

Poxvirus 2005.



## Variole et autres orthopoxvirus : Contre-mesures médicales



Pr. Daniel GARIN  
MD, PhD  
CRSSA Emile Pardé  
Grenoble (France)




Poxvirus 2005.

## Particularités des « poxvirus »

- Génome ADN db (140 to 300 kb)
- Grande particule (300nm)
- Réplication cytoplasmique
- Code pour de nombreuses enzymes
- Morphogénèse complexe
- Nombreux facteurs de virulence

Poxvirus 2005.

## Genre Orthopoxvirus : structure

- Non reconnaissables en ME
- Forme en « briques » ou en « tonneau »

Poxvirus 2005.

## Orthopoxvirus : cycle de réplication


Poxvirus 2005.

## Espace extracellulaire

## Espace intracellulaire

Poxvirus 2005.

## Smallpox



1798, E. Jenner : « The annihilation of smallpox, the most dreadful scourge of the human species, must be the final result of this practise (vaccination) ».

1980, the 33rd World Health Assembly : « declares solemnly that the world and all its peoples have won freedom from smallpox... »

1998, R.Campana, senior FBI official : « ... God help us if it 's smallpox. »

Poxvirus 2005.

Moyen Age : la variole en Europe de l'ouest

- XVII<sup>ème</sup> siècle : elle tue >1/10 population
- XVIII<sup>ème</sup> siècle : « Variolisation », mortalité > 1%




Poxvirus 2005.

- 14 mai 1796 : Jenner vaccine James Phipps (8 ans) avec le cowpox .
- 1 juillet 1796 : il lui inocule la variole.




Poxvirus 2005.

Le virus de la Vaccine remplace le virus cowpox en tant que vaccin antivariolique




- Vaccination antivariolique au Val de Grâce en 1910.




Poxvirus 2005.

**L'éradication de la variole, (\$200 millions)**

- 1955 - Dernier cas en France (Bretagne)
- 1959 - L'OMS adopte la proposition soviétique
- 1967 - Intensification
- 1972 - Dernier cas en Europe (Yougoslavie)
- 1975 - Dernier cas en Inde
- 1977 - Dernier cas « naturel » en Somalie
- 1978 - Accident de laboratoire à Birmingham



- 1980 - Certification de l'éradication, création des deux dépôts



Poxvirus 2005.

**Pourquoi l'éradication de la variole a-t-elle été possible?**

- Pas de réservoir animal
- Pas d'infection latente ou persistante
- Clinique pathognomonique
- Vaccin efficace contre toutes les souches de virus
- Vaccin stable à la chaleur (0.3€), facile à administrer.
- Programme OMS

Poxvirus 2005.

**La situation en France fin 2001**

- pas de diagnostic
- pas d'antiviraux
- pas de vaccin

Poxvirus 2005.

**La variole : le diagnostic au laboratoire**  
Pas de kits commerciaux, pas de CNR.

Microscopie électronique.

Culture sur œuf ou culture cellulaire :  
Habilitation?





**Amplification génique +++ (PCR)**

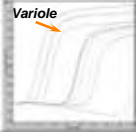
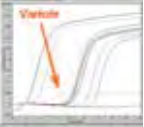

Poxvirus 2005.

**Diagnostic : développement d'une PCR en temps réel**

- Cible originale
- Consensus de genre puis orientation variole
- Quantitatif, sur lightcycler et Abi Prism 7000
- Témoins positifs variole

**Résultats :**

- protéine 14 kd
- plasmides cowpox, monkeypox, vaccine et variole
- deux sondes (+ sonde camel pox)

**Développement :**


- diffusion dans les hôpitaux biotox (+ G, B et Singapour)
- Plasmide intégrant phage  $\lambda$
- Validation définitive à Atlanta fin Juin
- biplec orthopox / varicelle

Poxvirus 2005.

**PRELEVEMENTS**

- **CUTANE** : écouvillon sec (ou type virocult), après effondrement de la pustule, en raclant les cellules du fond de la lésion
- **PHARYNGE** : *idem*
- **SANGUIN** : à titre scientifique (sérum et PBMC sur ACD) pour suivre la virémie
- **VISCERAL POST MORTEM**

• Adresser les prélèvements à l'hôpital biotox de zone, à un hôpital militaire, ou au CRSSA.



Poxvirus 2005.

**Estimation du statut vaccinal de la population française vis-à-vis de la variole**

Interruption de la primo-vaccination en France en 1979  
Abrogation totale de l'obligation vaccinale en 1984

Année de naissance (âge)	Effectif	%	Couverture vaccinale théorique		Couverture vaccinale réelle estimée
			Primovaccination	Revaccination	
1979-2001 (0 à 22 ans)	17.876.731	29	0%	0%	0%
1972-1978 (23 à 29 ans)	5.838.621	10	100%	0%	50%
1966-1971 (30-34 ans)	4.382.967	7	100%	100%	65%
Avant 1966 (35 ans et plus)	32.718.106	54	100%	100%	90%

Poxvirus 2005.

**Taux d'attaque secondaire en fonction du statut vaccinal antérieur, Pakistan, District de Shekhupura†**

Jamais vaccinés	26/27	96%
Vaccinés plus de 10 ans auparavant	8/65	12%
Vaccinés durant les 10 dernières années	5/115	4%


† De Mack et al, résumé dans Fenner et coll. Smallpox and its eradication, pp 688

Poxvirus 2005.

**Plan français**


**Immunité persistante (après au moins une vaccination antérieure à 1984)**

- Immunité Humorale (anticorps neutralisants > 1/20) : **45%**
- Immunité Cellulaire immédiate (ELISPOT) : **20%**
- Immunité cellulaire retardée (Lymphoprolifération) : **70%**



Poxvirus 2005.

### Vaccins 1ère génération



**Situation française :**


- Vaccin Pourquier historique : 5,5 millions de doses + Vrac Aventis
- Plus d'AMM, déficit en solvants et vaccinstyles

**Solutions :**

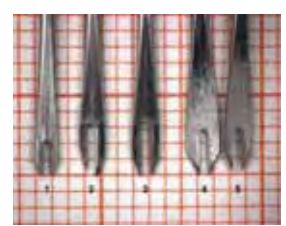
- Réduire la quantité utilisée (dilution, aiguille bifurquée)
- Comment valider le choix?

**Réponse : étude sur modèle simien**

- Montrer l'équivalence des deux vaccins Pourquier et Aventis
- Montrer l'équivalence des deux modes d'injection



Poxvirus 2005.




- 1: Precision Medical Products 1960 (gift from Health Canada, source: CDC)
- 2: Precision Medical Products 2002, Lot 022337 (gift from Health Canada)
- 3: Precision Medical Products 2002, Lot 022337 (gift from Baxter)
- 4: GRIBI AG, Switzerland 2002
- 5: Becton Dickinson 2002

Poxvirus 2005.

**Matériel et méthode :**

- 12 cynomolgus
- 320 injections



**Résultats :**

- Équivalence des vaccins
- Équivalence des modes d'injection
- Effet manipulateur avec la scarification

Millions de doses	Novembre 2001	Novembre 2002
Pourquier civil	4,3	66,2
Aventis civil	0	21,5
Pourquier militaire	0,5	7,5
<b>Total France</b>	<b>4,8</b>	<b>95,4</b>

**Conséquences :**

- Achat des vaccins Aventis
- Généralisation de l'usage de l'aiguille bifurquée.
- ATU et plan national variole

**Doses utiles : 70 millions**

Poxvirus 2005.

### La vaccination : cadre juridique

- Suppression vaccination en 1979, suppression re-vaccination en 1984
- Reprise de l'obligation de vaccination antivariolique en cas de menace d'épidémie : Art L 3111-8 du CSP
- Réparation par l'État des dommages imputables aux vaccinations obligatoires : Art L 3111-9 du CSP

Poxvirus 2005.

### Statut des vaccins

- ATU de cohorte pour les deux vaccins (titulaire DGS)
  - administrés par **aiguille bifurquée**
  - uniquement dans le cadre de la vaccination obligatoire

➔ Avis favorable de la commission d'AMM le 6/2/03

Poxvirus 2005.

### Vaccin Pourquier lyophilisé 130 doses (et 420 doses)



Poxvirus 2005.

**Vaccin Aventis liquide 180 doses**



Poxvirus 2005.

**Prélèvement de la dose de vaccin (1)**

- Prendre une aiguille bifurquée stérile
- Plonger verticalement l'aiguille dans le vaccin reconstitué







Poxvirus 2005.

**Prélèvement de la dose de vaccin (2)**


- Vérifier qu'il reste un volume de vaccin > 20 µL : le volume de liquide doit toujours être au dessus de la fourche de l'aiguille
- Retirer l'aiguille verticalement sans toucher la paroi du tube (évite l'effet d'essuyage)
- Une goutte de vaccin reste accrochée à la fourche de l'aiguille. Vérifier sa présence à l'œil nu

Poxvirus 2005.

**Injection du vaccin (1)**



- Maintenir le bras de la personne à vacciner avec une main
- Poser le poignet de l'autre main (qui tient l'aiguille) fermement sur le bras de la personne à vacciner



Poxvirus 2005.

**Injection du vaccin (2)**


- Réaliser rapidement 15 piqûres intradermiques (perpendiculaires)
- Zone de 5 mm de diamètre
- Chaque inoculation doit être suffisamment vigoureuse : traces de sang au niveau du site d'inoculation
- Jeter l'aiguille dans le container adéquat

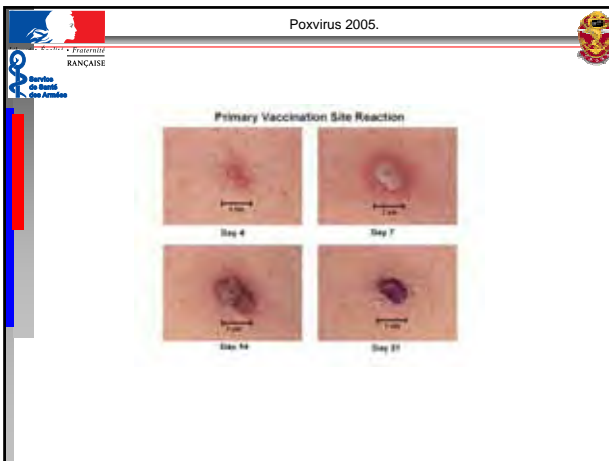



Poxvirus 2005.

**Pansement**

- Recouvrir le site d'injection par un pansement sec clos perméable : compresse tenue par 4 bandes adhésives
- Pas de membrane semi-perméable (macération)
- Changement de gants



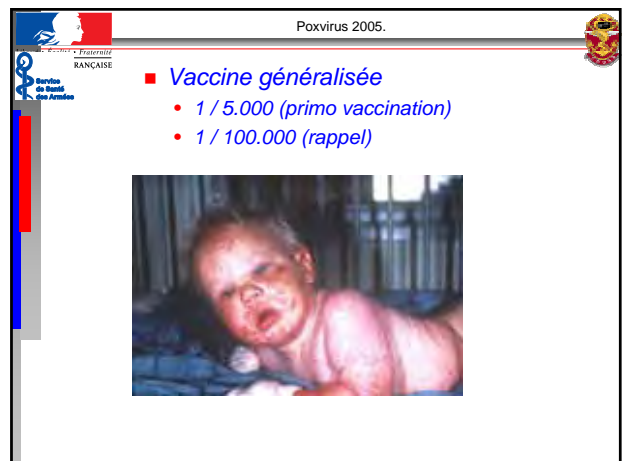
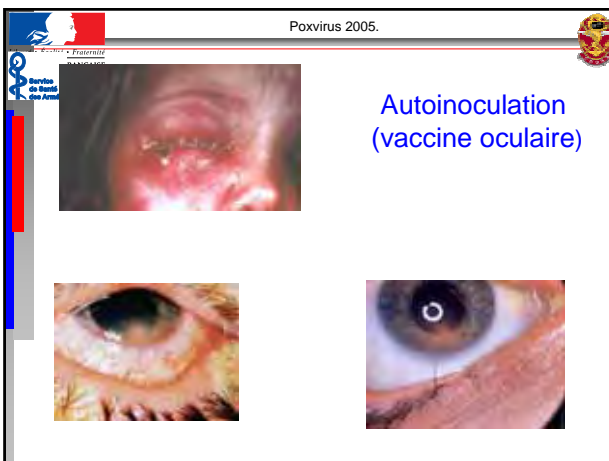
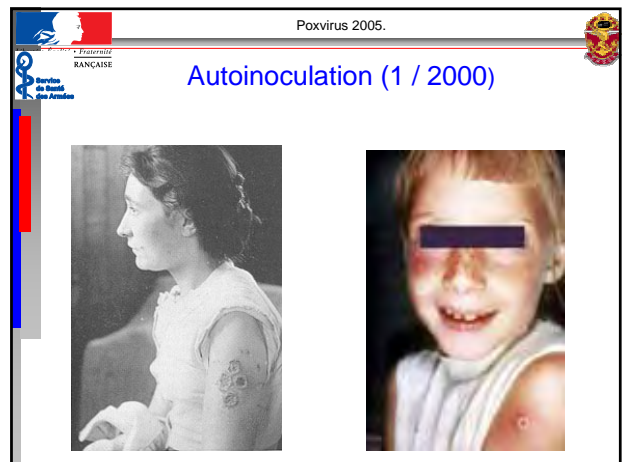


Poxvirus 2005.

Fraternité  
RANCAISE  
Service de Santé des Armées

**Atteintes du système nerveux central**

- Encéphalites :
- l'enfant < 2 ans, 6 à 10 jours après l'inoculation.
- Chez l'enfant > 2 ans et l'adulte
- 15 à 25% de décès; 25% de séquelles.
- Pas de thérapeutique spécifique éprouvée.
- 1 mort par million (primo vaccination)
  - 0.25 mort par million (rappel)




Poxvirus 2005.

Fraternité  
RANCAISE  
Service de Santé des Armées

### Les complications du vaccin

- Eczema vaccinatum (mortalité 10 à 40%)
- 1 / 25.000 (primo vaccination)
- 1 / 250.000 (rappel)



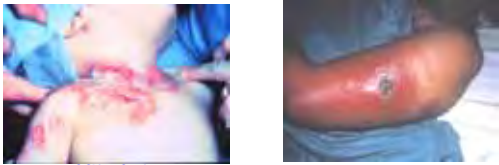
- Traitement
- VIG 0.3 to 0.6 mL/Kg (CDC, quantité limitée)

Poxvirus 2005.

Fraternité  
RANCAISE  
Service de Santé des Armées

### Les complications du vaccin

- Vaccinia necrosum (fatal, immunodéficience)
- 1 to 2 mort par million (primo vaccination ou rappel)




- VIG 0.3 to 0.6 mL/Kg (CDC, quantité limitée)

Poxvirus 2005.

Fraternité  
RANCAISE  
Service de Santé des Armées

### Les complications du vaccin

- Infection du fœtus



Poxvirus 2005.

Fraternité  
RANCAISE  
Service de Santé des Armées

### Effets indésirables attendus de la primo-vaccination antivariolique dans la population générale

Nb de vaccinations	Inoculation accidentelle	Vaccin généralisée	Eczéma vaccinal	Vaccin progressive	Encéphalite vaccinale	
< 1 an	760.000	385	300	11	0	32
1-4 ans	2.977.543	1719	695	132	1	28
5-19 ans	11.842.842	4396	1658	414	21	103
20-22 ans	2.296.346	1392	487	70	16	8
23-29 ans	2.919.311	1769	619	88	20	10
30-34 ans	1.534.038	930	325	46	11	5
35 ans et +	3.271.811	1983	694	99	23	11
<b>Total</b>	<b>25.601.890</b>	<b>12574</b>	<b>4778</b>	<b>860</b>	<b>92</b>	<b>199</b>

Nombre de décès

Nb de décès	Inoculation accidentelle	Vaccin généralisée	Eczéma vaccinal	Vaccin progressive	Encéphalite vaccinale
Primo	0	0	52	41	60
Revac	0	0	10	108	48
<b>Total</b>	<b>317</b>	<b>0</b>	<b>61</b>	<b>149</b>	<b>107</b>

Source: Utilisation du virus de la variole comme arme biologique, InVS, décembre 2001

Poxvirus 2005.

Fraternité  
RANCAISE  
Service de Santé des Armées

### Stratégie : Réaction graduée

- Niveau 0 (actuel) - menace non spécifique : vaccination de l'équipe nationale d'intervention, pas de vaccination de l'ensemble de la population
- Niveau 1 - menace avérée :
  - + vaccination d'équipes hospitalières dédiées zonales
- Niveau 2 - Un cas dans le monde :
  - + vaccination des intervenants de 1ère ligne
- Niveau 3 - Un cas en France : vaccination des sujets contacts ou exposés
- Niveau 4 - Plusieurs cas simultanés en France : +/- vaccination de l'ensemble de la population

Poxvirus 2005.

Fraternité  
RANCAISE  
Service de Santé des Armées

### Équipes nationales d'intervention

- Modalités de recrutement : volontariat, une vaccination antérieure, absence de contre-indication à la vaccination
- Cadre juridique
  - décret de vaccination, sur la base des articles L.3111-8 et L.3111-9 du CSP, (JO du 12/02/2003)
  - arrêtés fixant la liste composant ces équipes signés
- Calendrier : vaccination en plusieurs vagues

Poxvirus 2005.

## Contre-indications à la vaccination

- **Compte tenu des effets secondaires, évaluation du rapport bénéfice/risque :**
  - Evaluation des contre-indications du vacciné
  - Evaluation des contre-indication de son entourage
  - Evaluation de l'exposition

Poxvirus 2005.

## Contre-indications à la vaccination

- **Affection cutanées (en évolution ou antécédents)**
  - eczéma et autres dermatite atopiques
  - psoriasis étendu
  - toxidermie grave (maladie de Lyell, syndrome de Stevens-Johnson)
  - autres lésions cutanées jusqu'à guérison (brûlures...)
- **Affections malignes évolutives**
  - Lymphome non hodgkinien, leucémie, toute affection maligne localisée ou généralisée, évolutive, traitée par chimiothérapie ou radiothérapie de moins de 2 mois.
  - Antécédent de maladie de Hodgkin.

Poxvirus 2005.

## Déficits immunitaires congénitaux ou acquis

- Sujets VIH+ et sidéens
- Agamma et hypogammaglobulinémie
- autres déficits immunitaires non iatrogènes, lymphopénie sévère, granulomatose septique chronique
- traitement immunosuppresseurs (corticoïdes par voie parentérale ou orale, cyclosporine, greffe d'organe...)
- **Autres :**
  - Enfant de moins de un an
  - Grossesse
  - allergie connue à un des composants du vaccin
  - Maladies du système nerveux central
  - Maladies infectieuses en cours
  - Pathologie cardiovasculaire

Poxvirus 2005.

## Plan français (2)

**Actuellement (30 juin 2005) :**

- 191 personnes vaccinées
- Aucune complication déclarée
- Rares effets indésirables (réplication locale importante et prolongée)



Poxvirus 2005.

## La variole : antiviraux

Méthisazone (Marboran®) n'est plus disponible

**IN VIVO : efficacité du cidofovir sur modèle animal en prophylaxie post-exposition**  
aucune donnée actuelle dans les infections humaines


Antibiothérapie anti-staphylococcique (oxa-, cloxacilline)

Poxvirus 2005.

## Cidofovir in vivo

Modèle primate : Monkeypox

- **Modèle : Cynomolgus infecté par le virus monkeypox en Intra-veineux**
  - Infection avec  $10^7$  pfu ou 1000 DL<sub>50</sub>
  - énanthème, exanthème, monocytose
  - Mort après 6-8 jours





- Cidofovir (20 mg/kg) i.v. immédiatement après l'infection: signes cliniques atténués ou absents et survie

Poxvirus 2005.

**Cidofovir : inconvénients**

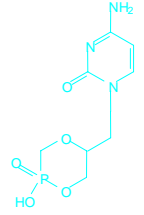
- Biodisponibilité orale : très faible (< 5%)  
Cmax dans sérum : < 0,5 µg/mL après administration orale de 5 mg/kg
- Toxicité:  
Fibroses après injections  
Administration intraveineuse obligatoire  
Néphrotoxicité occasionnelle après une administration prolongée (traitement CMV)

Poxvirus 2005.

**Cidofovir : diminution de la toxicité**

- *Probénécide et hydratation*
- Traitement par aérosol (Bray et al., 2002)  
Efficace  
Concentration pulmonaire élevée  
Concentration rénale faible
- Une à 2 doses sont suffisantes pour le ttt  
Dose unique suffit chez le singe  
Deux doses : peu de toxicité
- Utilisation du cidofovir cyclique  
10-20 fois moins d'effet néphrotoxique



Cidofovir cyclique



Poxvirus 2005.

**Cidofovir : forme orale**

■ *Esters alkoxyalkyl du cidofovir : HDP-CDV et ODE-CDV (Hostettler et al.)*

- Activité antivirale *in vitro* contre les poxvirus (variolo, monkeypox, vaccine, cowpox) 50-200 fois plus importante que le cidofovir (Kem et al., 2003)
- Biodisponibilité orale chez le souris de 93% versus <5% pour le cidofovir (Trehan et al., 2003)
- Après administration de 10 mg/kg concentration plasmatique > EC<sub>50</sub>

HDP-Cidofovir

CC(C)COC(=O)C1=CN=C(C=C1)C2=CC=CC=C2



Poxvirus 2005.

**Constitution d'un stock national d'immunoglobulines :**

- Développement d'une technique de référence (AFSSAPS - CRSSA)
- Constitution d'un standard Européen (JMC)
- 60 litres prélevés au 27 mai
- Titres entre 1/20 et 1/300
- Utilisables en IV (plus de 150 traitements)


Poxvirus 2005.

**Vaccinia cutaneous infection in monkey**

- Takes :
- Diameter at day 5 : 8.5 mm +/- 1.6
- Diameter at day 8 : 12.7 mm +/- 2.1
- Viraemia between D5 and D8

**FIRST RESULTS :**

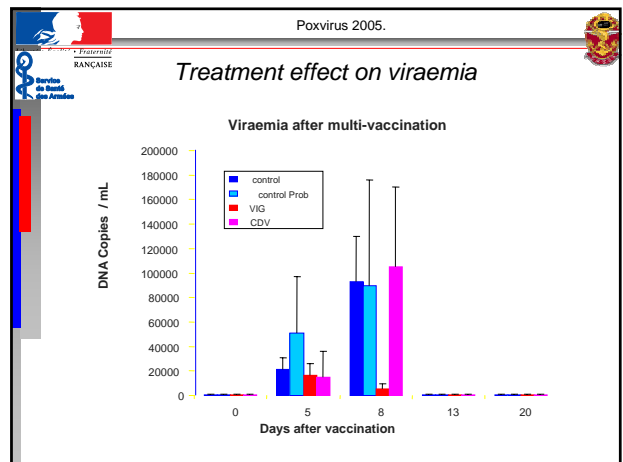
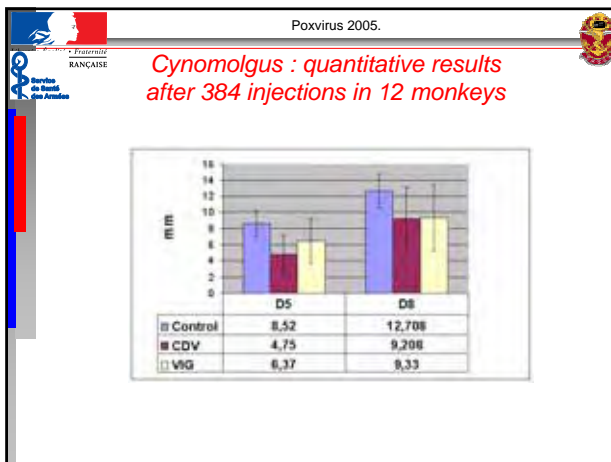
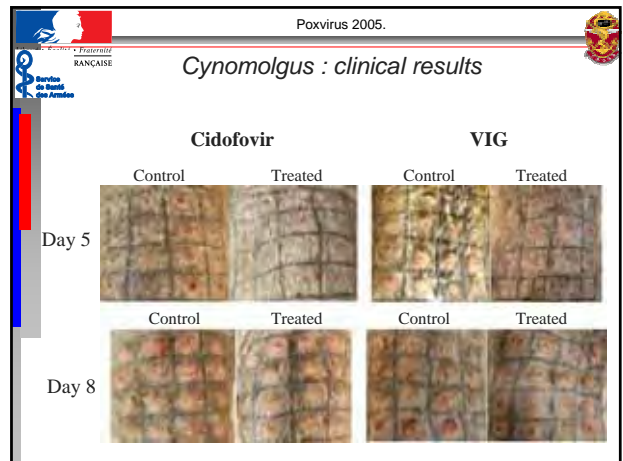
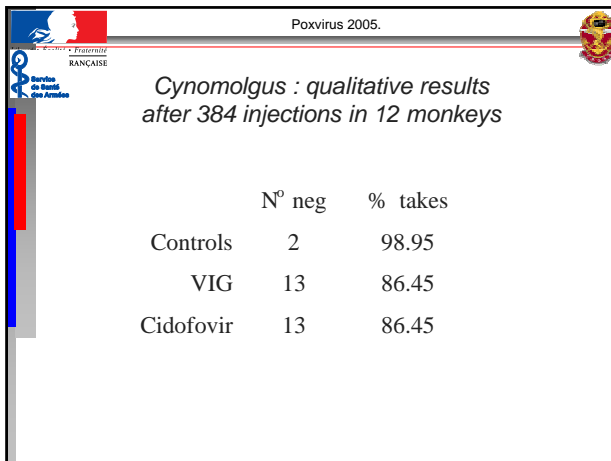
- Cidofovir inefficient at the dose of 7.5 mg/kg
- Cidofovir inefficient in administered after 5 days



Poxvirus 2005.

**Treatment by cidofovir or VIG on the day of vaccine inoculation**

- VIG : monkey hyper immune sera from monkey 1,2 mL (84 UI/mL) / kg ou 100 UI/kg
- Cidofovir : 12.5 mg/ kg IV (with probenecid)
- Clinical observation and blood sampling at D5, D8, D13, D20, D27 et D34
  - Central temperature - Weight
  - PCR quantification of viraemia



- Poxvirus 2005.
- Synergistic effect*
- VIG : monkey hyper immune sera from monkey 1.2 mL (84 UI/mL) / kg ou 100 IU/kg at J0 and
  - Cidofovir : 20 mg/ kg IV (with probenecide) J0 et J5
  - Clinical observation and blood sampling at D5, D8, D13, D20, D27 et D34
    - Central temperature - Weight
    - Genomic quantification of viremia



Poxvirus 2005.

Fraternité  
RANCAISE  
Service de Santé des Armées

## Vaccins 2ème génération (vivants produits sur culture cellulaire)

- « Guide line » européen de l'EMA
- Plusieurs producteurs (Acambis /Baxter ; Aventis ; Bavarian Nordic)
- Deux souches vaccinales:  
Lister / Elstree (Europe) et New York city board of health (USA)
- Trois types cellulaires :  
Vero, MRC5 et CEF
- Avantages : Qualité de production et rigueur des contrôles
- Inconvénients : Même risque vaccinal

United States Department of Health - Human Services

Poxvirus 2005.

Fraternité  
RANCAISE  
Service de Santé des Armées

## FUTUR Vaccin non répliquants troisième génération

**MVA** (Allemagne), LC16m8 (Japon), NYVAC (USA)


- délétion de gènes de virulence (UNG, Baxter)
- génétiquement « améliorées »

- Avantages : Peu voir pas de complications
- Inconvénients :
  - Usage général condamne le vecteur (vaccins anti -VIH)
  - Comment faire la preuve de leur efficacité?

Compréhension de la réponse induite par le vaccin  
« facteur prédictifs » de la protection

Modèles animaux

- Souris cowpox
- Cynomolgus monkeypox
- Cynomolgus variole



Poxvirus 2005.

Fraternité  
RANCAISE  
Service de Santé des Armées

