

Vaccins et bioterrorisme : vaccins anti-varioliques

Vaccines and bioterrorism: smallpox vaccines

Par T. DEBORD⁽¹⁾

(communication présentée le 22 octobre 2003)

RÉSUMÉ

Longtemps considéré comme une menace théorique, voire un simple mythe, le bioterrorisme est devenu une réalité à la suite des événements de l'automne 2001, aux États-Unis. La prise en compte de ce risque nécessite de disposer de moyens thérapeutiques et prophylactiques vis-à-vis des principaux agents potentiellement utilisables. Actuellement, la protection vaccinale contre les agents du bioterrorisme ne concerne, en France, que la variole, seule maladie contre laquelle nous disposons d'un vaccin. Nous envisageons l'état actuel et les perspectives de ce vaccin antivariolique.

Mots-clés : bioterrorisme, variole, vaccins antivarioliques.

SUMMARY

Long considered as a theoretical menace, or even a simple myth, bioterrorism has now become a reality in the aftermath of the events which occurred in the USA in autumn 2001. To deal with such a risk, therapeutic and prophylactic resources against the main potential agents must be available. In France today, the vaccine protection against bioterrorism agents is limited to smallpox, the only disease for which there is a vaccine. The current situation and perspectives of this smallpox vaccine are described.

Key words: bioterrorism, smallpox, smallpox vaccines.

(1) Service des Maladies infectieuses et Tropicales, Hôpital militaire Bégin, Saint-Mandé.

• INTRODUCTION

Pendant plusieurs siècles, la variole a constitué un véritable fléau pour l'humanité. Le 14 mai 1796, un médecin anglais, Edward Jenner, inocule à un garçon de 8 ans, James Phipps, le virus de la variole bovine (cowpox), isolé de la main de Sarah Nelmes, jeune femme accidentellement infectée. Le 1^{er} juillet de la même année, Jenner montre que le garçon vacciné résiste à la variole. Le nouveau procédé devient connu sous le terme de vaccination (du latin *vacca* : la vache). Le virus cowpox fut ensuite remplacé par le virus de la vaccine, virus très proche, d'origine toujours discutée, dérivé de la variole, du cowpox, du horsepox ou bien d'hybridation entre eux.

Jenner avait prédit "que la disparition de la variole, le plus épouvantable fléau de l'espèce humaine, serait le résultat final de cette pratique". De fait en 1980, la variole est officiellement déclarée éradiquée par l'OMS et la vaccination est progressivement abandonnée.

Paradoxalement, ce triomphe de la médecine moderne allait être à l'origine de notre vulnérabilité. La variole est le premier agent biologique à avoir été utilisé à des fins militaires au XVIII^e siècle. Le virus de la variole fait actuellement partie des principaux agents biologiques potentiellement utilisables dans un contexte de bioterrorisme. Les événements de septembre 2001 ont accru la perception de ce risque et amené à revoir les capacités de prévention notamment la vaccination anti-variolique.

• VACCINS ANTIVARIOLIQUES

Les vaccins antivarioliques sont arbitrairement classés en 3 générations :

- les vaccins de première génération, "historiques", ont été produits il y a 30 ans, par inoculation directe de souches vaccinales à des animaux, par scarification de la peau de génisses ou de moutons ;
- les vaccins de deuxième génération sont des vaccins produits à partir de souches historiques, adaptées sur cultures cellulaires, pour permettre une production conforme aux normes modernes ;
- les vaccins de troisième génération utilisent des souches non répliquatives, génétiquement modifiées, ou des peptides.

• VACCINS DE PREMIÈRE GÉNÉRATION

Souches vaccinales

Pendant des décennies, le vaccin variolique a été entretenu et multiplié dans des conditions extrêmement diverses, par passages chez l'homme, le bovin, le mouton etc. Il en est résulté une grande diversité des souches, différentes par leurs propriétés biologiques, telles que le pouvoir pathogène expérimental chez le lapin ou la souris, ou la formation de pocks sur la membrane chorioallantoïque de l'œuf embryonné.

Une revue faite en 1968 par l'OMS illustre cette diversité : 71 laboratoires de 49 pays ou régions utilisaient au moins 19 souches différentes. Au cours du vaste programme d'éradication de la variole, quatre souches ont été inoculées à près d'1/3 de la population mondiale à partir des années 50 (FENNER *et al.*, 1998).

La souche Lister aurait été isolée au Vaccine Institute de Cologne en 1870. Elle a été utilisée au Royaume-Uni depuis 1892 et développée à l'Institut Lister depuis 1916. Cette souche est parfois appelée souche Elstree (Lister/Elstree) du nom de la ville où se trouvait l'Institut. Un stock de lots de semence en a été établi aux Pays-Bas, en collaboration avec l'OMS. Cette souche a été distribuée à Paris, Tokyo, Atlanta et Moscou et à de nombreux fabricants dans le monde (23 l'ont utilisée pendant la période d'éradication).

La souche New York City Board of Health (NYCBH) a été introduite aux États-Unis en 1876 à partir de l'Angleterre. Elle a été utilisée dans les Amériques et en Afrique de l'Ouest. C'est la souche qui constitue le vaccin de première génération encore en usage aux USA (Dryvax®).

La souche EM63, dérivée de la souche NYCBH a été largement utilisée en URSS et en Inde entre 1967 et 1970.

La souche Temple of Heaven a été utilisée en Chine.

Les données épidémiologiques ne permettent pas de conclure à la supériorité d'une souche. Des travaux menés dans les années 70 ont montré des différences de pathogénicité entre les différentes souches, en particulier dans les tests de neurovirulence chez la souris, ceci étant corrélé avec l'incidence des encéphalites post-vaccinales. La souche NYCBH était ainsi considérée comme moins virulente que la souche Lister (FENNER *et al.*, 1998).

Vaccins actuellement disponibles en France

Deux vaccins vivants de première génération sont actuellement disponibles en France.

Le vaccin lyophilisé de l'Institut Pourquier est une culture de virus vaccinal souche Lister titrant environ 10⁸ unités formant pock (pfu) par ml. Il est présenté en ampoules de verre contenant le lyophilisat avec des ampoules de solvant permettant de reconstituer 150 et 500 µl de solution vaccinale, selon la présentation. Il correspond environ respectivement à 130 et 420 doses utiles de vaccin en utilisant pour la vaccination l'aiguille bifurquée (dont le volume moyen est de 1 µl).

Le vaccin purifié et stabilisé des laboratoires Aventis Pasteur utilise également la souche Lister et au même titre que le précédent. Il est présenté en flacon multidose de 3 ml contenant 0,3 ml, permettant d'effectuer avec l'aiguille bifurquée environ 180 vaccinations. Il se conserve congelé.

La qualité de ces 2 vaccins a été vérifiée, que ce soit la stabilité de leur activité ou leurs qualités microbiologiques, en sachant que leurs modalités de production en font des produits non stériles.

Une étude menée en collaboration avec le Centre de Recherche du Service de Santé des Armées de Grenoble, l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé et la Direction Générale de la Santé, a permis d'établir chez le singe macaque une équivalence d'efficacité des 2 vaccins disponibles, et de montrer que la multipuncture par aiguille bifurquée, avec 1 ml, est aussi efficace que la vaccination par scarification, qui utilise 10 µl de vaccin.

Le stock actuellement disponible est ainsi évalué en France à 70 millions de doses utiles environ.

L'efficacité de ces vaccins a été prouvée sur le terrain, permettant l'éradication de la variole. Mais les méthodes ayant permis leur production ne sont plus compatibles avec les exigences modernes de fabrication d'un vaccin.

Ces vaccins sont par ailleurs responsables de complications cutanées ou neurologiques rares mais parfois mortelles (Tableaux 1 et 2). Des estimations effectuées ont

ainsi évalué que le nombre de décès serait de 317 après vaccination anti-variolique de l'ensemble de la population française.

• VACCINS DE DEUXIÈME GÉNÉRATION

Ils sont produits à partir de souches vaccinales "historiques", adaptées sur cultures cellulaires. Ils offrent plusieurs avantages, notamment une meilleure qualité micro-biologique, la rigueur des contrôles tout au long de leur développement, en application des exigences de bonnes pratiques de fabrication. Cependant, un vaccin produit sur culture cellulaire sera associé aux mêmes risques d'effets secondaires qu'un vaccin de première génération.

En l'absence de maladie naturelle, l'évaluation de l'efficacité d'un vaccin de 2^e génération repose sur sa comparaison avec le vaccin historique en terme de taux de prise (la prise vaccinale est en effet corrélée avec l'immunité protectrice contre la variole) et de réponse immunitaire. Cette dernière est évaluée par la réponse en anticorps neutralisants, et par la réponse cellulaire (activité CTL et production d'IFN-γ).

Âge et Nb de vaccinations	Inoculation accidentelle	Vaccin généralisée	Eczéma vaccinal	Vaccin progressive	Encéphalite vaccinale*
Primo-vaccination					
< 1 an	507,0	394,4	14,1	0	42,3
1-4 ans	577,3	233,4	44,2	0,4	9,5
5-19 ans	371,2	139,7	34,9	1,8	8,7
> 20 ans	606,1	212,1	30,3	6,9	3,5
Revaccination					
< 1 an	-	-	-	-	-
1-4 ans	109,1	-	-	-	-
5-19	47,7	9,9	2,0	0	0
> 20 ans	25,0	9,1	4,5	6,8	4,5

- : effectif insuffisant pour calculer des taux

*inclut les encéphalopathies survenant chez les nourrissons

Source : LANE *et al.* (1970) *J. Infect. Dis.*, **122**, 303-309 ; LANE *et al.* (1969) *NEJM*

Tableau 1 : Taux de complications associées à la vaccination rapportées par tranche d'âge (cas/million de vaccinations)

Eczéma vaccinal	6 %
Vaccin progressive	30 à 60 %, moyenne 45 %
Vaccin généralisée	Bon pronostic
Encéphalite vaccinale	9 à 57 %, moyenne 30 %

S & E, p. 303-307

In : LEVY-BRUHL et GUERIN. *Utilisation du virus de la variole comme arme biologique. Estimation de l'impact épidémiologique et place de la vaccination. Institut de Veille Sanitaire.*

www.invs.sante.fr

Tableau 2 : Létalité des complications de la vaccination antivariolique

Plusieurs vaccins de deuxième génération sont actuellement en développement.

La souche de virus utilisée pour le vaccin ACAM 1000 des laboratoires Acambis-Baxter a été développée à partir du vaccin original Dryvax, qui contient la souche NYCBH. Un clone viral a été choisi en raison de sa moindre neurovirulence et d'une immunogénicité équivalente sur modèles animaux par rapport au vaccin Dryvax⁽²⁾. Un essai randomisé en double aveugle mené aux USA chez 60 volontaires non antérieurement vaccinés a montré l'innocuité, la tolérance et l'immunogénicité d'ACAM 1000, comparables au vaccin Dryvax (WELTZIN *et al.*, 2003).

Le vaccin ACAM 2000 correspond au développement industriel du vaccin ACAM 1000, pour répondre à une demande de production de plus de 200 millions de doses. Ce vaccin utilise le même clone que ACAM 1000, mais produit sur des cellules Vero.

Vis-à-vis de ce vaccin cloné, se pose la question de savoir si le clone reproduit bien la population virale historique en terme notamment d'efficacité de protection.

Aventis Pasteur a développé un vaccin de deuxième génération, en prenant pour point de départ un des lots de vaccins de première génération, préparé avec la souche Lister, conservé depuis 1978. Il a été choisi de ne pas cloner le virus de première génération, pour conserver autant que possible la structure génétique de la population virale. Le développement de ce vaccin suit son cours, avec la préparation d'essais cliniques.

Le laboratoire Bavarian Nordic développe également un vaccin de 2^e génération, utilisant la souche Lister cultivée sur cellules fibroblastiques embryonnaires de poulet (CEF).

• VACCINS DE TROISIÈME GÉNÉRATION

Leur qualité principale est l'innocuité, de façon à éviter les complications des vaccins classiques et pouvoir ainsi être administrés à des sujets présentant des contre-indications aux vaccins précédents (immunodéprimés, femmes enceintes notamment).

Ces vaccins font appel à des virus de la vaccine atténués, non répliquatifs dans les cellules humaines, mais ayant conservé leur pouvoir immunogène.

La souche MVA (Modified Vaccinia Ankara), a été atténuée par plus de 500 passages sur CEF de la souche Ankara, utilisée dans le vaccin turque contre la variole (HENDERSON et MOSS, 1999). Elle est délétée d'une vingtaine de gènes. Elle ne se multiplie pas dans la plupart des lignées de cellules de mammifères et elle n'est pas pathogène pour des animaux immunodéprimés. Cette souche MVA est par ailleurs utilisée comme vecteur d'expression en vaccinologie ou en thérapie génique.

Le vaccin MVA a été utilisé en Allemagne chez plus de 120 000 personnes lors de la campagne d'éradication de la

variole, en pré-vaccination avec les souches traditionnelles, en vue de réduire les effets secondaires. Après la vaccination par scarification, on n'observe pas de formation de pustules ni d'autres réactions locales. Il a été préconisé d'inoculer ce vaccin par voie sous cutanée ou même intramusculaire.

Le développement et la production de vaccins utilisant cette souche MVA sont en cours aux USA.

La souche LC16m8 est également une souche atténuée, produite par passage à basse température sur cellules de rein de lapin (HENDERSON et MOSS, 1999). Cette souche, développée au Japon en 1980, a été testée dans un essai de terrain chez 50 000 écoliers japonais.

L'effet protecteur direct de ces deux souches n'a cependant pas été évalué sur le terrain dans une situation épidémique, puisque les deux pays concernés n'étaient pas exposés à la variole.

D'autres souches atténuées sont construites par manipulation ciblée du génome.

Sur les 200 gènes environ du virus de la vaccine, 50 ou plus ne sont pas indispensables à la réplication de ce virus en culture *in vitro*. La délétion de quelques-uns de ces gènes réduit le pouvoir pathogène du virus, qui conserve cependant un pouvoir immunogène protecteur sur modèle animal. Une souche fortement atténuée du virus de la vaccine, la souche NYVAC, dérive de la souche Copenhagen par délétion ciblée de 18 gènes (HENDERSON et MOSS, 1999), dont certains jouent un rôle dans le pouvoir pathogène ou le spectre d'hôte. Cette souche ne se multiplie pas sur cellules humaines, mais elle se multiplie sur cellules d'embryon de poulet ou sur cellules Vero (TARTIGLIA *et al.*, 1992) Sa neurovirulence est très réduite après inoculation intracérébrale au souriceau. La souche NYVAC, développée en tant que vecteur d'antigènes étrangers, garde sa capacité à induire de fortes réponses immunes.

Une autre approche pour créer un virus vaccinal non répliquatif, est de le déléter d'un seul gène essentiel à la réplication virale. C'est le cas du gène D4R, codant pour l'uracile DNA glycosylase. Ce virus délété se multiplie uniquement sur une lignée cellulaire de complémentation, transfectée par le gène D4R, produisant la protéine virale (OBER *et al.*, 2002). Le virus est dépourvu de pouvoir pathogène chez la souris et présente des propriétés analogues à la souche MVA pour son pouvoir immunogène.

Ces vaccins de troisième génération ont plusieurs avantages. Ils entraînent peu, voire pas, de complications, et seraient utilisables chez l'immunodéprimé (en particulier VIH) et chez les personnes souffrant de maladie de peau. Mais ils ont l'inconvénient que leur usage comme vaccin variolique condamnerait leur utilisation en tant que vecteurs d'antigènes étrangers, vaccinaux notamment. Plusieurs questions restent actuellement sans réponse.

Quelle souche utiliser ? Quelle est l'importance de la réponse immunitaire induite par ces souches ? Faudra-t-il augmenter le dosage des vaccins pour compenser l'absence de répllication ? Quelles seront les modalités de la vaccination (voie d'inoculation, nombre d'injections) ?

L'évaluation de leur efficacité est complexe. Il n'y a en effet pas de modèle expérimental animal bien établi de la variole. Le modèle primate d'infection avec le virus de la variole humaine nécessite des inoculum élevés et entraîne une infection accélérée non superposable à la variole humaine. Un modèle utilisant le virus de la variole du singe (monkeypox) chez le primate pourrait servir de base à l'appréciation de l'efficacité. Encore faudra-t-il prouver que les modèles animaux utilisant un challenge orthopox non variole sont pertinents en terme d'efficacité pour un vaccin anti-variolique chez l'homme.

Une dernière approche des vaccins de troisième génération est celle des vaccins à ADN, qui n'en sont qu'au stade de la recherche.

Des souris vaccinées avec des mélanges d'ADN codant pour L1R et A33R (protéines du virion) sont protégées

contre une épreuve létale avec le virus de la vaccine. Après une vaccination par de l'ADN codant pour quatre protéines virales (L1R, A33R, A 27L et B5R) les souris sont complètement protégées. Des singes macaques vaccinés avec l'ADN codant pour ces quatre protéines développent des réponses anticorps appropriées pour chaque protéine (HOOPER, CUSTER et THOMPSON, 2003). Un vaccin ADN de ce type pourrait être un candidat pour la protection contre les orthopoxvirus, notamment le monkeypox et la variole.

• CONCLUSION

La demande de nombreux pays a été couverte par les stocks de vaccins de première génération. Les vaccins de troisième génération vont demander du temps, des ressources, et l'ajustement de nos connaissances sur les mécanismes de la protection. Les vaccins de deuxième génération représentent un relais, fiable et pharmaceutiquement moderne.

BIBLIOGRAPHIE

- FENNER F, HENDERSON DA, ARITA I, JESEK Z, LADNY ID (1988) Smallpox vaccine and vaccination in the intensified smallpox eradication programme. *In: Smallpox and its eradication.* World Health Organization, Geneva.
- HENDERSON DA, MOSS B (1999) Smallpox and vaccinia. *In: PLOTKIN SA, ORENSTEIN WA* editors. *Vaccines.* Saunders, 74-98.

- HOOPER JW, CUSTER DM, THOMPSON E (2003) Four-gene-combination DNA vaccine protects mice against a lethal vaccinia virus challenge and elicits appropriate antibody responses in nonhuman primates. *Virology*, **306** (1), 181-195.
- OBER BT, BRÜHL P, SCHMIDT M et al. (2002) Immunogenicity and safety of defective vaccinia virus Lister: comparison with Modified Vaccinia Virus Ankara. *J. Virol.*, **76** (15), 7713-7723.

- TARTAGLIA J, PERKUS ME, TAYLOR J et al. (1992) NYVAC : a highly attenuated strain of vaccinia virus. *Virology*, **188** (1), 217-232.
- WELTZIN R, LIU J, PUGACHEV KV et al. (2003) Clonal vaccinia virus grown in cell culture as a new smallpox vaccine. *Nat. Med.*, **9** (9), 1125-1130.