmodium vivax*. Une utilisation quotidienne conforme et appropriée des répulsifs, atteintes grâce à des conditions d'essais optimales et des ressources suffisantes pour promouvoir et distribuer les produits répulsifs, restent le principal obstacle. Une distribution généralisée de répulsifs topiques efficaces, en plus de l'usage de moustiquaires imprégnées, n'ont pas contribué à diminuer l'endémicité du paludisme dans un contexte de pré-élimination au Cambodge. **Sluydts et al. Lancet Infectious diseases, 2016.**

Cas de détections réactives du paludisme dans la province de Pailin, dans l'Ouest du Cambodge : les leçons tirées à l'issue d'une évaluation d'un an dans un contexte de pré-élimination. Alors que l'élan vers l'élimination du paludisme grandit, des stratégies sont développées pour intensifier les progrès dans des contextes d'élimination. Une stratégie prééminente, la détection réactive des cas (RACD), implique le dépistage et le traitement des personnes vivant à proximité immédiate de cas

détectés passivement ou de cas "index". Cette étude a conclu que la détection réactive des cas ne permettait d'identifier que très peu d'infections secondaires en ciblant les ménages index ou voisins dans le dépistage. Nos résultats indiquent que la détection réactive des cas n'est pas appropriée lorsque l'exposition au paludisme s'est produite en dehors de la communauté, et lorsqu'il y a un recours aux traitements dans le secteur privé. **Hustedt et al. *Malaria Journal*, 2016.**

RA.1.2. Epidémiologie et transmission au Cambodge : Méthodologie et Résultats

Structure de la population du parasite *Plasmodium falciparum* et flux de gènes associés à la résistance aux traitements antipaludiques au Cambodge. L'identification de la structure de la population du *P. falciparum* et du flux de gènes parmi la population des parasites au Cambodge sont essentielles pour anticiper la diffusion de la résistance à l'artémisinine. C'est pour cette raison qu'une technique PCR-LDR-FMA à moyen débit a été développée pour examiner les code-barres génétiques de 533 échantillons sanguins. Le code-barre à 11 loci permet d'identifier les sous-populations de parasites qui ont récemment émergé dans l'Ouest du Cambodge et qui sont associés à l'allèle C580Y de K13, prédominant dans la résistance à l'artémisinine. Une sous-population a été identifiée dans le Nord du Cambodge comme étant associée aux résistances à l'artémisinine (R539T) et à la méfloquine. **Dwivedi et al., *Malaria journal*, 2016.**

Prévalence nationale de Paludisme au Cambodge: La microscopie versus l'amplification en chaîne par polymérase (PCR). Des examens au microscope et des détections par PCR ont été réalisées sur des échantillons de films de sang et de gouttes de sang séché collectés auprès de 8 067 personnes participant à cette étude nationale, stratifiée, à plusieurs étapes d'échantillonnage en grappes, sur la prévalence du paludisme conduite au Cambodge en 2007. Les taux de prévalence générale du paludisme et les taux de prévalence des infections aux *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* et *Plasmodium malariae* estimés au microscope (N = 8 067) étaient respectivement de 2,74%, 1,81%, 1,14% et 0,01%. La prévalence générale du paludisme détectée par PCR (N = 7 718) était presque 2,5 fois plus élevée (6,31%, $P < 0.00001$). Cette différence était beaucoup plus marquée pour les infections à *P. falciparum* (4,40%) que pour les infections à *P. vivax* (1,89%) ou à *P. malariae* (0,22%). Cette part importante de détection négative par microscopie mais positive par PCR indique que l'examen au microscope sous-estime souvent les infections de paludisme. **Lek et al., *American journal of tropical medicine and hygiene*, 2016.**

Répartition géographique de la transmission du paludisme en fonction des marqueurs sérologiques pour le paludisme à *falciparum* et à *vivax* dans le Ratanakiri, Cambodge. Une meilleure compréhension de la distribution spatiale du paludisme peut permettre une stratégie plus efficace et plus ciblée pour diminuer la transmission du paludisme. Cette étude a pour but d'évaluer le potentiel des marqueurs sérologiques dans la définition de la répartition spatiale du paludisme. Un total de 6 052 échantillons ont été analysés dans une zone où la prévalence générale du parasite estimée par PCR dans les villages sélectionnés est de 3,4%. Les principaux facteurs de risque pour tous les antigènes de *P. falciparum* et *P. vivax* MSP1.19 sont l'âge, l'ethnicité et le fait de passer la nuit dans une cabane au milieu des rizières. **Kerkhof et al., *Malaria journal*, 2016.**

Des marqueurs sérologiques pour mesurer les récentes évolutions du paludisme au niveau de la population du Cambodge. Cette étude a pour objet de récolter des données sur la demi-vie des marqueurs sérologiques spécifiques au paludisme et d'évaluer la sensibilité de ces marqueurs, afin de comprendre les récentes évolutions du paludisme. Des échantillons sanguins prélevés au cours d'études transversales dans le Ratanakiri, Cambodge, ont été analysés. Les résultats ont montré que la plupart (17/21) des réponses anticorps étaient plus élevées dans les échantillons révélés positifs par PCR que dans les négatifs. Ces réponses anticorps suivent la même tendance à la hausse dans chacun des groupes d'âge. Les évaluations des demi-vies ont montré des différences entre les marqueurs sérologiques, qui reflètent des tendances de transmission sur le court-terme (saisonniers) et sur le long-terme (tout au long de l'année). **Kerkhof et al., *Malaria journal*, 2016.**

RA.1.3. Une mise en oeuvre sûre du traitement pour une cure radicale du *P. vivax* : un défi

Modéliser l'hémolyse provoquée par la primaquine dans les déficiences en G6PD. Un modèle en compartiments des dynamiques de production et destruction de globules rouges a été conçu pour caractériser l'hémolyse provoquée par la primaquine, en utilisant une analyse bayésienne holistique de toutes les données publiées, et a été utilisé pour définir une alternative plus sûre que l'administration de 0,75mg/kg par semaine actuellement recommandé pour les personnes atteintes d'un déficit en

G6PD. Le modèle indique qu'une augmentation graduelle des doses quotidiennes de primaquine administrées serait relativement sûres chez les personnes présentant un déficit en G6PD. Si cela est confirmé, ce régime recommandé comme cure radicale ne nécessiterait pas de dépistage de déficit en G6PD dans les zones où le G6PD Viangchan ou des variantes plus bénignes sont prévalentes. **Watson et al, eLife, 2017.**

Un schéma posologique optimisé en fonction de l'âge contenant une seule faible dose de primaquine pour bloquer la transmission du paludisme au Cambodge. Récemment, l'OMS recommandait l'ajout d'une seule faible dose de primaquine (SLDPQ, 0,25mg base/kg poids corporelle) aux combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine pour bloquer la transmission du *Plasmodium falciparum* sans avoir besoin de tester le déficit en glucose-6-phosphate-déshydrogénase. Comme aucun schéma d'administration n'était recommandé, nous avons conçu un schéma posologique de SLDPQ en fonction de l'âge, facile à utiliser, pour le Cambodge. Les doses de primaquine (1–20 mg) ont été testées à l'aide d'une base de données anthropométrique modélisée répertoriant 28 138 personnes cambodgiennes. Des schémas posologiques optimaux selon les groupes d'âge ont été sélectionnés selon les doses mg base/kg calculées et les proportions de personnes recevant une dose thérapeutique. Ce schéma posologique de SLDPQ selon l'âge pourrait considérablement contribuer à l'élimination du paludisme et nécessite une évaluation urgente au Cambodge et dans d'autres pays présentant des caractéristiques anthropométriques similaires. **Leang et al, BMC Medicine, 2016.**

RA.1.4. Comment améliorer la gestion des cas de paludisme?

L'incertitude spatiale pour une gestion optimale de la santé et des maladies : une caractérisation géographique des distributions de l'émergent *Plasmodium falciparum* résistant à l'artémisinine en Asie du Sud-Est. Les parasites du paludisme à *Plasmodium falciparum* résistants à l'artémisinine sont maintenant présents presque partout en Asie du Sud-Est continentale, où des études en cours mesurent et cartographient leur distribution spatiale. Nous proposons une méthodologie générique de 'surveillance SMART' pour identifier de potentielles zones optimales pour les prélèvements à venir, et ainsi cartographier la distribution de la résistance à l'artémisinine de manière plus efficace. **Grist et al, International Journal of Health Geographics, 2016.**

AXE DE RECHERCHE 2 : RESISTANCE DU *P. FALCIPARUM* A L'ARTEMISININE ET AUTRES TRAITEMENTS DERIVES

RA.2.1. Résistance à l'artémisinine

L'émergence du *Plasmodium falciparum* indigène résistant à l'artémisinine en Afrique. Les thérapies à base d'artémisinine sont des traitements de première intention du paludisme dans la majorité des pays où la maladie est endémique. Son efficacité est particulièrement importante en Afrique, où le paludisme est le plus répandu. Dans cette étude, nous rendons compte d'une souche de *P. falciparum* résistante à l'artémisinine, qui a été contractée en Afrique. **Lu et al. New England Journal of Medicine, 2017.**

La propagation du *Plasmodium falciparum* résistant à l'artémisinine dans la sous-région du Grand Mékong: une étude d'observation d'épidémiologie moléculaire. Nos résultats indiquent que le lignage dominant du *P. falciparum* C580Y résistant à l'artémisinine est probablement apparu dans l'Ouest du Cambodge, pour se propager vers la Thaïlande et le Laos, en concurrençant d'autres parasites et en acquérant une résistance à la pipéraquline. La propagation des lignages de parasites *P. falciparum* résistants à l'artémisinine, dans toute la sous-région du Grand Mékong, menace les objectifs régionaux de lutte et d'élimination du paludisme. L'élimination du paludisme par *falciparum* dans cette région devrait être accélérée tant que les traitements antipaludiques restent efficaces. **Imwong et al. Lancet Infectious Diseases, 2017.**

La résistance du *plasmodium falciparum* aux dérivés de l'artémisinine et à la pipéraquline: un défi majeur dans l'élimination du paludisme au Cambodge. Au cours de la dernière décennie, les ACT ont joué un rôle majeur en allégeant le poids du paludisme. Cependant, ces progrès sont compromis par l'émergence de parasites *Plasmodium falciparum* résistants à l'artémisinine et aux traitements dérivés. Dans cette étude, nous passons en revue ce que nous considérons comme les progrès majeurs réalisés dans le domaine de la résistance à l'artémisinine et à la pipéraquline, et définissons les défis auxquels nous serons confrontés dans les prochaines années. **Duru et al., American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 2016.**

Le rôle des mutations K13 dans les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine. Réponse à Phyo et al. (qui juge inefficace les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine contre le paludisme par *P. falciparum*, à la frontière entre la Thaïlande et le Myanmar (2003-2013) : rôle des facteurs génétiques parasitaires (Clin. Infect. Dis. 2016) dans les mutations K13 (marqueurs d'une résistance partielle à l'artémisinine) dans les échecs de traitement par combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (ACT) dans la sous-région du Grand Mékong (GMS). **Rasmussen et al. Maladies infectieuses cliniques, 2016.**

Les allèles mutants K13 de *Plasmodium falciparum* résistants à l'artémisinine, à la frontière entre la Thaïlande et le Myanmar. La caractérisation de la résistance à l'artémisinine dans chaque situation et la mise à jour rapide des phénotypes listés et classés comme résistants *in vitro* au traitement antipaludique sont nécessaires. Nous avons étudié les mutations K13 dans les phénotypes cliniques et *in vitro*, à la frontière entre la Thaïlande et le Myanmar, où une résistance à l'artémisinine avait été rapportée. **Boullé et al. Maladies infectieuses émergentes, 2016.**

Echecs thérapeutiques multiples et successifs chez un patient infecté par *Plasmodium falciparum* au Cambodge et traité par dihydroartémisinine-pipéraquline. Au Cambodge, des échecs de combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (ACT) sont désormais couramment observés. Nous décrivons ici le cas original d'un patient infecté par *Plasmodium falciparum* qui a présenté des épisodes successifs de recrudescence parasitaires après avoir suivi un traitement par dihydroartémisinine-pipéraquline. **Witkowski et al. Bulletin de la Société de Pathologie Exotique, 2016.**

Une carte mondiale des polymorphismes du domaine propeller de gène K13 de *Plasmodium falciparum* : l'étude Karma. Le polymorphisme de la séquence propeller du gène K13 a été examiné sur 14 037 échantillons prélevés dans 59 pays où le paludisme est endémique. Nous n'avons trouvé aucune preuve de résistance à l'artémisinine en dehors de l'Asie du Sud-Est et de la Chine, où les mutations du gène K13 associées à une résistance étaient confinées. L'allèle commun africain A578S n'a pas été associé à une résistance clinique ou *in vitro* à l'artémisinine, et de nombreuses mutations africaines semblent être neutres. **Menard et al. NEJM, 2016.**

RA.2.2. Résistance aux traitements dérivés

Un marqueur de substitution du paludisme à *Plasmodium falciparum* résistant à la pipéraquline: une étude d'association phénotype-génotype. Nous avons cherché à identifier les marqueurs génétiques de la résistance à la pipéraquline, pour étudier leurs liens avec les échecs de traitements par dihydroartémisinine-pipéraquline. Nous avons constaté que la résistance à la pipéraquline au Cambodge était fortement liée à l'amplification de la plasmepsine 2-3, codant pour les protéases digestives d'hémoglobine, quel que soit leur emplacement. La plasmepsine multicopie 2 constitue un marqueur moléculaire de substitution permettant de suivre la résistance à la pipéraquline. **Witkowski, Duru et al. The Lancet Infectious Diseases, 2016.**

Des échecs de la dihydroartémisinine-pipéraquline sur le paludisme à *P. falciparum* au Cambodge en lien avec des parasites mutants K13 présentant des taux de survie élevés dans les nouveaux essais *in vitro* de pipéraquline: études rétrospectives et prospectives. Un nouveautest *in vitro* (PSA pour Pipéraquline Survival Assay), qui mime l'exposition du parasite paludique à une dose pharmacologiquement pertinente de pipéraquline / temps, a été conçu et sa pertinence a été étudiée dans des études rétrospectives et prospectives. Le PSA capture correctement le phénotype de résistance à la pipéraquline / recrudescence, un élément essentiel pour identifier les marqueurs moléculaires et évaluer l'efficacité des traitements de substitution. Le génotypage PSA et K13 *ex vivo* combiné fournit un moyen de surveillance pratique de la résistance à l'artémisinine et à la pipéraquline, en cas de recours à la dihydroartémisinine-pipéraquline. **Duru et al. Médecine BMC, 2015.**

RA.2.3. Evaluation de l'efficacité d'une nouvelle ACT

Efficacité et sécurité de la artesunate- pyronaridine- dans le traitement du paludisme à *P. falciparum* sans complication dans l'Ouest du Cambodge. La artesunate -pyronaridine est une combinaison de thérapie à base d'artémisinine approuvée pour le traitement du paludisme par *P. falciparum* et *P. vivax*. Son efficacité sur le paludisme par *P. falciparum* sans complication a été évaluée dans une zone de résistance à l'artémisinine dans l'Ouest du Cambodge. La artesunate-pyronaridine a bien été tolérée. A J-42, le RCPA ajusté par PCR était de 89,8% pour Pursat et de 84% pour Pailin.

L'efficacité de la artesunate-pyronaridine était inférieure au seuil recommandé de l'OMS (90%) pour le traitement de première intention du paludisme de *P. falciparum* dans l'Ouest du Cambodge, malgré une forte efficacité ailleurs en Asie et en Afrique. **Leang et al. AAC, 2016.**

AXE DE RECHERCHE 3: LES DEFIS DU PALUDISME PAR *P. VIVAX*

Le paludisme par *Plasmodium vivax* au Cambodge. Cette étude présente en détail la situation antérieure et actuelle du paludisme par *P. vivax*, les activités du Programme national de Lutte contre le Paludisme et les mesures interventionnelles mises en place. Nous discutons aussi des contraintes et obstacles qui pourraient compromettre nos efforts dans l'élimination de cette espèce de parasite. **Siv et al. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 2016.**

Polymorphisme du *pvmr1* de *Plasmodium vivax* en Guyane française. L'objectif de cette étude est de rechercher une potentielle dispersion d'isolats de *P. vivax* résistants à la chloroquine en Guyane française. Peu d'isolats hébergeant des mutations résistantes à la chloroquine dans le gène *pvmr1* circulent en Guyane française. Cependant, la diminution de la prévalence des isolats portant de multiples copies de *pvmr1* pourrait indiquer que la population de *P. vivax* en Guyane française évolue vers une diminution de la sensibilité à la chloroquine. **Faway et al. Revue du paludisme, 2016.**

Complexité de l'infection et diversité génétique du *Plasmodium vivax* au Cambodge. Nous avons développé un test basé sur le séquençage nous permettant de génotyper simultanément plus de 100 SNP, pour l'appliquer à ~ 500 individus infectés par *P. vivax* et recrutés dans neuf endroits différents du Cambodge entre 2004 et 2013. Nos analyses ont montré que la grande majorité des infections étaient polyclonales (92%) et que le *P. vivax* présentait une grande diversité génétique au Cambodge sans stratification géographique apparente. Nous avons observé que la proportion d'infections monoclonales avait augmenté de manière significative entre 2004 et 2013, ce qui pourrait suggérer que les stratégies de lutte contre le paludisme au Cambodge seraient peut-être en train de prendre le dessus sur la population parasitaire. **Friedrich et al. PLoS NTD, 2016.**

Les génotypes *mdr1* de *Plasmodium vivax* chez les isolats issus de patients complètement guéris et vivant dans des zones endémiques et non endémiques du Brésil. Sur la base d'échantillons issus de patients guéris, vivant dans des zones endémiques et non endémiques du Brésil, nous avons constaté que 34 (70%) d'entre eux présentaient au moins une mutation dans le gène *pvmr1*. Les allèles mutants T958M étaient les plus courants (73%) suivis des Y976F (15%) et des F1076L (12%). Nos résultats semblent indiquer que le gène *pvmr1* n'est pas un marqueur fiable de CQR. **Gomes et al. Malaria Journal, 2016.**

AUTRES TRAVAUX COLLABORATIFS INTERNATIONAUX

Faible résistance à la sulfadoxine-pyriméthamine chez les parasites *Plasmodium falciparum* de Lubango, en Angola. Des profils moléculaires des *dhfr* et *dhps* du *P. falciparum* ont été évalués sur des échantillons angolais. Nous avons observé que les mutations génétiques des *pfdhfr* et *pfdhps* dans les isolats de Lubango indiquaient une faible résistance SP, et qu'une IPT pour les femmes enceintes et les nourrissons, adapté en fonction du traitement SP pourrait se révéler efficaces. **Kaingona-Daniel et al, journal du paludisme, 2016.**

Contrôle des variations du nombre de copies de *Plasmodium* : évaluation des nombres de copies de gènes chez les génomes haploïdes. Cette étude présente l'analyse des variations de nombre de copies sur trois gènes connus pour avoir différents niveaux d'amplification, et qui se trouvent dans les génomes nucléaires, apicoplastes ou mitochondriaux. Les résultats sont corrélés avec des expériences qPCR, habituellement réalisées dans l'identification de l'amplification / effacement spécifique au locus. Cet outil facilitera l'étude de l'adaptation génomique de *P. falciparum* en réponse aux changements écologiques : pression médicamenteuse, réduction de la transmission, réduction démographique des parasites (transition vers la pré-élimination de la zone endémique). **Beghain et al. Revue du paludisme, 2016.**

Induction de la tolérance à plusieurs médicaments chez le *Plasmodium falciparum* par la pression prolongée d'artémisinine. Nous avons cherché à comprendre si une d'artémisinine de longue durée pouvait permettre de sélectionner un nouveau profil de tolérance aux combinaisons thérapeutiques. Les parasites tolérants aux traitements ont montré des taux de recrudescence plus élevés pour les endopéroxydes, les quinolones et antifolate, y compris pour les traitements dérivés des

combinaisons thérapeutiques recommandées, mais sont restés sensibles à l'atovaquone. Les classes d'âge des phases intra-érythrocytaires capables de résister à l'artémisinine ont été étendues à des formes aneaux tardives et aux trophozoïtes. La tolérance aux traitements combinés résulte de la quiescence induite par les médicaments, qui permet aux parasites de survivre à l'exposition de médicaments antipaludiques sans aucun lien, et qui inhibent une variété de voies métaboliques. **Ménard et al., Emerg Infect Dis., 2016.**

Identification et caractérisation de deux nouveaux virus à ARN chez les moustiques du complexe *Anopheles gambiae*. L'interaction du complexe *Anopheles gambiae* avec des virus, ainsi que leur rôle dans la transmission des arbovirus pendant les épidémies n'a que très peu été examinée. Le séquençage en profondeur de petits ARN a révélé deux nouveaux virus à ARN d'insectes, un Dicistrovirus et un Cypovirus, trouvés dans des colonies de laboratoire d'*Anopheles gambiae*. Les *Anopheles* collectés dans leur milieu, au Sénégal et au Cambodge, étaient positifs pour le Dicistrovirus et Cypovirus, et présentaient une identité de séquence élevée avec le virus du laboratoire. **Carissimo et al. PlosOne, 2016.**

3.1.3 PROGRAMMES DE RECHERCHE – PROGRAMMATION SCIENTIFIQUE 2017

L'Unité mixte internationale (UMI), créée en 2016, associe le travail de terrain de première ligne, des compétences et une expertise de haut niveau, pour renforcer la visibilité scientifique de la recherche sur le paludisme réalisée dans les instituts Pasteur, et développer des projets communs. Les axes de recherche tentent de répondre aux nouveaux défis liés à l'élimination de *P. falciparum* et *P. vivax* et à développer de nouveaux outils d'élimination.

Le MTRU allie l'expertise de terrain à l'expertise de laboratoire des scientifiques de IP Cambodge, leur étroite collaboration avec le Programme national de Lutte contre le Paludisme (PNLP), leurs importantes ressources humaines techniques et financières, les possibilités de financement (le Fonds mondial de Lutte Contre le Sida, la Tuberculose et le Paludisme, l'Initiative 5%, l'OMS, USAID, l'EDCTP, la Fondation Gates), et leurs remarquables collections d'échantillons, associés à une expertise en laboratoire de première ligne en génétique, biochimie, biologie cellulaire et développement de traitements des scientifiques de IP Paris. Le MTRU promeut un nouveau paradigme dans l'articulation des recherches entre le RIIP et le campus de Paris, afin d'assurer des échanges rapides, constants et efficaces d'informations, de données, de matériel et de personnel, et des projets collaboratifs avec des scientifiques d'autres unités et unités de recherche sur le paludisme du RIIP, dans le Département des Parasites et Insectes vecteurs.

1 - Résistance aux nouveaux anti-paludiques et multi-résistance aux traitements

L'émergence du paludisme à *p. falciparum* résistant aux artémisinines et aux traitements dérivés est largement reconnue comme étant une entrave majeure à une élimination réussie du paludisme qui permettrait une éradication mondiale. Nous sommes constamment confrontés à des défis en empêchant une plus grande diffusion des multi-résistances aux traitements dans le reste de l'Asie, puis en Afrique, comme cela a déjà été le cas avec la chloroquine et le paludisme à *falciparum* résistant aux antifolates, dont l'émergence le long de la frontière entre la Thaïlande et le Cambodge a eu un coût humain important. Des recherches approfondies pour déchiffrer les mécanismes cellulaires et moléculaires associés à une résistance aux traitements antipaludiques, un solide système de surveillance et d'évaluation (M&E) et de nouvelles interventions (y compris sur les nouveaux traitements pour les nouvelles stratégies) sont nécessaires pour améliorer la qualité et assurer la réussite des interventions en cours, et permettre l'élimination du paludisme à *falciparum* dans les zones où la résistance a pris de l'ampleur. Nos objectifs sont les suivants:

Décrire et surveiller l'efficacité des traitements antipaludiques / Déchiffrer les mécanismes cellulaires et moléculaires associés à la résistance aux antipaludiques (*P. falciparum* et *P. vivax*), en particulier dans les zones de pré-élimination et de transmission faible

Depuis 2013, nos groupes ont atteint des étapes importantes dans la compréhension de la résistance à l'artémisinine et de sa distribution mondiale. Deux axes sont maintenant développés :

- **Surveiller la résistance à l'artémisinine et aux traitements dérivés au niveau mondial, en collaboration avec l'OMS.** Suite au projet Karma, notre objectif est de créer un réseau de partenariats en Afrique pour faciliter la surveillance de la résistance aux traitements antipaludiques.

Ce réseau travaillera en étroite collaboration avec le Programme mondial de Lutte contre le Paludisme (Unité pharmacorésistance et endiguement) et les Programmes nationaux de Lutte contre le Paludisme en Afrique.

• **Comprendre les phénomènes de dormance du parasite provoqués par l'artémisinine et la réponse au stress oxydatif au niveau cellulaire.** Nous voulons comprendre comment les gènes mutants K13 permettent aux parasites *Plasmodium* de résister aux doses létales d'artémisinine (**subvention PTR_535, 2015**). Notre stratégie consiste à: (i) explorer le rôle du gène K13 dans le contrôle de l'homéostasie redox du *Plasmodium*, (ii) comprendre le rôle biologique de la protéine K13 grâce à l'identification de ses partenaires spécifiques de liaison en générant des outils spécifiques au gène K13 du *Plasmodium*, (iii). Pour valider nos résultats *in vivo* en utilisant le modèle de *P. berghei* du paludisme chez les rongeurs et avec des isolats de terrain de *P. falciparum* isolés recueillis chez des patients cambodgiens.

En collaboration avec wWARN (<http://www.wwarn.org/about-us/scientific-groups/invitro>), nous fournissons rapidement des informations complètes et de qualité, nécessaires pour suivre l'émergence et la propagation des résistances aux traitements, et soutenons le milieu de la recherche en développant des méthodes et outils de tests *in vitro* de façon ponctuelle, pour surveiller la résistance aux traitements, en dispensant des formations sur l'utilisation de ces techniques et en assurant des contrôles d'assurance qualité.

Grâce à différents projets multicentriques (**NIH R01, subventions IP-Fiocruz**), nous menons des études visant à améliorer notre compréhension de la résistance du *P. vivax* à la chloroquine. Nous devons au préalable développer un essai biologique systématique robuste pour étudier la sensibilité *in vitro* aux antipaludiques. En menant des essais cliniques, nous examinons aussi en profondeur la caractéristique biologique de la rechute. Nous espérons compiler des données complètes qui serviront à explorer les facteurs hôtes et/ou les parasites associés aux rechutes, et définir des stratégies alternatives pour améliorer la prise en charge du paludisme *vivax* (traitement radical). La perspective, à long terme, est de créer un consortium de chercheurs du RIIP en Asie du Sud-Est, à Madagascar, en Iran et en Amérique du Sud, qui nous permettra de travailler ensemble sur le *P. vivax*.

Élaborer des protocoles, valider les cibles médicamenteuses et évaluer les molécules retardées/précliniques : des molécules aux traitements

En collaboration et avec le soutien financier de MMV (Medicine for Malaria Venture) et Sanofi, nous évaluons les nouveaux antipaludiques innovants issus de leur pipeline ou de la phase II du traitement (OZ439-Ferroquine). Pour évaluer la susceptibilité des combinaisons, nous avons développé un ensemble de tests dédiés, tels que des tests de survie, des tests isotopiques classiques, des tests de guérison, un test de sensibilité au niveau du parasite et des tests de sensibilité de réponses aux doses.

2 - Détection des réservoirs infectieux de Plasmodium & Transmission

Des outils améliorés pour détecter les stades de Plasmodium asexués et sexuels du paludisme chez les porteurs de parasites asymptomatiques (réservoir), en particulier dans les zones de pré-élimination et de transmission faible.

Pour atteindre l'objectif de l'élimination du paludisme, et en particulier de l'élimination des parasites de *P. falciparum* multi-résistants aux traitements qui sont apparus dans l'Ouest du Cambodge, des efforts supplémentaires sont nécessaires. En effet, la détection de réservoirs de parasites du paludisme est difficile et nécessite de nouveaux outils capables de détecter des niveaux très faibles de densité parasitaire. Nous devons changer notre stratégie en passant d'une "détection passive des cas" à une "détection active des cas". En d'autres termes, notre capacité à détecter les porteurs de parasites asymptomatiques (les «réservoirs») sur le terrain est essentielle pour garantir le succès des stratégies d'élimination du paludisme. Les tests moléculaires et sérologiques ont considérablement amélioré le seuil de détection des parasites du paludisme. En collaboration avec plusieurs partenaires (**MSF-Belgique, LSTMH, l'Institut de Médecine Tropicale à Anvers, le Malaria Consortium, Partenaire de Développement**), nous développons et mettons en œuvre de nouveaux outils pour redéfinir l'évolution du paysage épidémiologique de l'épidémiologie du paludisme afin d'adapter les stratégies visant à éliminer les réservoirs ou à évaluer l'impact des stratégies mises en œuvre.

Étudier les interactions entre les populations de parasites sexuels et les insectes vecteurs: Transmission

L'évolution de la résistance de *P. falciparum* aux traitements antipaludiques a principalement été étudiée chez l'Homme, négligeant les moustiques vecteurs, hôtes de la reproduction sexuelle et jouant un rôle majeur dans la dissémination de la résistance. Nous ne savons pas si les dérivés d'artémisinine augmentent la production de gamétocytes à partir de parasites résistants à l'artémisinine, ce qui augmenterait la transmission au vecteur. Des insectariums fixes et mobiles (**subventions Total et Rotary**) ont récemment été mis en place dans l'unité. Pour évaluer le potentiel de transmission du paludisme, nous infectons les moustiques avec des parasites naturels et déterminons la prévalence du parasite et son intensité dans le vecteur. Par conséquent, notre travail sera axé sur des réponses à trois questions primordiales: les parasites sensibles et les parasites résistants à l'artémisinine infectent-ils différemment les moustiques vecteurs ? Quels sont les impacts des ACT sur le développement et la transmission des différentes souches de *P. falciparum* ? Les parasites de *P. falciparum* et *P. vivax* ont-ils une influence mutuelle sur leur transmission et leur développement dans les moustiques vecteurs ?

En outre, en vue d'obtenir des preuves sur l'efficacité d'une seule faible dose de primaquine actuellement recommandée par l'OMS, nous évaluons l'efficacité d'une faible dose de primaquine dans le blocage de la transmission du paludisme en utilisant des tests de gorgement direct sur membrane (DMFA) (**subvention PMI**).

3 - Evolution & co-adaptation des parasites Plasmodium

3.1. Caractérisation de la diversité génétique de *P. vivax* et identification des polymorphismes génétiques associés à la résistance aux médicaments et au profil de rechute. Grâce à une **subvention NIH** (en collaboration avec David Serre et le Cleveland Clinic Lerner Research Institute), notre objectif est de caractériser la diversité génétique de *P. vivax* au Cambodge et d'identifier les polymorphismes d'ADN qui sont à la base de la sensibilité et de la résistance aux traitements.

3.2. Analyser les interactions récepteur-ligand impliquées dans l'invasion des cellules hôtes merozoïtes de *Plasmodium vivax* (PvDBP / PvEBP et PvRBP1a / b, PvRBP2a / b / c) (subvention PTR_490, 2014). En collaboration avec l'équipe de Biologie de Plasmodium et Vaccins (C. Chitnis) de l'IP Paris, l'Unité d'Immunologie du Paludisme (I. Vigan) de IP Madagascar et le MTRU, nous explorons les bases moléculaires des voies d'invasion empruntées par les isolats de *P. vivax* sur le terrain. Nous développons des tests de culture et d'invasion *in vitro* à court terme pour évaluer la fréquence selon laquelle des isolats de *P. vivax* en provenance du Cambodge et de Madagascar envahissent des réticulocytes par des voies indépendantes du DARC (antigène du groupe sanguin Duffy). En outre, nous étudions les principales interactions récepteur-ligand qui lient ces voies d'invasion. Les objectifs généraux sont de définir les voies utilisées par les isolats de terrain de *P. vivax* pour envahir les réticulocytes humains, comprendre les rôles fonctionnels et les caractéristiques immunologiques des familles de protéines de fixation de l'amplificateur (EBP) et protéines fixant l'ARN (RBP), et explorer la possibilité de développer un vaccin qui empêcherait l'invasion du paludisme *P. vivax* selon une combinaison de ces ligands de parasites fonctionnellement importants.

3.1.4 SOUTIEN AUX AUTORITÉS NATIONALES

Grâce à un établissement permanent au Cambodge depuis 2001, nous avons pu forger des liens étroits et solides avec le Programme national de Lutte contre le Paludisme du Cambodge. Nos rôles sont de développer des projets collaboratifs (Cf. section 3.1.2.) et fournir un soutien technique fiable à tous les partenaires nationaux. A titre d'exemple, nous conduisons systématiquement des PCR sur les soldats cambodgiens en partance pour l'Afrique dans le cadre de missions pour l'ONU. Nous sommes étroitement associés au suivi de l'efficacité de traitements antipaludiques, effectué chaque année dans des sites sentinelles (études d'efficacité thérapeutique). Nous rencontrons aussi régulièrement les principales parties prenantes du Cambodge pour partager notre expérience et connaissances sur l'épidémiologie du paludisme et sa dynamique.

3.1.5 ENSEIGNEMENT ET FORMATIONS

Etudiants accueillis et formés en 2016-2017

- Flore Nardella, 6 mois, novembre 2015- avril 2016, stagiaire de Master, Université de Strasbourg. “Evaluation de la sensibilité des isolats cambodgiens *P. falciparum* aux traitements actuels et nouveaux” ;
- Sina Heng, 3 mois, mai-juillet 2016, Lewis and Clark College, Oregon, Etats-Unis. “Innovation du test de diagnostic rapide de la PfHRP-2” ;
- Camille Roesch, 6 mois, février-juillet 2016, Ingénieur ESBS, Master 2 Université de Strasbourg. “Polymorphisme et expression des gènes codant des protéines de membrane de *Plasmodium vivax* : Corrélation avec le phénotype d'invasion *in vitro* dans les réticulocytes humains ;
- Lyse Primault, 6 mois, janvier-juillet 2016, Master 2 Emergences des maladies Parasitaires et Infectieuses, Université de Montpellier. ‘Dynamique de transmission et développement de *Plasmodium vivax* dans le moustique vecteur au Cambodge.’

Etudiants doctorants en 2016-2017

- Melissa Mairé Khedim, 3 ans, depuis janvier 2017, Université de Toulouse, doctorante : ‘Résistance de *Plasmodium falciparum* aux ACT en Asie du Sud Est et en Afrique centrale : épidémiologie, mécanismes et nouvelles options thérapeutiques’.
- Camille Roesch, 3 ans, depuis novembre 2016, Université de Montpellier, doctorante : ‘Déterminants de l'hôte et du parasite impliqués dans les phénotypes d'invasion et de croissance de *P. vivax* dans les réticulocytes humains’.

3.1.6 LISTE DES PUBLICATIONS (2016)

2016

1. Nardella F, Stiebing S, Wagner P, Collot V, Kaiser M, Witkowski B, Menard D, Schmitt M, Candolfi E and Vonthron-Sénécheau C. 2016. Flavone derivatives: a promising tool in the fight against malaria. *Planta medica*, 81, S1-S381.
2. Duru V, Witkowski B and Ménard D. 2016. Plasmodium falciparum Resistance to Artemisinin Derivatives and Piperaquine: A Major Challenge for Malaria Elimination in Cambodia. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 95, 1228-1238.
3. Faway E, Musset L, Pelleau S, Volney B, Casteras J, Caro V, Menard D, Briolant S and Legrand E. 2016. Plasmodium vivax multidrug resistance-1 gene polymorphism in French Guiana. *Malaria journal*, 15.
4. Witkowski B, Duru V, Khim N, Ross LS, Saintpierre B, Beghain J, Chy S, Kim S, Ke S, Kloeung N, Eam R, Khean C, Ken M, Loch K, Bouillon A, Domergue A, Ma L, Bouchier C, Leang R, Huy R, Nuel G, Barale J, Legrand E, Ringwald P, Fidock DA, Mercereau-Puijalon O, Arieu F and Ménard D. 2016. A surrogate marker of piperazine-resistant Plasmodium falciparum malaria: a phenotype-genotype association study. *The Lancet. Infectious diseases*.
5. Kerkhof K, Sluydts V, Willen L, Kim S, Canier L, Heng S, Tsuboi T, Sochantha T, Sovannaro S, Ménard D, Coosemans M and Durnez L. 2016. Serological markers to measure recent changes in malaria at population level in Cambodia. *Malaria journal*, 15.
6. Kerkhof K, Sluydts V, Heng S, Kim S, Pareyn M, Willen L, Canier L, Sovannaro S, Ménard D, Sochantha T, Coosemans M and Durnez L. 2016. Geographical patterns of malaria transmission based on serological markers for falciparum and vivax malaria in Ratanakiri, Cambodia. *Malaria journal*, 15.
7. Grist EP, Flegg JA, Humphreys G, Mas IS, Anderson TJ, Ashley EA, Day NP, Dhorda M, Dondorp AM, Faiz MA, Gething PW, Hien TT, Hlaing TM, Imwong M, Kindermans J, Maude RJ, Mayxay M, McDew-White M, Menard D, Nair S, Nosten F, Newton PN, Price RN, Pukrittayakamee S, Takala-Harrison S, Smithuis F, Nguyen NT, Tun KM, White NJ, Witkowski B, Woodrow CJ, Fairhurst RM, Sibley CH and Guerin PJ. 2016. Optimal health and disease management using spatial uncertainty: a geographic characterization of emergent artemisinin-resistant Plasmodium falciparum distributions in Southeast Asia. *International journal of health geographics*, 15.
8. Leang R, Khu NH, Mukaka M, Debackere M, Tripura R, Kheang ST, Chy S, Kak N, Buchy P, Tarantola A, Menard D, Roca-Felterer A, Fairhurst RM, Kheng S, Muth S, Ngak S, Dondorp AM, White NJ and Taylor WR. 2016. An optimised age-based dosing regimen for single low-dose primaquine for blocking malaria transmission in Cambodia. *BMC medicine*, 14.
9. Siv S, Roca-Felterer A, Vinjamuri SB, Bouth DM, Lek D, Rashid MA, By NP, Popovici J, Huy R and Menard D. 2016. Plasmodium vivax Malaria in Cambodia. *The American journal of tropical medicine and hygiene*.
10. Rasmussen C, Arieu F, Fairhurst RM, Ringwald P and Ménard D. 2016. Role of K13 mutations in Artemisinin-based combination therapy. *Clinical infectious diseases*
11. Boullé M, Witkowski B, Duru V, Sriprawat K, Nair SK, McDew-White M, Anderson TJ, Phyo AP, Menard D and Nosten F. 2016. Artemisinin-Resistant Plasmodium falciparum K13 Mutant Alleles, Thailand-Myanmar Border. *Emerging infectious diseases*, 22, 1503-1505.
12. Lek D, Popovici J, Arieu F, Vinjamuri SB, Meek S, Bruce J, Taylor WR, Socheat D, Menard D and Rogers WO. 2016. National Malaria Prevalence in Cambodia: Microscopy Versus Polymerase Chain Reaction Estimates. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 95, 588-594.
13. Sluydts V, Durnez L, Heng S, Gryseels C, Canier L, Kim S, Van Roey K, Kerkhof K, Khim N, Mao S, Uk S, Sovannaro S, Grietens KP, Sochantha T, Menard D and Coosemans M. 2016. Efficacy of topical mosquito repellent (picaridin) plus long-lasting insecticidal nets versus long-lasting insecticidal nets alone for control of malaria: a cluster randomised controlled trial. *The Lancet. Infectious diseases*, 16, 1169-1177.

14. Dwivedi A, Khim N, Reynes C, Ravel P, Ma L, Tichit M, Bouchier C, Kim S, Dourng D, Khean C, Chim P, Siv S, Frutos R, Lek D, Mercereau-Puijalon O, Arie F, Menard D and Cornillot E. 2016. *Plasmodium falciparum* parasite population structure and gene flow associated to anti-malarial drugs resistance in Cambodia. *Malaria journal*, 15.
15. Ménard D, Khim N, Beghain J, Adegnika AA, Shafiul-Alam M, Amodu O, Rahim-Awab G, Barnadas C, Berry A, Boum Y, Bustos MD, Cao J, Chen J, Collet L, Cui L, Thakur G, Dieye A, Djallé D, Dorkenoo MA, Eboumbou-Moukoko CE, Espino FJ, Fandeur T, Ferreira-da-Cruz M, Fola AA, Fuehrer H, Hassan AM, Herrera S, Hongvanthong B, Houzé S, Ibrahim ML, Jahirul-Karim M, Jiang L, Kano S, Ali-Khan W, Khanthavong M, Kremsner PG, Lacerda M, Leang R, Leelawong M, Li M, Lin K, Mazarati J, Ménard S, Morlais I, Muhindo-Mavoko H, Musset L, Na-Bangchang K, Nambozi M, Niaré K, Noedl H, Ouédraogo J, Pillai DR, Pradines B, Quang-Phuc B, Ramharter M, Randrianarivelojosa M, Sattabongkot J, Sheikh-Omar A, Silué KD, Sirima SB, Sutherland C, Syafruddin D, Tahar R, Tang L, Touré OA, Tshibangu-wa-Tshibangu P, Vigan-Womas I, Warsame M, Wini L, Zakeri S, Kim S, Eam R, Berne L, Khean C, Chy S, Ken M, Loch K, Canier L, Duru V, Legrand E, Barale J, Stokes B, Straimer J, Witkowski B, Fidock DA, Rogier C, Ringwald P, Arie F and Mercereau-Puijalon O. 2016. A Worldwide Map of *Plasmodium falciparum* K13-Propeller Polymorphisms. *New England journal of medicine*, 374, 2453-2464.
16. Carissimo G, Eiglmeier K, Reveillaud J, Holm I, Diallo M, Diallo D, Vantaux A, Kim S, Ménard D, Siv S, Belda E, Bischoff E, Antoniewski C and Vernick KD. 2016. Identification and Characterization of Two Novel RNA Viruses from *Anopheles gambiae* Species Complex Mosquitoes. *PLoS one*, 11.
17. Kaingona-Daniel EP, Gomes LR, Gama BE, Almeida-de-Oliveira NK, Fortes F, Ménard D, Daniel-Ribeiro CT and de Ferreira-da-Cruz Md. 2016. Low-grade sulfadoxine-pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum* parasites from Lubango, Angola. *Malaria journal*, 15.
18. Beghain J, Langlois A, Legrand E, Grange L, Khim N, Witkowski B, Duru V, Ma L, Bouchier C, Ménard D, Paul RE and Arie F. 2016. *Plasmodium* copy number variation scan: gene copy numbers evaluation in haploid genomes. *Malaria journal*, 15.
19. Witkowski B, Khim N, Kim S, Domergue A, Duru V and Menard D. 2016. [Multiple and successive treatment failures in a patient infected by *Plasmodium falciparum* in Cambodia and treated by dihydroartemisinin-piperaquine]. *Bulletin de la Société de pathologie exotique* (1990), 109, 87-90.
20. Friedrich LR, Popovici J, Kim S, Dysoley L, Zimmerman PA, Menard D and Serre D. 2016. Complexity of Infection and Genetic Diversity in Cambodian *Plasmodium vivax*. *PLoS neglected tropical diseases*, 10.
21. Leang R, Canavati SE, Khim N, Vestergaard LS, Fuhrer IB, Kim S, Denis MB, Heng P, Tol B, Huy R, Duparc S, Dondorp AM, Menard D and Ringwald P. 2016. Efficacy and safety of pyronaridine-artesunate for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in western Cambodia. *Antimicrobial agents and chemotherapy*.
22. Hustedt J, Canavati SE, Rang C, Ashton RA, Khim N, Berne L, Kim S, Sovannaroeth S, Ly P, Ménard D, Cox J, Meek S and Roca-Feltre A. 2016. Reactive case-detection of malaria in Pailin Province, Western Cambodia: lessons from a year-long evaluation in a pre-elimination setting. *Malaria journal*, 15.

2017

1. Lu F, Culleton R, Zhang M, Ramaprasad A, von Seidlein L, Zhou H, Zhu G, Tang J, Liu Y, Wang W, Cao Y, Xu S, Gu Y, Li J, Zhang C, Gao Q, Menard D, Pain A, Yang H, Zhang Q and Cao J. 2017. Emergence of Indigenous Artemisinin-Resistant *Plasmodium falciparum* in Africa. *New England Journal of Medicine*.
2. Watson J, Taylor WR, Menard D, Kheng S and White NJ. 2017. Modelling primaquine-induced haemolysis in G6PD deficiency. *eLife*.
3. Imwong M, Suwannasin K, Kunasol C, Sutawong K, Mayxay M, Rekol H, Smithuis FM, Hlaing TM, Tun KM, van der Pluijm RW, Tripura R, Miotto O, Menard D, Dhorda M, Day NP, White NJ and Dondorp AM. 2017. The spread of artemisinin resistant *Plasmodium falciparum* in the Greater Mekong Subregion: a molecular epidemiology observational study. *The Lancet. Infectious Diseases*.

3.2 EPIDEMIOLOGIE & SANTE PUBLIQUE

3.2.1 STRUCTURE FONCTIONNELLE DE L'UNITÉ

L'unité d'Epidémiologie et Santé publique (Epi Santé) réalise des études de recherche opérationnelle sur les principaux défis de santé publique au Cambodge. La direction de cette unité a été assurée par le Dr. Arnaud Tarantola jusqu'en août 2016, puis par le Dr. Patrice Piola depuis septembre 2016

Le Centre de Prévention de la Rage et le Centre de Vaccination international de l'Institut Pasteur du Cambodge font également partie de l'Unité d'épidémiologie et Santé publique, et sont sous la responsabilité directe du Directeur adjoint de l'unité Epi Santé, Dr. Sowath LY.

L'unité de recherche Epi santé est organisée autour de trois principaux groupes :

- Le Groupe d'Epidémiologie communautaire (GEC), dirigé par Dr. Sowath LY, bénéficie d'une grande expérience en matière de projets de recherche sur la rage, la fièvre dengue, la grippe aviaire et les enquêtes épidémiologiques.

- Le Groupe de Recherche clinique (GRC), dirigé par Dr. Laurence BORAND, travaille depuis longtemps sur des essais cliniques permettant de changer les recommandations nationales, en vue d'améliorer le diagnostic et le traitement des patients atteints du VIH, de la tuberculose et de l'hépatite B. Ce groupe mène également des recherches en milieu hospitalier sur les résistances aux antibiotiques et sur la coqueluche.

- Le Groupe d'Epidémiologie vétérinaire (GEV), dirigé par Dr. Véronique CHEVALIER, s'inscrit dans le cadre d'une collaboration entre le CIRAD (Centre de Coopération internationale en Recherche agronomique pour le Développement) et l'IPC. Le groupe porte une attention principale sur les maladies zoonotiques, avec un important volet sur la modélisation. Les maladies abordées par le GEV incluent la rage, l'encéphalite japonaise et le virus Nipah. La plupart des projets du CIRAD comprennent une composante humaine mise en œuvre par le GEC et/ou les unités de laboratoire de l'IPC.

Presque toutes les activités de recherche de l'unité Epi Santé s'appuient sur des collaborations étroites avec les laboratoires d'unités de l'IPC et le Ministère de la Santé cambodgien: le Centre national sur le VIH/Sida, la Dermatologie et les IST (NCHADS), le Centre national de Lutte contre la Tuberculose et la Lèpre (CENAT), l'Institut national de Recherche vétérinaire (NaVRI), l'Hôpital Sihanouk Center of Hope, le Centre cambodgien pour le Contrôle et la Prévention des Maladies (CDC Cambodge) et le Centre national de la Parasitologie, Entomologie et Lutte contre le Paludisme (CNM), pour n'en nommer que quelques-uns. Les projets de l'unité ne seraient pas possible sans l'intérêt et la contribution apportés par plusieurs hôpitaux de référence de Phnom Penh et de province, tels que l'Hôpital Calmette, le Centre national de Santé maternelle et infantile (NMCH), les hôpitaux provinciaux de Kompong Cham et Takeo, l'Hôpital Sihanouk Center of Hope et l'Hôpital Kantha Bopha. De solides partenariats avec l'Université des Sciences de la Santé et l'Institut de Technologie du Cambodge ont également pu être renforcés grâce à plusieurs projets collaboratifs.

Enfin, la plupart des projets de recherche sont le produit de partenariats établis avec des agences internationales ou des groupes de recherche, dont l'Agence nationale de Recherche sur le SIDA (ANRS), l'Initiative pour un vaccin contre la Dengue (DVI), l'International Vaccine Institute (IVI), l'Union européenne, la Fondation Total, l'INSERM, l'IRD, le Réseau international des Instituts Pasteur, l'Institut Pasteur de Paris, le CIRAD, la Fondation Pasteur, MSD Avenir, le Gillings Public Health Fellowship, l'Organisation mondiale de la Santé (OMS), et l'Agence française de Développement (AFD).

D'autres projets de recherche sont mis en œuvre parallèlement aux trois principaux groupes de recherche, comme le projet SEaE « SouthEast Asia encephalitis ».

En 2016, l'équipe de l'unité Epi-Santé était composée d'environ 50 personnes, toutes déterminées à mener à bien le large éventail de projets et satisfaire aux normes de qualité. L'unité Epi Santé se trouve au croisement de presque tous les laboratoires de l'IPC, et fournit un soutien épidémiologique aussi bien sur le plan méthodologique que sur le terrain. L'unité de virologie de l'IPC est un partenaire majeur

et de longue date dans la plupart des projets et activités menés par l'unité Epi Santé. Des projets avec l'unité d'épidémiologie moléculaire du paludisme sont également en cours de développement.

3.2.2 PROGRAMMES DE RECHERCHE – PRINCIPALES REALISATIONS EN 2016

Etude sur la santé et la charge économique de la dengue chez les populations rurales du Cambodge

Unité Epi Santé, chefs d'équipe : Sowath Ly, Arnaud Tarantola

Cette étude s'est déroulée sur une période de 2 ans (2015-2016), avec pour but de récolter des données épidémiologiques, économiques et comportementales, afin d'évaluer la charge de la dengue au Cambodge. L'objectif principal était de rendre compte de la morbidité, la mortalité, et des coûts financiers engendrés par les infections virales de la dengue dans des zones rurales de deux provinces. L'étude comportait quatre composantes: (1) six enquêtes sérologiques conduites auprès de 2 000 participants âgés de 1 à 55 ans ; (2) une enquête sur le recours aux structures de santé conduite auprès de 400 ménages sélectionnés de façon aléatoire parmi les participants à l'enquête sérologique ; (3) une surveillance passive conduite auprès de cinq hôpitaux de deux provinces visant à détecter d'éventuels cas de dengue à l'aide d'un test rapide (NS1, IgM, IgG) et d'un test PCR disponible à l'IPC; et (4) une étude sur le coût de la maladie incluant 200 cas de dengue confirmés et détectés au cours des autres études pour rendre compte du coût de la maladie pour les patients et pour les hôpitaux. Les récoltes de données sur le terrain se sont terminées en 2016. Les tests en laboratoire et le nettoyage des données devraient se terminer à la fin du mois de mars 2017.

Soutien financier : Initiative de vaccination contre la dengue DVI, IVI.

Dynamique des populations de chiens dans les zones rurales du Cambodge

Unité Epi Santé, chefs d'équipe : Sowath Ly, Arnaud Tarantola

La dynamique de la population canine varie d'un pays à l'autre. La rage est endémique au Cambodge et est principalement transmise à l'Homme par morsure de chien. Une meilleure compréhension de la dynamique des populations de chiens aiderait à renseigner et fournir des recommandations au programme de vaccination des chiens ou au programme de contrôle des populations canines, en vue de lutter contre la rage.

Cette étude a suivi une cohorte de 330 ménages, choisis au hasard dans 13 villages ruraux, pendant 15 mois, de 2015 à 2016. Un recensement des chiens a été effectué au cours d'une enquête de référence, tandis que des informations sur les chiens perdus et entrants ont été répertoriées aux 6^{ème} et 15^{ème} mois de l'enquête. Au cours de l'enquête de référence, tous les chiens de chaque ménage ont été pris en photo à côté d'un code d'identification, permettant de les identifier. Lors des enquêtes de suivi, les photos de chiens ont été montrées aux propriétaires, pour répertorier les éventuels pertes ou acquisitions de chiens (décès, perte de nouveau-né, adoption, etc.). L'enquête de référence a inventorié 392 chiens dans 330 ménages. Les données de suivi sont en cours de traitement.

Soutien financier: IPC.

Étude de la réponse immunitaire de la prophylaxie postexpositionnelle (PEP) contre la rage (RESIST 2)

Unité Epi Santé, chefs d'équipe : S. Ly, L. Borand, A. Tarantola

Les données disponibles indiquent que la réponse immunitaire à J-14 après un protocole de trois injections intradermiques, effectuées à J-0, J-3 et J-7, est comparable à un schéma de 5 doses. Le nombre de doses administrées au cours du protocole d'une semaine, qui consiste en trois sessions d'injections, reste élevé à 12 doses intradermiques. Des données cliniques, épidémiologiques et biologiques sont recueillies pour évaluer la possibilité de raccourcir le protocole d'injections intramusculaires et intradermiques existants (trois sessions d'injections effectuées sur un intervalle d'une semaine, sans injections à J-28) et réduire le nombre de doses (total de 6 doses au lieu de 8) en PrEP et dans les protocoles de PEP, sans risque pour les patients.

Etat : Le recrutement de patients est actuellement en cours.

Partenaire cambodgien principal : Ministère de la Santé.

Soutien financier : Réseau international des Instituts Pasteur.

STATIS ANRS 12290

Chef d'équipe : L. Borand

STATIS (traitement antituberculeux empirique systématique vs. guidé par des examens chez les adultes infectés par le VIH et sévèrement immunodéprimés qui débute un traitement antirétroviral avec des CD4 < 100/mm³) est un essai randomisé multicentrique contrôlé qui a pour but de comparer deux stratégies expérimentales permettant de réduire la mortalité et le risque d'infections bactériennes sévères (y compris la tuberculose) à 6 mois chez les adultes infectés par le VIH et sévèrement immunodéprimés (CD4 < 100/mm³). Les deux stratégies sont : 1) le dépistage continu intensif de la tuberculose pendant le suivi à chaque fois que le patient présente des symptômes (Xpert MTB/RIF, test LAM, radiographie pulmonaire) et 2) le traitement systématique empirique de la tuberculose initié deux semaines avant le début des ARV.

Etat : Le recrutement de patients est actuellement en cours.

Partenaires cambodgiens principaux : NCHADS, CENAT, Hôpital Sihanouk Center of Hope (SHCH).

Soutien financier : ANRS.

Programme d'immunisation pertussis dans les pays à ressources limitées (PERILIC)

Unité Epi Santé, chef d'équipe : L. Borand

Les infections par *Bordetella pertussis* ou *Bordetella parapertussis* surviennent par cycles épidémiques et peuvent causer des maladies respiratoires aiguës sévères, en particulier chez les nourrissons. L'incidence de la maladie clinique a diminué de plus de 90% dans les pays industrialisés. Néanmoins, la résurgence de l'incidence globale de la coqueluche a poussé l'OMS à lister cette maladie parmi les causes majeures de mortalité infantile en 2014. Le but de l'étude est de documenter le processus de contamination, les caractéristiques cliniques et le taux de prévalence de la coqueluche chez les nourrissons de moins de 6 mois suspectés d'être contaminés, et d'évaluer le statut vaccinal chez les enfants de 3 à 15 ans, ainsi que chez les personnes avec qui ils sont en contact au sein des ménages.

Etat : Le recrutement de patients est actuellement en cours.

Partenaires cambodgiens principaux : Programme national de Vaccination du Cambodge (NIP), Hôpital national pédiatrique du Cambodge (NPH), plusieurs hôpitaux de provinces et cliniques privées.

Soutien financier : Fondation Total.

BIRDY 2014-2018 + ACIP kb pneumoniae

Unité Epi Santé, chefs d'équipe : A. de Lauzanne – L. Borand

On sait peu de choses sur les infections bactériennes et les résistances aux antibiotiques chez les enfants dans les pays en développement. La résistance aux antibiotiques est l'une des plus grandes menaces pour la sécurité sanitaire mondiale. L'étude BIRDY (Infections bactériennes et antibiorésistance chez les jeunes enfants dans les pays à faible revenu) est une étude de cohorte internationale (Madagascar, Sénégal, Cambodge) multicentrique et prospective.

BIRDY vise à évaluer l'incidence des infections bactériennes et des résistances aux antibiotiques chez les nouveau-nés et les jeunes enfants (<2 ans), des milieux ruraux et urbains, pour décrire et caractériser les bactéries pathogènes et colonisantes, en vue d'analyser les charges médicales et économiques de l'antibiorésistance.

Parmi les 815 couples mère-enfant étudiés, nous avons noté que le portage de streptocoques vaginaux du groupe B était particulièrement faible (<1%) chez les mères tandis que le portage digestif d'entérobactéries productrices de BLSE était extrêmement élevé (80%, jamais décrits auparavant). La

mortalité néonatale au sein de la cohorte est faible par rapport aux données nationales, 6,2 vs 14,0/1000 naissances vivantes. Des analyses sur les infections néonatales et infantiles sont en cours. La cohorte BIRDY est fondamentale pour les autres projets de recherche ayant attiré aux sujets suivants : le portage de *Klebsiella pneumoniae* hypervirulentes, les applications mobiles permettant de prendre connaissance des résultats de laboratoire, et l'étude PEECNIC.

Partenaires cambodgiens : CDC, 2 centres de santé, 3 hôpitaux.

Soutien financier : IP Paris, MSD Avenir.

Etude bactériologique sur la viande et le poisson

Unité Epi Santé, chefs d'équipe : M. Nadimpalli, A. de Lauzanne

La résistance aux antibiotiques chez les bactéries responsables d'infections pourrait provenir d'une utilisation excessive ou abusive d'antibiotiques en médecine humaine et/ou vétérinaire et/ou d'une contamination de l'environnement. Le portage fécal d'entérobactéries productrices de BLSE, susceptible de provoquer des infections, est particulièrement élevé au Cambodge. L'objectif de cette étude était d'évaluer la prévalence d'entérobactéries productrices de BLSE et carbapénémase dans la viande et les poissons vendus au détail sur les marchés de Phnom Penh, pour les comparer phylogénétiquement aux souches des mères de l'étude BIRDY. Les taux de contamination par enterobactéries BLSE et salmonelles étaient élevés : avec respectivement 75% et 17% de contaminations détectées dans la viande et le poisson vendus au détail. Une entérobactérie productrice de carbapénémase a été récupérée sur un échantillon de porc. La caractérisation génétique est en cours.

Partenaires : Projet BIRDY, CDC : groupe de travail sur la Résistance aux Antibiotiques

Soutien financier: Gillings Public Health Fellowship, Fondation Pasteur.

SEAE (SouthEast Asia encephalitis)

Unité Epi Santé, chef d'équipe : JD Pommier

L'encéphalite, une inflammation aiguë du système nerveux central associée à un dysfonctionnement neurologique, est un problème majeur de santé publique en Asie du Sud-Est, car elle représente une cause fréquente d'hospitalisation pédiatrique (8/100 000 patients-année), avec un taux de mortalité élevé et des séquelles neurologiques sur le long terme. Le projet South East Asia encephalitis vise à (i) améliorer le diagnostic des encéphalites en consolidant les équipes cliniques et les laboratoires hospitaliers et (ii) identifier les étiologies de l'encéphalite dans 4 pays (Cambodge, Laos, Vietnam et Myanmar). Cette étude prospective a débuté mi-2015 (mi-2016 au Myanmar) et a déjà pris en compte plus de 550 patients. Dans la région du Mékong, les causes d'encéphalite non identifiées demeurent élevées (43%), l'encéphalite japonaise en est la cause principale (33%), suivie de la tuberculose, du typhus des broussailles et du virus de l'herpès simplex, qui ont une proportion égale (3%).

Partenaires : LOMWRU, Institut Pasteur de Paris, Institut national d'Hygiène et d'Epidémiologie du Viêt Nam.

Soutien financier : Fondation Total, INSERM, AIRD, IRD, RIIP, CIRAD

LACANET: Séroprévalence des pathogènes zoonotiques suite aux changements d'utilisation des terres dans la province de Monduliri

Unité Epi Santé, chef d'équipe : Sowath Ly

L'objectif était d'étudier le risque d'exposition aux agents pathogènes zoonotiques, tels que le typhus des broussailles, la leptospirose et le virus de l'encéphalite japonaise, chez les résidents et les personnes travaillant dans les industries extractives, à la suite de changements d'utilisation des terres. Une équipe multidisciplinaire (santé humaine, animale et écosystémique) a étudié le rôle que joue le changement d'utilisation des terres dans les dynamiques des maladies, en conduisant une surveillance des maladies au sein de réservoirs d'animaux domestiques et sauvages, et en évaluant l'exposition des personnes qui vivent à ces endroits aux agents pathogènes.

Soutien financier : Union européenne

Interface Hommes – macro-chiroptères dans la province de Kandal

Unité Epi Santé, chef d'équipe : J. Cappelle

Dans le cadre du projet ComAcross (financé par EuropeAid) et du projet TeleNipah (financé par le CNES), plusieurs études ont été mises en place en coordination pour :

1. Évaluer la circulation du virus Nipah (NiV) dans le réservoir du virus en prélevant des échantillons (prélèvements d'urine, oraux, rectaux et de sang) de chauves-souris macro-chiroptères (*Pteropus* sp.), et effectuer des tests de PCR pour détecter d'éventuelles infections par le virus Nipah et tests ELISA et Luminex pour détecter des anticorps contre le virus Nipah.
2. Caractériser l'interface entre les macro-chiroptères et les humains et identifier les éventuelles voies de transmission du virus en installant des colliers GPS sur 14 chauves-souris.
3. Évaluer d'éventuelles transmissions antérieures du virus en collectant des échantillons (de sang) chez les personnes exposées aux chauves-souris suivant l'étude de télémétrie, et vérifier la présence d'éventuels anticorps contre le virus Nipah avec les tests ELISA et Luminex.

Les résultats de la surveillance longitudinale de chauves-souris ont révélé que le virus Nipah était saisonnier avec un pic en mai, après la période de reproduction. Nous avons donc installé les colliers GPS durant cette période, afin d'étudier l'interface chauve-souris - Homme en détails.

En avril et mai 2016, 14 colliers GPS ont été installés sur des *Pteropus lylei* dans la province de Kandal, ce qui nous a permis d'identifier les potentielles zones de contacts entre les chauves-souris et les Hommes, en particulier par le biais de la consommation de jus de palme et la contamination des fruits.

Au total, 84 *Pteropus lylei* ont été capturés et échantillonnés en avril et mai 2016, et chaque animal s'est vu prélevé des échantillons sanguins, oraux et rectaux. Par ailleurs, un total de 244 échantillons d'urine ont été recueillis grâce à des bâches en plastique placées sous les toits.

Au cours de l'étude sur la séroprévalence humaine menée du 16 au 18 mai 2016, nous avons prélevé le sang de 122 personnes issues de 27 familles vivant à proximité de perchoirs de *Pteropus*, et qui présentaient un risque potentiel d'exposition aux chauves-souris. Les échantillons de sang sont disponibles.

ComAcross/SEA (WP 3)

Unité Epi Santé, chefs d'équipe : R. Duboz - V. Chevalier

L'objectif final de l'étude de cas sur l'encéphalite japonaise (EJ) est de construire un modèle de transmission adapté à différents contextes écoclimatiques et de proposer des mesures de contrôle adaptées. Un modèle compartimental et déterministe ajusté à l'aide (i) des données sérologiques recueillies auprès de 2 cohortes de porcs au Cambodge (Cappelle et al, 2016) et (ii) des données recueillies à la suite d'une étude sérologique nationale réalisée auprès de porcs cambodgiens (Veasna et al, 2009) corroborent l'existence d'une transmission directe entre les porcs. Une enquête sérologique effectuée sur des oiseaux domestiques échantillonnés dans des régions rurales et rizicoles, des régions rurales et forestières et zones périurbaines, montre que ces oiseaux sont exposés au virus de l'encéphalite japonaise et pourraient jouer un rôle dans le cycle de l'encéphalite japonaise au Cambodge; iii) l'analyse statistique des données sérologiques recueillies auprès des porcs dans le nord du Viêt Nam (projet GRIPAVI 2009) a permis d'évaluer la force de l'infection chez les porcs en périodes épidémique et non-épidémique, dans des zones non endémiques où la vaccination des porcs pourrait être un moyen rentable de réduire le nombre de cas d'encéphalite japonaise.

Soutien financier : ComAcross/ SEAE

ComAcross – Jeu de rôle

Unité Epi Santé, chef d'équipe : R. Duboz

Un des principaux objectifs du projet ComAcross est de développer des méthodes et outils qui permettent de faciliter les collaborations intersectorielles dans le cadre du réseau One Health. Les interactions entre les acteurs ayant des connaissances et des objectifs différents sont encouragées par des techniques participatives menant à la conception de solutions innovantes. L'objectif de cette étude de cas est de tester une technique participative, le jeu de rôle, pour répondre aux problèmes de santé publique. Sur la base de ce qui a été effectué au cours de l'étude de cas sur l'encéphalite japonaise (EJ) et le virus Nipah, nous avons conçu un jeu de rôle où les agriculteurs reproduisaient leurs propres activités quotidiennes tout en étant exposés aux virus de l'encéphalite japonaise et Nipah. Les objectifs étaient : l'étude de la perception du risque de contracter les virus EJ et Nipah au sein des communautés locales ; Le transfert des connaissances épidémiologiques aux agriculteurs; et la co-conception de mesures innovantes de surveillance et de contrôle. Nous avons organisé des formations avec nos partenaires d'AVSF et de NaVRI afin d'expliquer la technique. Nous avons également organisé deux séances de jeux de rôle avec des familles des provinces de Kampot et Kandal. Le jeu de rôle sera aussi présenté au groupe de travail technique sur les zoonoses.

Soutien financier: ComAcross

3.2.3 PROGRAMMES DE RECHERCHE – PROGRAMMATION SCIENTIFIQUE 2017

Ecomore2 & PANIC : Lutte contre les moustiques et éducation à l'école pour réduire la charge de la dengue dans la communauté

Unité Epi Santé, chefs d'équipe : S. Ly, P. Piola

Nous allons réaliser des essais randomisés par grappes qui couvriront au moins 2 saisons de dengue afin d'évaluer l'efficacité d'une stratégie intégrée, combinant un programme de lutte contre les moustiques et d'éducation à l'école sur la transmission de la maladie de la dengue au sein de la communauté et de ses environs. Une stratégie de lutte contre les moustiques combinée à une méthode éducative COMBI sera mise en œuvre dans les écoles de la zone d'intervention. Chaque grappe fera l'objet d'une surveillance communautaire active de la maladie de la dengue chez les enfants âgés de 5 à 15 ans, ainsi que d'un suivi sérologique de la salive chez les enfants de la même tranche d'âge dans les écoles, afin de documenter l'impact de l'intervention expérimentale.

Principal partenaire cambodgien : Centre national de Parasitologie, Entomologie et Lutte contre le Paludisme (CNM), centres de santé

Soutien financier : AFD (Ecomore) et ANR France (PANIC)

Etude pilote sur la structure de la population canine et sur les blessures causées par les morsures de chiens dans la province de Kandal

Unité Epi Santé, chefs d'équipe : Véronique Chevalier, Sowath Ly

Tous les chiens de 10 villages sélectionnés de façon aléatoire dans la province de Kandal seront vaccinés contre la rage et suivis pendant 12 mois. Le taux de renouvellement de la population canine, l'incidence des morsures de chien, l'attitude à l'égard du recours aux soins après morsure canine seront documentés avant et après la vaccination des chiens.

Soutien financier : OMS, IPC et CIRAD

Etude sur la rémanence de la protection immunitaire après vaccination antirabique (RESIST 3)

Unité Epi Santé, chefs d'équipe : S. Ly, (A. Tarantola)

L'objectif de cette étude est de comparer les réponses immunitaires humérales et cellulaires sur le long terme, après 3 et 4 sessions d'injections. Nous recontactons les personnes qui ont déjà reçu une prophylaxie post-exposition intradermique à IPC à la suite d'une morsure de chien potentiellement atteint de la rage. Certains patients avaient bénéficié du protocole recommandé de 4 sessions d'injections après avoir été mordus par un chien confirmé comme ayant la rage, tandis que d'autres avaient interrompu le protocole après 3 sessions d'injections, sans revenir pour la 4^{ème} session à J-28, pour des raisons diverses. Un nombre défini de ces patients (qui avaient bénéficié d'une PPE à l'IPC il y a entre 5 et 10 ans) seront invités à prendre part à un bilan sanguin. Une analyse tenant compte des

facteurs cliniques et d'une éventuelle vaccination de rappel à J-28 cherchera à comparer l'écart de durée et l'intensité de la réponse immunitaire sur le long terme entre une prophylaxie post-exposition en 3 sessions et une en 4 sessions.

Soutien financier : IP Paris

Rapport qualité-prix de la PEP contre la rage

Unité Epi Santé, chefs d'équipe : S. Ly, (A. Tarantola)

L'IPC possède des informations clés sur le nombre de chiens, l'incidence des morsures canines, les coûts de transport et de prophylaxie et le profil des victimes de morsures de chien qui se présentent au centre de prévention de la rage de l'IPC (> 20 000 patients par an depuis plus de 10 ans). Ces données seront utilisées pour effectuer une modélisation mathématique qui permettra d'évaluer la rentabilité et le nombre de vies épargnées, en comparant le protocole de vaccinations courant (4 injections) au protocole abrégé (3 injections).

Soutien financier : OMS et IPC

ZIKAlliance: Etude de la séroprévalence du virus Zika dans les provinces de Kampong Cham et Kampot, Cambodge – 2015-2016

Unité Epi Santé, chefs d'équipe : Sowath Ly, Patrice Piola

L'objectif est d'estimer la séroprévalence du ZIKV au sein de la population cambodgienne en testant les échantillons de sang récoltés dans le cadre de l'étude sur la séroprévalence de la dengue en 2015-2016, au sein d'une cohorte de personnes vivant dans les provinces de Kampong Cham et Kampot, au Cambodge. Cette étude de séroprévalence comprend six enquêtes transversales, avec des prélèvements d'échantillons de sang qui s'étendront sur une période de 18 mois.

Principal partenaire cambodgien : Centre national de Parasitologie, Entomologie et Lutte contre le Paludisme (CNM)

Soutien financier : Initiative de Vaccination contre la Dengue DVI, IVI.

Le Ténofovir comme moyen de prévention de la transmission mère-enfant de l'hépatite B (TA PROHM - ANRS 12345)

Unité Epi Santé, chefs d'équipe : L. Borand, P. Piola

Malgré une prophylaxie primaire efficace, le VHB reste un problème de santé important à l'échelle internationale et au Cambodge, où l'on recense encore des cas de transmission néonatale. L'OMS recommande l'administration immédiate du vaccin contre l'hépatite B et d'immunoglobulines chez les nouveau-nés dont les mères sont HBsAg positives. Les taux d'échec rapportés varient de 1 à 14%, malgré la séro-vaccination. Les facteurs associés aux échecs comprennent la positivité de HBsAg et les charges virales élevées dans l'ADN du VHB chez la mère. Des antiviraux peuvent être utilisés pour diminuer le risque de transmission verticale, en particulier dans les zones où la séro-vaccination recommandée par l'OMS n'est pas disponible. Ce projet vise à mettre en œuvre un PTME en diminuant la charge virale du VHB chez les mères grâce à la prise d'antiviraux, généralement initiée à partir de la 24^{ème} semaine de grossesse.

Etat : Le recrutement des patients débutera en 2017.

Principaux partenaires cambodgiens : Hôpital Calmette, Centre national de la Santé maternelle et infantile (NMCH), Hôpitaux provinciaux de Kompong Cham et Takeo.

Soutien financier : ANRS.

Les miRNA comme marqueurs prédictifs et/ou pronostiques pour l'IRIS chez les patients co-infectés par le VIH et la tuberculose

Unité Epi Santé, chef d'équipe : L. Borand

Le rôle des miARN dans le VIH-SIDA et de la tuberculose n'a pas encore été complètement défini. Les principaux objectifs de cette étude sont les suivants: 1) Identifier le profil d'expression des miARN comme potentiels nouveaux biomarqueurs prédictifs et pronostiques pour l'IRIS ; 2) Identifier le profil d'expression de l'ARNm chez les patients tuberculeux et les patients co-infectés par le VIH et la tuberculose.

Etat : Le recrutement des patients débutera en 2017.

Principal partenaire cambodgien : Hôpital Sihanouk Center of Hope.

Soutien financier : ANRS.

PEEC NIC 2017

Unité Epi Santé, chef d'équipe : A. de Lauzanne

La propagation des entérobactéries productrices (EP) de BLSE dans un pays en développement, où le taux de sepsis néonatal est élevé, peut avoir un impact important sur les options de traitement et la mortalité néonatale causée par les bactéries. Les taux de portage d'entérobactéries productrices (EP) de BLSE, qui étaient respectivement de 80% et 60% chez les mères étudiées dans le cadre de l'enquête BIRDY et chez les enfants qui présentaient des symptômes digestifs, sont alarmants.

Nous avons conçu une étude qui vise à évaluer le risque de transmission mère-enfant de portage fécal d'entérobactéries productrices de BLSE, la prévalence du portage chez les nourrissons durant leur 1^{ère} année de vie et identifier les facteurs de risques associés au portage. Une description des caractéristiques génétiques du portage d'entérobactéries au Cambodge sera également réalisée.

Partenaires: Projet BIRDY, CDC : groupe de travail sur la Résistance aux Antibiotiques

Soutien financier : Project BIRDY et Université de Lund, Suède.

Comprendre, surveiller et éliminer la transmission du paludisme dans la région de l'Asie-Pacifique (Centre internationaux d'Excellence pour la Recherche sur le Paludisme - ICEMR)

Unité Epi Santé, chef d'équipe : P. Piola

L'élimination du paludisme en Asie-Pacifique serait facilitée si chaque pays avait une meilleure connaissance non seulement du nombre de personnes infectées et atteintes de paludisme, mais aussi de l'endroit où les infections auraient pu se produire, ainsi que du mode de contamination des nouveaux moustiques qui transmettent l'infection aux humains. Un ensemble coordonné d'études épidémiologiques et vectorielles, menées au Cambodge, vise à déterminer des éléments clés sur l'endroit et le moment où les personnes contractent une infection, et comprendre comment la transmission est maintenue. Ces informations permettront de concevoir de meilleures façons d'identifier les groupes de villages et de populations les plus vulnérables au paludisme. L'objectif principal du projet de l'ICEMR est de mieux comprendre les interactions hôtes/parasites qui contribuent à maintenir la transmission résiduelle du paludisme malgré un contrôle intensifié, pour appliquer ces connaissances dans le développement de nouveaux moyens d'identification et de délimitation précise des poches de transmission résiduelle.

Soutien financier : Institut national de la Santé (NIH).

3.2.4 SOUTIEN AUX AUTORITÉS NATIONALES

- Un cours dispensé aux chercheurs de terrain dans le cadre du programme de formation à l'épidémiologie appliquée, organisé par le Ministère de la Santé et le Centre américain pour le Contrôle et la Prévention des Maladies (US-CDC). Intitulé du cours : communication scientifique (IMRAD), 07 Juin 2016.
- Un séminaire (une demi-journée, 8 présentations) sur la grippe à la conférence TEPHINET à Siem Reap, avec le soutien financier du bureau de l'OMS au Cambodge, 28 Novembre 2016.

- Deux personnes de l'équipe d'épidémiologie de l'IPC ont dispensé deux sessions de formation sur l'usage des appareils GPS et la cartographie à l'aide du logiciel Quantum GIS aux participants au Programme de Formation en Epidémiologie vétérinaire appliquée du Cambodge (CAVET), organisé par le Ministère de l'Agriculture et le Centre américain pour le Contrôle et la Prévention des Maladies (US-CDC), juin 2016.
- Encadrement de deux participants au Programme de Formation en Epidémiologie vétérinaire appliquée du Cambodge (CAVET), organisé par le Ministère de l'Agriculture et le Centre américain pour le Contrôle et la Prévention des Maladies (US-CDC), août 2017 – janvier 2017. Activités : (1) Surveillance clinique de la rage canine dans les abattoirs et (2) Surveillance de la rage canine avant et après la vaccination des chiens contre la rage, dans la province de Banteay Meanchey.
- Centre cambodgien pour le Contrôle et la Prévention des Maladies (CDC) et le directeur technique de l'Hôpital pédiatrique national. Rapport et premiers résultats de l'étude BIRDY. 24 mai 2015.
- Les entérobactéries multi-résistantes présentes dans la viande, le poisson et chez les mères en bonne santé à Phnom Penh. Résultats préliminaires et recommandations. Maya Nadimpalli, 8 décembre 2016.
- Symposium final sur l'étude PAANTHER 01 ANRS 12229 : Infections pulmonaires à mycobactéries non tuberculeuses chez les enfants séropositifs au VIH avec suspicion de tuberculose. Agathe de Lauzanne. Myanmar, 18 octobre 2016.
- Symposium final sur le projet ECOMORE au Myanmar. « Une manière d'étudier la résistance aux antibiotiques dans deux situations pédiatriques : la colonisation respiratoire et les infections respiratoires aiguës sévères ». Agathe de Lauzanne, 21 novembre 2016.
- Participations au groupe de travail mensuel sur les résistances aux antibiotiques (AMR) – Ministère de la Santé et Centre cambodgien pour le Contrôle et la Prévention des Maladies (CDC). Agathe de Lauzanne.

3.2.5 ENSEIGNEMENT ET FORMATIONS

Formations (SEAE) dispensées par Jean-David Pommier

- « Prise en charge de l'encéphalite » : formation dispensée au Laos à plus de 50 participants (25/02/2016)
- « Encéphalite auto-immune : Diagnostic et prise en charge » : formation dispensée au Viêt Nam, à plus de 30 participants. (05/12/2016)
- « Examen neurologique » : formation dispensée au Viêt Nam (13/01/2016) et au Laos (26/02/2016 et 07/07/2016), avec visites en hôpital.
- « Bonne pratique clinique en recherche clinique » : Séminaire dispensé les 21 et 22 mars 2016 avec Dr. Laurence Borand à Rangoun, Myanmar : plus de 50 participants.

Formations à l'Université des Sciences de la Santé

- Participation en tant que professeur à deux séminaires sur les maladies infectieuses, dispensés aux élèves de 5^{ème} et 6^{ème} années, les 13, 15 et 28 juillet 2016.
- Notions de base en pédiatrie expliquées aux surveillants BIRDY. 2 sessions à l'IPC, mars 2016.
- Bonnes pratiques de prélèvement sanguin chez les nouveau-nés et les enfants. 2 sessions dispensées à l'Hôpital de Kampong Speu (mars 2016) et à l'Hôpital de l'Amitié khméro-soviétique (juin 2016).

3.2.6 LISTE DES PUBLICATIONS (2016)

1. Julien Cappelle, Veasna Duong, Long Pring, Lida kong, Maud Yakovleff, Didot Budi Prasetyo, Borin Peng, Rithy Choeung, Raphaël Duboz, Sivuth Ong, San Sorn, Philippe Dussart, Arnaud Tarantola, Philippe Buchy and Véronique Chevalier; Intensive circulation of Japanese Encephalitis virus in peri-urban sentinel pigs near Phnom Penh, Cambodia. Plos Neg Trop Dis. 2016 Dec 7;10(12):e0005149. doi: 10.1371/journal.pntd.0005149.

2. J. Cappelletti, Veasna Duong, Long Pring, Lida Kong, Maud Yakovlev, Didot Budi Prasetyo, Borin Peng, Rithy Choeung, Raphaël Duboz, Sivuth Ong, San Sorn, Philippe Dussart, Arnaud Tarantola, Philippe Buchy, V. Chevalier. Risk of Japanese Encephalitis peri-urban transmission in Cambodia. 4th International One Health Congress & The 6th Biennial Conference of the ... Association for Ecology and Health, 4-7 December 2016, Melbourne, Australia
3. Ly S, Vong S, Cavailler P, Mumford E, Mey C, Rith S, Van Kerkhove MD, Sorn S, Sok T, Tarantola A, Buchy P. Environmental contamination and risk factors for transmission of highly pathogenic avian influenza A(H5N1) to humans, Cambodia, 2006-2010. *BMC Infect Dis.* 2016 Nov 4;16(1):631. PubMed PMID: 27809855; PubMed Central PMCID: PMC5095992.
4. Limsreng S, Marcy O, Ly S, Ouk V, Chanroern H, Thavary S, Boroath B, Canestri A, Viretto G, Delfraissy JF, Ségéral O. Dyslipidemias and Elevated Cardiovascular Risk on Lopinavir-Based Antiretroviral Therapy in Cambodia. *PLoS One.* 2016 Aug 31;11(8):e0160306. doi: 10.1371/journal.pone.0160306.
5. Horm SV, Tarantola A, Rith S, Ly S, Gambaretti J, Duong V, Y P, Sorn S, Holl D, Allal L, Kalpravidh W, Dussart P, Horwood PF, Buchy P. Intense circulation of A/H5N1 and other avian influenza viruses in Cambodian live-bird markets with serological evidence of sub-clinical human infections. *Emerg Microbes Infect.* 2016 Jul 20;5(7):e70. doi: 10.1038/emi.2016.69.
6. Blasdel KR, Duong V, Elloit M, Chretien F, Ly S, Hul V, Deubel V, Morand S, Buchy P. Evidence of human infection by a new mammarenavirus endemic to Southeastern Asia. *Elife.* 2016 Jun 9;5. pii: e13135. doi: 10.7554/eLife.13135.
7. Hem S, Ly S, Votsi I, Vogt F, Asgari N, Buchy P, Heng S, Picardeau M, Sok T, Ly S, Huy R, Guillard B, Cauchemez S, Tarantola A. Estimating the Burden of Leptospirosis among Febrile Subjects Aged below 20 Years in Kampong Cham Communities, Cambodia, 2007-2009. *PLoS One.* 2016 Apr 4;11(4):e0151555. doi: 10.1371/journal.pone.0151555. eCollection 2016.
8. Duong V, Tarantola A, Ong S, Mey C, Choeung R, Ly S, Bourhy H, Dussart P, Buchy P. Laboratory diagnostics in dog-mediated rabies-an overview of performance and a proposed strategy for various settings. *Int J Infect Dis.* 2016 Mar 19. pii: S1201-9712(16)31003-7. doi: 10.1016/j.ijid.2016.03.016.
9. Aguëmon CT, Tarantola A, Zoumènou E, Goyet S, Assouto P, Ly S, Mewanou S, Bourhy H, Dodet B, Aguëmon AR. Rabies transmission risks during peripartum - Two cases and a review of the literature. *Vaccine.* 2016 Mar 3. pii: S0264-410X(16)00260-7. doi: 10.1016/j.vaccine.2016.02.065.
10. Tarantola A, Mey C, Ly S, Haener C, Chhor N, Meng U, Ly S, Fontenille D, Dussart P. A confirmed rabies case in a French resident in Cambodia, June 2015. *J Travel Med.* 2016 Feb 28;23(2). pii: tav012. doi: 10.1093/jtm/tav012
11. Tarantola A, Crabol Y, Mahendra BJ, In S, Barennes H, Bourhy H, Peng Y, Ly S, Buchy P. Caring for rabies patients in developing countries - the neglected importance of palliative care. *Trop Med Int Health.* 2016 Jan 25. doi: 10.1111/tmi.12670.
12. Galatas B, Ly S, Duong V, Baisley K, Nguon K, Chan S, Huy R, Ly S, Sorn S, Som L, Buchy P, Tarantola A. Long-Lasting Immune Protection and Other Epidemiological Findings after Chikungunya Emergence in a Cambodian Rural Community, April 2012. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016 Jan 11;10(1):e0004281. doi: 10.1371/journal.pntd.0004281.
13. Huynh BT, Padget M, Garin B, Delarocque-Astagneau E, Guillemot D; BIRDY study group. Bacterial neonatal sepsis and antibiotic resistance in low-income countries. *Lancet.* 2016 Feb 6;387(10018):533-4

Résumés

Agathe de Lauzanne, Siyin Lach, Alexandra Kerleguer, Veronique Ngo, Sok Touch, Arnaud Tarantola, Laurence Borand, et le groupe d'étude BIRDY. « 2016 High Level of Extended Spectrum Beta Lactamase Producing Enterobacteria (EP ESBL) Fecal Carriage in Mothers and Infants: Preliminary Results of the BIRDY Program in Cambodia. Symposium du Réseau international des Instituts Pasteur », Poster. 31 Novembre 2016.

Présentations

1. "Factors associated with non-tuberculous mycobacteria pulmonary infection in HIV infected children suspects of tuberculosis in 4 developing countries of high TB incidence". Agathe de Lauzanne. Institut Pasteur du Cambodge. 21 janvier 2016.
2. "Ecomore project: SARI clinical cases". Agathe de Lauzanne-Malin Inghammar. 1er juin 2016. Myanmar

"Bacterial Infections and antibiotic Resistant Diseases among Young children in low income countries (BIRDY)". Symposium sur la résistance aux antibiotiques. Réseau Gabriel. Laos, 6 juillet 2016.

3.3 VIH HEPATITES

3.3.1 STRUCTURE FONCTIONNELLE DE L'UNITÉ

Nom de famille, prénom	Date de prise de fonction à l'IPC	Rôle	Niveau de qualification	PubMed (n° de publications)	Perspectives (2017-2018)
ROUET François	Juin 2013	Chef	Docteur en Pharmacie, docteur, PH	116	HDR
NOUHIN Janin	Mars 2002	Adjoint	Docteur, PSRL	21	Post-doctorat
PRAK Sophearot	Janvier 2015	Surveillant	Master	2	Formation ext.
KHORNSATH Somarany	Prévue pour Mars 2017	-	Technicien de laboratoire	-	-

3.3.2 PROGRAMMES DE RECHERCHE – PRINCIPALES RÉALISATIONS EN 2016

Sujet 1 : épidémie nosocomiale du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) dans le village de Roka

Financements et collaborations

Initiative 5% ; RIIP ; ANRS ; IPC - Cambodge (Phnom Penh) : Pr. Vonthanak SAPHONN, USS ; Dr. Mean Chhi VUN, Centre national sur le VIH/Sida, la Dermatologie et les IST (NCHADS) ; Dr. Artur RAMOS, Centre pour le Contrôle et la Prévention des Maladies (CDC) ; Dr. Laurent FERRADINI, OMS – France ; Pr. Jean-Christophe PLANTIER, CNR VIH, Rouen ; Dr. Catherine GAUDY-GRAFFIN et Pr. Francis BARIN, CNR VIH & INSERM U966, Tours ; Dr. Benjamin ROCHE, IRD, Montpellier – Etats-Unis ; Dr. Trevor BEDFORD et Dr. Allison BLACK, Seattle ; Dr. Chunfu YANG, Centre pour le Contrôle et la Prévention des Maladies (CDC), Atlanta.

Contexte

- À la mi-décembre 2014, le Ministère cambodgien de la Santé a alerté le Centre national sur le VIH/Sida, la Dermatologie et les IST (NCHADS) et l'IPC sur l'apparition d'environ 100 nouveaux cas d'infections par le VIH-1 dans le petit village de Roka, province de Battambang (Nord-Ouest du Cambodge).
- Le 28 Février 2015, sur les 2 045 habitants de la commune de Roka qui ont subi un test de dépistage pour le VIH-1, 242 ont été confirmés comme infectés par le VIH-1, ce qui correspond à un taux de prévalence du VIH de 11,8%.
- Les transmissions ont vraisemblablement été causées par des injections médicales (origine nosocomiale).

Principaux résultats

- Sur les 209 cas confirmés de VIH, la plupart (98,1%) ont rapporté avoir reçu une injection d'un praticien non autorisé, et 78,5% étaient co-infectés par le VHC.
- Une analyse phylogénétique de 202 séquences de VIH env C2V3 a fait apparaître un groupe monophylétique de 198 échantillons de souches CRF01_AE, avec un ancêtre commun présent en septembre 2013. Les séquences de VHC ont formé quatre clades distincts avec sous-type 1b ou 6e. Les clusters du sous-type 6e provenaient d'ancêtres circulant en 2002-2003.

- Trois microclusters géospatiaux du VIH ont été discernés dans le village de Roka et coïncidaient avec les signalements de consultations avec le praticien non autorisé. Grâce à une modélisation mathématique, nous avons pu estimer que près de 300 personnes non échantillonnées étaient mono-infectées par le VHC, suite à une transmission iatrogène.

Valorisation scientifique

- Un rapport épidémiologique a été publié dans les Rapports hebdomadaires sur la Morbidité et la Mortalité (MMWR) – (Cf. Réf. 2 dans la liste des publications).
- Les publications princeps, résumant toutes les données obtenues à l'IPC, sont prêtes à être soumises pour publication.

Sujet 2 : Validation des outils de laboratoire permettant de détecter le virus de l'hépatite B (VHB) dans un contexte de prévention de transmission du virus de la mère à l'enfant (PTME) chez les femmes enceintes au Cambodge

A. ANRS 12328

Financements et collaborations au Cambodge (Phnom Penh)

ANRS – Dr. Olivier SEGERAL, USS ; Dr. Kenrena CHIM, Service de maternité, Hôpital Calmette ; Dr. Sothea HOUT, Laboratoire, Hôpital Calmette ; Dr. Arnaud TARANTOLA, Epidémiologie et Santé publique, IPC ; Dr. Alexandra KERLEGUER, Laboratoire d'Analyses médicales, IPC ; Dr. Kimcheng HOK, Centre national de Transfusion sanguine.

Principaux résultats

- Sur un total de 250 femmes enceintes testées à l'hôpital Calmette, 128 étaient HBsAg positives selon le test ELISA HBsAg. La sensibilité et la spécificité du test rapide SD BIOLINE HBsAg, comparé au test ELISA, étaient respectivement de 99,2% (intervalles de confiance de 95%, 95.7-99.9) et 100% (97.0-100).
- Parmi les 128 échantillons HBsAg positifs au test ELISA, 29 (23%) étaient aussi positifs au test rapide SD BIOLINE HBeAg, 34 (26%) faisaient apparaître une virémie du VHB >200,000 IU/mL et 29 (23%) >2 000 000 IU/mL. La sensibilité et la spécificité du test rapide HBeAg dans la détection de la répllication du VHB étaient de 76.5% (60.0-87.6) et 96.8% (91.0-98.9) pour une charge virale > 200 000 IU/mL et 89.7% (73.6-96.4) et 97.0% (93.6-100.0) pour une charge virale >2 000 000 IU/mL.

Communication scientifique

Un résumé a été soumis à la Conférence de l'AIS (Paris, 23-26 juillet 2017) – Titre : Utilité des tests rapides VHB dans l'identification des femmes enceintes présentant un risque élevé de transmission du VHB à l'enfant : l'étude pilote ANRS 12328 au Cambodge.

B. ANRS 12327

Financement et collaborations au Cambodge (Phnom Penh)

ANRS – Dr. Alexandra KERLEGUER, Unité de Biologie médicale, IPC.

Principaux résultats

- Au total, 125 échantillons de plasma ont été testés à l'aide du kit de PCR VHB 2.0 de la société OMUNIS (Clapiers, France), et les résultats comparés avec ceux de la technique Roche TaqMan.
- La sensibilité globale du test OMUNIS était bonne (92,5%). Sa spécificité était excellente (100%). Le coefficient de corrélation avec la technique Roche était de 0,97.

Communication scientifique

Un résumé a été soumis à la Conférence de l'AIS (Paris, 23-26 juillet 2017) – Titre : Validation et augmentation de la charge virale de l'hépatite B sur des plateformes polyvalentes ouvertes de PCR

dans les pays d'Afrique de l'Ouest et d'Asie de l'Est. Une étude du groupe de travail AC12 (ANRS 12327).

Sujet 3: Infections par le virus de l'hépatite C (VHC) : Quelle charge pour le Cambodge ?

Financements et collaborations au Cambodge (Phnom Penh)

USS – Pr. Vonthanak SAPHONN, Dr. Mean Chhi VUN et Dr. Phearavin PHENG, USS ; Dr. Ly Penh SUN, Dr. Mam SOVATHA et Dr. Chandara MOM, Centre national sur le VIH/Sida, la Dermatologie et les IST (NCHADS).

Principaux résultats

- En mars-avril 2016, parmi les 935 participants (510 femmes enceintes et 425 personnes infectées par le VIH), la prévalence des anticorps anti-VHC était de 3,6% (34/935) et considérablement plus élevée chez les patients infectés par le VIH, par rapport aux femmes enceintes (6,8% vs 0,9%) ($p < 0.001$).
- Sur les 34 personnes avec des anticorps anti-VHC, 24 (70,6%) avaient des résultats détectables de charge virale ARN du VHC, conduisant à une prévalence globale de l'infection active par le VHC de 2,6%. La médiane de l'ARN du VHC était de 6,29 log₁₀ UI/mL (2,47 à 7,08). Les génotypes prédominants du VHC étaient 1b (55%), 6 (40%) et 2 (5%).
- L'analyse multivariée a montré que l'infection par le VHC était fortement liée à un âge avancé (OR 4,54) et au fait d'avoir reçu un traitement par voie intraveineuse au cours des 5 dernières années (OR 8,26).

Communication scientifique

Un résumé a été soumis à la Conférence de l' AIS (Paris, 23-26 juillet 2017) – Titre : La charge des mono-infections par le VHC et des co-infections par le VHC et le VIH dans quatre provinces au Cambodge.

Sujet 4: Les infections par le virus de l'hépatite E (VHE) en Asie du Sud-Est

Notre équipe a démontré que les infections par le VHE étaient actuellement endémiques dans différentes populations du Cambodge (J Clin Virol, 2015, voir Réf. N° 4). Nous avons également caractérisé une séquence de VHE d'un donneur de sang cambodgien appartenant à un cluster d'isolats de VHE aquatique de génotype 3 (EU274577), avec une identité nucléotidique >98% (Transfusion 2016, voir Réf. N° 1).

3.3.3 PROGRAMMES DE RECHERCHE – PROGRAMMATION SCIENTIFIQUE 2017

Sujet 1: Epidémie nosocomiale de VIH et VHC à Roka

A. ANRS 12352

Titre : Infections par le VIH et le VHC dans 2 communes de la province de Battambang : taux de prévalence, souches virales et pratiques d'injection dangereuses.

Financements, budget et collaborations au Cambodge (Phnom Penh)

ANRS – 120 000 € - Pr. Vonthanak SAPHONN, Dr. Mean Chhi VUN, Dr. Keovathanak KHIM et Dr. Phearavin PHENG, USS ; Dr. Ly Penh SUN, Dr. Mam SOVATHA et Dr. Chandara MOM, Centre national sur le VIH/Sida, la Dermatologie et les IST (NCHADS).

Principal objectif

Comparer les taux de prévalence du VIH/VHC et les souches virales correspondantes chez les sujets résidant dans la commune de Roka avec ceux de personnes résidant dans d'autres communes de la province de Battambang.

Calendrier : L'étude de terrain débutera après la soumission de ce projet au Comité d'Ethique national pour la Recherche en Santé (début de l'étude prévu en juin 2017)

B. Le séquençage de nouvelle generation (SNG) sur les spécimens de Roka positifs à l'ARN du VHC

L'unité de VIH a l'intention de soumettre une proposition de recherche afin de pouvoir effectuer un SNG sur les spécimens de Roka positifs à l'ARN du VHC. Le principal objectif de cette étude sera d'identifier les cas infectés par >1 souches de VHC (super ou co-infections). Ce travail sera conduit en collaboration avec le Dr. Etienne Simon-Lorière pour l'expertise en SNG (Unité Génétique fonctionnelle des Maladies infectieuses, IPP, France) et le Dr. Gonzalo Bellon Bentancor pour l'analyse de l'évolution virale (FIOCRUZ, Brésil).

Sujet 2: L'étude ANRS 12345 TA PROHM

Titre : Stratégie de dépistage et de traitement à l'aide d'un test rapide et d'un traitement par le ténofovir pour empêcher la transmission mère-enfant du VHB, chez les femmes enceintes infectées par le VHB et HBeAg positives, au Cambodge.

Financement, budget et collaborations au Cambodge (Phnom Penh)

ANRS - ≈900 000 € - Dr. Olivier SEGERAL, USS ; Dr. Chamsorphea CHHUN, Hôpital Calmette.

Principal objectif

Évaluer l'efficacité d'une stratégie basée sur l'utilisation de tests de diagnostic rapide du VHB chez les femmes enceintes au Cambodge et sur l'utilisation d'un traitement par le ténofovir sur environ 300 femmes dépistées comme étant HBeAg positives (stratégie "dépistage et traitement").

Calendrier : Les premières inclusions devraient commencer début 2017.

Sujet 3: Quantification de l'ARN du VHC au Cambodge

Une validation de l'utilisation du kit OMUNIS PUMA VHC (ARN), par rapport à la technique Roche TaqMan Roche VHC, est en cours dans l'unité de VIH/Hépatites, en collaboration avec le laboratoire de Dr. Kerleguer. Un résumé a été soumis à la Conférence de l'AS (Paris, 23-26 juillet 2017) – Titre : Les caractéristiques de performance d'un nouveau kit commercial permettant de quantifier la charge virale ARN du VHC dans le plasma : résultats préliminaires au Cambodge.

Sujet 4: Evaluation de l'émergence du virus de l'hépatite E (VHE) au Cambodge, en Thaïlande et au Viêt Nam et identification des facteurs de risque en fonction de l'exposition au sang et/ou à la nourriture et/ou à l'environnement et/ou aux zoonoses

Ce projet a été accepté par le comité scientifique de la Plateforme régionale de Recherche en Asie (PRR-Asia) à la fin de l'année 2016. Le budget total est de 75 000 €. Les études se baseront sur des spécimens humains (en Thaïlande et au Vietnam), ainsi que sur des foies de porcs, et des réservoirs aquatiques et de faune sauvage (au Cambodge).

3.3.4 SOUTIEN AUX AUTORITÉS NATIONALES

Suite à nos recherches sur les échantillons de Roka, les autorités sanitaires ont fourni un accès universel aux antirétroviraux aux villageois de Roka infectés par le VIH, et des mesures répressives ont été prises contre les cliniques illégales au Cambodge.

3.3.5 ENSEIGNEMENT ET FORMATIONS

François Rouet

Participation aux réunions ANRS AC11/AC12/AC33 (janvier 2015 et janvier 2016), en tant que coordinateur de recherche sur les hépatites dans les pays à ressources limitées.

Janin Nouhin

Formation technique au CNR du VIH de Rouen (France) (avril 2015) et au FIOCRUZ (Brésil) (novembre 2016), afin d'améliorer ses connaissances en analyse phylogénétique à l'aide des logiciels MEGA v6.0 et BEAST v1.8

Sophearot Prak

- Formation technique au logiciel QGIS et sur l'évaluation spatiale multi-critères (ESMC), Bangkok, Thaïlande (9-13 mai 2016 et 15-20 janvier 2017).
- Formation technique « Cours d'été sur la Bioinformatique pour les Maladies infectieuses », Hanoi, Viêt Nam (17-26 Septembre 2016).

3.3.6 LISTE DES PUBLICATIONS (2016)

(TRAVAUX CONDUITS AU CAMBODGE UNIQUEMENT)

2017

Nouhin J, Pean P, Madec Y, Chevalier MF, Didier C, Borand L, et al. Interleukin-1 receptor antagonist, a biomarker of response to anti-TB treatment in HIV/TB co-infected patients. *J Infect* 2017.

2016

1. Nouhin J, Prak S, Madec Y, Barennes H, Weissel R, Hok K, Pavio N, Rouet F. 2016. Hepatitis E virus antibody prevalence, RNA frequency, and genotype among blood donors in Cambodia (Southeast Asia). *Transfusion*;56(10):2597-2601.
2. Vun MC, Galang RR, Fujita M, Killam W, Gokhale R, Pitman J, Selenic D, Mam S, Mom C, Fontenille D, Rouet F, Vonthanak S; Roka Cluster Investigation Team. 2016. Cluster of HIV Infections Attributed to Unsafe Injection Practices - Cambodia, December 1, 2014-February 28, 2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*;65(6):142-5.
3. Barennes H, Virak K, Rouet F, Buisson Y, Strobel M, Vibol U. 2016. Factors associated with the failure of first and second-line antiretroviral therapies, a case control study in Cambodian HIV-1 infected children. *BMC Res Notes*;9:69.

2015

Nouhin J, Barennes H, Madec Y, Prak S, Hou SV, Kerleguer A, Kim S, Pean P, Rouet F. 2015. Low frequency of acute hepatitis E virus (HEV) infections but high past HEV exposure in subjects from Cambodia with mild liver enzyme elevations, unexplained fever or immunodeficiency due to HIV-1 infection. *J Clin Virol*; 71:22-7.

3.4 PLATEFORME D'IMMUNOLOGIE

3.4.1 STRUCTURE FONCTIONNELLE DE L'UNITÉ

L'équipe est composée d'un technicien de laboratoire et d'un chercheur (chef d'équipe). Depuis novembre 2016, Dr. Daniel SCOTT-ALGARA, chercheur de l'Institut Pasteur de Paris, a rejoint l'équipe en tant que visiteur scientifique, à raison de plusieurs mois par an, en vue de renforcer l'équipe. Afin de mener à bien les activités de recherche scientifique, l'unité a été équipée en cytomètres de flux de pointe, d'un système de culture cellulaire, et de tests ELISA et ELISpot. L'équipe a mené des recherches axées sur le mécanisme immunologique dans la co-infection par le VIH et sur la découverte de biomarqueurs liés à l'évolution de la co-infection par le VIH, plus précisément avec la tuberculose et l'hépatite virale.

3.4.2 PROGRAMMES DE RECHERCHE – PRINCIPALES RÉALISATIONS EN 2016

En 2016, nos études se sont étendues sur le rôle de l'immunité innée dans le mécanisme sous-jacent du syndrome inflammatoire de restauration immune (SIRI = IRIS) dans la co-infection TB/VIH. Le SIRI est le principal obstacle au traitement antirétroviral chez les patients co-infectés VIH/TB. Nos résultats précédents ont montré que les cellules tueuses naturelles jouaient un rôle dans le SIRI et pouvaient être un prédicteur. En utilisant les données existantes et les échantillons stockés provenant de l'essai clinique CAMELIA et de l'étude CAPRI NK (ANRS N° 12153), nous avons étudié le rôle des monocytes/macrophages, des cellules T gamma delta et des micro-ARN (miRNAs) dans le SIRI. En combinant tous ces paramètres, nous identifierons les biomarqueurs potentiels de prédiction ou de pronostic du SIRI.

A- Un antagoniste des récepteurs de l'interleukine-1 comme biomarqueur de la réponse au traitement antituberculeux chez les patients co-infectés VIH/TB.

L'étude visait à déterminer si les marqueurs d'activation des monocytes/macrophages pouvaient prédire l'apparition de TB-SIRI et s'ils étaient modulés par un traitement antituberculeux. Le plasma congelé a été obtenu auprès de 127 adultes participant à l'essai CAMELIA, co-infectés VIH/TB, et qui n'avaient jamais reçu de traitement antirétroviral. Parmi eux, 36 ont développé un SIRI. Les concentrations d'IL-1Ra, de sCD14 et de sCD163 ont été mesurées au début du traitement antituberculeux (point de comparaison), après 8 semaines de traitement antituberculeux et au moment de l'apparition de TB-SIRI. Les résultats obtenus indiquent que les concentrations d'IL-1Ra et de cCD14 au début du traitement étaient identiques chez les patients atteints de TB-SIRI et ceux qui ne présentaient pas de SIRI. Les concentrations de sCD163, bien que significativement plus élevées chez les patients atteints de TB-SIRI, ne sont pas restées liées à l'apparition de TB-SIRI dans l'analyse multivariée. Au moment de l'apparition de TB-SIRI, les patients avaient des concentrations plus élevées d'IL-1Ra ($p=0,002$) et de sCD14 ($p<0,001$). Le résultat le plus étonnant a été de noter une diminution significative d'IL-1Ra au bout de 8 semaines de traitement anti-TB (réduction médiane : -63% ($p<0,0001$)). En conclusion, aucun des biomarqueurs testés n'a été associé à l'apparition de TB-SIRI. Toutefois, des prises de mesure répétées d'IL-1Ra pourraient aider à diagnostiquer le TB-SIRI. La réduction substantielle d'IL-1Ra durant le traitement suggère que l'IL-1Ra pourrait être un biomarqueur de substitution de la réponse au traitement antituberculeux chez les patients infectés par le VIH. Les résultats ont été publiés dans le Journal of Infection (sous presse, février 2017).

B- Activation supérieure des cellules T gamma delta et du sous-ensemble de cellules T Vdelta2+ liés au SIRI dans la co-infection TB/VIH

Les cellules T gamma delta (cellules $T\gamma\delta$) et les cellules T tueuses naturelles invariantes (iNKT) jouent un rôle important dans le contrôle de *M. tuberculosis* (Mtb), et les voies cellulaires $T\gamma\delta$ et iNKT de réponse détermineront l'évolution de la maladie. L'étude visait à évaluer l'expression du répertoire des cellules $T\gamma\delta$ et iNKT dans le SIRI lié à la tuberculose. Les cellules mononuclées du sang périphérique stockées ont été obtenues auprès de 48 patients co-infectés TB/VIH, dont 21 avaient été atteints de SIRI, et 3 groupes témoins : 11 donateurs sains, 26 infectés par le VIH sans signe de tuberculose (VIH+/TB-) et 22 patients atteints de tuberculose sans infection par le VIH (VIH-/TB+) ont été étudiés. Les moments de prélèvement correspondaient au début du traitement antirétroviral (TAR) (point de comparaison), au moment de l'apparition de SIRI pour les patients co-infectés TB/VIH ; avant le TAR pour les patients VIH+/TB- et durant la deuxième semaine du traitement antituberculeux pour les

patients VIH-/TB+. L'expression du répertoire sur les cellules T $\gamma\delta$ et iNKT a été analysée par cytométrie en flux. Les résultats ont montré qu'au point de comparaison, la proportion de cellules T $\gamma\delta$ et iNKT était identique chez les patients atteints de SIRS et chez ceux non atteints de SIRS. L'expression du marqueur d'activation HLA-DR sur les cellules T $\gamma\delta$ et les cellules T V δ 2+ était significativement plus élevée chez les patients atteints de SIRS que chez les patients non atteints et que chez les patients témoins ($p < 0,0001$). L'expression de NKG2D était plus faible chez les patients VIH+/TB+ par rapport aux patients témoins. L'expression de CD158a du type de récepteur d'immunoglobuline tueuse sur les cellules $\gamma\delta$ 2+ était plus élevée chez les patients atteints de SIRS que chez les patients non atteints ($p = 0,02$), VIH+/TB- et HD. En conclusion, les patients atteints de SIRS ont un point de comparaison plus élevé de cellules T $\gamma\delta$ + et du sous-ensemble de cellules T $\gamma\delta$ 2+ que les patients non atteints de SIRS, ce qui suggère que les cellules T $\gamma\delta$ + pourraient jouer un rôle dans la pathogenèse du SIRS. Le manuscrit est en cours de révision.

C- Les microARN (miARN) comme marqueurs prédictifs et/ou pronostiques du SIRS (Syndrome inflammatoire de Reconstitution immunitaire) chez les patients co-infectés TB/VIH - ANRS N° 12358

Les microARN (miARN) sont des petits ARN, en général longs de 22 nucléotides, non codants (nc), endogènes et monocaténares. Le grand intérêt récemment porté par les chercheurs à ce sujet a permis de renseigner le fait que les miARNs sont de puissants régulateurs de l'expression des gènes et pourraient être utilisés comme biomarqueurs dans de nombreuses maladies, y compris les maladies infectieuses. Le rôle des miARN dans la maladie du VIH n'a pas encore complètement défini. Les microARN hôtes visent certains gènes du VIH, ce qui peut influencer sur la réplication du VIH et jouer un rôle dans le contrôle viral. Une sélection d'expression de miARN peut caractériser le phénotype de la maladie du VIH, comme cela a été démontré chez les contrôleurs d'élite du VIH. Plusieurs études ont décrit l'ARNm d'individus infectés par *Mycobacterium tuberculosis*, mais les biomarqueurs communs n'ont pas encore été identifiés. Toutefois, des études sur les miARN dans les infections aiguës de VIH et les co-infections, comme la tuberculose, restent encore à être réalisées. En outre, on assiste à une forte demande d'utilisation de miARN plasmatiques en tant que biomarqueurs dans l'application clinique. Une des limites de la détection de miARN est la technique, qui nécessite beaucoup de temps et un laboratoire spécialisé et équipé en technique moléculaire (QPCR, technique de séquençage). En revanche, la cytométrie en flux, qui a été développée dans les tests de laboratoire clinique de routine, est une technique désormais bien standardisée. La cytométrie en flux pourrait être la meilleure façon d'effectuer un dépistage à haut débit pour un prix abordable, dans les détectations de routine des miARN.

Dans cette étude, nous proposons d'évaluer par cytométrie de flux si les profils des miARN en circulation pourraient être applicables en tant que biomarqueurs potentiels dans la maladie du VIH. Pour la maladie du VIH, nous proposons d'étudier les profils d'expression des miARN dans une cohorte de patients atteints de VIH et de tuberculose, pour les corrélés avec leur évolution clinique et les éventuelles apparitions de SIRS.

L'étude a reçu le soutien financier de l'INSERM-ANRS en juillet 2016, et débutera après avoir obtenu l'approbation éthique du Comité national d'Ethique pour la Recherche en Santé du Cambodge et du CorC/IRB (Comité de Recherche Clinique/Institutional Review Board) de l'Institut Pasteur de Paris.

3.4.3 PROGRAMMATION SCIENTIFIQUE EN 2017

Le vaccin BCG contre la tuberculose entraîne une immunité solide contre des infections pathogènes non apparentées

Les preuves apportées par des études cliniques épidémiologiques randomisées indiquent que les vaccins vivants atténués tels que le BCG pourraient réduire la morbidité et la mortalité indépendamment de l'immunité adaptative des cellules B et des lymphocytes T spécifiques des vaccins. Cet avantage implique une association à des effets non-spécifiques bénéfiques contre un large éventail de pathogènes et de maladies non apparentées. Cependant, certains vaccins, tels que le vaccin contre la diphtérie, le tétanos et la coqueluche à cellules entières (DTP) ont eu un effet négatif non spécifique

sur les bénéficiaires, en cas d'administration trop rapprochée du vaccin contre le BCG. Ces effets de différences pourraient être liés à l'âge, au sexe, à la situation géographique, au bagage génétique, aux facteurs environnementaux (exemple : les infections des helminthes, la nutrition, le microbiome), aux calendriers vaccinaux et semblent être gérés par des mécanismes d'immunité solides qui se réfèrent à une mémoire immunitaire innée (y compris les cellules tueuses naturelles, les monocytes/macrophages) et la réactivité croisée des réponses des lymphocytes. Ainsi, il est très important de tester l'hypothèse selon laquelle une solide immunité innée chez les nourrissons vaccinés contre le BCG serait liée à un effet bénéfique et/ou négatif de la vaccination BCG. La description d'une immunité solide liée à un effet non spécifique du vaccin contre le BCG ouvrira la voie à de nouvelles possibilités dans l'optimisation du vaccin contre le BCG, ainsi que dans sa stratégie d'expansion. Cette proposition de projet de recherche sera une étude multicentrique et multidisciplinaire. L'étude se déroulera dans les pays où la tuberculose est prévalente, avec une forte couverture vaccinale contre le BCG, comme le Cambodge et le Mexique. Cette étude impliquera des équipes du Cambodge, du Mexique, des États-Unis et de France.

3.4.4 SOUTIEN AUX AUTORITÉS NATIONALES

La thématique de recherche de l'équipe a principalement porté sur l'étude du mécanisme immunologique de la co-infection par le VIH et sur l'identification des marqueurs biologiques comme outil biologique permettant d'améliorer le diagnostic et le traitement des patients cambodgiens, ainsi que des patients du monde entier. Bien que les résultats obtenus à partir de notre recherche n'aient pas encore été appliqués, sur le court terme, dans un contexte clinique, ces résultats pourraient nous permettre de mieux comprendre ce mécanisme pathologique inexplicé et identifier une intervention médicale adéquate. Les connaissances obtenues grâce à tous ces travaux ont été partagées avec les étudiants cambodgiens. L'équipe a également apporté son soutien à l'Université des Sciences de la Santé du Cambodge en participant à l'enseignement de l'immunologie et en aidant l'équipe universitaire à établir et/ou à mettre à jour ses programmes d'enseignement.

3.4.5 ENSEIGNEMENT ET FORMATIONS

M. PEAN a enseigné l'immunologie aux étudiants de Pharmacie de 3^{ème} année de l'Université des Sciences de la Santé. Chaque année, il enseigne 16 heures de cours à 150 étudiants cambodgiens.

M. PEAN a également participé à la supervision d'un étudiant cambodgien inscrit en doctorat (dont le superviseur de thèse est Dr. Daniel SCOTT-ALGARA, IP Paris), qui a défendu sa thèse en novembre 2016, à l'Université Paris VII-Denis Diderot, Paris, France.

3.4.6 LISTE DES PUBLICATIONS (2016)

2015

1. Haridas V, Pean P, Jasenosky LD et al. TB-IRIS, T-cell activation, and remodeling of the T-cell compartment in highly immunosuppressed HIV-infected patients with TB. *AIDS*. 2015 Jan 28;29(3):263-73.
2. Bunnet D, Kerleguer A, Kim P, Pean P et al. Necrotic Tuberculin Skin (Mantoux) Test Reaction: A Case Report and an Estimation of Frequency. *Chest*. 2015 Jul; 148(1): e1-4.
3. Nouhin J, Barennes H, Madec Y, Prak S, Hou SV, Kerleguer A, Kim S, Pean P, Rouet F. Low frequency of acute hepatitis E virus (HEV) infections but high past HEV exposure in subjects from Cambodia with mild liver enzyme elevations, unexplained fever or immunodeficiency due to HIV-1 infection. *J Clin Virol*. 2015 Oct; 71:22-7

2016

2017

Nouhin J, Pean P, Madec Y, Chevalier MF, Didier C, Borand L, et al. Interleukin-1 receptor antagonist, a biomarker of response to anti-TB treatment in HIV/TB co-infected patients. *J Infect* 2017.

3.5 IMMUNOLOGIE G4 (GROUPE À 4 ANS)

3.5.1 STRUCTURE FONCTIONNELLE DE L'UNITÉ

- Dr. Tineke CANTAERT, Chef du groupe
- M. Vinit Upasani, Doctorant
- Mrs Sivlin Ung, Technicienne de laboratoire

3.5.2 PROGRAMMES DE RECHERCHE - PRINCIPALES RÉALISATIONS EN 2016

Réponse immunitaire de l'infection par la dengue

Les virus de la dengue (DENV) infectent jusqu'à 390 millions de personnes par an, et 500 000 cas nécessitent une hospitalisation. Depuis 2012, la dengue est la maladie virale à transmission vectorielle la plus importante chez les humains, et probablement plus importante que le paludisme dans le monde, en termes de morbidité et d'impact économique. Les moustiques vecteurs, *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus* prospèrent dans les zones urbaines peuplées, ce qui contribue à la propagation du DENV. Les coûts engendrés par le traitement de la dengue sont considérables et comprennent à la fois les soins médicaux et les coûts non médicaux, tels que les jours de travail perdus et les mesures préventives, et sont estimés à 15-20 USD par personne et par an. Au Cambodge, lors de l'épidémie de 2006-2008, les coûts totaux ont atteint entre 0,03-0,17 du produit intérieur brut et ont été principalement endurés par les patients eux-mêmes.

Le DENV appartient à famille des *Flaviviridae* et est composé de 4 sérotypes apparentés (DENV-1 à DENV-4). L'infection par le virus de la dengue peut entraîner un large éventail d'effets cliniques, des infections asymptomatiques à une fièvre dengue classique (FD), à une fièvre hémorragique de la dengue/syndrome de choc de la dengue (FHD/SCD). Le syndrome de choc de la dengue se caractérise par une perte significative du volume plasmatique intravasculaire entraînant un choc hypovolémique, généralement entre le 4^{ème} et le 6^{ème} jour de l'apparition de la fièvre, et est la complication mortelle de la dengue la plus fréquente.

La plupart des infections primaires sont bénignes et fournissent probablement une immunité protectrice contre le sérotype infectant. En revanche, une infection secondaire avec un sérotype DENV hétérologue peut entraîner une fièvre dengue plus sévère, ce qui suggère qu'une infection primaire par le DENV engendre une réponse immunitaire dans la mémoire hôte, qui peut entraîner soit une protection, soit une aggravation des infections suivantes. Il reste à étudier dans quelle mesure ces mécanismes contribuent à la pathogenèse humaine. En raison d'une compréhension incomplète des réponses immunitaires adaptatives pertinentes conduisant à une protection ou à une aggravation de la maladie lors d'une infection secondaire, et à l'absence de biomarqueurs concluants pour la protection, le développement du vaccin a été ralenti.

Sujet 1 : Etude sur les réponses immunitaires des infections asymptomatiques de la dengue

La plupart des infections par le DENV ne causent que peu ou pas de symptômes. Les patients atteints d'infections asymptomatiques de la dengue offrent une occasion unique de comprendre les réponses immunitaires de l'hôte qui conduisent à une élimination du virus sans aucun impact négatif sur la santé de l'individu. Nous avons utilisé une approche intégrée du profilage transcriptionnel et de l'analyse immunologique, en comparant un échantillon de personnes cambodgiennes virémiques complètement asymptomatiques avec des patients atteints de dengue clinique. Alors que les voies inflammatoires et les réponses immunitaires innées étaient similaires entre les individus asymptomatiques et les patients atteints de dengue clinique, l'expression de protéines liées à la présentation de l'antigène et les voies d'activation des lymphocytes T et B suivantes étaient régulées de façon différente, indépendamment de la charge virale ou d'une éventuelle infection par le DENV précédente (Figure 1-2).

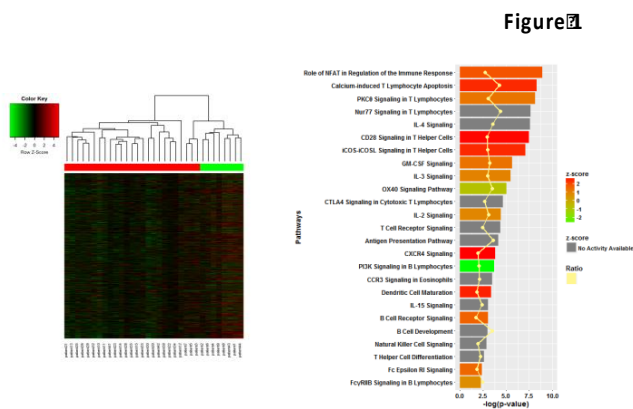


Figure 1

Figure 1: Les signatures transcriptionnelles distinguant les patients atteints de dengue asymptomatique des patients atteints de dengue clinique. (A) Une carte thermique hiérarchique non supervisée des gènes exprimés différemment entre les patients atteints de dengue asymptomatique (ASD, n=8) et les patients atteints de dengue clinique (CD, n=25). (B) Voies canoniques liées à l'immunité détectées à la suite de l'analyse d'enrichissement des voies, à l'aide du logiciel IPA. La signification de l'association entre les expressions génétiques et la voie canonique a été estimée par la valeur p tracée sur une échelle logarithmique de base 10 et la valeur du ratio reflète sa force. Le score z reflète l'état d'activation de la voie canonique (activée en cas de dengue asymptomatique : z-score > 0; inhibée en cas de dengue asymptomatique : z-score < 0).

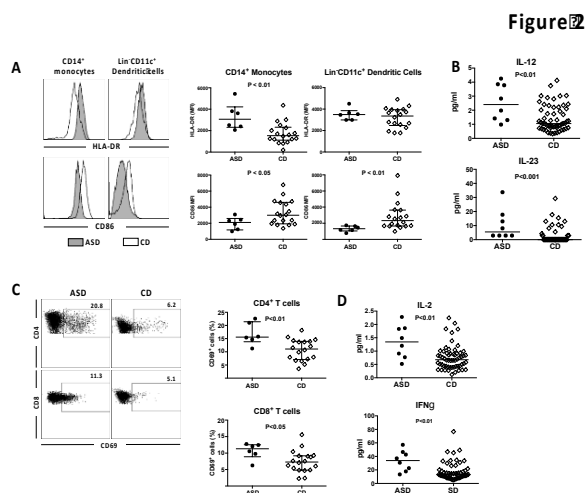


Figure 2

Figure 2: Augmentation de l'activation des lymphocytes T chez les personnes atteintes d'une infection asymptomatique de la dengue : (A) Histogrammes représentatifs de l'expression HLA-DR et CD86 sur les monocytes CD14⁺ et les cellules dendritiques Lin-CD11c⁺ de personnes atteintes d'infections asymptomatiques de la dengue (ASD, gris) et de patients atteints de dengue clinique (CD, blanc). Les données sont résumées à droite, où les lignes représentent l'écart médian et interquartile. ASD : n=6, CD : n=18. (B, D) Concentrations sériques d'IL-12, IL-23, IL-2 et IFNγ (pg/ml) mesurées par Luminex chez des personnes atteintes d'infections asymptomatiques de la dengue (ASD, N=8) et chez des personnes atteintes de dengue clinique (CD, n=58). La ligne représente la médiane. Les valeurs de P ont été obtenues avec le test de Mann-Whitney. (C) Des tracés de points représentatifs d'expression CD69 sur les cellules T CD4⁺ et CD8⁺. ASD : dengue asymptomatique (n=6), CD : dengue clinique (n=18). Les données sont résumées à droite, où les lignes représentent l'écart médian et interquartile. Les valeurs de P ont été obtenues avec le test de Mann-Whitney.

Les mécanismes de rétroaction ont dirigé la réponse immunitaire chez les personnes virémiques asymptomatiques, comme en témoigne l'activation accrue des voies liées à l'apoptose des cellules T et la signalisation FcγRIIB associées à une diminution des concentrations d'anticorps spécifiques anti-DENV (Figure 3). Mises en parallèle, nos données illustrent que les infections asymptomatiques de la dengue chez les enfants sont déterminées par une activation accrue du compartiment immunitaire adaptatif et des mécanismes de contrôle appropriés conduisant à une élimination de l'infection virale sans activation immunitaire excessive, ce qui a un grand intérêt dans les stratégies de développement de nouveaux vaccins.

Manuscrit soumis.

Collaborations avec l'Unité de Virologie, IPC ; l'Unité d'Epidémiologie et de Santé publique, IPC ; l'Unité de Génétique fonctionnelle des Maladies infectieuses, IPP

Financement : DENFREE - 7^{ème} programme-cadre de l'Union européenne

Figure 3

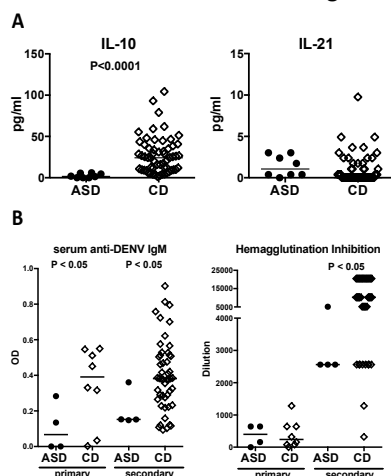


Figure 3: Les sécrétions d'anticorps anti-DENV corrént avec le développement de la dengue clinique. Une augmentation des concentrations sériques d'IL-10 et d'IL-21 (pg/ml) mesurées par Luminex chez les personnes infectées par la dengue asymptomatique (ASD, n=8) et les patients atteints de dengue clinique (CD, n=58). La ligne représente la médiane. (D) À gauche: IgM anti-DENV mesurés par MAC-ELISA, où la densité optique (OD) est rapportée. À droite: test d'inhibition de l'hémagglutination où la dilution maximale empêche l'agglutination. Les patients sont stratifiés selon le statut immunitaire. Les personnes atteintes d'infections asymptomatiques de la dengue (ASD, n=8) et les patients atteints de dengue clinique (CD, n=58). Les sérums ont été analysés 8 ± 2 jours après leur inclusion dans l'étude. La ligne représente la médiane. Les valeurs de P ont été obtenues avec le test de Mann-Whitney.

Sujet 2 : Mise en place d'une cohorte de patients infectés par le DENV de façon précoce et bien caractérisés

Les enfants âgés de ≥ 24 mois admis à l'hôpital Kantha Bopha de Phnom Penh, suspectés d'infection par le DENV, et dont les symptômes cliniques ont débuté en moins de 96 heures, sont inclus dans l'étude. Les inclusions ont commencé en juillet 2016 et se poursuivront jusqu'en novembre 2017. Des échantillons de sang sont envoyés à l'Unité de Virologie de l'IP Cambodge pour le diagnostic de la dengue. Nous étudions l'infection par la dengue en utilisant le test de diagnostic rapide (test combiné pour la détection des NS1 et IgM/IgG, les kits SD Biotec Dengue Duo de la société Standard Diagnostics - Kyonggi-do, Corée), nous effectuons le sérogroupage du DENV, testons la charge virale et la sérologie DENV (IgM et IgG) (17). Les cas positifs de dengue sont définis comme étant NS1 positifs et/ou positifs à la RT-PCR ou présentant une séroconversion IgM entre le jour de l'hospitalisation et le jour de la sortie de l'hôpital. Le test d'inhibition de l'hémagglutination est effectué au moment de l'hospitalisation et le jour de la sortie de l'hôpital, afin de distinguer l'infection primaire de l'infection secondaire. Au cours de l'hospitalisation, les patients sont rigoureusement surveillés et toutes les données cliniques et les diagnostics répertoriés dans un dossier anonyme destinés à la classification de l'OMS (2). Tous les patients ou tuteurs légaux reçoivent une explication du clinicien et donnent leur consentement avant d'être inclus dans l'étude. Le protocole a été approuvé par le Comité national d'Ethique pour la Recherche en Santé du Cambodge et les structures adéquates de l'IP Paris. Cette configuration reflète un contexte de vie réelle, où un biomarqueur prédisant le développement d'une maladie grave se révèle extrêmement utile.

À la fin de l'année 2016, notre étude avait inclus 21 patients témoins qui souffraient de symptômes similaires à la fièvre dengue, 31 patients atteints de fièvre dengue et 24 patients atteints de fièvre hémorragique de la dengue/dengue avec syndrome de choc. Les inclusions se poursuivront pendant la saison des pluies 2017 (mai-novembre).

Projet en cours. En collaboration avec l'Unité de Virologie, IPC

3.5.3 PROGRAMMATION SCIENTIFIQUE 2017

Sujet 3 : Identification des marqueurs immunologiques pour prédire les cas sévères de dengue : une approche basée sur l'hypothèse

La détection précoce des cas sévères aidera à identifier les patients qui auraient besoin d'un traitement intensif. Jusqu'à présent, aucun marqueur pronostique n'a été identifié et le diagnostic précoce repose sur une interprétation à plusieurs paramètres du fournisseur de soins de santé. Nous cherchons à

identifier un nouveau biomarqueur prédictif, qui puisse détecter les développements de cas sévères de dengue dans les 72 heures suivant le début des symptômes, dans un contexte cliniquement pertinent, en nous basant sur les résultats de notre étude précédente obtenus auprès de patients atteints de dengue asymptomatique et en enquêtant sur notre cohorte de patients décrits comme infectés par la dengue (voir Sujets 1 et 2). Nos biomarqueurs candidats incluront les réponses des cellules B de l'antigène spécifique, ce pourquoi nous développerons des outils permettant de détecter les réponses des cellules B de l'antigène spécifique, en collaboration avec l'Unité de Virologie structurale de l'IP Paris.

Projet en cours

En collaboration avec l'Unité de Virologie, IPC, et l'Unité de Virologie structurale, IPP

Sujet 4 : Caractérisation moléculaire et fonctionnelle des réponses des cellules B lors d'une infection par le DENV

Dans le sang, le DENV infecte les monocytes et aux cellules dendritiques et quelques rapports ont suggéré que les cellules B soutenaient la réplication virale. Comme les cellules B expriment les récepteurs de liaison IgG impliqués dans l'amélioration dépendante des anticorps (ADE), ils pourraient être la cible d'une réplication virale plus forte lors d'une infection secondaire. La conséquence d'une infection des cellules B par le DENV sur les fonctionnalités des cellules B reste inconnue. Les cellules B sont non seulement des précurseurs des cellules plasmiques, mais elles exercent aussi d'autres fonctions telles que la présentation de l'antigène, la production de cytokines et l'immunomodulation, comme l'ont montré nos études et celles des autres (27-29). Ces fonctions pourraient être modifiées à la suite d'une infection par le DENV. Nous mettons en place un modèle *in vitro* pour étudier des infections par le DENV dans des cellules B humaines primaires, afin d'identifier les potentiels mécanismes d'entrée virale et les conséquences d'une infection par le DENV sur les fonctions des cellules B. Nous confirmerons les résultats obtenus à l'aide des cellules B infectées par le DENV isolées chez les patients, en apportant une pertinence biologique aux résultats obtenus *in vitro* (résultats préliminaires de la Figure 4).

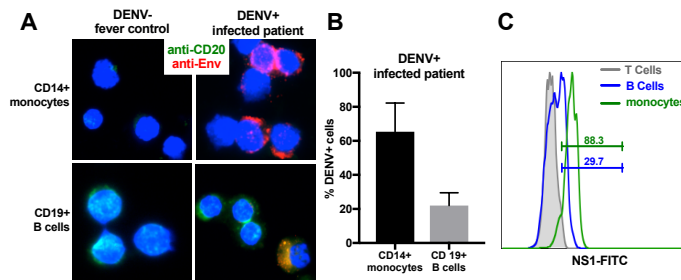


Figure 4: Les cellules B sont sensibles aux infections à DENV in vivo. (A) Les cellules B et les monocytes ont été purifiés à partir des patients témoins de DENV- (gauche, n=2) ou DENV+ (droite, n=3) et colorés avec les anti-CD20 (vert) et anti-enveloppe (rouge) (B) Quantification en pourcentage des cellules positives (C) Coloration FACS de cellules mononucléaires de sang périphérique isolées à partir de cas de DENV+ avec anti-NS1. La référence a été conçue à l'aide des cellules T CD3 + comme population négative (histogramme gris)

Projet en cours.

En collaboration avec l'Unité de Virologie, IPC et l'Université de Groningue, Pays-Bas

3.5.4 SOUTIEN AUX AUTORITÉS NATIONALES

Pas applicable

3.5.5 ENSEIGNEMENT ET FORMATIONS

2 séminaires dispensés aux étudiants de Pharmacie de 5^{ème} année de l'Université des Sciences de la Santé (2 heures/séminaire) : « Immunologie et infection par le virus de la dengue ».

Etudiant inscrit en doctorat

Vinit UPASANI 2017-2019 : L'étudiant a reçu une bourse Calmette et Yersin du Réseau international des Instituts Pasteur.

L'étudiant est inscrit à l'Université de Groningue, Pays-Bas.

Technicien

Sivlin UNG : A suivi les cours d'été 2016 en Immunologie de l'Université d'Utrecht, Pays-Bas.

Etudiants stagiaires

4 juillet 2016 – 4 septembre 2016 : Daneth PHANN, 3^{ème} année de Licence de Biochimie, Université royale de Phnom Penh

5 septembre 2016 – 5 novembre 2016 : Ratana LAY, 5^{ème} année à l'Université des Sciences de la Santé, Phnom Penh

20 novembre 2016 – 20 janvier 2017 : Sothy SONG, 1^{ère} année de Master de Médecine de Laboratoire, Institut royal de Technologie de Melbourne, Australie

3.5.6 LISTE DES PUBLICATIONS (2016)

2015

1. Cantaert T, Schickel JN, Bannock JM, Ng YS, Massad C, Oe T, Wu R, Lavoie A, Walter JE, Notarangelo LD, Al-Herz W, Kilic SS, Ochs HD, Nonoyama S, Durandy A, Meffre E. 2015. Activation-Induced Cytidine Deaminase Expression in Human B Cell Precursors Is Essential for Central B Cell Tolerance. *Immunity*; 43(5):884
2. Romberg N, Virdee M, Chamberlain N, Oe T, Schickel JN, Perkins T, Cantaert T, Rachid R, Rosengren S, Palazzo R, Geha R, Cunningham-Rundles C, Meffre E. 2015. TNF receptor superfamily member 13b (TNFRSF13B) hemizyosity reveals transmembrane activator and CAML interactor haploinsufficiency at later stages of B-cell development. *JACI*; 136(5):1315

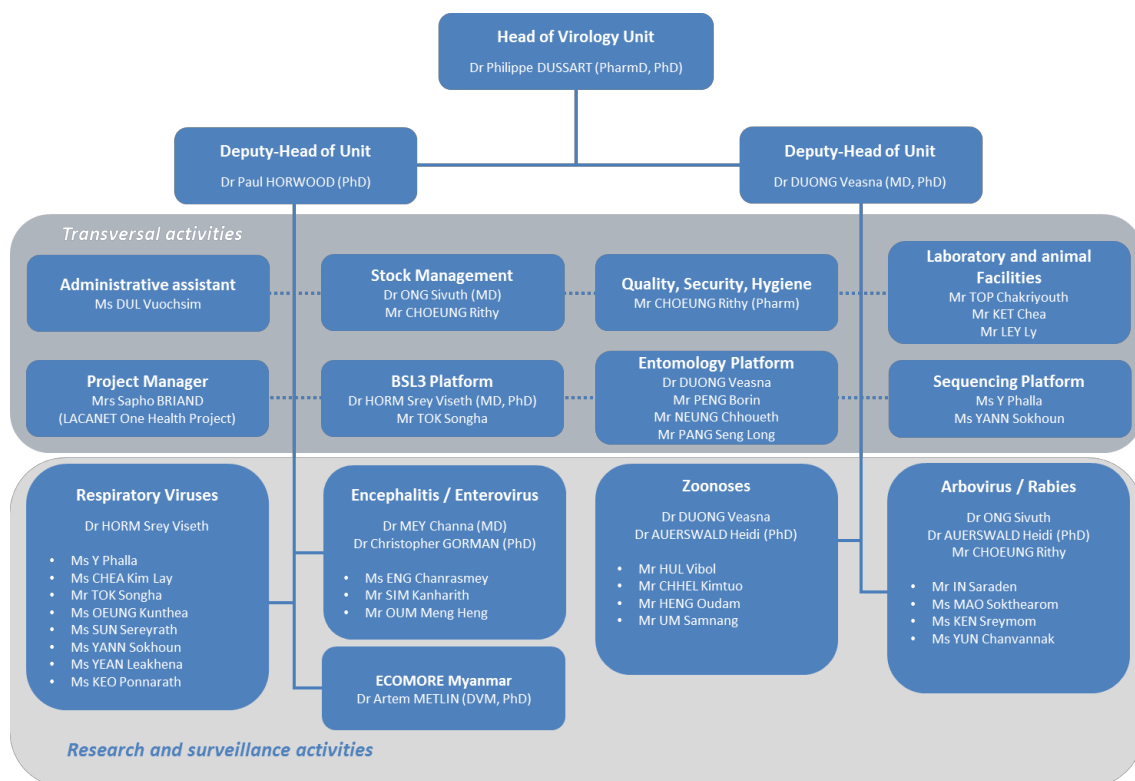
2016

1. Chamberlain N, Massad C, Oe T, Cantaert T, Herold KC, Meffre E. 2016. Rituximab does not reset defective early B cell tolerance checkpoints. *J Clin Invest*; 126(1):282
2. Jamin C, Le Lann L, Alvarez-Errico D, Barbarroja N, Cantaert T, Ducreux J, Dufour AM, Gerl V, Kniesch K, Neves E, Trombetta E, Alarcón-Riquelme M, Marañón C, Pers JO. 2016. Multi-center harmonization of flow cytometers in the context of the European "PRECISESADS" project. *Autoimmun Rev*; 15(11):1038
3. Cantaert T, Schickel JN, Bannock JM, Ng YS, Massad C, Delmotte FR, Yamakawa N, Glauzy S, Chamberlain N, Kinnunen T, Menard L, Lavoie A, Walter JE, Notarangelo LD, Bruneau J, Al-Herz W, Sebnem Kilic S, Ochs HD, Cunningham-Rundles C, van der Burg M, Kuijpers TW, Kracker S, Kaneko H, Sekinaka H, Nonoyama S, Durandy A, Meffre E. 2016. Abnormal induction of somatic hypermutation results in decreased regulatory T cell function and an impaired peripheral B cell tolerance checkpoint. *J Clin Invest*; 126(11):4289
4. Levels MJ, Van Tok MN, Cantaert T, Cañete JD, Kroese FG, Germar K, Spits H, Baeten DL, Yeremenko NG. 2016. The transcriptional co-activator Bob1 is associated with pathologic B cell responses in autoimmune tissue inflammation. *Arthritis & Rheumatism*; In press

3.6 VIROLOGIE

3.6.1 STRUCTURE FONCTIONNELLE DE L'UNITÉ

Les activités de l'Unité de Virologie de l'IPC portent sur la recherche biomédicale et la surveillance des maladies infectieuses. Les activités se divisent en quatre composantes principales : les arbovirus (dengue, Zika, Chikungunya et encéphalite japonaise), les syndromes respiratoires (grippe saisonnière et grippe aviaire H5N1), les encéphalites (encéphalite japonaise, EV-A71) et les agents pathogènes zoonotiques et émergents (coronavirus et virus Nipah). Six chercheurs sont impliqués dans ces activités de surveillance et de recherche, et l'Unité de Virologie compte environ 40 personnes. L'Unité de Virologie a développé de nombreux programmes de recherche autour de ces thèmes, et la plupart de ces programmes sont menés en collaboration avec l'Unité d'Epidémiologie et Santé publique de l'IPC (Epi Santé).



3.6.2 PROGRAMMES DE RECHERCHE - PRINCIPALES RÉALISATIONS EN 2016

A. MALADIES ARBOVIRALES

L'étude DENFREE

Chef d'équipe: V. Duong

DENFREE est un projet d'une durée de quatre ans financé par l'Union européenne (FP7). Il a débuté en 2012 dans le but d'examiner la question des infections par la dengue sous différents angles, à savoir l'immunologie, l'évolution génomique, la prédisposition génétique chez l'Homme, l'entomologie, le

développement d'outils de diagnostic, etc., avec une attention particulière aux infections asymptomatiques.

L'IPC a joué un rôle important dans le projet mené par l'Unité de Virologie et l'Unité d'Épidémiologie et Santé publique, en dirigeant trois principaux WP en Epidémiologie de terrain (WP1), en Virologie (WP6) et en Entomologie (WP5). Afin de détecter les cas de dengue asymptomatiques, des cas index de dengue ont été identifiés dans des hôpitaux et au sein de communautés à l'aide d'un test de diagnostic rapide NS1 et/ou par RT-PCR. Chaque confirmation de cas a donné lieu à une enquête épidémiologique, qui était menée au sein du ménage où le cas index avait été détecté, ainsi que dans les 20 ménages alentours. Tous les échantillons collectés sur le terrain étaient quotidiennement envoyés à IPC pour confirmation des infections de dengue par qRT-PCR. Entre 150 et 300 échantillons sanguins ont été testés chaque jour, et les résultats étaient communiqués en temps réel aux équipes de terrain, afin de permettre d'éventuels suivis et études entomologiques complémentaires, y compris une alimentation et collecte de moustiques. Au total, 594 cas index de dengue ont été identifiés parmi les 830 patients suspectés d'être infectés par la dengue et 200 enquêtes par grappes ont été menées. Dans le cadre de l'enquête par grappes, 8 125 membres de familles de 3 066 ménages ont été échantillonnés, et plus de 18 225 tests ont été effectués. Nous avons identifié 334 infections symptomatiques et 29 (8%) cas d'infections asymptomatiques de la dengue au sein de la communauté. Cette étude a également permis à l'IPC d'examiner plusieurs questions de recherche :

- L'utilité de la salive et de l'urine dans le diagnostic de la dengue et le rôle de la détection de NS1 dans l'urine comme marqueur pronostique de sévérité de la dengue (Andries AC et al., 2015).
- Le rôle de la protéinurie dans la prédiction d'une infection sévère par la dengue (Andries AC et al., 2016).
- La performance des kits commerciaux dans la détection de l'antigène NS1 de la dengue et des IgM, IgG et IgA anti-dengue dans les échantillons cliniques d'urine et de salive (Andries AC et al., 2016).
- Le rôle des infections asymptomatiques dans la transmission du DENV. Nous avons démontré pour la première fois que malgré leur niveau de virémie inférieur, les personnes atteintes d'infections asymptomatiques de la dengue étaient considérablement plus contagieuses (100 fois) pour les moustiques que les personnes atteintes d'infections symptomatiques (Duong V et al., 2015).
- La réponse immunitaire de l'hôte observée dans les infections asymptomatiques de la dengue conduit à une élimination du virus sans impact négatif sur la santé de l'individu. En collaboration avec le groupe d'immunologie (G4) dirigé par Dr. Tineke CANTAERT, nous avons constaté que les infections asymptomatiques du virus de la dengue étaient caractérisées par une activation accrue du compartiment immunitaire adaptatif et des mécanismes de rétroaction appropriés, ce qui entraîne une élimination de l'infection virale sans activation excessive de l'immunité chez les patients atteints de dengue clinique (Duong V et al., Soumis à Sci Transl Med).
- Les facteurs de risque liés aux infections asymptomatiques de la dengue. Une analyse préliminaire a suggéré que les eaux de canalisation pouvaient jouer un rôle dans la propagation des infections par le DENV, et que le DENV avait tendance à être moins présent chez les ménages qui versaient du teméphos dans leurs conteneurs d'eau (ratio du taux d'incidence (intervalle de confiance de 95%) respectivement de : 1.35 (1.06 - 1.71), 0.67 (0.41 - 1.08). Les infections totalement asymptomatiques sont également moins fréquentes que ce qu'on croyait auparavant. Aucune corrélation n'a été établie entre le sexe, l'âge, les relations avec les cas index, les sérotypes DENV et les infections asymptomatiques (Ly S et al., manuscrit en cours d'écriture).

Partenaires: A. Tarantola, S. Ly et coll. (Unité Epi Santé), A. Sakuntabhai, R. Paul et coll. (IP), membres du consortium DENFREE (U. Mahidol., Imperial College, Institut Pedro Kuri, etc.).

Soutien financier : Union européenne – Institut Pasteur, Paris.

Diagnostic, évolution moléculaire et compétence vectorielle des virus Zika d'Afrique, d'Asie et des îles du Pacifique

Unité de Virologie, chefs d'équipe : V. Duong, P. Dussart

Les objectifs étaient d'optimiser et d'uniformiser les outils de diagnostic ZIKV, étudier la diversité du ZIKV en Afrique, en Asie du Sud-Est et dans le Pacifique, en analysant la dynamique de l'évolution spatio-temporelle du virus et en évaluant la compétence des vecteurs locaux sur différentes souches du ZIKV issues des trois régions.

Le ZIKV a été détecté pour la première fois au Cambodge en 2010 par NAMRU-2. En utilisant des outils de diagnostic développés au cours de l'étude de 2010, nous avons mené une étude rétrospective pour examiner la circulation du ZIKV au Cambodge durant les dix dernières années (2007-2016) auprès de patients qui avaient été atteints de symptômes de la dengue. Au total, 2 400 échantillons sanguins et 173 surnageants des cultures cellulaires de sang C6/36 du système sentinelle du Programme national de Lutte contre la Dengue, 270 échantillons d'urine du projet DENFREE et 3 159 moustiques *Aedes aegypti* négatifs aux infections aiguës de la dengue ont été testés pour le ZIKV par qRT-PCR. Cinq échantillons ont été détectés comme positifs au ZIKV par qRT-PCR parmi les échantillons sanguins collectés en 2007 (n=1), 2008 (n=1), 2009 (n=2) et 2015 (n=1). L'analyse phylogénétique des séquences partielles du gène NS5 réalisée à partir d'échantillons humains (un de 2008 et deux de 2009) a fait apparaître que les trois souches cambodgiennes appartenaient à des génotypes asiatiques. Une étude sérologique conduite sur des échantillons sanguins de 1992 a montré que 16 échantillons sanguins de 2007 (n=2), 2008 (n=1), 2010 (n=2), 2012 (n=4) et 2015 (n=7) avaient des anticorps IgM anti-Zika sans réaction croisée avec les antigènes de la dengue ou de l'encéphalite japonaise, ce qui suggère un diagnostic présomptif d'une infection récente à partir d'un seul spécimen d'échantillons sanguin. Un résultat intéressant a été de savoir que le ZIKV était endémique au Cambodge avec un faible impact sur la santé publique (Duong V et al., 2017).

Partenaires : M. Dupont-Rouzeyrol (IPNC), O. Faye (IPD), M. Grandadam (IPL), V.M. Cao-Lormeau (Institut Louis Malardé) and A.B. Failloux (IPP).

Soutien financier : Institut Pasteur, Paris (ACIP)

B. LES VIRUS DE LA GRIPPE AVIAIRE

Unité de Virologie: P. Horwood

Grippe aviaire : caractérisation moléculaire du virus de la grippe A(H5N1) hautement pathogène, évolution, résistance aux antiviraux, surveillance sur les marchés de volailles vivantes à l'interface Homme – Animal – Environnement

En tant que Centre national de la Grippe au Cambodge et Laboratoire de Référence H5, l'IPC continue de soutenir le Ministère de la Santé et le Ministère de l'Agriculture, des Forêts et de la Pêche dans la confirmation d'infections grippales chez les Hommes et les animaux. En mai 2016, le Cambodge a connu une épidémie de grippe A(H5N1) chez des volailles de la province de Kampot. L'épidémie a entraîné la mort de 155 poulets et canards, ainsi que l'abattage de 350 oiseaux. Le travail de dépistage et de détection de la grippe A(H5N1) a d'abord été conduit par l'Institut national pour la Recherche en Santé et Reproduction animales – NAHPRI, anciennement appelé l'Institut national pour la Recherche vétérinaire – NaVRI, suite à une formation dispensée par l'IPC au personnel de NAHPRI, dans les locaux de l'IPC, à la détection des virus de la grippe par RT-PCR en temps réel. Tous les échantillons positifs de grippe A(H5N1), collectés durant l'épidémie volaillière de mai 2016, ont été envoyés à l'IPC pour confirmation et caractérisation virale. Nos tests de laboratoire ont confirmé la détection des cas d'A(H5N1) et l'analyse séquentielle des souches de l'épidémie a montré que les virus grippaux A(H5N1) appartenaient au clade 2.3.2.1c, qui était déjà étroitement liés aux souches qui circulaient sur les marchés de volailles vivantes en 2015 et qui étaient aussi présents lors de l'épidémie volaillière de novembre 2015.

Nous utilisons des outils de séquençage génétique avancés et étudions les risques d'exposition aux aérosols, afin de gagner une meilleure compréhension des virus grippaux A(H5N1) qui circulent au Cambodge.

- ***Analyse complète du génome des souches cambodgiennes A(H5N1)***

À ce jour, les séquences A(H5N1) du génome complet ont été générées à partir de souches de grippe collectées sur les marchés de volailles en 2015 et isolées dans des œufs embryonnés. Des séquences génétiques complètes des protéines HA et NA ont également été conduites sur d'autres souches A(H5N1). Jusqu'à maintenant, toutes les séquences A(H5N1) générées durant l'étude appartenaient au clade 2.3.2.1, qui a été détecté pour la première fois au Cambodge en mars 2014. Nous avons émis l'hypothèse que l'introduction de cette souche avait conduit au remplacement du réassortiment du virus appartenant au clade 1.1.2, ce qui avait provoqué une importante augmentation de cas humains. L'analyse des données de séquençage profond est en cours à l'IPC, à l'Université de Hong Kong et au Laboratoire du Dr. Thomas Friedrich de l'Université du Wisconsin. Grâce à ces analyses, nous essayons de déterminer le taux de mutation du virus A(H5N1) dans les cas d'infections humaines, en les comparant à un hôte naturel tel qu'un canard. Nous espérons ainsi obtenir des informations importantes sur le risque d'émergence de souches A(H5N1) adaptées aux mammifères suite à une infection humaine. Cette composante de recherche devrait se terminer en 2017.

- ***Séquençage des échantillons environnementaux de marchés pour étudier la diversité des virus grippaux circulant dans la volaille cambodgienne***

En 2015, nous avons débuté une nouvelle étude de surveillance de marchés visant à déterminer les caractéristiques de la circulation du virus A(H5N1), appartenant au clade 2.3.2.1c, actuellement dominant au Cambodge, par rapport au réassortiment du virus, appartenant au clade 1.1.2, dominant en 2013. Jusqu'à maintenant, notre équipe a déjà isolé 39 virus A(H5N1), 35 virus de grippe aviaire faiblement pathogène et 22 virus provenant d'infections mixtes à partir d'échantillons collectés sur les marchés de volailles en 2015. En 2017, ces isolats seront transférés au Centre collaborateur de l'OMS de Melbourne pour un séquençage complet du génome, à l'aide de séquençage nouvelle génération. Ces analyses nous donneront des informations importantes sur le taux de réassortiment survenant sur les marchés de volailles, ainsi que sur le risque d'émergence de nouvelles souches de grippe aviaire.

- ***Risque d'exposition aux aérosols de virus de grippe aviaire sur les marchés de volailles cambodgiens***

En février 2016, nous avons débuté une étude préliminaire pour enquêter sur le risque d'exposition aux aérosols A(H5N1) encourus par les vendeurs et les clients sur les marchés de volailles cambodgiens où nous avons déjà mené des recherches sur le virus A(H5N1) auparavant. Nous avons utilisé une pompe et un système de filtration, qui filtre activement l'air, pour récupérer les particules de virus vivantes, ce qui nous a ensuite permis de déterminer la taille des particules auxquelles les virus étaient attachées. Un tel système pourra sûrement fournir des informations importantes sur la dispersion des particules et déterminer le niveau de menace de profondes infections des voies respiratoires chez les vendeurs de volailles sur les marchés.

L'étude a consisté à collecter des échantillons d'air durant deux périodes d'une semaine en 2016, qui, d'après nos études précédentes, correspondaient à des moments où la circulation de la grippe aviaire était élevée, précédentes : le Nouvel An lunaire (février) et la Fête de Pchum Ben (septembre), ainsi que pendant une période de faible circulation du virus (mai). Des prélèvements effectués sur des volailles et des échantillons d'eaux de nettoyage de carcasses ont également été collectés durant chaque mission d'échantillonnage, afin de comparer les taux de détection et d'isolation des échantillons d'air avec la circulation générale du virus sur les marchés de volailles. Étant donné que les échantillons n'ont été collectés et analysés qu'après les sessions d'échantillonnages effectuées en février et mai 2016, une troisième session d'échantillonnage est prévue en avril 2017, moment correspondant au Nouvel An khmer.

Partenaires : A. Tarantola, S. Ly (Epi Santé), Ministère de la Santé, Institut national pour la Santé et la Reproduction animale (NAHPRI, anciennement NaVRI), OMS, FAO, US-CDC, Institut national de Santé publique (NIPH), hôpital Kantha Bopha, NAMRU-2.

Soutien financier: US DHHS – USAID – OMS – IPC.

C. VIRUS NEUROTROPIQUES

Le projet SEAE “South East Asia encephalitis Project” – Lutte contre les encéphalites infectieuses en Asie du Sud-Est

Unité de Virologie, chefs d'équipe : P. Dussart, C. Gorman

Les encéphalites infectieuses sont un problème de santé publique mondial, qui est d'autant plus important en Asie du Sud-Est en raison du nombre important de maladies infectieuses endémiques et émergentes, en particulier dans les pays à ressources limitées. La large diversité de pathogènes, ainsi que la difficulté à établir un diagnostic d'encéphalite en laboratoire rendent son étiologie difficile à définir. Les études antérieures sur les méningo-encéphalites menées par l'IPC ont identifié l'encéphalite japonaise (JEV), la dengue (DENV), la tuberculose et le typhus des broussailles comme étant les principaux agents pathogènes responsables d'encéphalites. Toutefois, environ 50% des diagnostics de patients n'avaient pas pu être confirmés en laboratoire. Le projet SEAE vise à renforcer les données des études antérieures, en prévoyant le recueil d'un plus large éventail d'échantillons biologiques et l'analyse d'un plus grand nombre de pathogènes. Chaque patient recruté dans le cadre du projet fait l'objet d'un test de dépistage comprenant la recherche d'environ 80 agents pathogènes. Les pathogènes réputés endémiques ou pour lesquels un traitement est disponible, se voient testés en priorité, et les résultats sont transmis au médecin dans un délai de 24 heures. Afin de garantir une stratégie de dépistage homogène à l'ensemble de la région, tous les tests de laboratoires sont standardisés entre chaque pays et les résultats sont combinés aux données cliniques et épidémiologiques. Les diagnostics de première intention des encéphalites sont réalisés dans les hôpitaux et sont supervisés par les centres nationaux, qui prévoient la mise en place d'un programme de contrôle qualité. Ces derniers réalisent en seconde intention une large gamme de tests supplémentaires applicables à la fois aux diagnostics en laboratoire et à la découverte de pathogènes nouveaux ou peu communs.

Partenaires : L'hôpital Kantha Bopha de Phnom Penh - le consortium SEAE : l'Unité d'Epidémiologie (Arnaud Tarantola), l'Institut de Microbiologie & Maladies infectieuses (IMMI), l'Institut Pasteur (Marc Lecuit, Olivier Lortholary, Marc Eloit), l'Institut national d'Hygiène et d'Epidémiologie de Hanoi (NIHE), l'IRD (Xavier de Lamballerie), l'Unité de Recherche clinique de l'Université d'Oxford au Laos (Paul Newton), le CIRAD (Julien Cappelle, Véronique Chevalier)

Financial support : Pathoquest – Fondation Total – Institut Pasteur – AVIESAN Sud – INSERM – IRD

D. ZOONOSES

PREDICT 2

Unité de Virologie, chef d'équipe : V. Duong

S'inscrivant dans la continuité du projet PREDICT 1 (2009-2014), la deuxième phase du projet PREDICT (PREDICT 2) (2014-2019) est financée par l'Agence des Etats-Unis pour Développement international (USAID). Le projet est dirigé par l'Université de Californie Davis, et l'IPC coordonne la partie cambodgienne du projet. À l'aide d'une approche épidémiologique, PREDICT 2 concentre ses activités de surveillance sur trois grands facteurs de risques de pandémies qui pourraient provoquer une émergence virale : la conversion des sols à des fins de commercialisation, l'intensification des systèmes de production animale et des chaînes de valeurs animales. Le projet a débuté en octobre 2014 et cherche à focaliser la surveillance et les interventions sur les sources d'émergence, l'amplification et la propagation des virus au sein des populations humaines pour mieux prévoir les risques de transmission de virus avant leur apparition :

- 1) En caractérisant de manière élargie les pathogènes propres aux épidémies connues et aux pandémies potentielles encore inconnues et leurs dynamiques entre les hôtes,

- 2) En décrivant la transmission des pathogènes entre la faune sauvage, les animaux domestiques et d'élevage et les êtres humains aux interfaces à hauts risques pour prévenir l'émergence de maladies ;
- 3) En concentrant la surveillance sur des emplacements géographiques présentant des risques d'émergence élevés, de contagions et de propagations de maladies, afin d'identifier les facteurs sociaux et écologiques qui influent sur l'émergence et la transmission de pathogènes, et en déterminant des cibles d'intervention appropriées ;
- 4) En s'appuyant sur les initiatives « One Health » prises au niveau mondial, pour une collaboration efficace entre les disciplines et les différents pays.

Au Cambodge, nos travaux se concentrent sur deux interfaces principales : 1) Les chaînes de valeur animales dans la province de Kandal et 2) L'intensification de la production animale dans la province de Kampong Cham. Le rôle de l'Unité de Virologie de l'IPC est d'assurer la coordination des travaux de terrain et de laboratoire, en collaboration avec des partenaires gouvernementaux de l'Administration forestière, de la Direction générale de la Santé et de la Reproduction animales (GDAHP) et du Centre pour le Contrôle et la Prévention des Maladies (CDC) au Cambodge. Deux fois par an, nous effectuons des missions de terrain pour collecter des échantillons (pendant la saison sèche et la saison des pluies) dans la province de Kandal, en vue de répertorier des informations sur l'interface Hommes - bétail - rats, et sur l'interface Hommes - bétail - chauves-souris dans la province de Kampong Cham.

Partenaires : Wildlife Conservation Society (WCS), Université de Californie Davis (UC Davis), Administration forestière, Institut national pour la Recherche en Santé et Reproduction animales (NAHPRI, anciennement NavRI), Centre pour le Contrôle et la Prévention des Maladies (CDC) du Cambodge

Soutien financier : USAID.

Le projet LACANET : Réseau de Surveillance et de Laboratoires « One Health »

Unité de Virologie, chef d'équipe : P. Horwood

Le projet LACANET vise à renforcer les capacités de surveillance et d'études de terrain sur les zoonoses, améliorer les collaborations intersectorielles aux niveaux nationaux et régionaux en établissant un réseau de surveillance et de laboratoires « One Health » (une seule santé) et en menant des recherches stratégiques sur deux principaux facteurs d'émergence de maladies : le commerce d'espèces sauvages et le changement d'utilisation des sols.

Les partenaires du projet LACANET ont commencé à mettre en œuvre un programme visant à améliorer la collaboration et la communication entre les secteurs One Health du Cambodge et du Laos. Au cours de la deuxième année du projet, nous avons déjà réussi à établir des systèmes de surveillance de maladies de faune sauvage dans les deux pays, ce qui nous a permis de collecter et d'analyser 326 échantillons provenant de 45 animaux, en lien avec des épidémies/mortalités. En outre, nous avons également assisté des zoos et des refuges pour animaux dans le dépistage de 197 échantillons provenant d'animaux confisqués. Notre système de surveillance de maladies de faune sauvage a permis des progrès importants dans la mise en évidence de problèmes de santé uniques à la région, comme en témoignent une enquête sur des trous d'eau empoisonnés par des pesticides, qui ont entraîné la mort de plusieurs animaux de faune sauvage et le potentiel empoisonnement de villageois et animaux domestiques. Des techniques de recherche innovantes, permettant d'étudier l'incidence du changement d'utilisation des sols et du commerce de faune sauvage sur l'émergence de maladies zoonotiques, mettent déjà en évidence des informations importantes sur les agents pathogènes prioritaires, les distributions de vecteurs et les risques pour l'Homme et le bétail. Aussi bien au Cambodge qu'au Laos, nos équipes de terrain ont été très actives durant les deuxième et troisième années du projet, en passant plus de 100 jours par an sur le terrain, dans chaque pays. Ces projets offrent également l'occasion de former le personnel de terrain et de laboratoire, et permettent d'améliorer les collaborations entre les trois secteurs One Health.

Partenaires : Wildlife Conservation Society (WCS), Institut national pour la Recherche en Santé et Reproduction animales (NAHPRI, anciennement NaVRI), le laboratoire national pour la Santé animale du Laos (NAHL), l'Unité de Recherche du Lao-Oxford-Mahosot-Hospital-Wellcome (LOMWRU).

Soutien financier : Union européenne.

Développement d'outils permettant d'étudier de nouveaux mammarenavirus transmis par les rongeurs et détectés au Cambodge

Unité de Virologie, chef d'équipe : P. Dussart

Plusieurs espèces de rongeurs ont déjà été identifiées comme hôtes de virus zoonotiques. Les recherches menées dans le cadre du projet CERoPath ont permis de découvrir deux nouveaux mammarenavirus issus de diverses espèces de rat (Duong V et al., 2016). L'un des virus découverts était une variante du virus Wēnzhōu (WENV), déjà isolé en Chine orientale. C'est la raison pour laquelle nos recherches initiales ont d'abord porté sur la culture de la variante cambodgienne du WENV. Nos objectifs étaient de cultiver la variante du WENV, collectée sur des rongeurs *Rattus norvegicus*, infectés en laboratoire, et de développer des méthodes de quantification du virus. Plusieurs tests ont été réalisés à l'aide de diverses lignées de cellules simiennes et canines, dans différentes conditions de culture (températures et milieux de culture différents). Nous avons infecté des cellules VeroE6 simiennes et des cellules DH82 canines. Le virus était détectable dans les cellules jusqu'à sept jours après l'infection initiale, dans certaines conditions de culture (28-32 °C). Une réplication active du virus conduisant à une sécrétion des particules virales n'a pas pu être observée. Par ailleurs, la détection du virus a également été évaluée en comparant les résultats d'une PCR semi-nichée aux résultats d'une qRT-PCR. Les deux méthodes ont été jugées comme appropriées dans la détection du WENV dans la culture et les échantillons d'animaux. D'autres études seront menées en 2017.

Soutien financier : Institut Pasteur, Paris – IPC

3.6.3 PROGRAMMATION SCIENTIFIQUE 2017

A. MALADIES ARBOVIRALES

L'étude DENFREE

Le travail dirigé par l'Unité de Virologie de l'IPC, dans le cadre du lot de travail WP6, est toujours en cours et vise à étudier les caractéristiques génétiques du DENV, afin de mieux comprendre l'évolution et la variation du virus chez les vecteurs et les hôtes humains, dans le but de déterminer si des mutations et des quasi-espèces spécifiques sont sélectionnées chez les moustiques et les Hommes. Les souches du DENV collectées chez les humains et les moustiques lors de l'épidémie de Kampong Cham en 2012-2013 sont en cours de séquençage, à l'aide de la technologie HTS, à l'IP Paris. Nous prévoyons d'examiner la diversité génétique du DENV chez les Hommes en utilisant différents modèles cliniques, tels que des cas symptomatiques (fièvre dengue, fièvre hémorragique de la dengue, dengue avec syndrome de choc) et asymptomatiques. En raison de la faible quantité de virus contenue dans certains échantillons, en particulier les échantillons de moustiques et certains cas asymptomatiques, le protocole de préparation de l'ARN et les techniques de séquençage ont été optimisés à Paris. Plus de 300 échantillons de plasma provenant de patients atteints de dengue clinique, d'autres atteints d'infections asymptomatiques de la dengue, ainsi que 170 moustiques ont été envoyés à IP Paris, où le séquençage est en cours.

Le virus Zika au Cambodge : diagnostic, séroprévalence et compétence vectorielle

Nous prévoyons de débiter une expérience en 2017 qui visera à étudier la compétence vectorielle de trois souches du ZIKV d'Afrique (Sénégal), de Nouvelle-Calédonie et d'Asie (Cambodge), à partir de moustiques *Aedes aegypti* collectés au Cambodge.

L'IPC participe au programme européen ZIKAlliance récemment sélectionné (2017-2019), avec trois objectifs principaux : clarifier l'impact de l'infection du virus Zika chez les femmes enceintes, mieux comprendre l'histoire naturelle de l'infection à virus Zika chez les Hommes et au sein de leur

environnement dans un contexte de circulation d'autres arbovirus, et établir un réseau de recherche collaborative durable en Amérique latine et dans les Caraïbes, afin de développer une capacité globale de recherche en matière de préparation à de futures menaces épidémiques dans la région. L'Unité de Virologie participera à trois tâches : l'identification des vecteurs du ZIKV (en collaboration avec la plateforme d'entomologie de l'IPC, dirigée par Dr. Sébastien Boyer), la compétence des vecteurs et la séroprévalence de l'infection à ZIKV au sein de la population.

Chikungunya

Unité de Virologie, chef d'équipe : P. Dussart

Une récente étude menée par les équipes de l'IPC a mis en évidence une protection immunitaire durable après une émergence de CHIKV en avril 2012, au sein d'une population rurale. Cette étude a révélé que le fait d'être l'âge de plus de 40 ans était un important facteur de protection contre l'infection à CHIKV, reflétant une protection immunitaire collective acquise pendant la circulation du Chikungunya au Cambodge dans les années 1960 et 1970, juste avant le début du régime des Khmers rouges en 1975. Ces données sont les premières à démontrer que des anticorps du CHIKV pouvaient persister sur une période de 40 ans.

Enfin, nous prévoyons de ré-examiner les résultats d'études antérieures sur la protection immunitaire contre le CHIKV, à l'aide de tests de laboratoire, à travers l'étude sur l'immunité contre les souches du CHIKV des années 1960 (du génotype asiatique), parmi les personnes cambodgiennes ayant une immunité acquise en 2012. En 2016, nous avons collecté des échantillons sanguins de personnes qui avaient été exposées au CHIKV en 2011-2012, avec ou sans exposition préalable (en fonction de leur âge). Nous envisageons maintenant de tester des échantillons humains récemment collectés par dosage de neutralisation en utilisant le CHIKV suivant : une souche cambodgienne du génotype de l'est-centre-sud-africain (ECSA) ; une souche de Nouvelle Calédonie du génotype asiatique ; deux souches asiatiques appartenant au génotype asiatique qui a circulé en Asie du Sud-Est dans les années 1960-1970. Les échantillons sanguins seront analysés en 2017. La confirmation des résultats précédents est importante pour comprendre l'immunité contre le Chikungunya, ainsi que pour anticiper ou lutter contre de potentielles futures épidémies.

Soutien financier: IPC.

B. VIRUS DES GRIPPES SAISONNIÈRE ET AVIAIRE

Grippe aviaire: étude des chaînes d'approvisionnement des marchés de volailles à Phnom Penh et évaluation en amont de la circulation des virus de grippe aviaire.

En 2016, l'Unité de Virologie a poursuivi ses activités sur la grippe aviaire en examinant la caractérisation moléculaire de grippe A(H5N1) à forte pathogénicité, l'évolution du virus, sa pharmacorésistance, et l'interface Animaux – Hommes - Environnement.

En 2017, nous mènerons également une étude de traçabilité de la chaîne d'approvisionnement en volailles du principal marché de Phnom Penh. Cette étude vise également à déterminer s'il existe des zones de circulation du virus A(H5N1) à la campagne. Dans cette étude, nous proposons une cartographie plus détaillée des réseaux d'approvisionnement que celles réalisées précédemment et une localisation des zones d'approvisionnement où la prévalence du virus de la grippe aviaire est plus élevée (Van Kerkhove et al., 2009).

Nous prévoyons de suivre des vendeurs intermédiaires et les mouvements de volaille à l'aide de systèmes GPS/GSM, et de collecter des échantillons de volailles à différentes étapes du transport, depuis les marchés provinciaux ou de districts et/ou des bâtiments de stockage jusqu'au principal marché de volailles vivantes de Phnom Penh.

Cette étude sera conçue et menée en collaboration avec l'Unité d'Epidémiologie et Santé publique de l'IPC et l'Institut national pour la Recherche en Santé et Reproduction animales (NAHPRI). L'étude des

mouvements de volailles depuis les provinces jusqu'à Phnom Penh, en plus du suivi de volailles infectées et de la détection des virus de la grippe aviaire devraient nous aider à mieux comprendre comment le virus circule et se propage de la campagne à Phnom Penh.

C. INFECTIONS NEUROTROPIQUES

Le projet SEAE “South East Asia encephalitis” – Lutte contre les encéphalites infectieuses en Asie du Sud-Est

Des patients pédiatriques et adultes sont actuellement recrutés dans quatre pays, et un total de 1 500 patients devraient être inclus d'ici à deux ans. Les tests sont en cours et incluent des techniques moléculaires et sérologiques de pointe. Nous continuerons de réaliser des tests prospectifs et rétrospectifs de CSF, de sang, d'urine, de prélèvements et d'échantillons de peau. Dans les cas où aucun agent infectieux n'est identifié, les échantillons des patients seront soumis à un séquençage haut débit pour identifier les agents pathogènes encore inconnus. Des formations sont régulièrement dispensées par les centres nationaux au personnel hospitalier et toutes les informations sont répertoriées dans des bases de données, pour être traitées dans le cadre d'un programme d'assurance-qualité qui est suivi et évalué par un consortium international d'experts.

Enquête de la prévalence et du rôle de neutralisation et de facilitation des anticorps contre les maladies pied-main-bouche dans les pays à faible incidence et diversité virale/évolution des entérovirus responsables d'infections sévères

Unité de Virologie, chef d'équipe : P. Dussart

En avril 2012, une maladie mortelle non diagnostiquée avec atteinte neurologique et insuffisance respiratoire a été détectée à l'hôpital Kantha Bopha de Phnom Penh. La plupart des enfants concernés étaient âgés de moins de trois ans et venaient surtout du sud et du centre du pays. La plupart d'entre eux sont morts au bout d'un jour d'hospitalisation. L'entérovirus A71 (EV-A71) a été le microorganisme le plus souvent détecté chez ces patients. L'analyse génétique du gène VP1 a montré que les souches EV-A71 qui circulaient au Cambodge appartenaient au génotype C4a (Duong V et al., 2016). En 2016, grâce au système de surveillance mis en place à l'hôpital pour enfants Kantha Bopha, 56 échantillons biologiques ont été collectés et analysés auprès de 15 patients qui présentaient différents types d'encéphalites, avec ou sans œdème pulmonaire. Parmi ces patients, nous n'avons détecté qu'un cas d'infection à EV-A71 et deux infections à d'autres types d'entérovirus.

Nous continuerons à surveiller la circulation du virus en adaptant notre étude sur les points de prévalence au sein des populations, si nécessaire. Nous étudierons également la variation génétique des souches d'entérovirus, afin de déterminer le rôle de la pathogenèse virale dans la gravité de la maladie et l'implication des facteurs immunologiques de l'hôte comme contributeur à la gravité de la maladie. Parallèlement à cette surveillance hospitalière menée à Phnom Penh, l'IPC travaille également avec l'Institut Pasteur de Paris sur l'évaluation d'un risque épidémique pour les populations exposées aux virus EV-A71, en comparant les caractéristiques des souches africaines avec celles des souches circulant en Asie du Sud-Est.

Partenaires : Institut Pasteur de Paris, Institut Pasteur de Shanghai.

Soutien financier: Fondation Total.

D. ZOONOSES

PREDICT 2

L'Unité de Virologie de l'IPC continuera à collaborer avec les autorités cambodgiennes et à mener des missions de terrain pour récolter des échantillons, à raison de deux fois par an (pendant la saison sèche et la saison des pluies) dans la province de Kandal, pour documenter l'interface Hommes - bétail - rats et dans la province de Kampong Cham, pour étudier l'interface Hommes – bétail - chauves-souris.

Depuis 2014, des milliers d'échantillons ont déjà été collectés et testés à l'IPC pour 10 familles de virus, dont les Togaviridae/Alphavirus, Coronavirus, Filoviridae, Flavivirus, Hantavirus, virus de la grippe A, Rhabdoviridae, Paramyxoviridae, Picornaviridae et Bunyaviridae.

Le projet LACANET : Réseau de Surveillance et de Laboratoires « One Health »

Durant la saison sèche de 2017, les chercheurs du projet LACANET seront de nouveau sur le terrain, au Cambodge, pour effectuer ce qui sera la dernière étude de terrain sur le changement d'utilisation des sols. En vue d'assurer un suivi efficace de l'étude de terrain menée pendant la saison des pluies de 2016, l'étude de terrain de la saison sèche de 2017 se déroulera sur les quatre mêmes sites. Sur chaque site, les rongeurs et petits mammifères seront capturés, marqués et échantillonnés avant d'être relâchés, afin d'étudier l'écologie de la faune sauvage en fonction des niveaux de dégradation de la forêt, ainsi que l'impact sur les agents pathogènes zoonotiques portés par ces rongeurs. Le projet LACANET étant également fortement engagé dans le renforcement des capacités locales, les chercheurs seniors profiteront, une fois de plus, de cette précieuse occasion pour former de nouveaux groupes d'étudiants cambodgiens durant toute la saison de terrain.

Développement d'outils permettant d'étudier les nouveaux mammarenavirus transmis par les rongeurs et détectés au Cambodge

Suite à l'infection réussie en laboratoire d'un *Rattus norvegicus* avec une variante du virus Wēnzhōu (WENV), nous allons effectuer des essais de culture en 2017, avec des lignées cellulaires provenant de la même espèce. En outre, l'infection sera effectuée à l'aide d'un virus obtenu à partir de rats sauvages capturés. Le WENV récupéré à partir de la culture cellulaire servira au développement d'une méthode de quantification du virus, qui sera appliquée à l'étude sérologique chez les Hommes et les populations de faune sauvage, qui nous permettra d'étudier la propagation de ce virus zoonotique plus en détails.

3.6.4 SOUTIEN AUX AUTORITES NATIONALES

Surveillance nationale de la dengue au Cambodge

Dans le cadre d'une collaboration avec l'OMS et le Programme national de Lutte contre la Dengue (NDCP), et dans le cadre d'un programme national de lutte contre les épidémies, le laboratoire de l'Unité de Virologie a reçu en 2016 des échantillons provenant de six hôpitaux provinciaux et de l'hôpital national pédiatrique de Phnom Penh. Ces sites de surveillance sont situés dans des zones présentant un risque élevé de fièvre hémorragique de la dengue (forte densité de population, présence du vecteur, histoire de la dengue dans la région). Chaque semaine, les résultats de la surveillance des syndromes hémorragiques sont communiqués aux différents participants au programme de surveillance (Directeur du NDCP, médecins hospitaliers, etc.).

Contrairement aux années précédentes, où le DENV-1 a été le principal sérotype de dengue détecté entre 2011 et 2015, l'année 2016 a été marquée par une détection accrue du DENV-2 au Cambodge. Le DENV-3 n'a pas du tout été détecté, tandis que des cas sporadiques de DENV-4 ont été diagnostiqués. Il convient de sérieusement surveiller la circulation du DENV-2 au cours des prochaines années, car une faible immunité collective de la population cambodgienne pourrait être un facteur de risque d'émergence de la maladie, ce qui pourrait entraîner une importante épidémie de dengue. Enfin, en 2016, sur les 12 843 cas d'hospitalisation, 18 décès ont été signalés dans tout le pays.

Surveillance des virus de la grippe au Cambodge

- ***Surveillance des virus de la grippe humaine saisonnière au Cambodge***

L'Unité de Virologie de l'IPC est le centre national de la grippe (NIC) du Cambodge depuis 2006. L'Unité de Virologie de l'IPC a aussi été désignée par l'OMS en octobre 2014 comme laboratoire de référence H5 du système mondial de surveillance et d'intervention contre la grippe (GISRS).

La surveillance des maladies de type grippe, établie en 2006, en collaboration avec le Ministère de la Santé et l'OMS, permet de récolter des souches et des données sur la saisonnalité. Sur la base de ces informations, notre centre national de la grippe fournit des recommandations annuelles au Ministère de la Santé concernant la stratégie vaccinale contre la grippe et l'utilisation de médicaments antiviraux dans le traitement des cas sévères. Les caractéristiques de la circulation et de l'évolution du virus de la grippe ont été décrites dans un rapport récemment publié, qui s'appuie sur des données cambodgiennes récoltées de 2009 à 2011 (HORM SV et al., 2014). Le centre national de la grippe fait partie du Système mondial de Surveillance et d'Intervention contre la Grippe (GISRS). Depuis janvier 2013, l'Unité de Virologie a conservé son rôle de centre national de la grippe, mais a commencé à confier des tests de confirmation de deuxième ligne d'échantillons de maladies de type grippe à l'Institut national de Santé publique/US CDC, l'Unité de Recherche médicale navale des Etats-Unis-2 (NAMRU-2) et à l'Institut de recherche des Forces armées sur les Sciences médicales (AFRIMS).

Contrairement à 2014 et 2015, la saisonnalité de la circulation de la grippe au Cambodge en 2016 était habituelle et s'est étendue de juillet à décembre, avec une forte circulation entre les mois de septembre et octobre. En 2016, nous avons observé une circulation de la grippe A(H1N1)pdm09 et de la grippe B (principalement B/Victoria), qui a souvent été détectée entre mai et août, avec un pic en juillet. La circulation de la grippe A(H3N2) n'a été observée qu'au deuxième semestre de 2016.

- **Surveillance des infections respiratoires aiguës chez l'Homme**

Afin de surveiller les infections de grippe aviaire chez les Hommes, nous avons établi un partenariat avec les hôpitaux Kantha Bopha, et examinons les échantillons collectés auprès de patients pédiatriques atteints d'infections respiratoires aiguës sévères, en vue de conduire une surveillance des infections de grippe aviaire ou de l'introduction de virus exotiques émergents, tels que le coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient (MERS-CoV). En outre, nous utilisons également ces échantillons pour rechercher d'éventuelles souches de grippe saisonnière (A/H1N1)pdm09, A(H3N2) et grippe B, afin de surveiller des modifications inhabituelles dans la circulation de ces virus. Nous avons aussi recherché des gènes de la grippe M, H5, H7, N1 et N9 (H5N1 et H7N9) et MERS-CoV à l'aide de tests RT-PCR en temps réel.

Dans le cadre du système national de surveillance A(H5N1) de 2016, 218 échantillons ont été reçus et testés, après avoir été collectés auprès de 159 patients qui présentaient des infections respiratoires aiguës sévères d'origine de grippe aviaire. Aucun des échantillons soumis n'était positif aux gripes A(H5N1), A(H7N9), ni au MERS-CoV. Cependant, depuis avril 2016, nous observons une augmentation accrue du nombre de cas d'infections respiratoires aiguës sévères, testées positives à la grippe A(H1N1)pdm09. Au cours de l'année 2016, 43 sur 159 patients (27%) ont été testés positifs à ce virus, et l'un d'entre eux avait une co-infection de A(H1N1)pdm et A(H3N2), 4 sur 159 patients (2,5%) ont été testés positif au virus A(H3N2) et 1 patient (0,6%) était positif à la grippe B. En comparaison, à la même période en 2015, nous avons répertorié 5 cas sur 84 (5,9%) de cas sévères de grippe saisonnière, tandis que nous avons enregistré 13 cas sur 151 (8,6%) en 2014. Un total de 24 cas de A(H1N1)pdm09 détectés parmi les cas d'infections respiratoires aiguës sévères, en 2016, ont été sélectionnés et envoyés au centre collaborateur de l'OMS de Melbourne, pour une caractérisation des souches plus poussée.

Diagnostic des infections de la rage

L'Unité de Virologie de l'IPC participe au diagnostic d'infections de la rage en utilisant des anticorps anti-nucléoprotéines spécifiques du virus de la rage couplés à la fluorescéine (Essai d'Anticorps par Fluorescence directe - FAT) depuis environ vingt ans. Ce test est régulièrement effectué sur des échantillons frais de la corne d'Ammon ou de cerveau. Lorsque ce test de diagnostic de première intention est négatif, une RT-PCR emboîtée peut également être réalisée sur des cerveaux en état de putréfaction avancé. L'Unité de Virologie dispose également du test d'infection de cultures de tissus par la rage (RTCIT).

En 2016, l'Unité de Virologie a reçu 157 échantillons de cerveau de chiens, ce qui représente une diminution de 15% par rapport à 2015. Le taux de positivité observé est resté stable, avec 50,3% d'échantillons de cerveau de chiens infectés par le virus de la rage (n=79). Le pourcentage moyen de têtes de chien testées positives de 2002 à 2016 était de 50%. La rage reste une préoccupation majeure en matière de santé publique au Cambodge.

3.6.5 ENSEIGNEMENT ET FORMATIONS

L'une des principales missions de l'IPC est de contribuer aux activités d'enseignement et de formation. L'Unité de Virologie a eu un rôle proactif dans la formation de techniciens de laboratoire des institutions partenaires, dans les domaines de la surveillance et de la recherche, menés aux niveaux national et régional. En 2016, 28 membres des pays voisins ont pu améliorer leurs compétences grâce à des formations dans les domaines des techniques de laboratoire en biologie moléculaire et diagnostic sérologique en virologie. Le développement des compétences du personnel de l'IPC reste également une priorité. C'est la raison pour laquelle plus de 30 employés de l'IPC (dont la majorité était issus de l'Unité de Virologie) ont suivi différents types de formation, cours et/ou d'ateliers organisés à l'IPC par des scientifiques de l'IPC ou organisés aux niveaux régional et international. Enfin, l'Unité de Virologie a également accueilli cinq étudiants étrangers (trois étudiants de Master et deux doctorants), ainsi que dix étudiants cambodgiens (cinq étudiants en Pharmacie, deux en Médecine vétérinaire et deux en Techniques de laboratoire). Notre objectif est maintenant d'accueillir davantage d'étudiants des universités cambodgiennes, dans le but d'identifier des étudiants cambodgiens qui auraient le potentiel de poursuivre leurs études jusqu'au niveau doctorat, dans les domaines de la virologie et de la microbiologie.

3.6.6 LISTE DES PUBLICATIONS (2016)

2015

1. Rith S, Chin S, Sar B, Y P, Horm SV, Ly S, Buchy P, Dussart P, Horwood PF. Natural co-infection of influenza A/H3N2 and A/H1N1pdm09 viruses resulting in a reassortant A/H3N2 virus with an NS gene originating from A/H1N1pdm09. *J Clin Virol*. 2015; 73: 108-111. dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2015.11.008.
2. Horwood PF, Buchy P. 2015. Chikungunya fever. *OIE Scientific and Technical Review*. 34(2): 479-489.
3. Katzelnick LC, Fonville JM, Gromowski GD, James SL, Pierson TC, Buchy P, Harris E, Aaskov JG, Muñoz-Jordán JL, Vasilakis N, Gibbons RV, Tesh RB, VanBlargan LA, Russell CA, Osterhaus ADME, Fouchier RAM, Simmons CP, Holmes EC, Whitehead SS, Smith DJ. Dengue viruses cluster antigenically but not as discrete serotypes. *Science*. 2015 Sep 18; 349 (6254): 1338-43. doi: 10.1126/science.aac5017.
4. Duong V, Lambrechts L, Paul R, Ly S, Lay SR, Long KC, Ngan C, Tarantola A, Scott TW, Sakuntabhai A, Buchy P. Asymptomatic humans transmit dengue virus to mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Nov 24;112 (47):14688-93. doi: 10.1073/pnas.1508114112. Epub 2015 Nov 9.
5. Andries AC, Duong V, Ly S, Cappelle J, Kim KS, Lorn Try P, Ros S, Ong S, Huy R, Horwood P, Flamand M, Sakuntabhai A, Tarantola A, Buchy P. Value of routine dengue diagnostic tests in urine and saliva specimens. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015 Sep 25;9(9):e0004100. doi: 10.1371/journal.pntd.0004100. eCollection 2015 Sep.
6. Rouvinski A, Guardado-Calvo P, Barba-Spaeth G, Duquerroy S, Vaney MC, Kikuti CM, Navarro Sanchez ME, Dejnirattisai W, Wongwiwat W, Haouz A, Girard-Blanc C, Petres S, Shepard WE, Desprès P, Arenzana-Seisdedos F, Dussart P, Mongkolsapaya J, Screaton GR, Rey FA. Recognition determinants of broadly neutralizing human antibodies against dengue viruses. *Nature*. 2015 Apr 2; 520 (7545): 109-13. doi: 10.1038/nature14130. Epub 2015 Jan 12.
7. Tarantola A, Mey C, Sek V, Ly S, Haener C, Chhor N, Meng U, Ly S, Fontenille D, Dussart P. A confirmed rabies case in a French resident in Cambodia, June 2015. *J travel Med*. 2016. 23(2). pii: tav012. Print 2016 Feb.
8. Mey C, Metlin A, Duong V, Ong S, In S, Horwood PF, Reynes JM, Bourhy H, Tarantola A, Buchy P. Evidence of two distinct phylogenetic lineages of dog rabies virus circulating in Cambodia. *Infect Genet Evol*. 2015 Dec 15;38:55-61. doi: 10.1016/j.meegid.2015.12.011.

2016

1. Horm SV, Tarantola A, Rith S, Ly S, Gambaretti J, Duong V, Y P, Sorn S, Holl D, Allal L, Kalpravidh W, Dussart P, Horwood PF, Buchy P. Intense circulation of A/H5N1 and other avian influenza viruses in Cambodian live bird markets with serological evidence of sub-clinical human infections. *Emerg Microbes Infect*. 2016 Jul 20; 5 (7):e70. doi: 10.1038/emi.2016.69.
2. Timmermans A, Melendrez MC, Se Y, Chuang I, Samon N, Uthaimongkol N, Klungthong C, Manasatienkij W, Thaisomboonsuk B, Tyner SD, Rith S, Horm VS, Jarman RG, Bethell D, Chanarat N, Pavlin J, Wongstitwairoong T, Saingam P, El BS, Fukuda MM, Touch S, Sovann L, Fernandez S, Buchy P, Chanthap L, Saunders D. Human Sentinel Surveillance of Influenza and Other Respiratory Viral Pathogens in Border Areas of Western Cambodia. *PLoS One*. 2016 Mar 30; 11(3):e0152529. doi: 10.1371/journal.pone.0152529.
3. Saha S, Chadha M, Shu Y, Lijie W, Chittaganpitch M, Waicharoen S, Lindblade KA, Phengta V, Phonekeo D, Corwin A, Touch S, Buchy P, Lin R, Low C, Kheong CC, Yusof AB, Tandoc A 3rd, Roque V Jr, Arguelles V, Dawood FS, Moen A,

- Widdowson MA, Cox NJ, Lal RB. 2016. Divergent seasonal patterns of influenza types A and B across latitude gradient in Tropical Asia. *Influenza Other Respir Viruses*. 10(3):176-84.
4. Andries AC, Duong V, Cappelle J, Ong S, Kerleguer A, Ly S, Tarantola A, Horwood PF, Sakuntabhai A, Dussart P, Buchy P. *Int J Infect Dis*. 2016 Dec 28. pii: S1201-9712(16)31667-8. doi: 10.1016/j.ijid.2016.12.022.
 5. Duong V, Dussart P, Buchy P. Zika virus in Asia. *Int J Infect Dis*. 2016 Dec 6. pii: S1201-9712(16)31640-X. doi: 10.1016/j.ijid.2016.11.420. Review.
 6. Cavailler P, Tarantola A, Leo YS, Lover AA, Rachline A, Duch M, Huy R, Quake AL, Kdan Y, Duong V, Brett JL, Buchy P. Early diagnosis of dengue disease severity in a resource-limited Asian country. *BMC Infect Dis*. 2016 Sep 26; 16(1):512.
 7. Andries AC, Duong V, Ong S, Ros S, Sakuntabhai A, Horwood P, Dussart P, Buchy P. Evaluation of the performances of six commercial kits designed for dengue NS1 and anti-dengue IgM, IgG and IgA detection in urine and saliva clinical specimens. *BMC Infect. Dis*. 2016. May 16; 16(1):201. doi: 10.1186/s12879-016-1551-x.
 8. Galatas B, Ly S, Duong V, Nguon K, Chan S, Baisley K, Huy R, Ly S, Sorn S, Som L, Buchy P, Tarantola A. Long-lasting immune protection and other epidemiological findings after Chikungunya emergence in a Cambodian rural community, April 2012. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016 Jan 11; 10(1):e0004281. doi: 10.1371/journal.pntd.0004281.
 9. Duong V, Mey C, Eloit M, Zhu H, Danet L, Huang Z, Zou G, Tarantola A, Cheval J, Perot P, Laurent D, Richner B, Ky S, Heng S, Touch S, Sovann L, van Doorn R, Tan Tran T, Farrar JJ, Wentworth DE, Das SR, Stockwell TB, Manuguerra JC, Delpeyroux F, Guan Y, Altmeyer R, Buchy P. Molecular epidemiology of human enterovirus 71 at the origin of an epidemic of fatal hand, foot and mouth disease cases in Cambodia. *Emerg Microbes Infect*. 2016 Sep 21;5(9):e104. doi: 10.1038/emi.2016.101.
 10. Horwood PF, Andronico A, Tarantola A, Salje H, Duong V, Mey C, Ly S, Dussart P, Cauchemez S, Buchy P. Seroepidemiology of human enterovirus 71 infection among Cambodian children. *Emerg Infect Dis*. 2016. 22(1): 92-5. Doi: 10.3201/eid2201.151223.
 11. Duong V, Tarantola A, Ong S, Mey C, Choeung R, Ly S, Bourhy H, Dussart P, Buchy P. Laboratory diagnostics in dog-mediated rabies – an overview of performance and a proposed strategy for various settings. *Int J Infect Dis*. 2016 Mar 19. pii: S1201-9712(16)31003-7. doi: 10.1016/j.ijid.2016.03.016.
 12. Lacroix A, Duong V, Hul V, Sorn S, Hull D, Omaliss K, Chea S, Hassanin A, Theppangna W, Silithammavong S, Khamvavong K, Singhalath S, Afelt A, Grotorex Z, Fine AE, Goldstein T, Olson S, Joly DO, Keatts L, Dussart P, Frutos R, Buchy P. Genetic diversity of coronaviruses in bats in Lao PDR and Cambodia. *Infect Genet Evol*. 2016 Dec 5. pii: S1567-1348(16)30513-5. doi: 10.1016/j.meegid.2016.11.029. [Epub ahead of print].
 13. Lacroix A, Duong V, Hul V, Sorn S, Holl D, Omaliss K, Chea S, Hassanin A, Theppangna W, Silithammavong S, Khamvavong K, Singhalath S, Afelt A, Fine A, Goldstein T, Olson S, Joly D, Grotorex A, Keatts L, Dussart P, Frutos R, Buchy P. Diversity of bat astroviruses in Lao PDR and Cambodia. *Infect Genet Evol*. 2016 Nov 15; 47:41-50. doi: 10.1016/j.meegid.2016.11.013. [Epub ahead of print].
 14. Cappelle J, Duong V, Pring L, Kong L, Yakovlev M, Prasetyo DB, Peng B, Choeung R, Duboz R, Ong S, Sorn S, Dussart P, Tarantola A, Buchy P, Chevalier V. Intensive circulation of Japanese Encephalitis virus in peri-urban sentinel pigs near Phnom Penh, Cambodia. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016 Dec 7; 10(12):e0005149. doi: 10.1371/journal.pntd.0005149.
 15. Duong V, Blasdel KR, Eloit M, Chretien F, Ly S, Hul V, Deubel V, Morand S, Buchy P. Evidence of human infection by a new mammarenavirus endemic to Southeastern Asia. *Elife*. 2016 Jun 9;5. pii: e13135. doi: 0.7554/eLife.13135.

3.7 ENTOMOLOGIE MEDICALE

Cette plateforme a été créée en 2016.

3.7.1 STRUCTURE FONCTIONNELLE DE L'UNITÉ

La Plateforme d'Entomologie médicale a été créée le 15 septembre 2016 (N/Réf : N°295/IPC/DIR/2016). Elle est dirigée par Dr. Sébastien BOYER, sous la supervision de Dr. Didier FONTENILLE. La plateforme accueille l'Unité d'Epidémiologie moléculaire du Paludisme (Dr. Amélie VANTAUX) et l'Unité de Virologie (Dr. Veasna DUONG).

En 2016, cette unité comptait 2 membres : Dr. Sébastien BOYER, chef d'unité et Mme. Sony YEAN, étudiante en deuxième année de Master et technicienne de laboratoire. La Plateforme d'Entomologie médicale a l'intention de recruter 3 techniciens en 2017, par le biais des projets Ecomore2 et Zikalliance.

3.7.2 PROGRAMMES DE RECHERCHE – PRINCIPALES RÉALISATIONS EN 2016

Projet LACANET ; projet ComAcross

Ces 2 projets visent (en partie) à documenter la charge et la transmission du virus de l'encéphalite japonaise (projet SEAE, porteur de projet : Dr. Philippe DUSSART, Unité de Virologie et projet ComAcross, porteur de projet : Dr. Véronique CHEVALIER, Unité d'Epidémiologie et Santé publique). Nous avons principalement axé nos recherches sur la diversité, les dynamiques et l'implication des vecteurs potentiels dans la transmission de l'encéphalite japonaise (essentiellement *Culex*), à Kandal et Ta Khmau, près de Phnom Penh. Nous avons également testé des moustiques sauvages, collectés dans les provinces de Monduliri et Kompong Thom, pour les arbovirus.

Projet Ecomore

L'un des objectifs du projet Ecomore était d'améliorer le suivi de l'émergence des maladies (en utilisant le Chikungunya et la Dengue comme « proxys »), ainsi que la progression de ces maladies par rapport aux dynamiques démographiques humaines et aux modes de transport. Les activités entomologiques concernent la tentative de développement d'un outil d'alerte précoce qui permet d'évaluer la variation de la « masse biologique » des moustiques (y compris les moustiques *Aedes*), tout en tenant compte des données météorologiques.

Résistances aux insecticides

La Plateforme d'Entomologie médicale, en collaboration avec l'ONG Malaria- Consortium, a étudié le statut de résistance aux insecticides du principal vecteur du virus de la dengue, l'*Aedes aegypti*. Les insecticides testés étaient le tétraméthos (larvicide), la perméthrine et la deltaméthrine (adulticide). Nous avons démontré qu'*Aedes aegypti* (4 populations) étaient résistants aux trois insecticides actuellement utilisés au Cambodge. Les résultats ont été communiqués au Ministère de la Santé (CNM : Centre national de la Parasitologie, Entomologie et Lutte contre le Paludisme).

Ces résultats ont également été présentés lors de 4 conférences nationales/internationales :

- 23 novembre 2016 : Réunion Vectoland, conséquences des changements d'utilisation des sols et changements climatiques sur les moustiques vectoriels et les structures de communautés, Institut Pasteur du Cambodge, Phnom Penh
- 1^{er} décembre 2016 : Gestion intégrée du vecteur de la dengue : Atelier sur la communication des résultats et l'adoption des politiques, Phnom Penh Hotel, Phnom Penh

- 05 décembre 2016 : Réunion Ecomore, Amélioration de la surveillance de l'émergence et de la progression des maladies liées aux nouvelles dynamiques démographiques humaines et aux moyens de transport, Royal Raffles Hotel, Phnom Penh
- 13 décembre 2016 : Symposium de recherche opérationnelle sur les vecteurs de maladies au Cambodge, Université royale de Phnom Penh, Phnom Penh

3.7.3 PROGRAMMATION SCIENTIFIQUE 2017

Projet ComAcross

Le virus de l'encéphalite japonaise (JEV) demeure la principale cause d'encéphalites aiguës en Asie de l'Est et du Sud. Le *Culex tritaeniorhynchus* est le principal vecteur d'encéphalite japonaise dans les milieux ruraux, suivi du *Culex vishnui* et du *Culex gelidus*, alors que les espèces anthropophiles, comme le *Culex quiquefasciatus*, semblent être plus impliquées dans les transmissions en milieux urbains et périurbains. Les porcs sont les principaux hôtes amplificateurs et les oiseaux *Ardeidae* constituent le principal réservoir sauvage. Cependant, une récente étude expérimentale a montré que de jeunes poussins et canetons pouvaient développer une virémie suffisamment élevée pour permettre la transmission du virus aux moustiques. Bien que l'encéphalite japonaise soit toujours considérée comme une maladie rurale, plusieurs études menées au Cambodge, en Thaïlande et au Vietnam ont détecté l'encéphalite japonaise et ses vecteurs dans des zones périurbaines. Il reste encore beaucoup à apprendre sur l'épidémiologie complexe de l'encéphalite japonaise. Les habitudes alimentaires des moustiques sont un paramètre clé qui peut nous permettre d'améliorer notre compréhension de cette épidémiologie. L'objectif de ce travail est d'analyser le comportement alimentaire des principaux vecteurs d'encéphalite japonaise en milieu rural et périurbain, au Cambodge, en utilisant deux méthodologies : des pièges appâtés et une analyse par PCR des échantillons de sang destinés à l'alimentation des moustiques.

Les deux résultats escomptés sont 1) L'analyse des habitudes alimentaires des principales espèces de vecteurs d'encéphalite japonaise dans les régions rurales et périurbaines du Cambodge et 2) La vérification des hypothèses faites sur le rôle épidémiologique respectif de ces espèces de moustiques dans la transmission de l'encéphalite japonaise et sur le rôle joué par les oiseaux domestiques dans le cycle épidémiologique de l'encéphalite japonaise au Cambodge.

Projet Zikalliance

ZIKAlliance est un projet de 3 ans financé par le programme Horizon 2020, pour la recherche et l'innovation de l'Union européenne, selon la convention de financement n° 734548. Ce consortium international regroupe 53 partenaires et vise à créer une alliance mondiale de lutte et de prévention des virus Zika. Le projet a trois objectifs principaux : 1) Déterminer l'impact des infections à virus Zika pendant la grossesse et des effets à court et moyen termes sur les nouveau-nés, 2) Retracer l'histoire naturelle des infections à virus Zika chez l'Homme et son environnement, dans un contexte de circulation d'autres arbovirus, et 3) créer une capacité générale de recherche en matière de préparation à de futures menaces épidémiques.

Dans ce contexte, notre objectif est à la fois de 1) former des scientifiques, au niveau local, qui soient capables de répondre à un tel problème et 2) étudier la diversité des vecteurs potentiels de ZIKV dans les zones sauvages (c'est-à-dire dans la forêt naturelle). L'idée est de vérifier si le cycle du ZIKV existe dans les zones naturelles et préservées, et de comprendre comment un échange pourrait survenir entre des zones naturelles et anthropisées.

Projet Ecomore 2 ; projet Panic

Le projet Ecomore 2 est financé par l'AFD (Agence française de Développement), tandis que le projet Panic est financé par l'ANR. L'objectif du projet, dans un contexte de développement, est de déterminer

si la gestion intégrée des vecteurs dans des zones localisées (ici les écoles) pourrait diminuer l'incidence de la fièvre dengue sur les populations des zones rurales et périurbaines. Dans les écoles participantes, nous procéderons à la destruction des sites de développement larvaires avec l'aide des élèves et de leurs enseignants, nous organiserons des animations scientifiques et utiliserons un insecticide bactérien (*Bacillus thuringiensis israelensis*), ainsi qu'un insecticide qui sera diffusé par les moustiques eux-mêmes (Pyriproxyfen). Le principal indicateur sera le nombre de cas de fièvre dengue dans les villages situés aux alentours des écoles. Nous pourrions ainsi définir si les méthodes utilisées dans la lutte antivectorielle focalisée sont efficaces et pourrions également décoder les principaux mécanismes anthropiques et/ou écologiques responsables de l'émergence des maladies infectieuses. La finalité du projet est de proposer une stratégie d'intervention que le Ministère de la Santé pourra appliquer.

3.7.4 SOUTIEN AUX AUTORITES NATIONALES

Les résultats et les données sur les vecteurs de la dengue résistants aux insecticides (aux teméphos et pyréthroïdes) ont été communiqués au CNM (Centre national de Parasitologie, Entomologie et Lutte contre le Paludisme) et nous avons déjà discuté des conséquences avec eux.

3.7.5 ENSEIGNEMENT ET FORMATIONS

Enseignement

La Plateforme d'Entomologie médicale accueille actuellement deux étudiants de Master 2.

Mme. Sony YEAN est une étudiante cambodgienne inscrite en Master 2 de Conservation de la Biodiversité à l'Université royale de Phnom Penh. Elle travaille sur la biodiversité et la densité relative de *Aedes aegypti* dans les écoles traitées et non traitées, dans le cadre du projet Ecomore2. La direction de son mémoire est assurée par Dr. Sebastien BOYER.

M. Kshitiz SHRESTHA est un étudiant népalais inscrit en Master 2 du projet InterRisk à l'Université Kasetsart (Bangkok, Thaïlande). Il travaille sur les habitudes alimentaires des vecteurs de l'encéphalite japonaise dans les zones rurales et périurbaines du Cambodge. Ses superviseurs de stage sont Dr. Véronique CHEVALIER et Dr. Sébastien BOYER.

Organisation d'une conférence internationale

VECTOLAND est une coopération ASEAN-UE dans les domaines des sciences, de la technologie et de l'innovation. Fondée par le projet SEA-EU-NET, ce réseau international de coopération scientifique vise à approfondir la coopération scientifique et technologique entre l'Europe et l'Asie du Sud-Est. La deuxième réunion a été organisée par la Plateforme d'Entomologie médicale de l'Institut Pasteur du Cambodge, à Phnom Penh, au Cambodge. Les principales préoccupations reflétées au travers des présentations et de l'atelier sont la propagation rapide de certaines espèces envahissantes (*Ae. albopictus* et Zika Virus), les difficultés de lutter contre le paludisme dans le Sud-Est de l'Inde (à cause des résistances aux traitements et aux insecticides, et à la gestion de ses résistances), la communication avec les autorités et les populations locales.

Cette réunion a été organisée en novembre 2016 et comprenait 24 présentations scientifiques internationales, regroupant 16 partenaires issus de 7 pays différents.

Formations

En 2016, un cours sur les méthodes utilisées dans l'étude de la résistance des moustiques aux insecticides a été organisé à l'Institut Pasteur du Cambodge. En 2017, nous prévoyons d'organiser un cours sur la taxonomie et l'identification des moustiques.

En 2016, une formation d'une semaine sur les méthodes utilisées par l'OMS dans l'étude sur les résistances aux insecticides a été organisée du 25 au 29 septembre 2016, et dispensée par le Dr. Stéphane DUCHON de l'IRD (Institut de Recherche pour le Développement), dans les locaux de la Plateforme d'Entomologie médicale. Les participants à cette formation comprenaient 4 techniciens de laboratoire et 1 chercheur scientifique de l'IPC, 3 techniciens et 1 étudiant en doctorat du Consortium sur le Paludisme, et 1 chercheur scientifique de NAMRU. À la suite de cette formation, une enquête sur les résistances a été effectuée (voir 3.1.2).

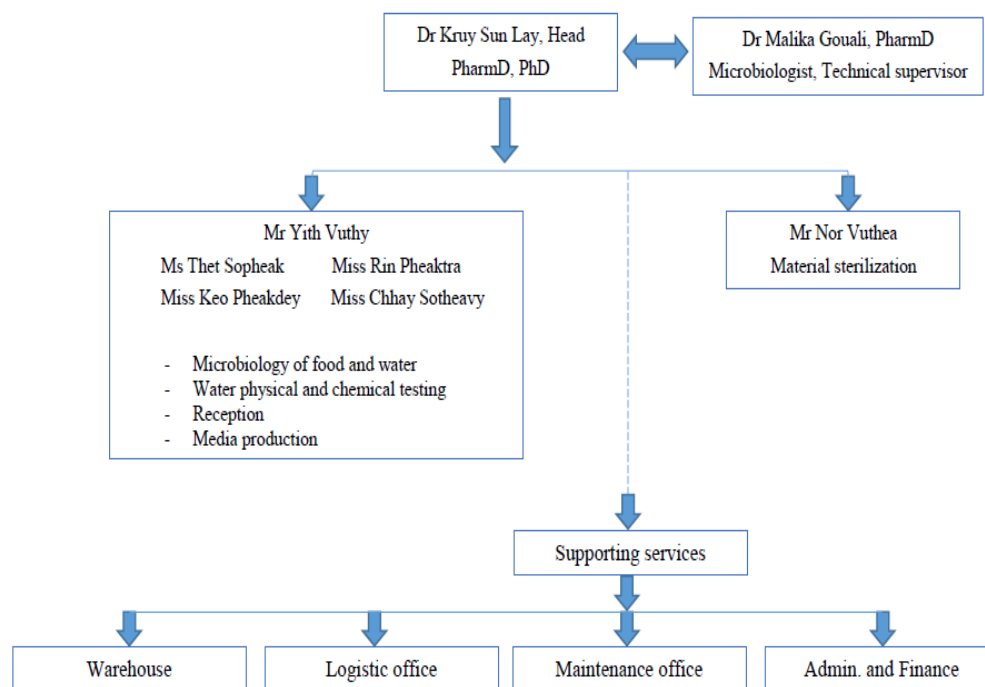
En 2017, la Plateforme d'Entomologie médicale a réussi à obtenir un fonds de formation auprès de l'Organisation mondiale de la Santé, afin de développer la systématique des moustiques au Cambodge. Le professeur Paul Rueda de la Smithsonian Institution viendra former des techniciens et scientifiques cambodgiens. Les partenaires invités/impliqués sont le Ministère de la Santé (CNM), l'Université royale de Phnom Penh, le Consortium sur le Paludisme, NAMRU et l'IPC.

3.7.6 LISTE DES PUBLICATIONS (2016)

S.O. (unité créée le 15 Septembre 2016)

3.8 LABORATOIRE DE SECURITE ALIMENTAIRE ET ENVIRONNEMENT

3.8.1 STRUCTURE FONCTIONNELLE DE L'UNITÉ



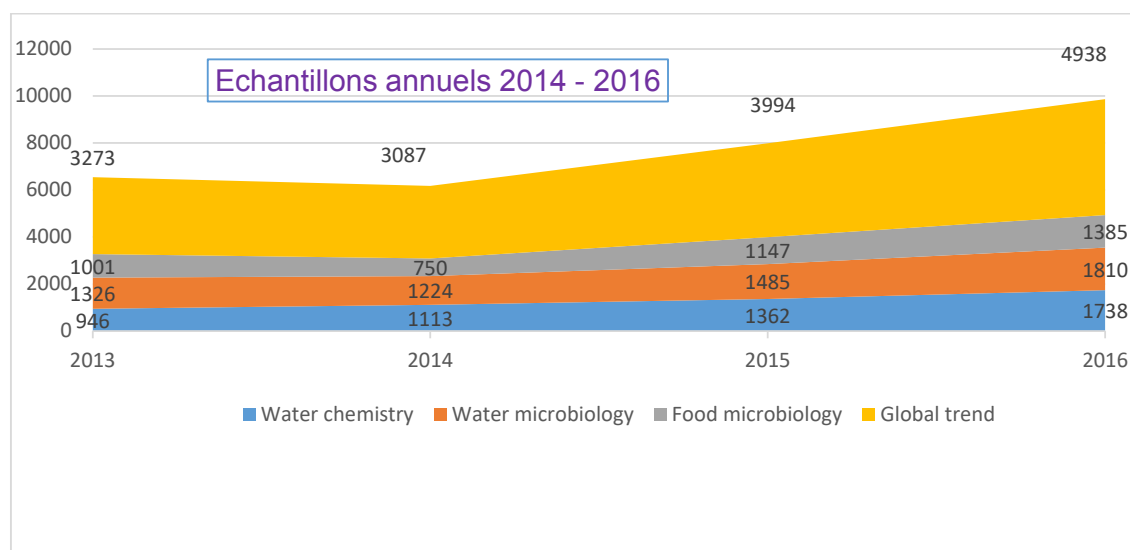
3.8.2 ACTIVITÉS COURANTES EN 2016

Depuis 2014-2016, nous avons noté une progression de 1 000 échantillons par an, avec une augmentation particulière de 27,6% pour la physico-chimie de l'eau, 21,9% pour la microbiologie de l'eau et 20,7% pour la microbiologie alimentaire.

Figure 1. Échantillons annuels (a) et paramètres totaux (b) de 2013 à 2016

	2013		2014		2015		2016	
	a	b	A	b	a	b	a	b
Analyses des eaux :								
Chimie	946	7.226	1.113	8.533	1.362	10.662	1.738	13.482
Microbiologie	1.326	8.176	1.224	8.521	1.485	10.435	1.810	11.151
Analyses des aliments :								
Microbiology	1.001	5.735	750	5.392	1.147	8.029	1.390	6467
Total	3.273	21.137	3.087	22.446	3.994	29.126	4.938	31.100

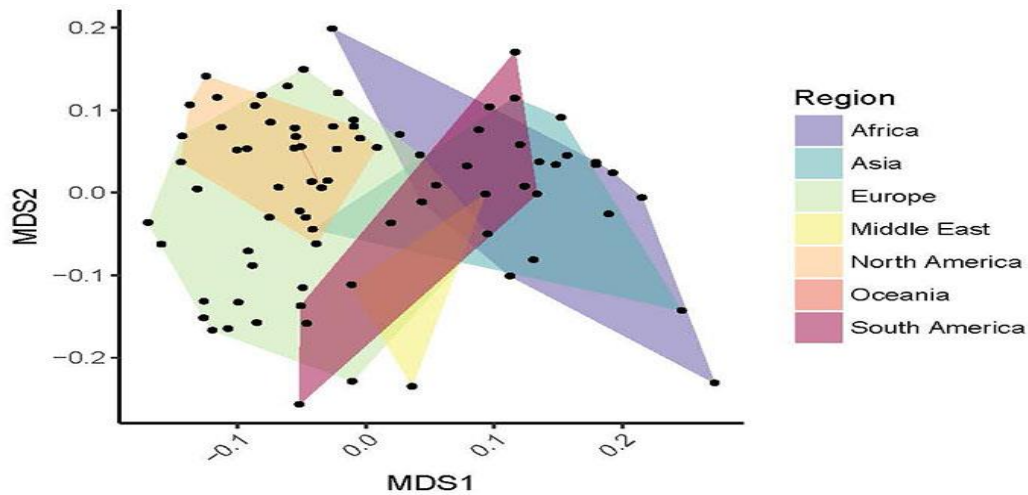
Figure 1. Progression des échantillons de 2014 à 2016



3.8.3 PRINCIPALES RÉALISATIONS EN 2016

1. Résultats préliminaires de la surveillance des eaux usées

Objectif : Une stratégie efficace de prévention et de lutte contre les maladies nécessite une détection rapide et une identification précise des agents pathogènes et des résistances aux antimicrobiens. Grâce à nos partenaires qui ont réalisé une analyse métagénomique de matériel génétique à l'aide du séquençage à haut débit, nous avons réussi à considérablement améliorer notre capacité à rapidement détecter les agents pathogènes émergents et les gènes de résistance aux antimicrobiens. Le projet pourrait être le début d'une surveillance globale des maladies infectieuses humaines, y compris des résistances aux antimicrobiens détectées dans les eaux usées des principales villes du monde, afin de détecter, lutter, empêcher et prévenir les maladies infectieuses humaines. Le projet est actuellement dans la phase analytique de la surveillance des maladies infectieuses et des résistances aux antimicrobiens détectées dans les eaux usées, et prévoit l'interprétation de données de séquençage et de résidus issues de 80 échantillons récoltés dans 63 pays. Avec le soutien du réseau COMPARE et de l'OMS, notre projet mondial de surveillance des eaux usées a pu avancer dans la phase analytique, puisque nous interprétons actuellement les résultats. En 2017, l'Université technique du Danemark (DTU) interprétera toutes les données générées, quantifiera les gènes de résistance aux antimicrobiens, les données sur les résidus, les données épidémiologiques, ainsi que d'autres paramètres de santé qui pourraient expliquer les résultats.



Résultats préliminaires des types de résistances aux antimicrobiens et des gènes identifiés pour chacun des échantillons. (Données partenaires)

Figure 2. Ordination des résistances d'eaux usées mondiales. La matrice de comptage (gènes par échantillons) a été normalisée à l'aide de la transformation de Hellinger. Nous avons calculé les indices de dissimilarité de Bray-Curtis entre tous les échantillons, calculé et analysé les coordonnées principales (PCoA), pour projeter les données, afin que les distances atteignent des valeurs similaires aux dissimilarités entre les échantillons. Les échantillons tracés sont reliés par des enveloppes convexes, qui mettent en évidence les régions géographiques. (Données partenaires)

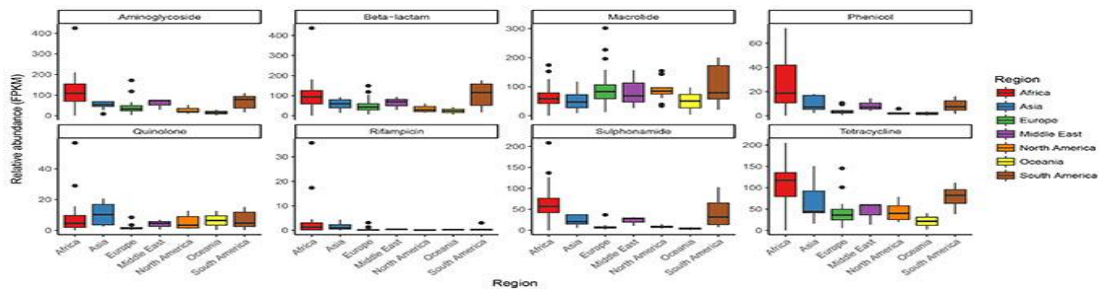
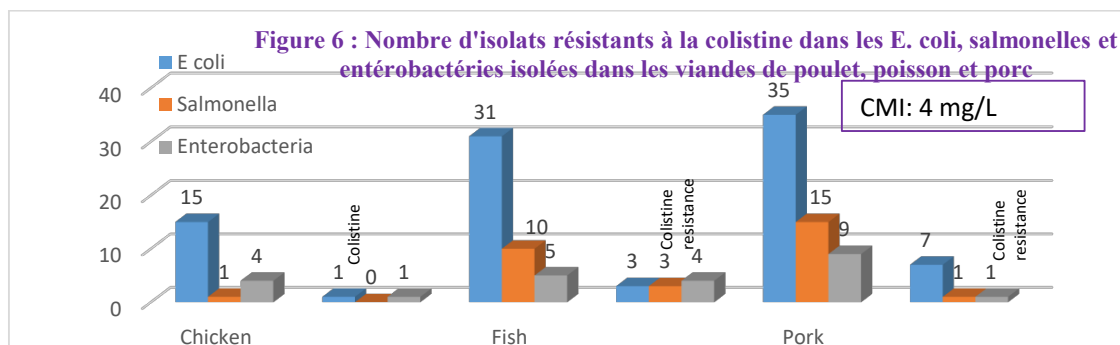


Figure 3. Diagramme en boîte des résistances mondiales des eaux usées selon les classes de médicaments et les régions. La matrice de comptage (gènes par échantillons) a été ajustée aux longueurs de gènes et aux profondeurs de séquençage des échantillons, afin que l'abondance relative (fragments par kilobase de référence par million de fragments, FPKM) soit obtenue. Les abondances de gènes des mêmes classes de médicaments ont été additionnées et indiquées dans les régions géographiques auxquelles elles se rapportaient. (Données partenaires)

Résultats préliminaires des résidus antimicrobiens identifiés pour chacun des échantillons.



Une prévalence de 6,7% d'*E. Coli* et 25% d'entérobactéries résistants à la colistine ont été observés dans des isolats de poulet. Une prévalence de 9,6% d'*E. Coli*, 30% de salmonelles et 80% d'entérobactéries résistants à la colistine ont été observées sur des souches isolées de poisson. Enfin, nous avons observé une prévalence de 20% d'*E. Coli*, 30% de salmonelles et 80% d'entérobactéries résistants à la colistine dans la viande de porc.

3.8.4 PROGRAMMATION SCIENTIFIQUE 2017

1. Prévalence d'entérobactéries productrices de bêtalactamases à spectre élargi (BLSE) chez des adultes en bonne santé, dans des aliments, dans des viandes animales destinées à la consommation et dans l'environnement au Cambodge.

Objectif : Déterminer la prévalence de bactéries résistantes aux antibiotiques, en particulier les entérobactéries productrices de bêtalactamases à spectre élargi (BLSE), dans des échantillons prélevés chez des adultes en bonne santé, sur des aliments, des viandes animales destinées à la consommation et dans l'environnement de certaines régions du Cambodge.

Méthode : Des échantillons de selles seront prélevés chez les employés d'une usine de produits alimentaires et produits alimentaires animaliers, sur des aliments frais et cuits destinés à être vendus sur les marchés. Nous ferons des prélèvements rectaux sur des porcs et des poulets en bonne santé, ainsi que de viande de porcs fraîchement abattus, d'échantillons d'eaux de canaux et bassins de fermes d'élevage de poissons et de crevettes. La sensibilité aux antibiotiques sera déterminée à l'aide de tests de diffusion sur disque ou de dilution d'agar. La production de bêtalactamases à spectre élargi (BLSE) sera testée à l'aide d'un test de diffusion à double disque.

2. Diffusion d'Escherichia Coli producteurs de Bêtalactamases à spectre élargi et AmpC Bêtalactamases dans le système de distribution alimentaire de Phnom Penh, au Cambodge

Objectif : Enquêter sur la diffusion d'*E. Coli* producteurs de BLSE/pAmpC dans le système de distribution alimentaire de Phnom Penh, au Cambodge, ainsi que sur la prévalence des souches d'*E. Coli* producteurs de BLSE/pAmpC dans la viande de poulet, de porc, de bœuf et de poisson/crevette obtenus sur des échantillons prélevés chez un grossiste et dans des supermarchés.

Méthode : Les phénotypes de BLSE ont été confirmés grâce au test de diffusion à double disque, et en utilisant de la cefotaxime et de la ceftazidime avec et sans acide clavulanique, selon les recommandations de l'Institut des Standards cliniques et des Laboratoires (CLSI). La sensibilité aux antibiotiques a été évaluée selon la méthode de diffusion sur disque, selon les normes de performance pour les tests de sensibilité aux antibiotiques développées par le CLSI. Les agents antibiotiques testés étaient constitués d'ampicilline, de céfoxitine, de céfotaxime, de ceftazidime, de meropenem, d'acide nalidixique, de ciprofloxacine, de streptomycine, de kanamycine, de gentamycine, de triméthoprim-

sulfaméthoxazole, de tétracycline, de chloramphénicol et de fosfomycine. La sensibilité des isolats d'*E. Coli* producteurs de BLSE/pAmpC à chaque agent antibiotique ont été classées comme sensibles, intermédiaires ou résistantes, selon les critères du CLSI.

3. Prévalence des contaminations par *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline (SARM) dans la viande de porc vendue au détail sur les marchés de Phnom Penh.

Objectif : L'étude soulève des inquiétudes quant au potentiel des aliments en tant que vecteur de transmissions du SARM. Les objectifs de cette étude sont de déterminer la prévalence des contaminations par le SARM dans la viande de porc vendue au détail au Cambodge, et de caractériser les isolats de SARM récoltés.

Méthode : Des côtes de porc, de la viande de porc hachée et des épaules de porc seront achetés sur différents étals de deux marchés de Phnom Penh, dans le cadre de la composante sur la surveillance active de la viande vendue au détail pour la surveillance sur les résistances aux antibiotiques, puis seront testés au laboratoire.

4. Diffusion généralisée d'*Escherichia coli* producteurs de β -lactamases à spectre élargi résistants aux antibiotiques dans les produits du bétail et de la pêche au Cambodge

Objectif : La diffusion généralisée d'*Escherichia coli* producteurs de β -lactamases à spectre élargi (BLSE) est une menace pour la santé publique. Les produits d'élevage étant des réservoirs potentiels de bactéries productrices de BLSE, la propagation de ces bactéries dans les aliments et les caractéristiques de ces organismes dans les produits alimentaires devraient être évalués pour mieux connaître les sources potentielles de contamination.

Méthode : Des échantillons de volaille, porc, crevette et poisson ont été collectés sur les marchés locaux d'une région rurale du Cambodge, de 2013 à 2014. Des *Escherichia coli* productrices de BLSE ont été isolées à partir de ces échantillons, et leurs génotypes de BLSE, groupes phylogénétiques et résistances aux antibiotiques ont été évalués. Nous avons recherché des gènes hébergeant des groupes CTX-M-1, CTX-M-9, et TEM dans les bactéries *E. coli* productrices de BLSE isolées sur des échantillons alimentaires. Nous avons ensuite évalué la prévalence d'*E. coli* producteurs de BLSE extrêmement et multi-résistants aux antibiotiques à au moins cinq classes d'antibiotiques dans des échantillons de volaille, porc, crevettes et poisson.

3.8.5 SOUTIEN AUX AUTORITES NATIONALES

L'IPC soutient depuis plusieurs années des laboratoires non médicaux au Cambodge, y compris le laboratoire national de santé publique, le laboratoire de sécurité des produits alimentaires et médicamenteux du Ministère de la Santé et du Ministère de l'Industrie et de l'Artisanat ; le laboratoire Camcontrol du Ministère du Commerce, le laboratoire national pour la recherche vétérinaire du Ministère de l'Agriculture, de la Pêche et des Forêts, ainsi que d'autres laboratoires du secteur privé.

3.8.6 ENSEIGNEMENT ET FORMATIONS

La responsable du laboratoire de sécurité alimentaire et environnement donne des cours d'immunologie à l'Université de Sciences de la Santé et à l'Université militaire de Médecine.

Un étudiant de l'Institut de Technologie du Cambodge, un étudiant de l'Université royale de Phnom Penh et un étudiant de l'Université royale d'Agriculture ont effectué un stage et ont écrit un rapport de stage

Huit étudiants de première et troisième années du Département de Chimie génétique et Ingénierie alimentaire de l'Institut de Technologie du Cambodge ont effectué un stage de deux mois.

Deux étudiants de troisième année de l'Ecole technique des Soins médicaux de l'Université des Sciences de la Santé ont effectué un stage de deux mois.

Huit étudiants de quatrième année de la Faculté de Pharmacie de l'Université des Sciences de la Santé ont effectué un stage de deux mois.

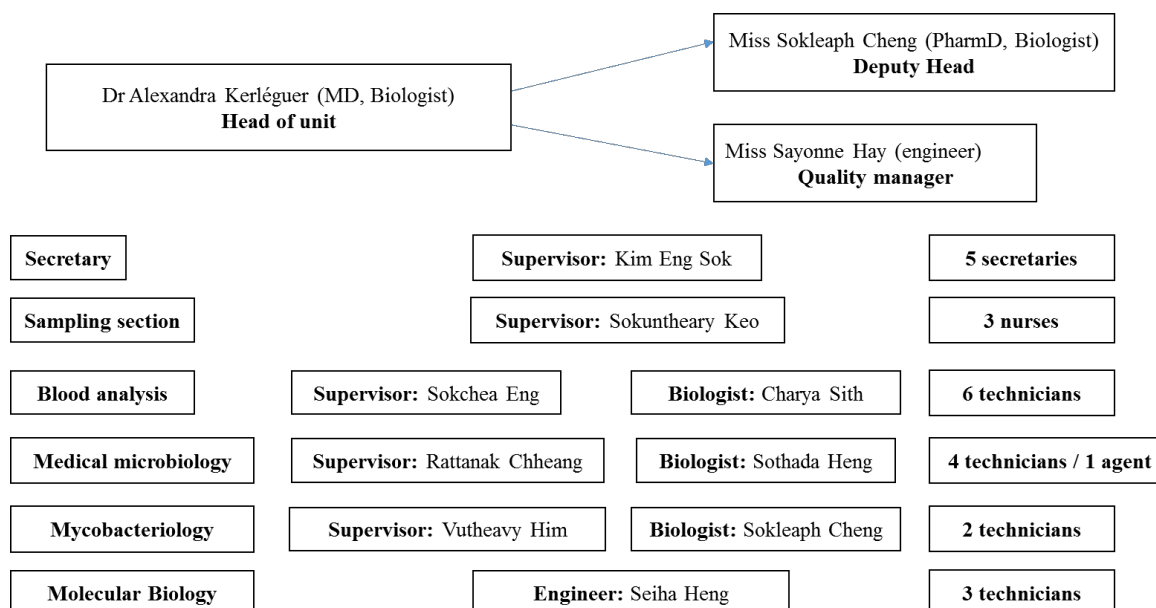
En 2016, membre du personnel a suivi des cours d'anglais à ACE (Australian Centre for Education), Phnom Penh.

3.8.7 LISTE DES PUBLICATIONS (2016)

1. Kruy Sun Lay, Vuthy Yith, Alexandra Kerleguer, Arnaud Tarantola, and Awa Aidara-Kane. submitted Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. and *Salmonella* subsp. isolated from poultry value chains and patients in Cambodia. Asian pacific Journal of tropical medicine.
2. YithVuthy, Kruy Sun Lay, Heng Seiha, Arnaud Tarantola, Awa Aidara-Kane. Antibiotic susceptibility and molecular characterization of resistance genes among *Escherichia coli* in markets and among *Salmonella* in chicken value chains. Submitted Journal of Veterinary Medicine Sciences.

3.9 UNITÉ DE LABORATOIRE DE BIOLOGIE MÉDICALE (INCLUANT LE COMPOSANT DE RECHERCHE : TUBERCULOSE ET RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES)

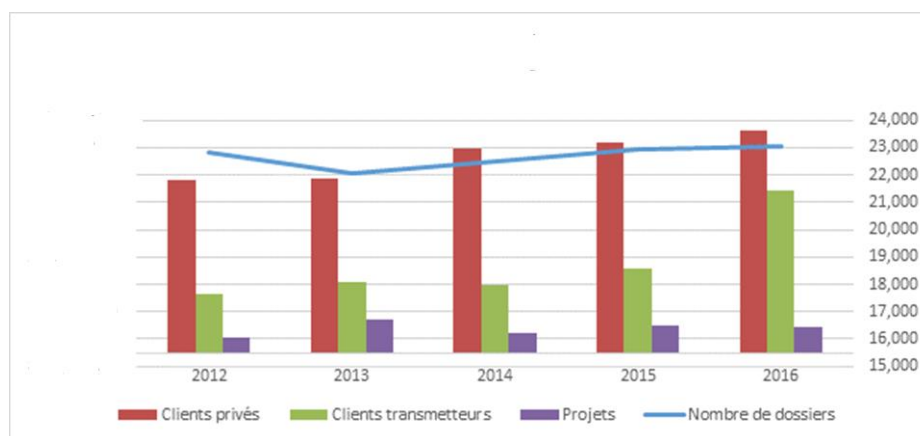
3.9.1 STRUCTURE FONCTIONNELLE DE L'UNITÉ



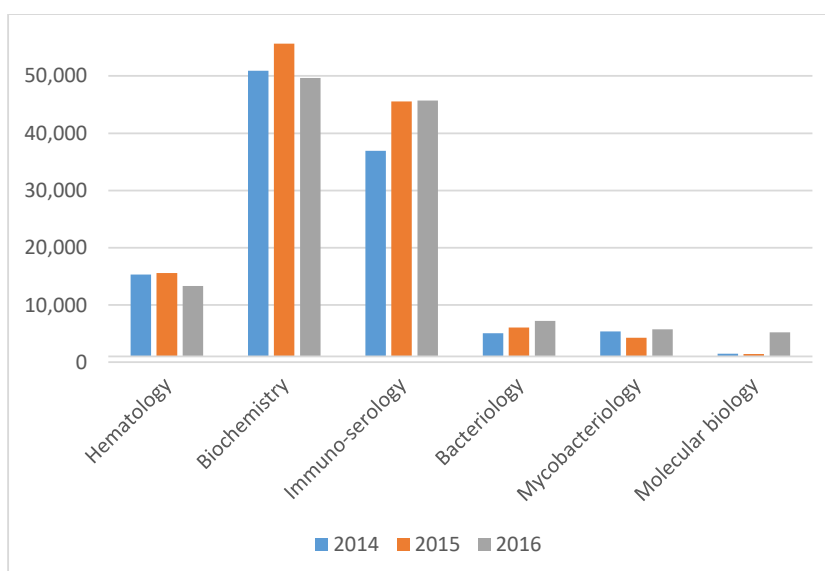
3.9.2 ACTIVITÉS COURANTES - PRINCIPALES RÉALISATIONS EN 2016

De 2012 à 2016, le nombre de dossiers de patients reçus est resté stable, de même que la proportion cambodgiens/étrangers.

Nombre de dossiers enregistrés			
Années	Cambodgiens ≠ 93 %	Etrangers ≠ 7 %	Total
2012	21 419	1 421	22 840
2013	20 371	1 686	22 057
2014	20 866	1 628	22 494
2015	21 489	1 476	22 965
2016	21 640	1 432	23 072



La plupart des analyses effectuées relevaient de la biochimie, puis de l'immuno-sérologie, de l'hématologie, de la bactériologie, de la mycobactériologie, puis de la biologie moléculaire.



Autres résultats ayant attiré à la santé publique

Dépistage du VIH

VIH	NEGATIFS		POSITIFS	TOTAL
	Initialement négatifs	Négatifs après contrôle		
	5720	16		
Nombre	5736		130	5866
%	97,5		2,5	

Dépistage du VHC

VHC	NEGATIFS	POSITIFS	TOTAL
Nombre	8004	1966	9970
%	80%	20%	

Diabète :

Diagnostic : Le diabète se définit par une glycémie à jeun supérieure à 1,26 g/L (7 mmol/L)

G	< 7 mmol/L	> 7 mmol/L	TOTAL
Nombre	3980	685	4665
%	85%	15%	

Suivi : l'hémoglobine glyquée (HbA1c) est un indicateur important dans le contrôle glycémique du diabète sucré. Afin de garantir de bons contrôles diabétiques, des cibles HbA1c de moins de 6,5 à 7% nous ont été proposées par diverses organisations.

HBA1C	< 7%	> 7%	TOTAL
Nombre	1445	381	1826
%	79%	21%	

Patients atteints de diabète mal maîtrisé : 21%

3.9.3 PROGRAMMES DE RECHERCHE – PRINCIPALES RÉALISATIONS EN 2016

Plusieurs projets de recherche sont menés en étroite collaboration avec les unités d'épidémiologie, du paludisme et de virologie (voir les rapports des autres unités pour plus de détails)

BIRDY-PEECNIC : Les infections résistantes aux antibiotiques chez les enfants des pays à faibles revenus

STATIS : Traitement antituberculeux empirique systématique vs. guidé par des examens chez les adultes infectés par le VIH et sévèrement immunodéprimés qui débutent un traitement antirétroviral avec des CD4 < 100/mm³ : l'essai randomisé contrôlé STATIS

PERILIC : Programmes de vaccination contre la coqueluche dans les pays à faibles et moyens revenus. L'objectif est d'améliorer nos connaissances sur la coqueluche chez les nourrissons (proportion, origine de la contamination, variabilité génétique des souches circulantes), ainsi que de la durée sur la protection induite par la vaccination contre la coqueluche chez les enfants âgés de moins de 15 ans et chez les personnes avec qui ils sont en contact.

Paludisme Déficit en G6PD, résistance à l'artémisinine

Effet de la génétique du *Mycobacterium tuberculosis* sur des résultats cliniques d'adultes co-infectés VIH/tuberculose et participant à l'essai CAMELIA (ANRS 1295 / CIPRA KH001)

L'étude sur les résistances aux antibiotiques en Asie du Sud-Est (LMI-DRISA) vise à évaluer l'étendue des résistances aux antibiotiques, y compris du *Mycobacterium tuberculosis* en Asie du Sud-Est, en collaboration avec l'UMR MIVEGEC (IRD, CNRS, Université de Montpellier), le Viêt Nam (NIHE, OUCRU, USTH) and le Laos (CICML) (sujet de thèse de doctorat de Mme. Cheng Sokleaph).

3.9.4 PROGRAMMATION SCIENTIFIQUE 2017

Application de la technologie des puces à ADN dans le développement de kits de diagnostics pour la détection rapide de la tuberculose résistante aux antibiotiques en Asie du Sud-Est Fondation pour les nouveaux Diagnostics innovants (FIND) et Hôpital Calmette. Début de l'étude : février 2017.

Aspergillose

La prévalence et le traitement des Aspergilloses au Cambodge (principalement *Aspergillus fumigatus*)

Début de l'étude : février 2017 en collaboration avec l'Institut Pasteur de Paris (IPP) et trois hôpitaux de Phnom Penh (Calmette, Kossamak et Amitié Khmère-Soviétique).

Résistances aux antibiotiques

En collaboration avec le laboratoire sur les antibiotiques du NIHE, dirigé par le Dr. Tran Huy Hoang.

Objectifs : Former deux membres du personnel du laboratoire d'analyses médicales de l'IPC au NIHE (Viêt Nam) aux techniques de PCR simple et multiplex pour détecter les gènes codant la BLSE (blaTEM, blaSHV, blaCTX).

Caractériser les plasmides porteurs de BLSE (CTX-M, SHV).

Électrophorèse sur gel en champ pulsé (ECP) pour caractériser les entérobactéries productrices de BLSE et déterminer leurs relations entre les établissements hospitaliers et les communautés de populations, pour faire une comparaison entre les pays.

Les analyses moléculaires préliminaires seront réalisées sur les premiers échantillons d'entérobactéries productrices de BLSE de l'IPC (*E. coli* and *K. pneumonia*), par ECP, MLST et Southern blot.

3.9.5 SOUTIEN AUX AUTORITES NATIONALES

- Surveillance des résistances aux antibiotiques avec le Centre pour le Contrôle et la Prévention des Maladies (CDC) du Ministère de la Santé du Cambodge
- Mise en place d'un contrôle de qualité et d'une politique nationale en laboratoire dans des institutions gérées par le Ministère de la Santé
- Participation à des Groupes de Travaux techniques avec le Centre national de Lutte contre la Tuberculose et la Lèpre (CENAT) : Tuberculose multi-résistante et laboratoire

3.9.6 ENSEIGNEMENT ET FORMATIONS

Thèse de D.E.S. des étudiants de l'Université des Sciences de la Santé du Cambodge

Étude sur les entérobactéries productrices de bêta-lactamase à spectre étendu à l'Institut Pasteur du Cambodge.

Bactéries productrices de carbapénémases, suivi évolutif à l'Institut Pasteur du Cambodge.

Etude moléculaire sur des souches de *Mycobacterium tuberculosis* multirésistantes au Cambodge. Étude des mutations des gènes liées à la résistance de *Mycobacterium tuberculosis* isolées chez des patients au Cambodge

Infections par le virus de l'hépatite E (VHE) au Cambodge : Les tendances temporelles dans les taux d'IgG anti-VHE chez les Hommes

Stages

Département de Technologies de laboratoire médical (étudiants en 3^{ème} année)

- Université de Puthisastra : 10 étudiants (1 mois)
- Ecole technique et Soins médicaux : 8 étudiants (1,5 mois)

D.E.S. de Biologie médicale

- Biochimie : 2 (3 mois)
- Bactériologie : 2 (3 mois)
- Hématologie : 1 (3 mois)

Etudiants en 4^{ème} année de Pharmacie

- Biochimie, Sérologie : 4 stagiaires (1 mois)

- Bactériologie : 4 stagiaire (1 mois)

Cours

- D.E.S. de Biologie
Virologie : 4 heures, Parasitologie : 18 heures
- Master 2 Pharmacologie clinique : 2 heures sur les résistances aux antibiotiques

Formation du personnel de laboratoire

DATE	INTITULE DE LA FORMATION	COMMENTAIRE	VISA
CHENG SOKLEAPH			
30/05-03/06 2016	Formation « MIRU-VNTR »	IPC	Lucie Contamin
11-16/04/2016	Methods in Epidemiologic, Clinical and Operations Research (MECOR), Level 2	Vietnam	ATS
01/09/-30/11/2016	Stage de thèse de sciences	Montpellier	AK
CHHEANG RATTANAK			
13-14/01/2016	Formation BactAlert	IPC	AK
HENG SEIHA			
30/05-03/06-2016	Formation « MIRU-VNTR »	IPC	Lucie Contamin
05/09-09/09/2016	Formation PCR gène de résistance	IPC	Lucie Contamin
HIM VUTHEAVY			
13-14/01/2016	Formation bact-alert (automate for blood culture)	IPC	BioMérieux
19/01/2016	Clinical reasoning for diagnosis and diseases	International University, PP	Cambodia-Japan Seminar
30/05-03-06/2016	MIRU-VNTR	IPC	Lucie Contamin
05/09-09/09-2016	PCR gène de résistance	IPC	Lucie Contamin
HOR SETHA			
01-08/05/2016	Training HORIBA PENTRA PC400	IPC	HORIBA
HOU SEREY VANNAK			
01-08/05/2016	Training HORIBA PENTRA PC400	IPC	HORIBA
KEO SOKUNTHEARY, KIM ENG SOK, YIN SOKNAY, PHOUNG VISETH, LY AFFINY, SOUN SOMETA, NONG KHENG PHALLY, VOALKUCH CHANKAKADA			
Janvier 2016	Formation aux gestes de premier secours	IPC	South East Asia & associated LTD
KONG KUNTHEA			
30/05-03/06/2016	MIRU-VNTR	IPC	Lucie Contamin
YIN SOKNAY, LY AFFINY, SOUN SOMETA, NONG KHENG PHALLY, VOALKUCH CHANKAKADA			
08/09/2016	Formation à l'accueil des clients	IPC	KIM ENG SOK
KIM ENG SOK			
5-12/02/2016	Good clinical practice training		
ENG SOKCHEA			

DATE	INTITULE DE LA FORMATION	COMMENTAIRE	VISA
Mai 2016	Training automates Pentra 80XL et PentraC400	IPC	HORIBA

3.9.7 LISTE DES PUBLICATIONS (2016)

1. Padget M, Tamarelle J, Herindrainy P, Ndir A, Diene Sarr F, Richard V, Piola P, Guillemot D, Delarocque-Astagneau E; BIRDY Study Group.. A community survey of antibiotic consumption among children in Madagascar and Senegal: the importance of healthcare access and care quality.J Antimicrob Chemother. 2017 Feb; 72(2):564-573. doi: 10.1093/jac/dkw446.
2. Andries AC, Duong V, Cappelle J, Ong S, Kerleguer A, Ly S, Tarantola A, Horwood PF, Sakuntabhai A, Dussart P, Buchy P. Proteinuria during dengue fever in children. Int J Infect Dis. 2016 Dec 28; 55:38-44. doi: 10.1016/j.ijid.2016.12.022. [Epub ahead of print]
3. Chauillac N, Brochard N, Payet C; EGEE (Étude Gatekeepers en EHPAD) study group., Duclos A, Terra JL. How does gatekeeper training improve suicide prevention for elderly people in nursing homes? A controlled study in 24 centres. Eur Psychiatry. 2016 Sep; 37:56-62. doi: 10.1016/j.eurpsy.2016.05.011.
4. R. Chheang, P. Nop, S. Heng, A. Tarantola, A. Kerléguer Bêta-lactam resistance among enterobacteriaaceae: follow-up 7 years International Journal of infectious disease, April 2016, Volume: 45 Supplement: 1 Pages: 85-85
5. Huynh BT, Padget M, Garin B, Delarocque-Astagneau E, Guillemot D; BIRDY study group.. Bacterial neonatal sepsis and antibiotic resistance in low-income countries.Lancet. 2016 Feb 6;387(10018):533-4. doi: 10.1016/S0140-6736(16)00220-8. No abstract available.
6. Marcy O, Ung V, Goyet S, BORAND L, Msellati P, Tejiokem M, Nguyen TNL, Nacro B, Cheng S, Eyangoh S, Pham TH, Ouedraogo AS, Tarantola A, Godreuil S, Blanche S and Delacourt C for the PAANTHER study group. Performance of Xpert MTB/RIF and Alternative Specimen Collection Methods for the Diagnosis of Tuberculosis in HIV-Infected Children. Clinical Infectious Diseases 2016: ciw036v2-ciw036

3.10 PLATFOME REGIONALE DE RECHERCHE EN ASIE (PRR-ASIA)

3.10.1 COMPOSITION DE LA PLATFOME

- Responsable de la PRR-Asie : Dr. Didier FONTENILLE, Directeur de l'IPC
- Les scientifiques qui travaillent dans la PRR-Asie sont sous la responsabilité de l'Unité d'Epidémiologie moléculaire du Paludisme, de la Plateforme d'Entomologie et de l'Unité de Virologie

3.10.2 STATUT DE LA PRR ASIE

Les institutions membres d'AVIESAN (Institut Pasteur, INSERM / I3M / ANRS, IRD, Fondation Mérieux, CIRAD) et l'IPC ont lancé la création de la PRR-Asie sur le campus de l'Institut Pasteur du Cambodge (IPC). LA PRR-Asie est devenue opérationnelle en mars 2014.

Ses objectifs sont les suivants :

* Rassembler les chercheurs et les institutions fondatrices partenaires dans le cadre d'objectifs partagés et offrir une plateforme commune dans la région de l'Asie du Sud-Est, notamment les pays du Mékong, pour entreprendre des programmes scientifiques collaboratifs en réponse aux défis mondiaux et régionaux.

* Coordonner des projets transdisciplinaires sur les maladies infectieuses en impliquant différents partenaires régionaux et internationaux, ainsi que les autorités sanitaires des pays de la région.

L'ambition de la PRR-Asie est de devenir un centre d'excellence sur les maladies émergentes en Asie du Sud-Est grâce à des programmes de recherche et d'éducation de haut niveau.

3.10.3 PRINCIPALES RÉALISATIONS EN 2016

En 2016, 3 projets ont été réalisés en PRR-Asie (voir les rapports des unités respectives : 3.1 et 3.7) :

Dr. Benoit Witkowski, sur des organismes résistants au *Plasmodium* (projet connu sous le nom de WARN, World Antimalarial Resistance Network). Dr. Benoit Witkowski a utilisé un bureau et une très petite partie des laboratoires de la PRR-Asie.

Dr. Amélie Vantaux, sur la transmission expérimentale de *Plasmodium* sensibles et résistants, traités avec divers antipaludiques, par les moustiques *Anopheles* (*An. Dirus* et *An. Minimus*).

Dr. Sébastien Boyer, sur la biologie et le contrôle des moustiques vecteurs de la dengue, du Chikungunya et de Zika.

La PRR-Asie a accueilli plusieurs séances de formation depuis son ouverture (cours magistraux et cours de travaux pratiques) sur le paludisme, l'entomologie et l'épidémiologie.

3.11 AUTRE SERVICE DE L'INSTITUT PASTEUR DU CAMBODGE

Les **activités médicales** assurées par l'Institut Pasteur du Cambodge dans le cadre d'un accord du gouvernement cambodgien avec l'IPC (décrites comme activités de services ou activités de soins de santé publique à l'Institut Pasteur), offrent également un accès direct aux patients.

3.11.1 PRINCIPALES ACTIVITES DU CENTRE DE PREVENTION DE LA RAGE EN 2016

Créé en vertu de l'Article 7 de la Convention du 27 août 1992 entre l'État du Cambodge et l'Institut Pasteur, le Centre de Prévention de la Rage de l'Institut Pasteur du Cambodge est le plus grand centre de prévention de la rage au Cambodge. Il a une équipe médicale équivalente à 4-5 employés embauchés à temps plein, placés sous la responsabilité d'un médecin. Le nouveau responsable du centre est le Dr. LY Sowath. Cette équipe offre un protocole de prévention aux normes de l'OMS à un prix abordable, car le traitement est subventionné par l'Institut Pasteur du Cambodge (US\$ 10 pour un

protocole de 8 injections). En 2015, le Centre de Prévention de la Rage de l'Institut Pasteur du Cambodge a accueilli 21 301 patients pour des prophylaxies post-exposition. Un total de 185 têtes d'animaux ayant mordu des personnes ont été examinées dans les laboratoires de l'Unité de Virologie, 94 (50,8%) d'entre elles ont été confirmées positives à la rage, grâce à la méthode d'immunofluorescence. En 2016, le Centre de Prévention de la Rage de l'IPC a accueilli 21 664 patients pour des prophylaxies post-exposition. Au total, 157 têtes d'animaux ayant mordu des personnes ont été examinées dans les laboratoires de l'Unité de Virologie, et 79 (50,3%) ont été confirmées positives à la rage, grâce à la méthode d'immunofluorescence.

3.II.2 PRINCIPALES ACTIVITES DU CENTRE DE VACCINATION INTERNATIONALES EN 2016

Créé en vertu de l'Article 7 de la Convention du 27 août 1992 entre l'État du Cambodge et l'Institut Pasteur, le Centre de Vaccinations internationales de l'Institut Pasteur du Cambodge dispose d'une équipe médicale équivalente à 2,5 employés embauchés à temps plein et placés sous la responsabilité d'un médecin. Le nouveau responsable du centre est le Dr. Ly Sowath. Le centre propose, 6 jours/7, des vaccins issus du programme élargi de vaccination, ainsi que d'autres vaccins et des immunoglobulines. Tous nos vaccins sont de qualité internationale, ils sont conservés dans une chaîne de froid et soumis à des contrôles qualité également aux normes internationales. En 2016, l'équipe médicale a réalisé 27 043 injections (dont des injections d'immunoglobulines) dans le cadre de 16 472 protocoles de vaccination. En 2015, l'équipe médicale a réalisé 25 255 injections (dont des injections d'immunoglobulines) dans le cadre de 14 148 protocoles de vaccination. En 2014, 26 282 injections (dont des injections d'immunoglobulines) ont été réalisées dans le cadre de 15 849 protocoles de vaccination, comparées à 21 521 injections (+ 22,1%) dans le cadre de 14 165 protocoles de vaccination (+ 14,8%) en 2013.

3.II.3 PRINCIPALES ACTIVITES DU CENTRE DE DEPISTAGE ANONYME ET GRATUIT (CDAG) EN 2016

Au Cambodge, le premier cas de VIH a été diagnostiqué en 1991. Après un pic de prévalence de 1,4% à 1,7% entre 2001 et 2003, le taux de prévalence a aujourd'hui chuté à environ 0,6%. En 1995, l'Institut Pasteur du Cambodge (IPC) a été le premier centre à mettre en place un centre de dépistage et de conseils anonyme et gratuit (CDAG). Ce service est entièrement financé par l'IPC. Au fil des années, le nombre de centres dans tout le pays a considérablement augmenté. À la fin de l'année 2010, il y avait déjà 246 CDAG dans le pays (source : Centre national sur le VIH/Sida, la Dermatologie et les IST - NCHADS). Toutefois, le CDAG de l'IPC est un centre de référence pour les confirmations de dépistage positifs, d'où le pourcentage élevé de tests confirmés positifs. Le centre dispose d'un médecin embauché à temps plein, qui travaille sous la supervision d'un autre médecin.

En 2016, le CDAG de l'Institut Pasteur du Cambodge a reçu des patients en consultation pré-tests, et 647 d'entre eux se sont vus offrir des conseils post-tests (en 2015, nous avons effectué 622 consultations pré-tests, dont 618 avaient été suivies par des conseils post-tests). En 2016, 70,9% des patients vivaient à Phnom Penh (66,1% en 2015). Les motifs de dépistage étaient un rapport de risque ou une pratique à risque dans 69,1% des cas (68,2% en 2015). Avec 33 cas confirmés (36 en 2015), la prévalence a été de 5,1% (5,8% en 2015) parmi la cohorte globale de patients, 5,5% des patients n'avaient jamais été testés auparavant (6,8% en 2015). 5,8% des patients, qui sont revenus prendre connaissance de leurs résultats, ont été dirigés vers un système public de soins de santé (5,6% en 2015). Aucun résultat indéterminé n'a été effectué depuis que nous utilisons le test Western blot.

4 LA PROGRAMMATION SCIENTIFIQUE 2017

4.1 GRANDES CAUSES DE MALADIES / MORBIDITE

4.1.1 PALUDISMES A PLASMODIUM VIVAX ET A P. FALCIPARUM

Contexte & justification : Si le paludisme au Cambodge a été très sensiblement réduit ces dernières années, il reste des poches de transmission, et beaucoup plus préoccupant, les *Plasmodium falciparum* transmis sont de plus en plus résistants aux dérivés de l'artémisinine, à la pipéraquine et à d'autres molécules de l'arsenal préconisé par l'OMS. Par ailleurs *P. vivax* devrait devenir la parasite le plus transmis, et sa biologie / contrôle sont encore mal connus

Objectifs : Contribuer, par des recherches opérationnelles sur le diagnostic, sur le rôle des porteurs asymptomatiques dans le réservoir et la transmission, sur les mécanismes de résistance et sur la transmission vectorielle, à atteindre l'objectif d'élimination du paludisme en 2025, d'abord de *Plasmodium falciparum* puis de *Plasmodium vivax*

4.1.2 TUBERCULOSE : DE NOUVELLES STRATEGIES DE DIAGNOSTIC ET DE TRAITEMENT

Contexte & justification : La tuberculose, y compris résistante, est un problème de santé publique très important au Cambodge.

Objectifs : Contribuer, par des recherches en épidémiologie, par des essais cliniques, et par des recherches phénotypiques, génétiques, de biologie cellulaire en mycobactériologie à mieux comprendre les résistances et à améliorer le traitement des porteurs de *Mycobacterium tuberculosis*.

4.1.3 ESSAIS CLINIQUES ET EPIDEMIOLOGIE DES VIRUS DES HEPATITES B, C ET E

Contexte & justification : La prévalence des hépatites B et C est importante au Cambodge. Maintenant qu'un traitement contre le virus de l'hépatite C existe, les patients traités doivent être suivis et la génétique du virus, en lien avec l'évolution des hépatites, doit être précisée. L'hépatite E est sous-estimée au Cambodge et les données très partielles.

Objectifs : Conduire les programmes ANRS en cours sur HBV et HCV. Initier de nouveaux programmes sur HEV.

4.1.4 EPIDEMIOLOGIE DES VIRUS GRIPPAUX ET AUTRES VIRUS RESPIRATOIRES

Contexte & justification : De nombreuses infections respiratoires touchent l'homme au Cambodge, incluant la grippe saisonnière, et parfois des formes plus sévères dues à des virus d'influenza d'origine aviaire. Par ailleurs la plupart des grands épisodes pandémiques de grippe de type H5 prennent naissance en Asie du sud-est, suite à l'émergence de virus réassortants. L'émergence de H7N9 en Chine est un sujet préoccupant pour le Cambodge

Objectifs : Maintenir l'activité de diagnostic et de surveillance des virus Influenza, en lien avec les hôpitaux et les communautés. Estimer les risques d'émergence de virus recombinants hautement pathogènes au Cambodge.

4.1.5 EPIDEMIOLOGIE DES ENCEPHALITES

Contexte & justification : L'étiologie des encéphalites, fréquentes en Asie du sud-est, est mal connue. Le programme SEAE qui se réalise dans 3 pays (Cambodge, Vietnam et Laos) a pour objectifs de faire un meilleur diagnostic et par là, de permettre une meilleure prise en charge.

Objectifs : Poursuivre le programme, préciser la part de l'Encéphalite Japonaise dans l'ensemble des encéphalites observées, en comprendre son épidémiologie et les risques en dehors des zones rurales. Améliorer le diagnostic des autres causes d'encéphalites.

4.1.6 EPIDEMIOLOGIE ET PRISE EN CHARGE DE PATHOLOGIES NON INFECTIEUSES

Contexte & justification : Pour le moment l'IPC ne travaille pas sur les pathologies non infectieuses.

4.2 RECHERCHE LIEES AUX EPIDEMIES

4.2.1 LABORATOIRES DE SECURITE DE NIVEAU 2 ET 3

L'IPC poursuit la rénovation et la construction de ses laboratoires P2. Quatre BSL2 ont été réhabilités fin 2016, le BSL2 grippe sera réhabilité en 2017. Le BSL 3 est le seul du Cambodge. Une des salles a été équipée d'une « boîte à gants », le classant en P3+, et permettant de manipuler tous prélèvements considérés comme hautement pathogènes ou transmissibles que l'IPC peut être conduit à recevoir.

4.2.2 RESEAU DE SURVEILLANCE SENTINELLE DES MALADIES FEBRILES A POTENTIEL EPIDEMIQUE.

Contexte & justification : Les maladies fébriles à potentiel épidémique peuvent être des maladies respiratoires, des arboviroses, des zoonoses, (virales, bactériennes, parasitaires)

Objectifs : Grâce à ses centres de références (H5, dengue, TB,...), ses partenariats avec les centres de surveillance du Cambodge (dengue, paludisme, tuberculose, hépatites, ..), l'IPC continuera de participer à la surveillance et à l'alerte en cas d'épidémie. L'IPC fait partie des groupes de travail sur l'émergence des résistances aux antimicrobiens, sur la dengue, sur Zika, la rage, les gripes aviaires, etc.

4.3 MALADIES INFECTIEUSES NEGLIGÉES

4.3.1 LA RAGE

Contexte & justification : Avec probablement 800 morts par an au Cambodge, plus de 600 000 personnes mordues, 21 000 nouveaux consultants mordus par an au centre de traitement de l'Institut Pasteur, la rage reste un fléau majeur au Cambodge.

Objectifs : Terminer les recherches du projet *Resist* pour évaluer l'intérêt de passer de 4 injections à 3 injections en post exposition. Documenter sur des données rétrospectives et prospectives immunologiques. Documenter la rage canine. Aider le Ministère de la Santé dans son plan de contrôle de la rage. Aider à mettre en place des centres de vaccination provinciaux. Contribuer à l'éducation et à la communication.

4.3.2 LES INFECTIONS FUNGIQUES

Contexte & justification : On ne connaît pratiquement rien des infections fongiques, en particulier à *Aspergillus*, au Cambodge, alors que des patients immunodéprimés, greffés ou sous traitements anticancéreux, et donc à risques d'infections fongiques, sont en augmentation dans le pays.

Objectifs : Développer un programme d'étude des infections fongiques à l'IPC en partenariat avec l'Unité des *Aspergillus* de l'IP Paris.

4.4 MALADIES EMERGENTES ET VECTORIELLES

4.4.1 NIPAH

Contexte & justification : Les conditions de persistance et d'émergence du virus Nipah, virus de chauve-souris potentiellement très pathogène pour l'homme, sont mal connues au Cambodge, où le virus est présent.

Objectifs : Identifier les mécanismes en jeu dans les cycles de transmission entre chauve-souris et de chauve-souris à l'homme, estimer les risques d'émergence de maladie due au virus Nipah au Cambodge.

4.4.2 ARENAVIRUS

Contexte & justification : la preuve de la présence d'arenavirus, virus de fièvre hémorragiques, a été apportée récemment au Cambodge.

Objectifs : Identifier les mécanismes en jeu dans les cycles de transmission des arénavirus au Cambodge, caractériser ces virus, estimer les risques d'émergence au Cambodge.

4.4.3 DENGUE

Contexte & justification : La dengue circule chaque année au Cambodge, où elle est un facteur de morbidité et de mortalité important en particulier chez les enfants. L'IPC a une très grande expérience de l'épidémiologie, y compris moléculaire, de la dengue. Depuis 2015 un vaccin (Dengvaxia®) est certifié, d'autres vaccins sont en cours de développement.

Objectifs : Maintenir la surveillance en partenariat avec le programme national de lutte (CNM), poursuivre le rôle de laboratoire de référence. Initier des projets de recherche sur l'efficacité du contrôle de la dengue basé sur une la lutte antivectorielle exhaustive et efficiente dans les établissements scolaires.

4.4.4 ZIKA

Contexte & justification : Le virus Zika est endémique en Asie du sud-est, mais il n'y a actuellement pas d'épidémie au Cambodge alors qu'il y a eu des foyer en 2016 au sud Vietnam, en Thaïlande et à Singapour. Il est donc possible que l'épidémie d'Amérique du Sud (2015 -16) diffuse en Asie et au cambodge, où les vecteurs sont présents.

Objectifs : Vérifier la compétence des vecteurs *Aedes* pour différents génotypes Zika. Développer les méthodes de surveillance et de diagnostic. Estimer les risques d'émergence d'épidémie due au virus Zika au Cambodge. Documenter les éventuelles microcéphalies.

4.5 RESISTANCE AUX ANTI-INFECTIEUX

4.5.1 BACTERIES MULTI-RESISTANTES : DYNAMIQUE DE TRANSMISSION ET IMPACT SANITAIRE.

Contexte & justification : Les résistances bactériennes aux antibiotiques sont en augmentation rapide, partout dans le monde y compris en Asie du sud-est et au Cambodge.

Objectifs : 1) Evaluer l'impact sanitaire des résistances bactériennes aux antibiotiques, 2) identifier ses déterminants biologiques (en particulier génétiques), comportementaux et environnementaux.

4.5.2 PALUDISME: RESISTANCES DE *PLASMODIUM FALCIPARUM* ET *P. VIVAX* AUX ANTIPALUDIQUES.

Contexte & justification : La résistance de *P. falciparum* et de *P. vivax* aux antipaludiques est une des principales menaces pesant sur le contrôle du paludisme. Les *plasmodium falciparum* transmis au Cambodge sont de plus en plus résistants aux dérivés de l'artémisinine, à la pipéraquline et à d'autres molécules de l'arsenal préconisé par l'OMS.

Objectifs : Mettre en place les techniques les plus avancées pour l'évaluation de la sensibilité *in vitro* et *in vivo* de *P. vivax* et de *P. falciparum* aux antipaludiques (méthodes clinico-parasitologiques, reposant sur la culture, ou moléculaires) et en étudier la dynamique et les déterminants. Développer et améliorer les tests. Tester de nouvelles molécules. Faire des recommandations au programme national de lutte.

4.5.3 VECTEURS (MOUSTIQUES): BIOLOGIE ET RESISTANCES AUX INSECTICIDES

Contexte & justification : La résistance des vecteurs aux insecticides et leurs changements de comportements vis-à-vis des techniques de lutte antivectorielle sont les principales menaces pesant sur le contrôle des vecteurs de maladies infectieuses.

Objectifs : Mettre en place les techniques et les infrastructures nécessaires qui sont pour le moment embryonnaires à l'IPC et de manière générale déficitaires au Cambodge afin i) de mieux connaître la biologie des moustiques vecteurs, ii) d'évaluer la sensibilité de moustiques (*Aedes*, *Anopheles*, *Culex*) aux insecticides, iii) d'identifier les mécanismes biologiques, biochimiques et génétiques de la résistance. Renforcer la plate forme d'entomologie.

4.6 DEVELOPPEMENT DE NOUVEAUX OUTILS DE DIAGNOSTIC

4.6.1 DEVELOPPEMENT DE TESTS

Contexte & justification : Le diagnostic des maladies infectieuses, la détection des agents pathogènes chez des porteurs asymptomatiques et l'investigation d'épidémies reposent souvent sur des techniques sérologiques ou de biologie moléculaire adaptées au terrain. Des tests de diagnostic rapide seraient très utiles au lit du malade (*i.e.* approche « point of care »).

Objectifs : Développer ou évaluer la sensibilité / spécificité de tests de diagnostic rapides, peu onéreux, simples à utiliser, dans le domaine du paludisme, des arboviroses (dengue, Zika), tuberculose, etc.

4.7 FORMATIONS

4.7.1 FORMATION CONTINUE AUX BONNES PRATIQUES

Assurer une qualité des activités de recherche conforme aux standards internationaux, que ce soit au laboratoire ou sur le terrain, nécessite une formation initiale et continue du personnel aux bonnes pratiques de laboratoire et de recherche clinique et épidémiologique. L'IPC poursuivra sa politique de mise à niveau et de développement des compétences chez son personnel et chez ses partenaires au Cambodge.

4.7.2 RENFORCEMENT DES CAPACITES

L'IPC s'est résolument engagé dans un programme d'accueil d'étudiants gradués (Master, PhD, Médecins, Pharmaciens, et Ingénieur), avec l'aide du Ministère de l'Education, du Ministère de la Santé, et des principales Universités cambodgiennes. L'IPC proposera entre 20 et 25 sujets de stage en 2017-2018, pour des étudiants cambodgiens et étrangers (dont français).

4.7.3 CREATION D'UN MASTER INTERNATIONAL D'INFECTIOLOGIE

A la demande de l'Université des Sciences de la Santé du Cambodge, l'IPC, en partenariat avec l'IP Paris, proposera un cadre pour un master international d'infectiologie au Cambodge.

5 CONCLUSION

L'Institut Pasteur du Cambodge, avec plus de 220 personnes, dont plus de 50 cadres scientifiques cambodgiens, français, et d'autres nationalités, et près de 30 étudiants en DES, master et thèse, est parmi les principaux instituts de recherche en santé en Asie du Sud-Est.

Fort de ses près de 60 contrats sur convention, de ses 55 articles scientifiques publiés en 2016, de son expertise en santé publique, des services rendus à travers ses laboratoires d'analyse et ses centres de vaccination et de référence, l'Institut Pasteur du Cambodge est fier de ses activités au service du Cambodge et de la communauté internationale.

Cependant il reste encore beaucoup à faire. De nouveaux champs scientifiques et de santé publique restent à explorer. Les capacités doivent être renforcées dans certains domaines. Des recherches innovantes préliminaires, mais à risque, doivent être initiées sur certains sujets, sur fonds propres de l'IPC.

Enfin, l'intérêt de l'Institut Pasteur du Cambodge pour l'ensemble de ses partenaires (Ministères, universités, Institut Pasteur, centres de recherche nationaux et internationaux, secteur social et secteur économique) doit être réaffirmé et renforcé.

Tout cela ne sera possible qu'avec un soutien fort et constant des tutelles : Ministère de la Santé du Cambodge, Ministère de l'éducation de la jeunesse et des sport du Cambodge Institut Pasteur et Ministères de la Recherche et des Affaires Etrangères de France, et avec la confiance des partenaires nationaux et internationaux.

ANNEXE

ORGANIGRAMME 2016 DE L'IPC

