CPER INFECTIOPOLE

Expertise

Marseille 2009

SOMMAIRE

1. Demande d'expertise
2. Description générale des objectifs et du contenu du projet
   2.1. Historique du projet
   2.2. Nature du projet et justification
   2.3. Objectifs généraux
   2.4. Choix du site et intégration au schéma directeur de développement du site
   2.5. Objectifs pédagogiques, de recherche et de vie étudiante
   2.6. Effectifs attendus, vivier et débouchés
3. Justification des choix d'équipement
4. Projet d'aménagement des structures
5. Contenu du projet
   5.1. Clauses administratives et juridiques
   5.2. Plan détaillé de financement
   5.3. Coût final de l'opération
6. Projet de localisation

1. Demande d'expertise

Demande du Chef d'établissement
Délibération du conseil d'administration
Avis du Recteur

2. Description générale des objectifs et du contenu du projet

2.1. Historique du projet

Le projet d'Infectiopôle à Marseille est un projet Hospitalo-Universitaire visant à regrouper l'ensemble des capacités techniques et intellectuelles dans le domaine de la recherche de l'enseignement et du soin en maladie infectieuses pour améliorer la prise en charge et la gestion des maladies infectieuses et tropicales à Marseille. Originellement imaginé comme un projet immobilier neuf hospitalo-universitaire sur le Campus Timone, il a évolué vers la *réhabilitation de surfaces vacantes à l'hôpital de la conception pour la partie clinique et diagnostique et la réhabilitation de locaux sur la faculté de la Timone pour sa partie recherche et enseignement.*

L'objet de cette demande de financement est l'acquisition d'équipement de recherche pour 10 290 300 millions d'Euros

En parallèle a ce projet a été crée en 2007 une Fondation le Réseau Thématique de Recherche et de soins « Infectiopole sud » regroupant les CHU et Université de Montpellier, Nice et Marseille, le CNRS, l'IRD, l'IMTSSA, EFS, et l' INSERM sur des objectifs commun de recherche et de soins et consigné en annexe.

2.2. Nature du projet et justification

Le tiers de la mortalité mondiale est due aux maladies infectieuses. Elle est plus fréquente dans les pays les plus pauvres mais de récentes épidémies dans les pays les plus riches y compris la France se sont développées et sont une cause **d'infection chronique** et de mortalité importante. Ainsi le virus du SIDA, le virus de l'hépatite C (avec une estimation à 500 000 infections chroniques en France) le virus de l'hépatite B (avec une estimation de 300 000 cas d'infections chroniques en France, et les Papillomavirus (responsable des cancers du col de l'utérus et de la gorge) ou *Helicobacter pylori* (responsable des ulcères et des cancers de l'estomac), sont à l'origine de problèmes majeurs de Santé Publique. A côté de ces maladies fréquentes et difficiles à traiter s'ajoutent des épisodes **d'épidémies** redoutées ou avérées, qui déclenchent chaque année des mesures de parade extrêmement coûteuses mais peu coordonnées. Les affaires successives de la maladie de la "vache folle", de la fièvre aphteuse, de l'épidémie de SARS ou de grippe aviaire, celle de Chikungunya et plus récemment de la Grippe H1N1 porcine associé à la crainte du bioterrorisme sont venus rappeler la résonance extrême qu'a le **risque de contagion** dans la population.

Pour faire face à ces **risques chaotiques** et aux épidémies à venir, la plupart des pays du monde ont constitué des regroupements sur un site unique comportant des unités d'hospitalisation, des centres de prévention, de vaccinations et de conseils, et des centres de recherche et d'enseignement. Ce type de regroupement a été baptisé **"Infectiopôle"** dans le rapport Raoult au Ministre de la Santé et au Ministre de la Recherche remis en 2003.

Dans la région PACA/LR au même titre que le centre anticancéreux « IPC », l'infectiopôle Marseille devrait être considéré comme le centre régional référent de prise en charge de l'infection au cœur du Réseau Thématique de Recherche et de Soin « RTRS infectiopôle Sud ».

2.3. Objectifs généraux

2.3.1. *Introduction*

L'objectif de l'infectiopôle est de faire face aux défis des maladies infectieuses du 21ième siècle. Ceci comprend la lutte contre la contagion qui comporte trois volets, un volet de transport jusqu'à l'hôpital, un confinement intra-hospitalier et le développement d'une expertise dans la lutte contre la transmission intra-hospitalière. La prise en charge thérapeutique des infections justifie une professionnalisation dans les stratégies de diagnostic (diagnostic rapide pour décider de l'isolement et des stratégies thérapeutiques) et la standardisation des protocoles thérapeutiques pour les infections empiriques, comme pour les traitements empiriques des infections aiguës, comme pour les prises en charge des infections chroniques. Cette lutte contre la contagion ne put être possible sans une recherche forte en amont pour développer des outils diagnostics performants, rapides, reproductibles, transférables, comprendre les mécanismes de l'infection, développer les nouvelles molécules thérapeutiques et les évaluer cliniquement et surveiller, comprendre et prévoir l'évolution des épidémies. Cette connaissance doit enfin être transféré aux plus jeunes pour assurer la pérennité du système. Ainsi il a été défini des **objectifs de soins** de **recherche** et d'**enseignement**

2.3.2. Objectifs de soins : Localisation CHU CONCEPTION

Pré acheminement des urgences et prise en charge des maladies contagieuses
Dans cet objectif, il est question lors d'une suspicion de maladie infectieuse, d'adresser directement à l'infectiopôle les patients, qu'il s'agisse du SAMU, des pompiers ou éventuellement d'un appel international. L'infectiopôle comportera une garde ouverte jour et nuit, des « sarcophages » permettant le transport des malades hautement contagieux et contractera des accords avec des assurances internationales pour pouvoir prêter ces sarcophages dans le cadre du rapatriement de maladies extrêmement contagieuses survenues à l'étranger.
La prise en charge des urgences supposées contagieuses se fera par des professionnels immédiatement dans des boxes isolés avant d'orienter les patients vers des chambres à degré de confinement variable.

Raccourcissement de la durée d'hospitalisation par l'amélioration du diagnostic et de la prise en charge.
Le regroupement sur un site unique des urgences infectieuses des hospitalisations infectieuses du laboratoire de microbiologie et de la recherche permettra de développer un système de diagnostic en très grande urgence. L'objectif est de réaliser la plupart des examens diagnostiques permettant une orientation ou une indication de confinement ou de traitement antibiotique dans l'heure qui suit le prélèvement. Ceci sera rendu possible par une automatisation complète fonctionnelle 24 heures sur 24 des techniques de sérologie et de PCR, et par ailleurs, par le développement de points de diagnostic permettant une mise en œuvre immédiate des stratégies adéquates. Par ailleurs, seront développés des protocoles standardisés de prises en charge de traitement empirique des infections aiguës. La spécialisation de l'infectiopôle justifiera dès que le problème infectieux aigu sera réglé que le patient non contagieux puisse rejoindre un service spécialisé, son domicile ou un partenaire d'hospitalisation extérieur. L'objectif est de ne traiter que le problème de maladie infectieuse et de confier le malade porteur de poly pathologies aux spécialistes ou aux internistes les plus adaptés à la prise en charge pour ce type de problème. La mise en place d'un réseau public- privé de prises en charge des patients en suite de soin est une des priorités de l'infectiopôle. L'infectiopôle construit comportera 90 lits : 30 lits en très grand confinement « de niveau de sécurité 3 », et 60 lits en chambre seule en dépression.

Etre capable d'assurer le confinement des malades les plus contagieux.
Il existe différents niveaux de confinement recommandés en fonction de la contagiosité. La contagiosité des patients comprend les infections transmissibles par aérosol

nécessitant des chambres en niveau P3, lorsqu'il s'agit d'infections graves ou difficiles à traiter. Les autres patients bénéficieront de simples chambres en dépression. Les patients porteurs de bactéries multirésistantes ou d'infections à transmission par contact seront traités dans des chambres en dépression simple.
Le confinement des patients les plus contagieux nécessitera la mise en place de moyens de communication entre la chambre et l'extérieur en utilisant le réseau et permettant la continuité d'une activité personnelle et professionnelle, malgré le confinement. Le transport à l'intérieur de l'hôpital pour les examens radiologiques se fera par utilisation de sarcophages de sécurité.

Développement de l'interface de la connaissance avec le public et les autres centres spécialisés.
Notre objectif est basé sur un système informatique interne très rapidement évolutif, d'intégrer l'ensemble des banques de données disponibles dans le monde pour évaluer les risques de contagion à tout moment. Ceci comporte plusieurs associations et structures dont la synthèse sera assurée dans l'infectiopôle en coordination avec la médecine des voyages et le conseil vaccinal. La mise à jour hebdomadaire du site disponible pour le grand public permettra une information permanente sur les risques infectieux dans le monde.
Enfin, l'ensemble des protocoles de prises en charge des patients contagieux dans leur transport dans leur confinement ou leur traitement sera régulièrement mis à jour et échangé sur une base internationale.

Prise en charge de l'Hygiène et des Infections Nosocomiales. Nécessité d'une expertise
Les Infections nosocomiales sont un problème collectif sensible qui met en danger les prescripteurs et les finances de l'établissement. (Procès qui seront à l'avenir de plus en plus souvent gagnés par les plaignants …)
Ainsi la prévention et la prise en charge des Infections nosocomiales doit relever d'une stratégie d'ensemble associant
a /Isolement des patients contagieux
b/Consultation de spécialiste (qui évite les procès en informant les patients des risques encourus, en permettant une prise en charge optimale des injections et en établissant les rapports sur la source, la prise en charge et la thérapeutique)
C/ Faire appliquer les moyens de prévention reconnus efficaces. L'AP-HM a été le premier établissement Français à disposer d'un système de désinfection hydro-alcoolique rapide des mains. Son excellent classement dans les hôpitaux CHU propre en 2008 est le résultat de l'incessant travail des équipes opérationnelles en hygiènes. Il est le seul CHU pour lequel les IN sont constamment en régression.
Pour ce faire l'interface entre l'infectiopôle et le CLIN est obligatoire. Le CLIN doit rester une propriété commune à l'établissement gérée par la CME, mais les moyens (médicaux et paramédicaux) doivent être intégré dans le pôle.
Par ailleurs la politique de prescription des antibiotiques menée depuis longtemps à l'AP-HM par la commission des antibiotiques porte ses fruits avec une nette réduction de la prévalence des Staphylocoques résistants. Cette économie de l'écosystème hospitalier est très important et il est important que la Commission des antibiotiques garde un lien fort avec l'infectiopôle

Optimiser et améliorer la qualité de l'analyse médicale : Un nouveau concept de laboratoire

Un laboratoire central « core laboratory » qui se divise lui même en deux avec :

a/ un plateau technique automatisé permettant de répondre à des analyses de routine avec les meilleures performances qualité/coût, ouvert 24/24 et tous les jours de l'année et permettant de répondre à d'éventuelles situations de crise. Il permet le

développement en interface avec l'industrie de nouveau plateau technique toujours plus performant.
b/ Un plateau technique spécifique ultra performant comme la culture cellulaire, la PCR et les autres techniques moléculaires avec une interface avec la recherche académique

Un diagnostic de proximité appelé « Point of Care » ou POC

Ici sont réalisés des test standardisés (Doctor test) rapides à proximité des urgences par du personnel sans formation technique permettant de répondre rapidement aux problèmes posés par le clinicien d'isolement et de traitement, la plupart des examens diagnostics ce faisant dans un délai ne dépassant pas l'heure.

Interface avec la population : Informer et prévenir les nouvelles maladies :
Un site web d'information du public, des films sur les télévisions de l'AP-HM est en discussion pour informer le public et les voyageurs sur les nouvelles maladies et les risques d'exposition. L'activité de conseil aux voyageurs sera amélioré par la mise en interface avec les agences de voyage et la carte Santé du Voyageur qui permettra consultation de conseil au départ, vaccination et parapharmacie en « package » avec le billet d'avion. La capacité de vaccination et de conseils aux voyageurs va aussi s'amplifier avec la signature d'un contrat entre l'Hôpital d'Instruction des Armées Lavéran et l'AP-HM concernant cette prise en charge. Par ailleurs, est en cours de renouvellement un système de conseil aux voyageurs par téléphone beaucoup plus moderne que le système ancien permettant une amélioration de la capacité à conseiller les voyageurs par téléphone. Enfin, le renouvellement du site Internet est en cours. Un Réseau de surveillance de la pathologie d'importation est aussi en cours de réflexion appuyé par un réseau de médecins.
Développer l'interface avec la population par l'Information sur les maladies infectieuses a l'aide d'exposition temporaire, de conférence de panel d'expert sur la grippe aviaire, le SRAS le SIDA

Interaction avec le milieu socio économique
Nous allons créer une unité fonctionnelle permettant de centraliser les relations entre praticien et l'industrie pour une meilleure transparence dans la gestion des contrats avec l'industrie. Cette unité fonctionnelle sera géré par un responsable nommé par le conseil de pole et permettra de gérer les contrats d'essai thérapeutique, essai diagnostique, réalisation des examens extérieur au pôle….

2.3.3. *Objectif de recherche : Localisation Faculté de médecine Timone*

Les objectifs de recherche sont ceux des deux UMR de l'infectiopôle, URMITE CNRS-IRD UMR 6236 de Didier Raoult et l'Unité des Virus Emergents de l'UMR 190 "Pathologies Virales Emergentes". Elles ont été labellisées dans le dernier plan quadriennal et les objectifs sont résumés ci-dessous. Par ailleurs ces objectifs de recherches sont aussi ceux du RTRS et sont repris dans la convention d'objectif de la Fondation « infectiopôle sud ».

L'Unité de Recherche en Maladies Infectieuses et Tropicales Emergentes « URMITE » est composée de 9 unités de recherche avec des thématiques très différentes mais complémentaires permettant de répondre aux objectifs de soins cités plus haut et d'une Unité de R&D

Equipe 1 [1]: Physiopathologie des infections à bactéries intracellulaires. Pr Jean-Louis Mège

[1] Projet 4. Faculté de Médecine 4ème Etage BP2

Thématique N° 1 : Développer l'étude ex vivo des réponses immunes innées et adaptatives chez les patients atteints de maladies infectieuses

Thématique N° 2 : Etudier l'infection des cellules cibles par les agents infectieux intracellulaires

Thématique N° 3 : Développer une approche intégrée des maladies infectieuses via des modèles animaux spécifiques

Equipe 2 [2]: Microbiogénomique et Paléomicrobiologie, Michel Drancourt

Thématique N° 1 : Microbiogénomique

Séquençage à très haut débit

Identification et taxonomie moléculaire des bactéries d'intérêt médical

Thématique N° 2 : Paléomicrobiologie

Nouvelle technique de préparation de la pulpe dentaire

Réparation de l'ADN bactérien ancien

Détection et identification moléculaires universelles dans les échantillons anciens

Immunodétection des pathogènes dans la pulpe dentaire ancienne

Equipe 3 [3]**:** Base moléculaire des traitements en maladies infectieuses, Jean-Marc Rolain

Thématique N° 1 : Evaluation de la sensibilité et de la résistance aux agents anti-infectieux – Epidémiologie moléculaire

Thématique N° 2 : Détection et description d'agents infectieux émergents et/ou multi résistants chez les patients atteints de mucoviscidose –

Description de nouveaux pathogènes et de pathogènes émergents - Veille épidémiologique - Traitement

Equipe 4 [4]**:** Bactéries de l'environnement, bioterrorisme et pneumonies, Bernard La Scola

Thématique N°1 : Nouveaux agents pathogènes de l'eau

Thématique N°2 : Etude de la viabilité des microorganismes dans l'eau

Thématique N°3: Analyse du transcriptome de Mimivirus

Thématique N°4 : Détection, typage et analyse de la virulence des agents de bioterrorisme

(*C. burnetii, Rickettsia* sp. et *Francisella tularensis*)

Thématique N°5 : Détection de nouveaux agents de pneumonies nosocomiales par métagénomique différentielle.

Equipe 5 [5]**:** Veille et modèles entomologiques des maladies vectorisées ubiquitaires et tropicales émergentes, Philippe Brouqui

Thématique N° 1 : Veille sur les Maladies Vectorisées chez le voyageur, notamment dans la communauté comorienne et dans les Populations en Situation Précaire (SDF)

Thématique N° 2 : Traitement et Chimioprophylaxie des Maladies Vectorisées :

Fièvre des Tranchées – Paludisme – Rickettsioses à Tiques

Thématique N° 3 : Veille sur les Micro-organismes Emergents Associés aux Arthropodes

Thématique N° 4 :Modèles expérimentaux sur les arthropodes

Equipe 6 [6]**:** Approche vaccinale du paludisme, Jürg Gysin

[2] Projet 1 et 1' :Métagénomique et transcriptomique :Unité des Rickettsies Faculté de Médecine 2 ème Etage

[3] Projet 4 : Biologie cellulaire. Faculté de Pharmacie

[4] Projet 4 : Labo P3 Faculté de Médecine 2 et 3ème Etage aile verte

[5] Projet 2 : Insectarium Faculté de Médecine 6 ème Etage aile verte

[6] Projet 1' :Transcriptome Faculté de Médecine 3 ème Etage aile rouge

Thématique N°1 : Etude de l'importance des différents domaines de PfEMP1^{CSA} dans la protection contre le paludisme de la femme enceinte
Thématique N°2 : Anémies périphérique et centrale associées à RSP2
Thématique N°3 : Altérations endothéliales induites par P. falciparum

Equipe 7 [7]: Unité des Rickettsies et des pathogènes émergents, Didier Raoult
Thématique N°1 - Découverte de pathogènes émergents
Thématique N°2 : Génomique des rickettsies
Thématique N°3 : Post Génomique
Analyse du transcriptome de *R. conorii* par microarray
Mise au point d'un système de transformation génétique de *R. conorii*
Thématique N°4 : Cardiologie infectieuse
Thématique N°5 : Maladie de Whipple

Equipe 8 [8]: Maladies émergentes et moustiques, Christophe Rogier
Thématique N° 1 : Moustiques vecteurs et transmission
Etude de la composition et de dynamique de la faune culicidienne dans la région de Marseille et dans différentes villes africaines.
Utilisation de la télédétection pour l'analyse des densités vectorielles et du risque de transmission
Thématique N° 2 : Emergence des résistances aux antipaludiques et nouveaux médicaments
Thématique N° 3 Paludisme grave: facteurs parasitaires et immunologiques d'émergence

Equipe 9 [9]: Infections respiratoires sévères émergentes et leur prise en charge, Laurent Papazian
Thématique N°1 : Identification de nouveaux agents de pneumonies
Incidence et facteurs de risque des pneumonies à Cytomegalovirus chez les patients ventilés.
Etude de la signification clinique d'une séroconversion à Mimivirus
Détection de nouveaux agents de pneumonies nosocomiales par métagénomique différentielle.
Thématique N°2 : Modèle expérimental de pneumonie
Thématique N°3 : Optimisation de la prise en charge des infections respiratoires

Equipe 10[10] : Projet de création d'une entreprise innovante : AmiKana.BioLogics, Pablo Gluschankof

AmiKana.BioLogics a pour objectif de développer successivement:

- Des kits d'analyse phénotypique de la résistance des patients aux anti-rétroviraux
- Une plate forme de service « variants minoritaires » dédiée à la caractérisation chez un patient infecté des populations virales circulantes minoritaires afin d'améliorer son traitement
- D'autres projets complèteront ce programme : une plate forme de service de « profiling » pour l'industrie pharmaceutique, ainsi que l'analyse de résistance du VIH aux inhibiteurs d'entrée, et l'analyse de la résistance dans le domaine du virus de l'Hépatite C (VHC).

[7] Projet 1 et 1' : Faculté de Médecine 2 ème Etage aile verte
[8] Projet 2 Insectarium Faculté de Médecine 6 ème Etage aile verte
[9] Projet 1et 1'. Unité des Rickettsies Faculté de Médecine 2 ème Etage aile verte
[10] Faculté de Médecine 3 ème Etage aile verte

L'UMR190 "Emergence des Pathologies Virales" (Université de la Méditerranée – IRD) est constituée de 5 implantations internationales situées sur des zones cruciales pour l'émergence virale :

- *En Afrique Centrale*, l'UMR190 est implantée au Centre International de Recherches Médicales (CIRMF) de Franceville (Gabon). Le groupe dirigé par Eric Leroy est internationalement reconnu dans le domaine de la recherche sur les filovirus (Ebola et Marburg) et a été couronné en 2009 par le prix C Mérieux de l"Académie des Sciences. Ce groupe (qui est également centre régional de référence OMS pour le diagnostic des filovirus) a récemment diversifié ses thématiques de recherche en abordant le diagnostic, l'épidémiologie et l'histoire naturelle des arbovirus (dengue, fièvre jaune, chikungunya, fièvre de la vallée du Rift).

- *En Asie*, l'UMR190 est implantée au Laos et en Thaïlande (responsable: Marc Souris) ou sont gérés un programme interdisciplinaire sur la grippe (incluant en particulier une approche géographique et de modélisation) et un programme d'étude des encéphalites et méningoencéphalites.

- *En Amérique du Sud*, une implantation récente en Bolivie (Santa Cruz) est consacrée au transfert technologique pour le diagnostic virologique et à l'épidémiologie de la dengue. Ce centre a pu bénéficier avec l'appui de l'UMR d'une labellisation comme centre de national de référence pour la dengue, ainsi que de la mise en place d'un laboratoire P3. des travaux sont en cours pour la caractérisation épidémiologique et moléculaire des infections par les virus de la dengue, de la fièvre jaune et Mayaro.

- *A Marseille*, l'**Unité des Virus Emergents** [11] gère la région du pourtour Méditerranéen et assure la coordination des différentes équipes. Les thématiques de recherche majeures sont:

    - **La génomique virale**. L'unité a caractérisé de novo plus d'une centaine d'espèces virales. Elle a coordonné le volet virologique du programme Européen Vizier, qui a apporté à la communauté scientifique plus des trois-quarts des structures enzymatiques caractérisées pour des virus à génome ARN. L'équipe est reconnue pour son savoir faire taxonomique et participe aux instances internationales pour les familles *Flaviviridae* et *Arenaviridae*.

    - **Les arboviroses et roboviroses**. L'unité a activement travaillé sur la dengue, le virus chikungunya, les phlébovirus et les arenavirus. Elle a caractérisé de nombreux nouveaux virus et contribué à améliorer le diagnostic et la connaissance de l'histoire naturelle de ces maladies. Elle développe une politique active de recherche de molécules antivirales et de nouveaux concepts vaccinaux pour ces maladies. Autour de la Méditerranée, des programmes collaboratifs sont menés en Grèce, en Algérie et en Tunisie.

    - **Les antiviraux**. L'UVE a caractérisé plusieurs molécules actives sur les flavivirus, le virus chikungunya, le virus respiratoire syncytial et la grippe. Certaines de ces molécules ont été amenées au stade de l'essai clinique. D'autres sont actuellement testées in vitro ou dans un modèle de primate non-humain développé sur le site du CIRMF. Des recherches sont en cours pour le virus Ebola et le virus de la rage.

    - **Les collections de virus**. L'UVE a créé et dirige le consortium Européen EVA, dédié à la mise en place d'un réseau international de collections de virus et de produits dérivés.

[11] Projet 2 : Faculté de médecine. 3ème étage aile Rouge

- **Les pathogènes respiratoires et leur impact en santé publique**. Le Directeur de l'UVE dirige le Centre Interdisciplinaire de Santé Internationale et Humanitaire de l'Ecole des Hautes Etudes en Santé Publique. A ce titre, il coordonne le volet virologique du programme WHO-CoPanFlu dédié à l'étude de la pandémie H1N1swl. L'UVE est en charge du volet national métropolitain (gestion d'une cohorte de 1000 foyers), est associé au volet mis en place sur l'île de la Réunion par le Centre de Recherche et de Veille de l'Océan Indien (dont XdL dirige le conseil scientifique), et coordonne la mise en place du volet virologique pour plus de 20 pays associés au programme français. L'UVE a publié le premier article français dédié au virus H1N1swl.

2.3.4. *Objectif d'enseignement :*

L'enseignement des maladies infectieuses et tropicales à Marseille s'appuie sur deux axes qui seront associés dans le cadre de l'Infectiopole. Le premier est un axe deformation à la recherche en maladies infectieuses et tropicales. Il s'appuie sur la spécialité recherche « Maladies Transmissibles et Pathologies Tropicales » (Responsable : Professeur B La Scola) du Master « Sciences et Santé, mention Pathologie Humaine » (http://www.timone.univmrs.fr/medecine.). Cette spécialité est issue du DEA «Maladies Transmissibles et Pathologies Infectieuses et Tropicales » qui, depuis sa création en 1997, a été un acteur important de la formation par la recherche des médecins civils et militaires impliqués dans les maladies infectieuses et tropicales et les scientifiques désireux d'une recherche tournée vers l'homme. Son bilan (201 diplômes de DEA et Master, 53 Thèses d'Université) garantit une développement local, national et international (15% des diplômés sont extérieurs à la CEE). Cet enseignement repose sur les laboratoires de l'IFR 48, les laboratoires nationaux hors IFR, le Service de Santé des Armées et le Collège des Universitaires de Maladies Infectieuse et Tropicales. Des cours internationaux sur les trypanosomiases africaines (IMTSSA), les maladies transmises par vecteurs et l' « European Virtual Institute for Functional Genomics of Bacterial Pathogens » complètent l'offre de formation. Le deuxième axe a un caractère plus professionnalisant et repose sur les UFR de Médecine et de Pharmacie. Il s'appuie sur le parcours « Système de santé dans les pays en développement » (Responsable : Professeur J. Delmont) au sein du master professionnel « ingénierie des Systèmes de Santé ». Cet axe inclut : 1 diplôme national, la capacité de médecine tropicale, 1 diplôme interuniversitaire (Lyon, Marseille, Montpellier) en Santé Humanitaire, 10 diplômes universitaires portant sur les thèmes suivants : hygiène hospitalière, hygiène et soins, infections nosocomiales, antibiologie, sida, médecine et santé publique tropicale, lutte antipaludique, santé et développement en milieux méditerranéen et tropical, soins et santé communautaire en milieu tropical, surveillance épidémiologique des maladies tropicales. 2 CEU portant sur la prise en charge du patient contagieux (Agents de Bioterrorisme et Pathogènes de Classe 3 et 4) et sur la prévention des maladies du voyageur. Un DESC de « Pathologies infectieuses et tropicales, clinique et biologique » complète l'offre de formation pour les médecins infectiologues et tropicalistes.
Les enseignants chercheurs interviennent aussi dans les formations initiales des étudiants des diverses filières de l'Université de la Méditerranée et sont invités à dispenser des enseignements spécialisés dans d'autres structures hospitalo-universitaires françaises ou des institutions en France et à l'étranger.

2.4. Choix du site et intégration au schéma directeur de développement du site

La demande de financement concerne pour 100% du montant a des équipements de recherche qui seront déployés sur le site de la faculté de médecine de la Timone dans les locaux que nous occupons actuellement.

2.5. Objectifs pédagogiques, de recherche et de vie étudiante

L'UMR s'est donné des règles de fonctionnement qui comporte une **vie d'unité extrêmement active** comprenant des réunions d'encadrement des thésards, des présentations, des séminaires et 3 réunions structurantes : l'une avec les responsables d'équipe ingénieurs, une sur la stratégie concernant les pathogènes émergents et une réunion de laboratoire comprenant l'ensemble des membres du laboratoire. Il existe des présentations hebdomadaires de l'ensemble des doctorants et des post doctorants.
Enfin, ont été définies des **règles d'éthiques** de la production scientifique, et de la **place des auteurs,** ainsi que des **seuils minimaux** en terme de production scientifique par **chercheur** avec **des objectifs chiffrés de performance pour chacune des équipes** constituantes.
Sur le plan de **l'environnement scientifique**, cette UMR associe des unités de recherches de Marseille spécialisées dans la physiopathologie et l'immunologie. Dans cet esprit, de nombreuses relations scientifiques ont été mises en place dans le passé avec les équipes de Jean Michel CLAVERIE pour la génomique, (UPR 2589), Jean Pierre GORVEL et Bernard MALISSEN (UMR 6102) pour l'immunologie et la physiopathologie, Daniel OLIVE pour la physiopathologie (UMR119) et Xavier de Lamballerie (Virologie). Nous souhaitons renforcer ces coopérations scientifiques afin d'apporter un savoir-faire microbiologique et médical et de bénéficier d'une contribution fondamentale de ces unités de recherches.

L'unité a vocation à accueillir des doctorants et des post doctorants **venus de l'étranger** et en particulier des pays du Sud et dans les dernières années en permanence une trentaine de doctorants et post doctorants ou visiteurs scientifiques étrangers étaient présents dans l'UMR 6020. La nouvelle UMR veut renforcer cette ouverture, si possible.
Cette politique d'accueil et de formation des étudiants étrangers s'intègre dans la dynamique de **formation doctorale** qui a été mise en place depuis plusieurs années avec un ancien DEA devenu une formation spécialisée de master dans le domaine **des maladies infectieuses et tropicales** qui accueille 1/3 d'étrangers, 1/3 de professionnels de santé et 1/3 de scientifiques français. Cette option du Master recherche (dirigé maintenant par Jean-Louis MEGE) a permis de mettre en place une stratégie qui a donné des résultats particulièrement significatifs en terme de **production scientifique**. Cette intégration parfaite entre la formation doctorale et l'unité de recherche a été une clé importante de la réussite des dernières années et nous comptons la poursuivre.

2.6. Effectifs attendus, vivier et débouchés

Les effectifs actuels de l'Infectiopôle dans sa partie recherche sont de **190 chercheurs** dont 24 PU, 18 MCU, 24 ingénieurs de recherche, 57 personnels administratifs et techniciens et 50 doctorants et post-doctorants (Annexe).
Il faut se rappeler qu'en 2004 le personnel de l'unité était alors de **31 personnels** dont un tiers de PU.
Selon les objectifs de recherche fixés on peut penser que le développement de l'Infectiopôle puisse d'ici 2013 créer entre **10 et 20 postes supplémentaires** notamment dans la catégorie des ingénieurs de recherche portant a plus de 200 les effectifs de recherche de l'infectiopôle

De nombreux brevets (14) ont été pris par des membres de l'UMR aussi bien sur l'identification microbienne, la détection de mécanisme de résistance que la mise au point de molécules, d'activités antibiotiques ou anti-virales. (Annexe)

Marseille est une des villes dans laquelle quelques **entreprises de biotechnologie** ont pu voir le jour. La plus ancienne ayant à ce jour le plus grand degré

de réussite est Immunotech qui a été crée par M. DELAAGE et A. BERRE dont le champ essentiel a été la création d'anticorps.

Une petite entreprise, INODIAG, a été créée avec M. DELAAGE et C.ESCARGUEL (le créateur de deux sociétés de microbiologies : internationales mycoplasma rachetées depuis par STAGO et une entreprise de création de vaccins rachetée par VIRBAG) et des membres de l'UMR 6020. Cette entreprise incubée à l'université de la Méditerranée a maintenant créé une usine à la Ciotat pour la mise en place de techniques de diagnostiques sérologiques.

Deux entreprises sont en incubations, une sur la création d'anti-viraux (Christian CAMBILLAU et Xavier de LAMBALLERIE) et une sur la mise au point de tests de détection de résistance des virus de l'immunodéficience humaine (P .GLUSCHANKOF : Equipe 9 de l'URMITE), enfin une start-up a été créée en pharmacie (SYNPROSIS) pour la création de molécules anti-HIV.

3. Justification des choix d'équipement

Projet N°1 MICROBIOGENOMIQUE

Une des spécificités de l'Infectiopole est d'avoir développé un nouveau champ thématique que nous appelons Microbiogénomique. Il s'agit d'appliquer les techniques et méthodes de génomique et post-génomique à haut débit, à l'étude des micro-organismes pathogènes ou potentiellement pathogènes, avec pour objectifs de (1) identifier très rapidement les pathogènes émergents, les pathogènes hautement transmissibles, les pathogènes épidémiques, les pathogènes utilisables dans le cadre du bio-terrorisme (2) développer des outils de détection directe (détection immunologique et détection moléculaire) et de détection indirecte (sérologie pour la détection des anticorps spécifiques) de ces pathogènes (3) décrypter les mécanismes de la transmissibilité de ces pathogènes (rapports microorganismes – environnement inanimé, micro-organismes – amibes, microorganismes – vecteurs) et de leur adaptation à l'homme (virulence).

Cette capacité d'analyses basées sur la génomique microbienne et sur les techniques post-génomiques, vient en complément de la capacité d'isolement et de culture des microorganismes, qu'il convient de renforcer pour standardiser mieux encore les protocoles (mode d'ensemencement, nature des milieux de culture, température, atmosphère et durée d'incubation). En effet, nous prévoyons que les isolats réalisés à partir des prélèvements cliniques et des prélèvements d'environnements sources des pathogènes, continueront à constituer une source essentielle de diagnostic des maladies infectieuses et de découverte de pathogènes émergents.

L'Infectiopôle dispose dans ces domaines d'une capacité attestée par les travaux publiés dans les revues scientifiques et médicales internationales et le dépôt de brevets, qui traduisent les avancées techniques effectivement mises en œuvre dans les laboratoires. Cette capacité est compétitive au niveau international.

Cette capacité en Microbiogénomique repose en partie sur les axes techniques suivants :

1. ROBOTISATION DES ISOLEMENTS / CULTURE

1.1. Situation actuelle

L'ensemencement des prélèvements (prélèvements cliniques et prélèvements d'environnements sources) est actuellement une opération entièrement manuelle. Egalement, la détection des cultures stériles et des cultures positives demeure une opération manuelle, à l'exception des prélèvements ensemencés directement au lit du patient (hémoculture essentiellement ; plus rarement, produits de ponction ; prélèvements pour recherche de mycobactéries). Même dans ce cas, la détection des cultures positives repose sur une manipulation du milieu de culture pour examen direct après coloration, ou, dans un proche avenir, détection de pathogène par spectrométrie de masse (cf. ci-dessous).

Ceci comporte un risque mesurable d'écarts par rapport aux protocoles de référence, entrainant un risque de faux négatifs ; également, ceci expose les personnels de laboratoire au risque de manipulation de pathogènes contagieux au laboratoire (*Mycobacterium tuberculosis* ; *Brucella* spp. ; *Franscisella tularensis* ; *Coxiella burnetii* en culture cellulaire).

1.2. Objectifs

L'objectif est de standardiser l'ensemencement des prélèvements, la détection des cultures négatives et des cultures positives, et l'identification des isolats selon des protocoles reproduits à 100%.

1.3. Moyens prévus.

Il est prévu de robotiser et automatiser ces activités de laboratoire par l'acquisition d'une plate-forme dédicacée comportant un ensemenceur automatique, un ou plusieurs incubateurs chargés automatiquement à partir de l'ensemenceur, une détection automatique de croissance des colonies, un robot piqueur de colonies et une possibilité de connexion physique et informatique avec un spectromètre de masse.

2. INFORMATIQUE ET BIO-INFORMATIQUE

2.1. Situation actuelle

Les activités informatiques et bio-informatiques sont des activités transversales nécessaires à l'ensemble des équipes et des plates-formes de l'Infectiopole, qui doivent connaître un développement tant quantitatif que qualitatif au cours des deux prochaines années. Ces activités sont servies par quatre ingénieurs en bio-informatique.Ces activités sont actuellement limitées par (1) des difficultés de connexion des différents sites même réunis au sein du même campus Timone, et par la lenteur intrinsèque du réseau de la Faculté de Médecine (2) la multiplication des équipes utilisant les ressources informatiques et bio-informatiques (3) la diversification grandissantes des taches à traiter : gestion de séquences nucléotidiques dans différents formats de fichiers ; gestion de séquences peptidiques issues du spectromètre de masse; gestion d'images issues des travaux de protéomique (images de gels bi-dimensionnels) et des travaux de morphologie (microscopie électronique, microscopies confocales) notamment par le développement du life-imaging (séquences vidéos).

2.2 Objectifs

Les objectifs sont :

(1) sécuriser les banques de données de séquences et d'images.
(2) accéder à de nouvelles fonctions d'analyse.
(3) accroître la vitesse de traitement des informations et des calculs utilisés pour les analyses de séquences nucléotidiques et peptidiques.
(4) augmenter l'espace de stockage des données et prévoir son back-up
Ces objectifs sont représentés sur les Figures 1 & 2.

2.3 Moyens prévus

La réalisation de ces objectifs passe par la mise en place d'un réseau spécifique reliant, avec une grande vitesse de transmission des données, les plateformes de séquençage, de protéomique et de morphologie aux serveurs de stockage sécurisés des données. Egalement, il convient de mettre en place cet ensemble de serveurs (« Cluster serveurs ») permettant le stockage (sécurisé par « back-up » pour palier les risques de pertes des données stockées) dans des conditions spécifiques. Enfin, nous projetons de mettre en place des serveurs de calcul (« cluster calcul ») pour répondre aux objectifs de rapidité de traitement des informations et de développement de nouvelles fonctions d'analyse.

3. MASSIFICATION DU DIAGNOSTIC MOLECULAIRE DES MALADIES INFECTIEUSES

3.1. Situation actuelle

Le diagnostic moléculaire des maladies infectieuses repose actuellement sur l'amplification par PCR d'une fraction de l'ADN / ARN extrait des échantillons, suivi du séquençage par méthode de Sangers ou pyroséquençage des produits d'amplification ; de leur hybridation sur des oligonucléotides complémentaires (« puce d'hybridation ») ; ou de leur détection généralement à l'aide d'une sonde oligonucléotidique spécifique marquée dans les méthodes dites de PCR en temps réel.

L'extraction des acides nucléiques constitue donc une étape initiale pour tous les diagnostics moléculaires actuels, cette étape combine des étapes de lyse des échantillons par lyse mécanique, lyse thermique, lyse chimique et lyse enzymatique selon des protocoles adaptés à la nature des échantillons et des pathogènes recherchés.

Pour quelques échantillons, les protocoles ont été automatisés sous forme d'extracteurs d'ADN ou d'ARN. Cependant, la capacité de ces extracteurs est limitée, les protocoles d'extraction sont figés par le constructeur et ne permettent pas d'adapter l'extracteur à plusieurs types d'échantillons.

L'extraction des acides nucléiques reste donc un processus essentiellement manuel, mal compatible avec le passage à un haut débit de diagnostic moléculaire.

3.2. Objectifs

Massifier la détection des acides nucléiques des pathogènes après leur extraction, pour accéder à un haut débit de diagnostic moléculaire polyvalent

3.3. Moyens

Plusieurs sociétés développent des plateformes robotisées pouvant intégrer, à la demande, différents composants tels que bloc chauffant, agitateur, système d'aspiration et de pipetage.

Une telle plateforme peut répondre aux besoins d'extraction polyvalente et massive des acides nucléiques à partir d'échantillons variés tel que le sang, les fluides biologiques, les biopsies y compris les biopsies de tissu osseux.

Egalement, il existe spécifiquement des automates de distribution sous format 96 / 384 puits, associés à des centrifugeuses à plaques, permettant d'augmenter le débit des réactions de PCR temps réel utilisant maintenant le même format, et dont dispose déjà le laboratoire.

4 SEQUENCAGE NUCLEOTIDIQUE

4.1 Situation actuelle

L'Infectiopôle dispose d'un plateau de biologie moléculaire et de séquençage permettant le séquençage rapide et à haut débit des génomes des microorganismes bactériens et viraux. En particulier, les activités de séquençage sont regroupées au sein d'une plate-forme Marseille-Nice-Génopole en cours de demande d'agrément IBISA. Cette plate-forme comporte notamment deux séquenceurs capillaires Appplera ABI 3130 et un pyroséquenceur très haut débit GSFlex Roche. Les activités de séquençage sont servies par deux techniciens et un ingénieur.

Les activités de séquençage sont actuellement limitées au niveau de l'étape terminale, dite de « finishing » qui consiste à combler les trous de séquençage. Cette étape est actuellement réalisée en combinant des amplifications PCR croisées et la technique Genome-walker ; ces deux approches sont grandes consommatrices en temps et en amorces oligonucléotidiques, leur coût est donc important.

4.2 Objectifs

L'objectif est d'accélérer l'obtention de la séquence génomique complète des pathogènes d'intérêt en réduisant le temps de « finishing » des séquences, avec pour avantages une obtention rapide des données et une diminution par dix du coût du « finishing ».

4.3 Moyens

Depuis la commercialisation du pyroséquenceur GSFlex, deux nouvelles chimies de séquençage nucléotidique à très haut débit ont été mises à disposition des laboratoires [Medini D, Serruto D, Parkhill J, Relman DA, Donati C, Moxon R, Falkow S, Rappuoli R. Microbiology in the post-genomic era. Nat Rev Microbiol. 2008 ;6:419-30]. Les premières données font état d'une complémentarité des différentes chimies qui permettent chacune de séquencer des régions génomiques difficilement accessibles aux autres chimies. En particulier, la méthode « Solexa Sequencing technology » semble être directement complémentaire du pyroséquençage à très haut débit dont nous disposons.

5.TRANSCRIPTOME, EXPRESSION ET ANALYSE DES PROTEINES

5.1. Situation actuelle

L'infectiopôle dispose d'une capacité d'analyse des produits des gènes comportant l'analyse des transcrits (« transcriptomique ») et leur expression sous forme de protéines dans différents systèmes d'expression *in-vitro* et vivants (il ne s'agit pas d'expression à haut débit mais d'expressions ponctuelles dans le cadre d'applications spécifiques tenant compte notamment du niveau de sécurité exigé pour certains pathogènes) et l'analyse des protéines d'intérêt des pathogènes dans la triple perspective de (1) décrypter les mécanismes pathogéniques et leur évolution (récepteurs et ligands, système toxine-antitoxine) (2) identifier des protéines antigéniques pouvant entrer dans la composition de tests diagnostiques directs (détection de pathogène par anticorps polyclônaux ou monoclonaux spécifiques produits par immunisation à partir des protéines) et de tests diagnostiques indirects (sérologie) par incorporation d'antigènes de spécificité connue (antigènes de genre, antigènes d'espèce ou antigènes de souches) (3) identifier les pathogènes par analyse de leur profil protéique par spectrométrie de masse. L'activité de recherche est, dans ce domaine, couplée à une activité de valorisation de la recherche au travers la société InoDiag® qui développe et commercialise des tests sérologiques et de dépôt de brevets.

L'expertise en analyse du transcriptome est assurée par trois enseignants-chercheurs, un chargé de recherche CNRS et un ingénieur et repose sur une plateforme d'analyse (Agilent). La limite actuelle est située en amont de cette plateforme, au niveau de la production des transcrits pour laquelle le débit de production actuel est inférieur aux besoins d'analyse et à la capacité d'analyse de la plateforme Agilent.

L'expertise en expression des protéines et production d'anticorps spécifiques est assurée par trois ingénieurs. La production de protéines d'intérêt est essentiellement réalisée par collaboration avec le laboratoire AFMB (Luminy, Marseille) qui dispose de l'expertise et des équipements permettant une production à haut débit avec un contrôle de qualité.

L'expertise en analyse de protéines est assurée par quatre ingénieurs dans le domaine de l'analyse par gels bi-dimensionnels et DIGE (appareils Etan IPGphor II et Etan DALT six IPGphor II), de l'identification des protéines par spectrométrie de masse (SELDI-TOF Ciphergen et MALDI-TOF Autoflex Brücker-Daltonic) et de la production d'anticorps par hybridomes. La lecture des gels DIGE est actuellement assurée en collaboration sur un lecteur laser (Typhoon)(Service de Santé des Armées, Pharo, Marseille) ce qui limite la capacité d'analyse dans ce domaine. Egalement, la préparation des spots protéines à partir des gels bi-dimensionnels vers le spectromètre de masse est réalisée manuellement, et représente un goulot d'étranglement dans la perspective d'analyser 300 spots protéiques par semaine par spectrométrie de masse.

Enfin, le spectromètre de masse est actuellement utilisé pour deux taches différentes, identification des spots protéiques issus des gels bi-dimensionnels d'une part et identification des bactéries par analyse de leur profil protéique d'autre part.

Les analyses du transcriptome sont actuellement limitées dans leur débit au niveau des réactions d'amplification. Les limites actuelles des analyses protéomiques comportent (1) une limite dans le débit des analyses lié au temps de préparation des échantillons qui est actuellement une préparation manuelle (2) une limite de détection des modifications post-traductionnelles de type glycosylation, méthylation et phosphorylation, qui peuvent modifier très sensiblement les propriétés biochimiques et physiologiques des protéines et leur antigénicité (3) Le passage en routine de l'identification des pathogènes par spectrométrie de masse est limitée par le fait que nous ne disposons que d'un seul spectromètre, sans back-up en cas de panne ; ne permettant pas d'analyser les pathogènes de classe 3 qui requièrent une phase d'inactivation en P3, longue et délétère pour les profils protéiques ; et limitée à l'identification des bactéries.

5.2 Objectifs

Un premier objectif est d'augmenter le débit des amplifications pour les analyses de transcriptome.

Un deuxième objectif est la production haut débit avec assurance qualité de protéines d'intérêt.

Un troisième objectif est d'augmenter le débit de l'identification des protéines par spectrométrie de masse en augmentant le débit de préparation des échantillons après l'analyse en gel bi-dimensionnel, avec un objectif de 3 X 96 spots analysés par semaine.

Un quatrième objectif est de routiniser l'identification des pathogènes par spectrométrie de masse avec une diminution par 100 du cout de l'identification comparée à l'identification par techniques de biologie moléculaire, y compris les pathogènes de classe 3, les virus, les parasites et les champignons d'intérêt médical.

Un cinquième objectif est d'améliorer la qualité de détection des modifications post-traductionnelles des protéines.

Un sixième objectif est de développer l'analyse fonctionnelle des peptides et protéines d'intérêt.

5.3 Moyens

L'augmentation du débit des analyses des transcrits peut être obtenue par l'acquisition d'un appareil en PCR temps réel à haut débit (format 384 puits).

L'augmentation du débit de production des protéines antigéniques passe par l'acquisition d'une station robotisée de clonage, expression et purification de protéines ; ces robots doivent être disposés dans une armoire dont la température est maintenue stable à +4°C (chambre froide). L'augmentation du débit de production et la production d'anticorps spécifiques passe par l'acquisition de petits matériels de détection rapide (lecteur ELISA) et de purification par chromatographie liquide.

L'augmentation de débit des analyses protéomiques peut être obtenue par l'acquisition d'une plateforme robotisée de découpe et de traitement des spots protéiques à partir d'un gel bi-dimensionnel.

Le passage en routine de l'identification des pathogènes par spectrométrie de masse peut être obtenu par l'acquisition de 4 instruments d'un modèle transportable adapté de spectromètre de masse et des logiciels d'identification et base de données adaptés ; les 4 instruments étant destinés respectivement aux deux laboratoires P3 de la Faculté de Médecine, au laboratoire de Bactériologie hors P3 et au laboratoire de Parasitologie-Mycologie hors P3.

L'amélioration de la détection des modifications post-traductionnelle peut être obtenue par l'acquisition d'un lecteur laser de gels.

Le développement de l'analyse fonctionnelle des protéines passe par le développement des techniques de micro-injection des peptides/protéines dans des cellules vivantes et des arthropodes vecteurs pour appréhender la physiologie cellulaire ; couplé à un système d'acquisition d'images pour suivre la séquence des événements en « time-laps microscopy ».

Projet N°2 INSECTARIUM ACL 3/4

1. INSECTARIUM

1.1 Situation actuelle

Les équipes de niveau international de l'infectiopôle comme l'Unité des Rickettsies de la Faculté de Médecine et l'Institut de Médecine Tropicale du service de santé des armées sont très impliquée dans l'étude des maladies transmises par les vecteurs comme les moustiques, les tiques, les puces, ou les poux. Ces équipes se sont notamment illustrées ces dernières années sur l'infection à Chikungunya, dont le risque d'installation en PACA a été confirmé, le paludisme, ainsi que les rickettsioses et les typhus, dont le centre mondial de référence est à Marseille. Afin de mieux étudier ces maladies, ce projet de l'infectiopôle se propose d'équiper un insectarium commun qui permettra d'effectuer des élevages de tiques, de poux, de puces, de moustiques. Il sera ainsi possible de développer des programmes de recherches sur les maladies infectieuses transmises par ses vecteurs, ainsi que leur risque de propagation. *Ce projet présente les équipements nécessaires pour réaliser cet insectarium qui, à terme, se localisera dans l'enceinte de l'infectiopôle sur la Timone*

1.2 Objectifs du projet

Les maladies à transmission vectorielle sont en extension sur l'ensemble du globe. L'accélération des échanges internationaux et le réchauffement climatique permettent l'installation dans les zones tempérées de nouveaux vecteurs dangereux pour la santé humaine ou animale mais aussi l'arrivée de nouveaux pathogènes pouvant être transmis parfaitement par des vecteurs locaux. Ainsi en région PACA, un nouveau vecteur *Aedes albopictus* fait courir le risque d'une transmission autochtone de Chikungunya identique à celle survenue en 2007 en Italie. D'autre part, de nouveaux travaux ont montrés en 2007 1) que les anophèles camarguais restent parfaitement capables de transmettre les parasites du paludisme régulièrement importés par les touristes ou les migrants, 2) qu' *Aedes caspius* moustique omniprésent en Camargue est parfaitement capable en laboratoire de transmettre le virus du Chikungunya. D'autre part, les phlébotomes, petits moucherons bien connu des vétérinaires et des médecins, car vecteurs de la leishmaniose, ont été trouvés porteur à Marseille et à Nice, du Virus Toscana, agent de fièvres estivales mais aussi de méningites et méningo-encéphalites. Les poux de corps qui parasitent la quasi-totalité des sans abris l'hiver, sont des vecteurs de la fièvre des tranchées qui a été redécouverte à Marseille, mais aussi du typhus, qui peut être à tout instant importé des pays en voie e développements comme en 1999, et déclencher une épidémie dans les foyers de SDF. Les puces, vecteurs de la peste transmettent aussi des maladies bien étudiées à Marseille, comme le typhus murin. Enfin, les tiques transmettent dans le sud de la France plusieurs rickettsioses, comme la fièvre boutonneuse méditerranéenne dont la mortalité des cas hospitalisés atteint 5%. *Pour étudier les maladies infectieuses transmises et mener une lutte efficace, il faut connaître les caractéristiques des vecteurs* (durée de développement, facteurs favorisants, facteurs limitants, etc.) et pouvoir évaluer la sensibilité aux insecticides. Pour mener ces études, il est indispensable de pouvoir procéder à l'élevage de ces insectes et acariens. De la même manière, la capacité des vecteurs potentiels locaux à transmettre des pathogènes importés doit être évaluée. Pour cela, il faut disposer d'un *insectarium sécurisé* permettant de réaliser des infections artificielles pour évaluer la compétence des vecteurs locaux mais aussi leur capacité à transmettre les pathogènes à leur descendance. *Actuellement, il n'existe en France qu'un seul insectarium de niveau de sécurité biologique 3, situé à l'institut Pasteur de Paris.*

1.3 Moyens prévus

Pour élever des moustiques dans des conditions idéales d'hygrométrie, de température et en respectant les rythmes jours/nuits, il faut disposer de locaux comprenant des pièces équipés pour maintenir température et hygrométrie et/ou de chambres climatiques permettant de reconstituer ces conditions sans travaux d'infrastructures, en équipant des locaux existants. Pour travailler sur les moustiques vecteurs en combinant élevage temporaire de souches sauvages et maintien de souches de référence de différentes sensibilités aux insecticides, il est nécessaire de disposer de quatre pièces d'élevages distinctes et suffisamment distantes pour éviter les contaminations des colonies et de 8 chambres climatiques, quatre étant dédiées aux souches de référence maintenus séparées selon leurs caractéristiques génétiques. Dans les deux situations, l'achat de petit matériel d'élevage (larve et adulte) est nécessaire : 48 cages adultes, 48 plateaux d'élevages larves, 2 aspirateurs à moustiques, pondoirs, appareil de séchage de ponte etc. Pour alimenter l'insectarium en souches sauvages, un investissement en pièges de capture adulte, larves et œufs doit être fait : pièges bg-sentinel, mosquitomagnet, CDC light trap, oviposition trap, pondoirs pièges etc. D'un autre coté, l'élevage de tiques, poux et puces, nécessite le disposer d'étuves réfrigérées dont on peut réguler la température, l'humidité. L'ensemble doit être sécurisé afin d'éviter tout échappement d'arthropodes. Il faut des Le repas sanguin est pris sur des animaux (lapins) dans des cages sécurisées dont la température et l'humidité sont réglables. Divers petits matériels sont également nécessaires : pinces, tissus, anesthésiants, …

Conditions particulières aux agents de Class 3 et 4. Le travail avec les arthropodes infectés avec des agents de class 3 comme les rickettsies, yersinia pestis …nécessite un travail en zone appelé ACL pour « Arthopods Containing (biosecurity) Level » dont la description est jointe en annexe. Parmi les arthropodes sur lequels nous travaillons certain sont susceptibles d'être infectés par des agents de pathogénicité inconnue ou connu de classe 3 ou 4 comme le virus Crime-Congo dans le tiques du genre *Boophilus*. Dans ce cas l'analyse des tiques ou les études de transmission expérimentale avec ces agents doit être réalisée dans un ACL 3 voire 4. Pour ce faire les locaux ACL3/4 seront séparé des locaux ACL2 et élevage non infecté et en conséquence l'ensemble des équipements d'élevages doit être doublé. Ceci nécessite en plus de l'équipement de biosécurité niveau 2 des hôtes a flux laminaire de class 2/3, et un autoclave. Un inventaire détaille des arthropodes et des agents doit être mise à jour en permanence.

1.4 Surface

L'ensemble de ces matériels seront installés dans un insectarium A3/4 qui sera assemblé dans l'actuelle animalerie de la faculté de médecine au niveau 6 sur une surface d'environ 110 m2 dont 50m2 seront en NSB 3 pour les expérimentations et la stabulation/stockage des arthropodes et des animaux infectés par des agents de classe 3 et 60m2 seront consacrés à la stabulation des animaux (Lapins et autres petits rongeurs) et des arthropodes non infectés. Voir plan en annexe

Projet N°3 Thérapeutique antivirale

1. Situation actuelle.

Une des préoccupations majeures de l'infectiopôle est le traitement des pathologies infectieuses humaines. Le défi majeur dans ce domaine pour la prochaine décennie est incontestablement la découverte de traitements antiviraux. En effet, les pathogènes viraux sont responsables de la majorité des infections humaines mais, à la différence des pathogènes bactériens, ne peuvent que rarement être combattus par des médicaments anti-infectieux spécifiques. En particulier, les virus à génome ARN incluent des pathogènes humains extrêmement fréquents (on a évoqué le chiffre de 75% des infections humaines) et paradoxalement, à l'exception du VIH et de la grippe, il n'existe aucun traitement anti-infectieux spécifique contre ces virus.

Les scientifiques de l'infectiopôle ont donc mis en place une stratégie de recherche de molécules antivirales basée d'une part sur l'étude de chimiothèques d'intérêt (incluant des chimiothèques de référence, mais également une collection spécifique de produits déjà utilisés en thérapeutique humaine) et d'autre part sur des technologies diversifiées incluant la recherche d'interactants avec des protéines virales recombinantes et l'évaluation de l'effet inhibiteur de candidats antiviraux en culture cellulaire infectées par des souches d'intérêt clinique.

Le projet présenté ici propose la mise en place de nouveaux équipements pour renforcer les capacités du pôle pour l'identification de molécules à potentiel antiviral et leur évaluation en culture cellulaire sur des souches virales d'intérêt clinique.

2. Objectifs du projet – Moyens prévus pour répondre à ces objectifs.

Les équipes de l'infectiopôle ont développé depuis plusieurs années des plateformes d'étude des antiviraux dont l'excellence a permis la labellisation "IBISA" par le CNRS. Les progrès majeurs effectués au cours des dernières années imposent maintenant de réaliser la recherche et l'évaluation de molécules actives à une échelle plus importante. Il est donc indispensable d'automatiser certaines étapes et d'accéder aux technologies les plus performantes pour d'autres.

Pour la recherche et la caractérisation d'interactions avec les protéines virales d'intérêt, les partenaires de l'infectiopôle ont produit pendant un projet de génomique structurale Européen (VIZIER) plusieurs centaines de protéines recombinantes impliquées dans la réplication de virus à génome ARN (*Flaviviridae, Picornaviridae, Caliciviridae, Bunyaviridae, Arenaviridae, Filoviridae, Orhomyxoviridae, Paramyxoviridae, Coronaviridae* etc..). Il est indispensable de pouvoir identifier des interactants sélectionnés avec ces protéines d'intérêt, et de pouvoir caractériser les interactions moléculaires à un débit élevé, sans système de marquage spécifique. La technologie Biacore est parfaitement adaptée pour cet usage et la génération de machines la plus récente (Biacore T100) permet de bénéficier de toutes les fonctionnalités des appareillages de recherche avec un débit élevé. La mise à disposition d'une puce "sensor chip NTA" permet l'étude des protéines portant un marquage poly-histidine (His-tag) ce qui est le cas de la totalité des protéines produites dans les programmes antérieurs. Le Biacore T100 permettra donc à la fois des études de criblage d'interactants (avec une limite basse de détection de 100 Daltons) et la caractérisation fine (affinité, cinétique) des interactions observées. Ceci représente une avancée majeure des capacités de criblage du pôle pour la sélection de molécules à potentiel antiviral.

Il est important de noter que cet appareillage est également d'un très grand intérêt pour des groupes de l'infectiopôle ne travaillant pas dans le domaine des antiviraux. En particulier, les possibilités d'utilisation de la technologie Biacore pour la caractérisation des réponses immunes sont importantes et ont fait l'objet d'une concertation avec les scientifiques concernés.

Pour la mise en évidence d'une activité antivirale *in cellulo* (probablement l'étape critique dans le processus d'identification), les scientifiques de l'infectiopôle ont opté pour la technologie de l'immuno fluorescence pour la mise en évidence de l'inhibition de la réplication virale. Les avantages décisifs de cette approche sont sa versatilité, son application possible à des souches non lytiques et à des souches de niveau de sécurité biologique 3, et son adaptation aisée à des souches cliniques. Cette technologie est maintenant parfaitement rodée et peut être automatisée dans sa phase amont par l'utilisation de robots pipetteurs pour la préparation des cultures cellulaires sur lame de verre. De tels robots peuvent réaliser avec une très grande reproductibilité les phases d'infection, d'ajout des dilutions de molécules antivirales, puis de fixation et révélation par des anticorps fluorescents spécifiques. Ils seront installé dans un laboratoire de niveau de sécurité biologique 3 afin de pouvoir être utilisé pour l'étude des pathogènes les plus sévères.
En aval, la lecture des lames sera automatisée au moyen d'une plateforme d'immunofluorescence robotisée couplée à une caméra numérique et à un logiciel de quantification de la fluorescence. Cette méthodologie permet d'éliminer la lecture individuelle de chacun des puits testés par un opérateur. Elle introduit davantage de sensibilité et de reproductibilité dans la mesure quantitative, permet de circonvenir une étape absolument limitante en terme de débit d'analyse et autorise l'archivage des données obtenues. Elle est donc décisive pour le fonctionnement intégré de la chaîne de criblage.
Ici également, il est important de noter que cet appareillage est d'un très grand intérêt pour des groupes de l'infectiopôle ne travaillant pas dans le domaine des antiviraux.

L'activité antivirale *in cellulo* peut également être évaluée par des outils de biologie moléculaire. Ceci nécessite de disposer en laboratoire de niveau de sécurité biologique 3 d'outils performants pour l'extraction des acides nucléiques à partir des surnageants de larges séries de cultures infectées. Ceci peut être automatisé par l'installation et l'utilisation en laboratoire NSB3 d'un extracteur d'acides nucléiques à haut débit. Cet automate peut lui-même être couplé à une plateforme de PCR en temps réel à haut débit afin de quantifier les génomes viraux. L'ensemble de cette chaîne offre une alternative indépendante pour l'étude des antiviraux *in cellulo*. Cette technologie est d'un intérêt particulier pour l'étude des virus pour lesquels il n'existe pas de système de détection par immunofluorescence.

Projet N°4 : PLATEFORME BIOLOGIE CELLULAIRE ET CYTOMETRIE
BIOLOGIE CELLULAIRE

1. Situation actuelle

Les progrès de la génétique moléculaire et de la biologie cellulaire ont rendu possible la dissection moléculaire des interactions entre les agents pathogènes et leurs cellules cibles. Cependant, les stratégies mises en place par une bactérie, en particulier intracellulaires, pour envahir une cellule hôte, y persister et s'y multiplier restent mal comprises de nos jours.

En effet de nombreux pathogènes émergents tel que le *Acanthamoeba polyphaga mimivirus* (APMV) (Lascola and al, Science 2003), *Tropheryma whipplei* (Desnue et al) ou reémergents tels que *Coxiella burnetii* responsable de la fièvre Q (Ghigo CIR), *Mycobacterium tuberculosis* agent de la tuberculose (Russell D Nat Rev Mol Cell Biol. 2001) ou les rickettsies ont restreint leur mode de vie a des cellules dotées d'un puissant équipement bactéricide, les monocytes/macrophages, contrairement à d'autres agents infectieux qui survivent et se multiplient dans des cellules dépourvues d'un tel potentiel microbicide (Falkow. S and al, Nat Rev Microbiol. 2004).

Nos objectifs sont de mieux comprendre les interactions des agents pathogènes émergent ou re-émergent avec leur cellules hôtes afin d'identifier et de mieux comprendre les mécanismes qui permettent leurs échappement à la réponse immune. Les informations obtenues par un tel projet permettront d'envisager de nouvelle approche thérapeutique.

L'évaluation des interactions hôtes-pathogène nécessite de nouvelle technique d'investigation telle que la microscopie confocale ou la microscopie confocale dynamique en temps réel. L'URMITE s'est récemment équipée (2007-2008) d'un microscope confocal, dont l'utilisation a permit récemment d'élucider le mécanisme d'internalisation de APMV par les macrophages (Ghigo Plos), ainsi a que les mécanismes de détournement de la maturation du phagosome mis en œuvre par *T. whipplei* (Pretat et al, manuscript en préparation).

La microscopie confocale dynamique en temps réelle (live-imaging), va permettre suivre en temps réel l'entrée des agents pathogènes, leur interaction avec les récepteurs des cellules hôte, la modulation de la transduction du signal, de la réponse immunitaire, leur mobilités et leur interaction avec la voie d'endocytose. Il est donc nécessaire de pouvoir compléter la plateforme microscopie confocale par une plateforme microscopie confocale dynamique en temps réel.

2. Objectifs

2.1 Etude de l'internalisation et engagement des récepteurs

Les cellules exprimant des formes taggées (GFP, YFP, CFP, mRFP) de certaines récepteurs tels que les TLRs et les intégrines, mais aussi de l'actine, seront infectées et placées dans une chambre thermostatée à 37°C sous CO_2 permettant de suivre par microscopie confocale en temps réel la dynamique d'interaction des agent pathogènes, rendus fluorescent (liaison covalente avec un fluorophore), avec la cellule hôte. Une telle approche va nous permettre d'identifier les effecteurs clé de la dynamique d'infection des cellules par les agents pathogènes. En effet nous pourront observer le recrutement de l'actine et des récepteurs. Nous pourrons en utilisant des souris invalidées pour certains gènes des récepteurs d'intérêt, étudier les modifications d'internalisation, ainsi que le recrutement des récepteurs non invalidées

2.2 Etude de la mobilité des agents pathogènes

Les cellules expriment des formes taggées (GFP, YFP, CFP, mRFP) de l'actine seront infectées et placées dans une chambre thermo statée à 37°C sous CO_2 permettant de suivre par microscopie confocale en temps réel la dynamique de déplacement des agents pathogènes, ainsi que le mode de polymérisation de l'actine utilisé par ces agents pathogènes pour induire leur mobilité. Une telle approche va nous permettre d'identifier les effecteurs clé de la de mobilité intracellulaire des agents pathogènes dans les cellules.

2.3 Etude de la modulation la réponse immunitaire et la transduction du signal

Les molécules d'intérêt comme les kinases ou les cytokines impliquée dans la réponse microbicides pourrons être exprimé sous forme formes tagguées (GFP, YFP, CFP, mRFP). Le recrutement ou la sécrétion de ces molécules lors de l'infection pourront alors être suivis en temps réel. Par photobleaching il sera possible de définir la vitesse de recrutement des ces effecteurs mais aussi le turn-over de celui-ci. La visualisation du rôle de la phosphorylation lors de la transduction du signal sera, elle, possible par utilisation de marqueur fluorescent des phosphorylations. Le suivi du recrutement de certain médiateur de la transduction (i.e NFk□) du signal sera possible en utilisant des gènes fluorescents rapporteurs. Ce type d'approche permettra d'étudier la relation en temps réel entre le pathogène et la réponse immunes et d'identifier les mécanismes qui orientent la réponse immune en faveur du pathogène.

2.4 Etude du trafic intracellulaire des agents pathogènes

La dynamique d'interaction entre le phagosome contenant les agents pathogènes et les endosomes reste indéterminée. Pour répondre à ces questions, il est utile de disposer d'une méthode reproductible de comptage des cellules et des bactéries en routine ; ceci peut être réalisé par des cytomètres en flux, qui sont des instruments protables, pouvant être installés dans les laboratoires P3. Ensuite, nous utiliserons deux approches basées sur la microscopie confocale « live imaging » et « photobleaching ». L'étude de la dynamique d'interaction du phagosome avec les endosomes (fusion hetérotypique) ou avec d'autres phagosomes (fusion homotypique) se fera dans un système de reconstitution de fusion in vitro. Brièvement des phagosomes et des endosomes seront mis en contact en présence de microfilament d'actine et de cytoplasme. Leur mobilité et leur interactions avec les différents éléments du système sera suivi par microscopie confocale, ceci sera possible par le fait que les phagosomes seront purifiés de cellules exprimant la forme CFP Rab5 (phagosome précoce) ou Rab7 (phagosome tardif), les endosomes seront eux purifiés de cellules exprimant la forme mRFP de rab5 (endosomes précoce) ou rab7 (endosomes tardif). Les microtubules d'actine seront eux marqués par de la phalloidine-488. Avec ce système trois couleurs il sera possible de suivre les fusions entre endosomes ou phagosomes ainsi que leur mobilité. Un programme informatique permettra de calculer les taux de fusion et les vitesses de mobilité.

Le photobleaching nous permettra de suivre les échanges entre endosomes - phagosomes et phagosomes-phagosomes. Pour cela nous travaillerons avec des endosomes ou des phagosome exprimant les protéines d'intérêt (Rab, kinase…) sous forme GFP. Une région du phagosome sera alors photobleachée par un faisceau laser à haute intensité, puis le temps de recouvrement de la fluorescence sera mesuré. La réapparition de la fluorescence sera du à l'acquisition par le phagosome de protéines provenant de cargo ou d'endosomes. Le temps de recouvrement nous permettra d'estimer la dynamique d'échange du phagosome avec les endosomes au sein des cellules infectées. Ces résultats seront comparés avec ceux obtenus lors de l'utilisation de phagosomes non infectieux (billes de latex).

3. Moyens

La mise en place d'un équipement de microscopie à temps réel nécessite un budget à la hauteur de 350.000 euros pour acquérir l'équipement, ainsi que 100.000 euros qui seront nécessaire aux travaux de mise aux normes du local où sera installé l'équipement. Par ailleurs cette salle devra être équipée d'un incubateur C02 et d'une hôte de culture type 2, pour un budget de 50.000 euros.

3.1 LA MICROSCOPIE CONFOCALE DYNAMIQUE en temps réelle (live-imaging) consiste en un microscope inversé équipé pour la fluorescence et vidéo microscopie: Nécessaire à l'expérimentation avec des cellules et des tissus vivants. Les expériences traitant d'aspects dynamiques, ce microscope doit donc être équipé de périphériques motorisés afin d'automatiser les prises de vues ainsi que d'enceintes thermo statées et contrôlées en CO2. Il est nécessaire aussi de disposer une table antivibratoire performante. Un équipement sur ce microscope de microscopie laser à balayage équipé avec des lasers dans le far red (633 nm) et le visible (488nm, 543nm), d'objectifs 10x, 40x, 63x et 100x La technique FRET (Fluorescence Résonance Electro Transfert) sera nécessaire à l'étude des interactions fonctionnelles entre les structures. Dans cette technique les modifications spectrales des marqueurs fluorescents indiquent leur couplage fonctionnel. Un système de déconvolution spectrale sur ce microscope. Nécessaire pour: les techniques de FRET, l'observation d'échantillons avec une forte autofluorescence et le marquage avec des fluorophores avec des pics d'émission proches.
Afin de pouvoir faire des aquisitions a grande vitesse en temps réel en, ce microscope devra être équipé d'un fast spining disque, ce qui permettra des acquisition de l'ordre du milliseconde. Les ressources informatiques et logiciels nécessaires au fonctionnement intégré de l'ensemble du système. Un système de stockage des données, ainsi que la possibilité de faire de l'analyse et de la reconstruction des structures tridimensionnelles. Tous ces équipements sont installés sur le même statif du microscope inversé motorisé.
L'équipement de ce microscope avec cet ensemble de systèmes est absolument nécessaire à la polyvalence du poste. En effet, les contraintes liées au confinement en biosécurité de type 3 vont exiger que toutes les manipulations, observations, marquages, enregistrements, soient faits sur place dans l'enceinte P/A3. L'utilisation et la prise en charge de ce type de matériel seront assurées par des chercheurs et un ingénieur.

3.2 CYTOMETRIE EN FLUX : Les réponses de l'hôte à l'infection reposent sur l'activation de populations cellulaires et leur recrutement tissulaire. L'UMR 6236 s'est dotée d'une plateforme pour étudier la réponse in situ. Cette plate-forme comporte actuellement des microscopes à fluorescence avec ou sans caméras, un microscope à dissection laser et un microscope confocal biphotonique. Néanmoins, ces méthodes ne permettent pas d'étudier de façon quantitative les populations cellulaires impliquées dans la reconnaissance des microorganismes, à savoir les cellules immunes (les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques, les différentes sous-populations de lymphocytes T) et les cellules non immunes cibles des agents infectieux (les hématies et les cellules trophoblastiques à titre d'exemple). La cytométrie en flux permet de caractériser phénotypiquement et fonctionnellement des populations y compris minoritaires et jette les bases de l'isolement de populations à partir de prélèvements, en particulier humains.
Le premier objectif sera de caractériser de façon quantitative les populations immunes impliquées dans l'organisation de la réponse immune dans les modèles murins d'infection et dans les prélèvements cliniques (sang et biopsies tissulaires). Les modèles infectieux bactériens comprendront les infections *à Coxiella burnetii, Rickettsia conorii, R. prowazeckii* et *Orientsia tsutusugamushi*. A partir de tissus hépatiques et spléniques, nous isolerons par tri les populations immunes en particulier myéloïdes qui seront ensuite caractérisées phénotypiquement et fonctionnellement. Une même approche sera développée avec les échantillons humains : endocardes (endocardites infectieuses), tissu intestinal (maladie de Whipple) et placenta (fièvre Q). Nous isolerons et caractériserons les populations myéloïdes mais aussi lymphoïdes. Les paramètres étudiés : l'analyse du cycle cellulaire, l'expression des cytokines intracellulaires (interféron □, interleukine (IL)10, IL-12, IL-16, IL-17) et l'évaluation de la mort cellulaire (annexine V, effet tunnel, caspases). L'analyse des réponses cellulaires amènera à évaluer la polarisation des populations cellulaires (Th1/Th2 ; M1/M2 ; DC1/DC2).
La caractérisation des populations myéloïdes et lymphocytaires dans les modèles murins d'infection est un objectif important des équipes impliquées dans l'étude de la physiopathologie des maladies infectieuses. Ceci permettra de mesurer le degré d'immunosuppression et la polarisation immune in vivo ou, à titre d'exemple, l'isolement des populations immunes en vue de transfert adoptif.
Le projet cytométrie en flux repose sur l'acquisition d'un analyseur trieur à haute vitesse correspondant au FACSAria™. L'appareillage comporte un banc optique à 3 lasers (405, 488, et 633), un système fluidique, un système de tri et un équipement informatique. Le coût de l'opération est de 370 000 euros (un devis indicatif est fourni : annexe FACSAria).

3.3 AUTOMATISATION DU SCREENING CELLULAIRE
Afin de mieux comprendre les interactions hôte pathogènes a grande échelle, il est nécessaire de pouvoir screener différent effecteurs cellulaire (kinase, Rab protéines) ou bactérien (toxine, micro RNA), mais aussi de pouvoir identifier les molécules potentiellement bactéricide ou bactériostatique tel que les antibiotiques de nouvelle génération (statine), RNAi. Pour cela, il faut pouvoir effectuer des approches microscopiques automatisées à grande échelle (96 et 384 puits) qui permette des études fonctionnelles. Ceci est possible, grâce au nouvelle technologie comme Automated microscopy system ArrayScan VTI (Cellomics) couplé a un système d'analyse automatique tel que Image analysis software BioApplications (Cellomics)

Projet N° 5 Renfort P3

Les laboratoires P3 de Microbiologie de l'Infectiopôle ont actuellement un fonctionnement et un équipement conforme aux normes en vigueur. Toutefois, les équipements ont vieilli et il y a un besoin actuellement d'upgrader certains aspects, notamment moyens de décontamination (décontaminations programmées dans la maintenance ou lors de survenue d'accidents), sécuriser les accès par des systèmes modernes et possibilité de travailler en toutes sécurité sur des prélèvements humains potentiellement de classe 4.

MODERNISATION DES LABORATOIRES P3

1.1. Situation actuelle

Nous travaillons actuellement sur 2 laboratoires P3, le laboratoire de l'URMITE et le laboratoire commun de la Faculté de médecine de Marseille dont nous utilisons plus de 50% de la capacité. Actuellement notre seul moyen pour réaliser les décontaminations lors des maintenances est d'utiliser un système de fumigation de formaldéhyde. Ce produit étant très toxique pour l'homme, sont utilisation sera bientôt interdite dans cette indication. Les systèmes d'accès aux laboratoires P3 ainsi qu'aux souchiers sont assurés par des sytèmes classiques, respectivement carte magnétiques individuelles et clefs. Les 2 pouvant être perdus ou en cas de malveillance volé, la sécurisation des souches et cultures sensibles est perfectible. Pour finir, si la totalité des cultures que nous faisons peuvent être faites sous poste de sécurité microbiologique (PSM) car nous savons qu'il s'agit de pathogènes de classe 3, la culture et l'analyse de prélèvements humains en cas d'affection inconnue mériteraient un niveau de sécurité plus élevé pour l'opérateur. En effet, de par la spécificité de nos services cliniques et des analyses que nous pratiquons il est possible voire probable que nous puissions recevoir un jour des prélèvements de patient infectés par un pathogène de classe 4 sans qu'il y en ait la suspiscion. Dans ce ca slà, l'utilisation des systèmes plus sécurisés que les PSM serait un gage de sécurité pour nos personnels.

1.2. Objectifs

L'objectif est d'upgrader l'équipement de nos P3 au niveau sécurité.

1.3. Moyens prévus.

Pour la décontamination, il nous faut acquérir un système de décontamination par peroxyde d'hydrogène de grande taille qui permet de décontaminer toutes les pièces des laboratoires P3. Nous avons aussi besoin d'un appareil générateur d'acide péracétique de petite taille permettant de décontaminer les isolateurs.
Pour assurer de façon efficace la sécurisation des accès aux laboratoires P3 et des souchiers qui y sont attachés, nous avons besoin d'acquérir des systèmes sécurisés biométriques qui sont actuellement les systèmes modernes les plus efficaces de contrôle d'accès.
Pour travailler en toutes sécurité sur des prélèvements humains potentiellement de classe 4, nous avons besoin d'acquérir plusieurs isolateurs. Contrairement au PSM, ces systèmes sont totalement fermés et les prélèvements et le matériel y sont amenés par des systèmes de sas. Ils sont aussi décontaminables de façon efficace sans jamais être ouverts sur l'extérieur. L'utilisation de bains secs pour la préparation des échantillons aux techniques de biologie moléculaire participe à ce besoin.

Projet N° 6 : FROID

Les laboratoires de Microbiologie de l'Infectiopôle conservent depuis de nombreuses années les souches bactériennes entrant dans les cadres suivants :

- Souches bactériennes d'espèce ou genre non décrits.
- Souches bactériennes d'espèces classées comme des agents de niveau de sécurité biologique 3.
- Souches bactériennes d'espèces connues possédant des caractères phénotypiques et/ou génotypiques inhabituels : résistance aux antibiotiques, toxines,
- Souches bactériennes isolées de patients présentant des infections profondes : endocardite.
- Souches bactériennes d'espèces de culture fastidieuse, en particulier intra-cellulaires strictes ou facultatives : *Rickettsia* sp., *Bartonella*sp., *Mycobacterium sp.*

A ce jour, plusieurs milliers de souches bactériennes sont conservées. L'importance de cette collection est d'autant plus grande que la majorité de ces souches est unique. Cette spécificité, couplée à la difficulté de déposer les souches intracellulaires strictes dans d'autres collections de souches, a motivé la création d'une collection de souches officielle, la Collection de Souches de l'Unité des Rickettsies (CSUR, WDCM 875, http://ifr48.timone.univ-mrs.fr/portail2/index.php?option=com_content&task=view&id=96&Itemid=52). Cette collection conserve actuellement 618 souches de *Bartonella* et 174 souches de *Rickettsia*, constituant la plus grande collection mondiale de souches des bactéries de ces deux genres bactériens. Témoins de son implication dans la conservation et l'étude des bactéries de culture difficile, les seules nouvelles espèces de *Rickettsia* décrites officiellement depuis 2001 (*R. heilongjiangensis*, *R. asiatica*, *R. tamurae*, *R. raoultii*) ont toutes été décrites par l'Infectiopôle.

La pérennisation de la conservation de cette collection et des autres souches bactériennes isolées par les laboratoires de l'infectiopôle est donc particulièrement cruciale, en particulier pour la description de la biodiversité bactérienne de l'environnement humain.

CONSERVATION SECURISEE DES SOUCHES BACTERIENNES

1.1. Situation actuelle

La conservation des souches bactériennes est actuellement essentiellement réalisée en congélateurs à -80°C. La gestion des stocks est réalisée manuellement, avec étiquetage des tubes et saisie de l'état des stocks en fichier Excell. Ce type de conservation par une seule méthode expose au risque de perte des souches en cas de panne mécanique ou électrique des congélateurs. Par ailleurs, l'étiquetage de chaque tube expose au risque de vol.

1.2. Objectifs

L'objectif est de multiplier et sécuriser les moyens de conservation des souches bactériennes de l'Infectiopôle, avec un système de traçabilité optimisé permettant un suivi très précis des souches conservées.

1.3. Moyens prévus.

Il est prévu de multiplier les moyens de conservation, avec dédoublement des stocks de souches conservées en congélateur à -80°C, qui seront également conservés en azote gazeux à -196°C et sous forme lyophylisée à température ambiante. Chaque appareil de congélation sera équipé d'un système d'alarme visuelle et sonore qui enverra en cas de problème un message d'alarme aux agents de sécurité de la Faculté de Médecine de Marseille. De plus, les tubes dans lesquels seront conservées les souches seront identifiés par des puces électroniques individuelles reconnues par un lecteur automatisé. L'avantage d'un tel système est, outre l'anonymisation des tubes qui renforce la sécurité, est de permettre une traçabilité accrue de chaque tube et d'assurer une gestion optimisée des stocks. Deux pièces seront équipées : une dédiée aux souches « sensibles » : souches de niveau de sécurité biologique 3, incluant les souches d'espèces considérées comme des agents potentiels de bioterrorisme ; et une pièce dédiée à la conservation des autres souches de la CSUR. Chaque pièce aura une capacité initial de conservation de 15000 souches, sera climatisée et sécurisée par une serrure à carte magnétique.

Total de la demande de financement Equipement (€)HT

Projet N°1 MICROBIOGENOMIQUE	5 009 617
Projet N°2 INSECTARIUM ACL ¾	1 404 247
Projet N°3 Thérapeutique antivirale	975 000
Projet N°4 Plateforme biologie cellulaire et cytométrie	1 453 454
Projet N°5 Renfort P3	518 081
Projet N° 6 Froid	929 900
Total €	**10.290.300**

4. Projet d'aménagement des structures :financement initialement prévu dans le cadre du CPER qui sera finalement porté par l'IHU (Institut hospitalo-universitaire) dans le cadre des investissements d'avenir-grand emprunt.

4.1. Plan détaillé de financement
Tous les montants sont présentés en HT

L'opération est programmée dans le cadre du contrat de projet Etat/Région 2007 – 2013.

Financeurs	Montant de la subvention (HT €)
Etat	500 000
IRD CO- financeur	700 000
CNRS CO-financeur	836 120
Conseil Régional	2 836 120
Conseil Général	2 000 000
Ville de Marseille	418 060
FEDER	3 000 000
Budget GLOBAL	**10 290 300**

4.2. Coût final de l'opération

5.3.2 – Coût d'achat des équipements

Le cout global d'achat des équipements est de 10 290 300 euros

5. Projet de localisation

L'Infectiopôle sera localisé sur le campus santé de l'Université de la méditerranée, dans les bâtiments des Facultés de Médecine et de Pharmacie.
Il sera implanté dans des structures existantes.