

Analyse scientifique de la recherche sur le virus variolique, 1999-2010

Décembre 2010

ALERTE ET ACTION
AU NIVEAU MONDIAL



Organisation
mondiale de la Santé

Analyse scientifique de la recherche sur le virus variolique, 1999-2010

Décembre 2010



**Organisation
mondiale de la Santé**

Remerciements

L'OMS remercie tous ceux qui ont participé à la rédaction du présent document, à savoir :

Responsables de la rédaction

Ali S. Khan

Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, États-Unis d'Amérique

Geoffrey L. Smith

Imperial College London, Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord

Auteurs

Antonio Alcamí, Inger Damon, David Evans, John W. Huggins, Christine Hughes, Peter B. Jahrling, Grant McFadden, Hermann Meyer, Bernard Moss, Sergei Shchelkunov, Evgeny Stavskiy, Nina Tikunova

Secrétariat de l'OMS

Pierre Formenty, Daniel Lavanchy

© Organisation mondiale de la Santé 2011

Tous droits réservés.

Les appellations employées dans la présente publication et la présentation des données qui y figurent n'impliquent de la part de l'Organisation mondiale de la Santé aucune prise de position quant au statut juridique des pays, territoires, villes ou zones, ou de leurs autorités, ni quant au tracé de leurs frontières ou limites. Les lignes en pointillé sur les cartes représentent des frontières approximatives dont le tracé peut ne pas avoir fait l'objet d'un accord définitif.

La mention de firmes et de produits commerciaux ne signifie pas que ces firmes et ces produits commerciaux sont agréés ou recommandés par l'Organisation mondiale de la Santé, de préférence à d'autres de nature analogue qui ne sont pas cités. Sauf erreur ou omission, une majuscule initiale indique qu'il s'agit d'un nom déposé.

L'Organisation mondiale de la Santé a pris toutes les précautions raisonnables pour vérifier les informations contenues dans la présente publication. Toutefois, le matériel publié est diffusé sans aucune garantie, expresse ou implicite. La responsabilité de l'interprétation et de l'utilisation dudit matériel incombe au lecteur. En aucun cas, l'Organisation mondiale de la Santé ne saurait être tenue responsable des préjudices subis du fait de son utilisation.

Les opinions exprimées dans la présente publication n'engagent que les éditeurs et les auteurs cités nommément.

Imprimé par le Service de production des documents de l'OMS, Genève (Suisse)

Table des matières

Historique	vii
1. Les vaccins antivarioliques	1
Résumé d'orientation	2
1.1 Introduction	3
1.2 Historique de la vaccination antivariolique.....	3
1.3 Le Programme mondial d'éradication de la variole lancé par l'OMS	4
1.4 Origine du virus de la vaccine.....	5
1.5 Le vaccin utilisé pour éradiquer la variole.....	6
1.6 Culture tissulaire et vaccins antivarioliques clonaux.....	7
1.7 Vaccins antivarioliques atténués par passage en culture tissulaire ou par recombinaison génétique.....	7
1.8 Vaccins antivarioliques constitués de sous-unités protéiques ou d'ADN.....	9
1.9 Vaccination après exposition	9
1.10 Les futurs enjeux de la vaccination antivariolique.....	9
Abréviations	11
Références bibliographiques	12
2. Tests pour le diagnostic de la variole (virus variolique) au laboratoire	15
Résumé d'orientation.....	16
2.1 Introduction	17
2.2 Collecte et manipulation des échantillons.....	17
2.3 Isolement du virus.....	19
2.4 Microscopie électronique	19
2.5 Tests de diagnostic basés sur l'examen du génome ou d'éléments du génome.....	20
2.5.1 Les travaux sur l'ADN du virus variolique	20
2.5.2 Polymorphisme de longueur des fragments de restriction.....	21
2.5.3 Amplification génique (PCR).....	21
2.5.4 Amplification génique – polymorphisme de longueur des fragments de restriction	22
2.5.5 PCR en temps réel.....	22
2.5.6 Analyse avec des micropuces à oligonucléotides.....	26
2.5.7 Séquençage.....	27
2.6 Tests de diagnostic basés sur les protéines	28
2.7 Tests de diagnostic basés sur la sérologie	28
2.8 Quelques réflexions en guise de synthèse	29
Abréviations	31
Références bibliographiques	32

3.	Génomique de la variole	35
	Résumé d'orientation	36
3.1	Le génome du virus variolique	37
3.2	L'évolution de la variole	41
3.3	Technologies portant sur le génome des poxvirus	42
3.4	Lignes directrices applicables au génome des virus varioliques	43
	Abréviations	48
	Références bibliographiques	49
4.	La situation des conservatoires de virus variolique et d'ADN viral des centres collaborateurs de l'OMS.....	53
	Résumé d'orientation	54
4.1	Introduction	55
4.2	La situation des conservatoires de souches de virus variolique et d'acide nucléique viral établis au centre collaborateur OMS de la Fédération de Russie	55
4.2.1	L'état de la collection de souches de virus variolique et de son conservatoire	55
4.2.2	L'état de la collection d'ADN du virus variolique détenue par le VECTOR et de son conservatoire.....	61
4.3	La situation des conservatoires de souches du virus variolique et d'acide nucléique viral établis au centre collaborateur OMS des États-Unis	68
	Abréviations	83
	Références bibliographiques	84
5.	Modèles animaux et pathogenèse	85
	Résumé d'orientation	86
5.1	Introduction	87
5.2	Modèles animaux.....	87
5.3	Conclusions	96
	Abréviations	97
	Références bibliographiques	98
6.	La mise au point d'antiviraux pour le traitement de la variole – la situation des agents thérapeutiques constitués de petites molécules	103
	Résumé d'orientation	104
6.1	Introduction	106
6.2	Recherche de médicaments	108
6.2.1	Les thiosemicarbazones	108
6.2.2	Évaluation des nouveaux médicaments autorisés ou expérimentaux	108
6.2.3	Phosphonates nucléosidiques acycliques	109
6.2.4	Inhibiteurs de l'inosine monophosphate déshydrogénase	109
6.2.5	Inhibiteurs de la S-adénosylhomocystéine hydrolase	110
6.2.6	Inhibiteurs de l'orotidine-5'-monophosphate décarboxylase	110
6.2.7	Inhibiteurs de la thymidylate synthétase	110
6.2.8	Composés qui entravent le processus d'assemblage du virus	110

6.2.9	Les kinases de la famille Abl.....	111
6.2.10	Les préparations immunologiques	111
6.2.11	Composés divers	111
6.2.12	Composés dont la structure ne sera pas révélée avant un stade avancé de développement.....	112
6.2.13	Méthodes d'inhibition de la réplication virale basées sur la biologie moléculaire, comme l'interférence par l'ARN.....	112
6.3	Modélisation de la variole humaine et de l'orthopoxvirose simienne sur modèles primates.....	112
6.4	Données humaines pour valider les modèles animaux	114
6.5	Le cidofovir en intraveineuse	114
6.6	Le CMX001 par voie orale	115
6.7	Le ST-246 par voie orale	117
6.8	Effet de l'administration d'antiviraux sur la protection conférée par le vaccin...	119
6.8.1	Cidofovir et Dryvax.....	119
6.8.2	ST-246 (técovirimat) et Dryvax ou ACAM2000	119
6.9	Médicaments en cours de développement clinique	120
6.10	Durée de développement des agents thérapeutiques antivarioliques	121
6.11	Considérations finales.....	122
	Abréviations	124
	Références bibliographiques	125

Historique

La question de la destruction des stocks de virus variolique, l'agent étiologique de la variole, est débattue au sein de l'Assemblée mondiale de la Santé depuis 1986, consécutivement à la déclaration, sans précédent dans les annales, de l'éradication de la maladie en 1980. Plusieurs comités se sont livrés à des discussions intensives sur le point de savoir s'il fallait conserver le matériel viral vivant qui subsistait afin de procéder ultérieurement à des travaux de recherche essentiels pour la santé publique et sur la nature de tels travaux faisant usage du virus vivant. Conformément aux résolutions WHA49.10, WHA52.10 et WHA55.15 de l'Assemblée mondiale de la Santé, le Comité consultatif OMS de la Recherche sur le Virus variolique (ACVVR), mis en place en 1999, a pour mandat de surveiller tous les travaux de recherche dans lesquels il est fait usage de virus varioliques vivants. Il n'existe à l'heure actuelle que deux conservatoires de virus varioliques vivants qui soient autorisés par l'OMS : l'un est détenu par les Centers for Disease Control and Prevention d'Atlanta (États-Unis d'Amérique) et l'autre par le laboratoire VECTOR du Centre de Recherche d'État en Virologie et Biotechnologie de Koltsovo, région de Novossibirsk (Fédération de Russie).

En mai 2007, la Soixantième Assemblée mondiale de la Santé a adopté la résolution WHA60.1 par laquelle elle priait le Directeur général de l'OMS de procéder en 2010 à une vaste analyse des résultats des recherches entreprises, des recherches en cours, ainsi que des plans et des besoins concernant les recherches essentielles aux fins de la santé publique mondiale, en tenant compte des recommandations formulées par l'ACVVR, afin que la Soixante-Quatrième Assemblée mondiale de la Santé puisse parvenir à un consensus mondial sur la date de destruction des stocks existants de virus variolique.

En novembre 2007, l'ACVVR a proposé de préparer des récapitulatifs écrits des travaux de recherche en vue de leur discussion par l'Assemblée mondiale de la Santé en 2011. En novembre 2008, l'ACVVR a décidé de procéder comme suit pour cette vaste analyse :

- la préparation, en six chapitres distincts (détaillés plus loin), d'une analyse exhaustive de la littérature et des données inédites relatives aux recherches impliquant des virus varioliques vivants, est confiée à un groupe de scientifiques agréés par le Comité et représentant tous les secteurs de la recherche et du développement concernant le virus variolique ainsi que les travaux pertinents portant sur d'autres orthopoxvirus ;
- l'analyse scientifique est examinée par un certain nombre de membres de l'ACVVR (de décembre 2009 à avril 2010) ;
- l'analyse scientifique est examinée par un groupe externe d'experts indépendants qui travaillent dans un autre secteur que la recherche sur le virus variolique – le Groupe consultatif d'experts indépendants chargé d'examiner la recherche sur la variole (AGIES) (de septembre 2010 à novembre 2010) ;
- l'analyse scientifique et le rapport de l'AGIES sont soumis à l'ACVVR pour examen final (novembre 2010) ;
- le Conseil exécutif de l'OMS examine l'analyse scientifique et le rapport de l'AGIES demandés par l'Assemblée mondiale de la Santé dans sa résolution WHA60.1, y compris les recommandations formulées par l'ACVVR (WHA60.1 OP4(1)) (janvier 2011) ;
- ce rapport ainsi que les observations du Conseil exécutif sont examinés par l'Assemblée mondiale de la Santé (mai 2011).

La première phase de ce processus, à savoir l'analyse exhaustive et le récapitulatif, a été amorcée par un groupe de scientifiques auxquels l'ACVVR a donné son agrément lors de sa réunion de 2008 et qui représentaient tous les secteurs de la recherche sur le virus

variologique. Sous l'autorité de l'ACVVR, ce groupe de scientifiques possédant des compétences particulières dans la recherche sur le virus variolique et les autres orthopoxvirus s'est lancé dans la rédaction du présent document intitulé *Analyse scientifique de la recherche sur le virus variolique, 1999-2010*. Ce document comporte six chapitres respectivement consacrés aux vaccins antivarioliques, aux tests de diagnostic en laboratoire, à la génomique de la variole, à la situation des conservatoires du virus autorisés par l'OMS, aux modèles animaux et aux antiviraux.

En novembre 2009, l'ACVVR a examiné et analysé les six chapitres du document puis, entre novembre 2009 et octobre 2010, celui-ci a été réanalysé et retravaillé à plusieurs reprises.

En octobre 2010, l'AGIES a passé en revue les six chapitres et il a communiqué une évaluation indépendante des besoins en virus varioliques vivants.

Dans leur ensemble, ces six chapitres ainsi que leur examen par le groupe d'experts indépendants montrent que des progrès considérables ont été réalisés sous les auspices de l'OMS dans les domaines suivants :

- caractérisation d'un grand nombre de souches différentes de virus variolique ;
- mise au point de deux excellents antiviraux expérimentaux dotés de modes d'action distincts ;
- développement de nouveaux vaccins antivarioliques moins réactogènes (vaccins homologués et vaccins candidats) ;
- mise au point de tests de diagnostic pour le virus de la variole et d'autres orthopoxvirus ;
- mise au point de modèles animaux pour le virus de la variole et d'autres orthopoxvirus.

Une version antérieure de l'Analyse scientifique de la recherche sur le virus variolique, 1999-2010, datée du 10 novembre 2010 a été présentée à la douzième réunion de l'ACVVR les 17 et 18 novembre 2010. La présente version, qui est datée de décembre 2010, comporte des révisions proposées par l'AGIES et les membres de l'ACVVR.

Ali S. Khan et Geoffrey L. Smith

Genève, décembre 2010

1. Les vaccins antivarioliques

Antonio Alcami¹ et Bernard Moss²

¹ Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSCI-UAM), Madrid (Espagne)

² National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland (États-Unis d'Amérique)

Remerciements

La rédaction de cette analyse relative aux vaccins antivarioliques a bénéficié d'un soutien accordé pour partie par la Division of Intramural Research, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, les National Institutes of Health des États-Unis d'Amérique et par le Ministère espagnol de la Science et de l'Innovation.

Résumé d'orientation

Importance pour la santé publique

La variole est la seule maladie humaine qui ait été éradiquée grâce à une campagne de vaccination à l'échelle mondiale. Cette réussite demeure l'un des grands triomphes de la science médicale. Le vaccin antivariolique, constitué de virus vivants de la vaccine, s'est révélé d'une très grande efficacité. Il a toutefois à son passif des cas de complications graves, notamment chez les sujets immunodéficients ou présentant un eczéma. Par ailleurs, étant donné qu'il s'agit d'un produit préparé sur des animaux vivants dans des conditions non stériles, il ne pourrait satisfaire aux directives actuelles en matière de fabrication. Il est donc clairement dans l'intérêt de la santé publique de mettre au point un nouveau vaccin qui soit à la fois efficace et sans danger.

Bilan des progrès réalisés

Des vaccins antivarioliques préparés en cultures tissulaires ont été produits et homologués. Comme il est toutefois probable que ces vaccins entraînent autant d'effets indésirables que les vaccins originaux, plusieurs voies ont été explorées pour produire des vaccins plus sûrs. C'est avec des vaccins constitués de virus de la vaccine plus atténués que l'on a le plus progressé – à savoir la souche Ankara modifiée de virus de la vaccine (MVA) et le virus LC16m8, qui ont été produits par des passages répétés en cultures tissulaires. Le MVA est plus fortement atténué que le LC16m8 ; on l'administre habituellement par voie intramusculaire ou sous-cutanée et il ne produit donc pas la lésion cutanée caractéristique qui signe la « prise » du vaccin. Le LC16m8 peut être administré par scarification cutanée, comme le vaccin antivariolique classique, mais la lésion de prise du vaccin est moindre qu'avec le virus parent, la souche Lister du virus de la vaccine. L'expérimentation sur des primates non humains montre que le MVA et le LC16m8 sont sans danger, qu'ils sont dotés d'une bonne immunogénicité et qu'ils protègent aussi contre le virus de l'orthopoxvirose simienne, qui est un proche parent du virus variolique. Tous les vaccins de la nouvelle génération constitués soit de virus de la vaccine vivants porteurs de mutations géniques déterminées, soit d'ADN (acide désoxyribonucléique) codant pour des gènes poxviraux, soit encore de protéines purifiées se sont montrés prometteurs sur modèles animaux, mais aucun d'entre eux n'a encore atteint le stade des essais cliniques.

Résultats et implications

L'homologation des vaccins antivarioliques obtenus en cultures tissulaires est une avancée utile ; toutefois, il serait contre-indiqué, sur le plan médical, de les administrer à des sujets immunodéprimés ou présentant certaines affections dermatologiques. La variole ayant été éradiquée, il va falloir évaluer l'efficacité des vaccins de nouvelle génération à l'aide de poxvirus apparentés au virus variolique dans le cadre d'études de protection chez l'animal et déterminer leur innocuité et leur immunogénicité par des études chez l'homme. Cela étant, on serait plus assuré de l'aptitude de ces vaccins à protéger contre la variole si l'on procédait à des tests de neutralisation *in vitro* et à des études sur des primates non humains au moyen du virus variolique vivant lui-même.

1.1 Introduction

L'éradication de la variole a été déclarée en 1980, grâce au succès du Programme mondial d'éradication de la variole mis en œuvre par l'Organisation mondiale de la Santé (OMS). Pour faire face au risque d'un acte terroriste mondial consistant dans la dissémination de virus varioliques, certains pays ont fabriqué des vaccins antivarioliques afin de reconstituer leurs réserves. Le vaccin antivariolique, constitué de virus de la vaccine (abrégé dans la suite du chapitre par le sigle VACV pour plus de brièveté), est le seul vaccin qui ait jusqu'ici permis d'éradiquer une maladie infectieuse humaine. Ce vaccin n'a toutefois pas à son actif une innocuité conforme aux normes qui sont actuellement exigées des vaccins en la matière : l'usage de ce vaccin comporte un risque de transmission d'autres maladies infectieuses (du fait qu'il est produit sur des animaux) et il entraîne un certain nombre d'effets indésirables. C'est d'ailleurs pour cette raison que les vaccins antivarioliques produits ces dernières années l'ont été en cultures tissulaires ; ils sont constitués de souches de VACV purifiées par la technique des plages ou encore de souches non clonales multipliées en cultures tissulaires ou sur des œufs de poule embryonnés. Certains de ces vaccins antivarioliques utilisent des souches de VACV non répliquantes ou très atténuées qui sont dotées à la fois d'une meilleure innocuité et de bonnes propriétés immunogènes.

Les informations tirées de la recherche sur le VACV permettent la mise au point de vaccins vivants atténués, élaborés au moyen des techniques de recombinaison génétique, en modifiant les gènes qui interviennent dans la gamme d'hôtes ou l'échappement à la réponse immunitaire. Une autre stratégie qui évite d'utiliser des VACV infectieux consiste à vacciner au moyen de protéines virales capables de susciter une réponse immunitaire protectrice contre l'infection. Les vaccins de nouvelle génération peuvent être expérimentés sur des modèles animaux de substitution et comparés aux vaccins utilisés pour éradiquer la variole, en s'appuyant sur des caractéristiques telles que la neutralisation du virus ou l'induction d'une réponse immunitaire spécifique. Ces vaccins de nouvelle génération sont plus sûrs que les vaccins antivarioliques classiques – cette propriété pouvant être étudiée dans le cadre d'essais cliniques sur des sujets humains – mais ils conservent leur immunogénicité. Toutefois, comme la variole a été éradiquée, l'expérimentation se heurte à une contrainte de taille, à savoir l'impossibilité de démontrer que les nouveaux vaccins confèrent à des sujets humains une immunité protectrice contre la variole.

1.2 Histoire de la vaccination antivariolique

La variole est la seule maladie humaine qui ait été éradiquée à la suite d'une campagne mondiale de vaccination et cette réalisation reste l'un des plus grands triomphes de la science médicale moderne (Fenner et al., 1988 ; Smith & McFadden, 2002 ; Henderson, 2009).

La variolisation a été la première mesure utilisée pour lutter contre la variole. Elle consistait à prélever des fragments de pustules sur un sujet infecté et à inoculer le virus variolique à un sujet non immun en procédant par insufflation ou scarification. Ce procédé entraînait un taux élevé de mortalité (0,5 à 2 %), mais se révélait bénéfique compte tenu du taux de mortalité que comportait la transmission naturelle de la variole par la voie respiratoire (jusqu'à 40 %). La variolisation a été pratiquée pendant des siècles en Inde et en Chine avant d'être introduite en Europe occidentale en 1723 et elle est restée le seul moyen de protection contre la variole jusqu'à ce que Edward Jenner invente la vaccination en 1796.

Jenner, qui exerçait la médecine dans la petite ville anglaise de Berkeley, avait remarqué que les trayeuses avaient parfois les mains infectées par l'orthopoxvirus bovin et souffraient d'une infection locale qui semblait leur conférer une protection contre la variole. Il fut le premier à mettre cette hypothèse à l'épreuve en effectuant un prélèvement sur une lésion dont était porteuse une trayeuse du nom de Sarah Nelmes et en vaccinant un garçon nommé James Phipps. Après avoir variolisé le jeune Phipps, il constata que ce dernier

résistait à l'infection. Il effectua encore une étude puis publia son *Enquête* sur la question, ouvrant ainsi l'ère de la vaccination.

Cette corrélation entre l'infection par le virus de la variole bovine et la résistance à la variole avait été notée par d'autres, mais c'est Jenner qui a fait la démonstration de son efficacité en inoculant le virus variolique à titre d'épreuve, qui a recommandé d'entretenir le virus par des passages successifs sur des sujets humains et qui a encouragé la vaccination. Ces actions justifient que la découverte de la vaccination soit entièrement portée au crédit de Jenner. La pratique de la vaccination s'est rapidement substituée à la variolisation et son succès a amené Jenner à prophétiser en 1801 « ... que l'annihilation de la variole, le plus terrifiant fléau de l'espèce humaine, résultera obligatoirement de cette pratique » (Jenner, 1801).

Cette découverte arrivait à point nommé, car la variole était alors une plaie considérable pour l'Europe et le reste du monde. En l'espace de cinq ans, l'*Enquête* de Jenner fut traduite dans la plupart des langues européennes, des instituts de vaccination furent créés dans de nombreux pays et le vaccin parvint sur tous les continents. Toutefois, la généralisation de la vaccination connut des limites en raison de problèmes techniques et de l'insuffisance de l'approvisionnement en vaccin. La variole bovine était une maladie rare en Europe et était inconnue dans les Amériques. La vaccination interhumaine était pratiquée mais, comme elle pouvait transmettre d'autres germes pathogènes, on finit par l'interdire.

Ultérieurement, le virus de la variole bovine et le vaccin antivariolique basé sur ce virus (VACV) qui lui est étroitement apparenté ont été produits dans le tissu cutané d'animaux vivants. Le développement en 1950 d'un vaccin lyophilisé a constitué un progrès supplémentaire car on pouvait ainsi conserver le vaccin, le transporter et l'utiliser sur le terrain sans avoir à le réfrigérer et sans risque d'une perte d'activité. Enfin, la mise au point de l'aiguille bifurquée a permis à des personnels non qualifiés d'administrer le vaccin avec succès.

1.3 Le Programme mondial d'éradication de la variole lancé par l'OMS

En 1959, la Douzième Assemblée mondiale de la Santé a adopté une résolution proposée par l'Union soviétique, qui appelait à l'éradication de la variole dans le monde (Fenner et al., 1988). Entre 1959 et 1966, les progrès ont été plus lents que prévu mais, en 1967, a été lancé le programme intensifié d'éradication de la variole. La politique de vaccination mise en œuvre à l'échelon mondial dans le cadre de ce programme mettait l'accent sur la surveillance de la maladie et a consisté notamment à adopter la méthode de vaccination en anneaux pour éviter la transmission interhumaine et endiguer les épidémies de variole. On pouvait ainsi identifier les nouveaux cas de variole, les mettre en quarantaine, puis vacciner les personnes en contact étroit avec les sujets infectés et les mettre également en quarantaine. Cette politique a permis d'éradiquer la variole, le dernier cas d'origine naturelle ayant été signalé en Somalie en 1977. Après avoir mis en place une surveillance de grande ampleur sur tous les continents, l'OMS a confirmé en 1979 que la variole avait été éradiquée de la planète et la Soixante-Troisième Assemblée mondiale de la Santé a déclaré le 8 mai 1980 que l'éradication de cette maladie avait été menée à bien.

L'éradication de la variole constitue à ce jour le succès le plus important remporté par l'OMS et ce résultat montre qu'une prophylaxie fondée sur la vaccination de masse peut permettre d'éradiquer des maladies infectieuses. Ce succès a été conditionné par six caractéristiques déterminantes du vaccin et de la maladie :

- La variole est une maladie infectieuse strictement humaine. Il n'existe pas de réservoir animal dans lequel le virus pourrait persister et à partir duquel il serait susceptible d'être réintroduit dans la population humaine.
- Le virus variolique ne peut pas être la cause d'infections latentes ou persistantes car les sujets qui guérissent de la maladie éliminent la totalité des virus.

- La variole est une maladie grave et les signes en sont facilement reconnaissables. Les sujets infectés étaient donc rapidement identifiés et leurs contacts potentiels pouvaient ensuite être vaccinés.
- Le vaccin conférait une immunité protectrice de longue durée et il était efficace contre toutes les souches de virus variolique.
- Aucun variant du virus variolique ne pouvait échapper à l'immunité protectrice par des variations antigéniques en raison de la grande fidélité de l'ADN (acide désoxyribonucléique) polymérase virale et de la présence d'antigènes multiples.
- Le vaccin était facile à préparer, peu coûteux et stable sans réfrigération, ce qui a facilité son transport dans de bonnes conditions au cours de la campagne mondiale d'éradication.

Il est remarquable que l'éradication de la variole ait été obtenue avant l'avènement de la biologie moléculaire et avec une connaissance limitée du cycle de réplication du virus de la vaccine, des protéines virales qui sont la cible de la réponse immunitaire neutralisante ou des mécanismes immunitaires à la base de la protection conférée.

Pour éviter toute réintroduction de la variole dans la population humaine, tous les stocks connus de virus varioliques détenus par différents laboratoires dans le monde ont, sous la direction de l'OMS, été détruits ou envoyés à deux conservatoires varioliques situés l'un aux États-Unis d'Amérique et l'autre en Union soviétique (c'est-à-dire dans l'actuelle Fédération de Russie). Ces conservatoires varioliques, qui sont situés respectivement dans des laboratoires de haute sécurité sis aux Centers for Disease Control and Prevention d'Atlanta (États-Unis d'Amérique) et au Centre de Recherche d'État en Virologie et Biotechnologie VECTOR de Koltsovo, sont actuellement les seuls endroits où sont officiellement détenus des stocks de virus variolique. Les recherches portant sur ces échantillons sont étroitement surveillées par l'OMS.

1.4 Origine du virus de la vaccine

Au départ, le virus de la variole bovine était utilisé pour la vaccination antivariolique. Ce virus est parfois présent chez les bovins et il est la cause d'infections sporadiques chez l'homme et certains animaux, mais son réservoir naturel est probablement constitué de rongeurs sauvages. En 1939, Downie a montré que les préparations de l'époque contenant ce virus, et qui étaient utilisées pour la vaccination antivariolique, renfermaient en fait un virus différent du virus présent dans la nature et appelé virus de la vaccine (VACV), par allusion à la vaccination (Downie, 1939). Au fil des années, le VACV a remplacé le virus de la variole bovine pour la vaccination antivariolique. Par suite de la très large utilisation du VACV pour la vaccination antivariolique au cours du XX^e siècle, ce virus a fini par infecter des animaux domestiques, comme les buffles en Inde et les bovins au Brésil. Ces animaux peuvent à leur tour transmettre le virus à des sujets humains. Malgré tout, le VACV n'est pas considéré comme un agent pathogène naturel de l'homme.

D'après l'analyse des séquences du génome viral, il est peu probable que le VACV dérive d'un virus de la variole bovine ou d'un virus variolique. L'hypothèse actuellement en faveur au sujet de l'origine du VACV est qu'il s'agirait d'une espèce d'orthopoxvirus (OPV) qui infectait antérieurement des animaux chez lesquels il n'est plus endémique. On a avancé que le virus de la variole équine pourrait être à l'origine du VACV, étant donné que les premiers vaccinateurs tiraient également leur vaccin de chevaux infectés par des orthopoxvirus et il existe au moins une souche de VACV (Ankara) qui a été isolée sur un cheval (Mayr, Hochstein-Mintzel & Stickl, 1975 ; Baxby, 1981). Par ailleurs, un orthopoxvirus dont le plus proche parent est le VACV a été isolé sur des chevaux mongols malades (Tulman, 2006). On ne possède pas de documentation indiquant pour quelles raisons c'est le virus de la vaccine plutôt que celui de la variole bovine qui est devenu le vaccin antivariolique au XX^e siècle. Il est possible que la prévalence du VACV ait été plus élevée

lorsque les vaccins ont été élaborés ou que les vaccinateurs aient choisi le VACV parce que le virus de la variole bovine provoquait des réactions plus sévères et que le VACV était moins virulent. Même si l'origine et l'hôte naturel du VACV restent un mystère, ce virus est le plus intensément étudié des poxvirus.

1.5 Le vaccin utilisé pour éradiquer la variole

En raison de la longue histoire du VACV en tant que vaccin, toutes sortes de souches de ce virus ont été utilisées dans les différentes régions du monde (Fenner et al., 1988). La souche du Conseil de la Santé de New York (New York City Board of Health – NYCBH) a été utilisée en Amérique du Nord et en Afrique de l'Ouest. Les laboratoires Wyeth ont commercialisé le vaccin Dryvax, préparé à partir de la lymphé du revêtement cutané de veaux infectés par la souche NYCBH ; il était disponible aux États-Unis après la campagne d'éradication de la variole. La souche EM-63, qui dérive de la souche NYCBH a été utilisée en Russie et en Inde, mais c'est la souche Lister/Elstree, mise au point par l'Institut Lister au Royaume-Uni, qui s'est imposée comme la souche vaccinale la plus largement utilisée dans le monde (Rosenthal et al., 2001). La souche du Temple du Ciel/Tian-Tan (Chine) a été également largement utilisée. Parmi les autres souches de VACV que l'on a utilisées pendant la campagne d'éradication figurent la souche de Copenhague (Danemark), la souche de Berne (Suisse), la souche de Dairen (Japon), la souche d'Ankara (Turquie), la souche de Tachkent (Ouzbékistan) et la souche de Paris (France). La plupart des vaccins utilisés dans le cadre du programme d'éradication de la variole ont été obtenus en multipliant le virus vaccinal dans la peau d'animaux vivants – principalement des veaux, mais aussi des moutons, des buffles et des lapins.

Bien que le vaccin antivariolique soit le seul qui ait jamais permis d'éradiquer une maladie infectieuse humaine, son bilan n'a pas été parfait en termes d'innocuité. En effet, il était produit sur des animaux, ce qui comportait un risque de transmission d'autres maladies infectieuses, et la vaccination avait un certain nombre d'effets secondaires indésirables. Des infections accidentelles se sont produites en raison de la transmission du virus par des personnes vaccinées ou par leurs contacts à partir du point d'inoculation ; à cet égard, c'étaient les infections oculaires ou les infections généralisées qui étaient le plus à craindre. Une des complications majeures de la vaccination consistait en de graves infections chez les sujets présentant un eczéma ou une immunodéficience. Ces deux pathologies contre-indiquent la vaccination antivariolique. Chez une petite proportion de sujets vaccinés, on a également observé de graves effets neurologiques, comme une encéphalite par exemple, et ces cas étaient imprévisibles.

Les effets indésirables consécutifs à la vaccination étaient plus souvent imputables à certaines souches de virus vaccinal qu'à d'autres (Lane et al., 1969 ; Fenner et al., 1988) – les données épidémiologiques limitées dont on dispose incitent à penser qu'avec les souches NYCBH et Lister, les effets indésirables étaient moins fréquents, les souches de Copenhague et de Tachkent se révélant plus virulentes. Selon certaines études de modélisation, le nombre de décès consécutifs à une vaccination au moyen de la souche NYCBH a été estimé à un décès pour un million de vaccinations (Halloran et al., 2002 ; Kaplan et al., 2002 ; Porco et al., 2004). Une étude récente, qui a consisté à passer en revue les données épidémiologiques disponibles, estime que le nombre de décès au cours d'une campagne de vaccination s'est monté à quelques dizaines par million dans le cas de la souche NYCBH et jusqu'à deux cents par million dans le cas de la souche Lister (Kretzschmar et al., 2006). Lors d'une campagne de vaccination menée aux États-Unis et portant sur plus de 700 000 personnes, la fréquence des cas de myopéricardite liés à la vaccination s'est révélée plus élevée que prévu, ce qui a donné lieu à une controverse au sujet du programme (Arness et al., 2004 ; Eckart et al., 2004). Même en l'absence d'effets indésirables, des effets moins graves tels qu'une lésion cutanée, une petite fièvre et des céphalées sont monnaie courante. Cela peut dissuader les gens de se faire vacciner.

1.6 Culture tissulaire et vaccins antivarioliques clonaux

La préparation de vaccin antivariolique sur des animaux vivants n'est plus acceptable à l'heure actuelle car les contrôles de qualité axés sur la contamination microbienne posent problème. Les vaccins de nouvelle génération sont plutôt préparés en culture tissulaire ou sur des œufs de poule embryonnés. Bien qu'à l'occasion, le vaccin antivariolique ait été préparé sur des œufs de poule embryonnés pendant la campagne d'éradication, on ne possède qu'une expérience limitée de la production à grande échelle du vaccin dans des cultures tissulaires, et son efficacité sur le terrain n'est pas parfaitement attestée.

L'hétérogénéité génétique des vaccins Lister et Dryvax utilisés au cours du programme d'éradication est attestée (Li et al., 2006 ; Osborne et al., 2007 ; Garcel et al., 2009). Les vaccins de la génération suivante sont des clones viraux purifiés par la technique des plages dont les propriétés sont similaires à celles des souches parentes. On estime qu'ils devraient être aussi efficaces que les premiers vaccins utilisés pour éradiquer la variole mais il est possible, encore qu'improbable, qu'ils aient perdu des clones viraux jouant un rôle important dans leur efficacité chez les sujets humains.

Sanofi Pasteur a produit un vaccin non clonal en multipliant la souche Lister en culture cellulaire, et ce vaccin fait actuellement l'objet de tests cliniques. Un autre vaccin antivariolique clonal de nouvelle génération, l'ACAM2000, a été homologué aux États-Unis en août 2007 (Frey et al., 2009). Ce vaccin dérive du Dryvax par purification au moyen de la technique des plages et il est cultivé dans la lignée cellulaire simienne Vero. Bien que ces vaccins soient fabriqués conformément aux normes en vigueur, il n'est pas exclu qu'ils provoquent les mêmes effets indésirables que les vaccins Lister ou Dryvax classiques utilisés lors de la campagne d'éradication de la variole ; de toute manière, une minorité importante de la population présente des contre-indications qui lui interdisent l'usage de ces vaccins.

En raison de l'existence d'effets indésirables rares mais non négligeables observés avec les vaccins antivarioliques à base de VACV dont la réplication est complète, la recherche s'est orientée vers la mise au point de vaccins utilisant des souches de VACV non répliquantes ou très atténuées qui offrent davantage d'innocuité tout en conservant une bonne immunogénicité. Une méthode couramment utilisée pour atténuer le VACV consiste à multiplier les passages en culture tissulaire, ce qui conduit à des modifications génétiques, à une baisse de la virulence et à une restriction de la gamme d'hôtes.

1.7 Vaccins antivarioliques atténués par passage en culture tissulaire ou par recombinaison génétique

La souche de virus de la vaccine Ankara modifiée (MVA) est une souche de VACV qui a été obtenue à partir du virus de la vaccine Ankara cultivé sur membrane chorioallantoïdienne vers la fin des années 1950 par 570 passages sur des fibroblastes d'embryon de poulet (Mayr, Hochstein-Mintzel & Stickl, 1975). Ces passages ont permis d'obtenir un virus à gamme d'hôtes restreinte qui est incapable de se répliquer efficacement dans les cellules humaines tout en exprimant cependant la plupart des protéines virales (Sutter & Moss, 1992 ; Mayr, 2003). Ce virus a été homologué à titre de vaccin en Allemagne et on l'a utilisé dans de bonnes conditions de sécurité pour vacciner plus de 100 000 personnes, mais son efficacité contre la variole n'a pas été testée. La souche MVA présente d'importantes délétions dans les régions terminales de son génome qui contiennent des gènes non essentiels souvent impliqués dans l'échappement à la réponse immunitaire de l'hôte ou dans le maintien de la large gamme d'hôtes du VACV (Antoine et al., 1998). En raison de ces délétions, la souche MVA se réplique bien dans les fibroblastes d'embryon de poulet et les cellules de rein de jeune hamster, mais sa réplication est restreinte dans les cellules humaines (Carrol & Moss, 1997). Dans la plupart des types de cellules, la souche MVA exprime la majorité des antigènes viraux, mais seules des particules virales immatures sont

formées et la propagation intercellulaire est restreinte. En tant que vaccin, la souche MVA est jugée efficace car elle fournit une dose d'antigènes à peu près complète, et on estime qu'elle est également sans danger du fait qu'elle ne se réplique pas parfaitement dans les cellules humaines et la plupart des autres cellules mammaliennes (comme le confirment des études sur des singes immunodéficients [Stittelar et al., 2001]). Cette souche suscite un profil anticorpal analogue à celui qu'induit le Dryvax et, chez les primates non humains, elle confère une immunité protectrice contre le virus de l'orthopoxvirose simienne (Earl et al., 2004, 2008). Toutefois, une dose plus forte ou des doses multiples de MVA sont nécessaires pour obtenir l'immunité protectrice conférée par une seule dose de VACV se répliquant. Les essais cliniques de phases I et II sur le vaccin MVA sont terminés et les essais de phase III devraient démarrer en 2011 (Vollmar et al., 2006 ; Wilck et al., 2010). Complétés par des études appropriées sur l'animal, ces essais devraient conduire à l'homologation du vaccin.

Le LC16m8 est une souche de VACV qui a été élaborée par passage à basse température (30°C) de la souche Lister du VACV sur des cellules épithéliales primaires de rein. Ce vaccin a été homologué au Japon en 1975 (Hashizume et al., 1985 ; Kenner et al., 2006). Ce vaccin prend à une vitesse similaire à celle de la souche Lister ; il en diffère du fait qu'il présente une température restrictive, que sa gamme d'hôtes est limitée et que ses effets indésirables sont très réduits (tant sur le plan de la gravité qu'en ce qui concerne le nombre de personnes présentant de tels effets). Le génome du LC16m8 ne présente pas d'importantes délétions et la plupart des cadres de lecture ouverts se révèlent fonctionnels. Le phénotype à petites plages du LC16m8 a été attribué à une mutation au niveau du gène *B5R*, qui code pour une protéine présentant une homologie avec les protéines régulatrices du complément. Cette protéine est essentielle pour la formation de virus enveloppés extracellulaires et c'est un antigène cible important pour les anticorps qui neutralisent le virion (Putz et al., 2006). Comme cette mutation peut facilement s'inverser, on a développé une version stabilisée du LC16m8 qui présente une délétion de la totalité du gène *B5R* (Kidokoro, Tashiro & Shida, 2005). D'autres mutations responsables de la restriction de température et de l'atténuation *in vivo* se trouvent probablement en d'autres endroits du génome viral. On a montré que le LC16m8 protégeait les singes contre l'orthopoxvirose simienne (Saijo et al., 2006).

La souche Dairen I (DI) du VACV a été obtenue à partir de la souche vaccinale parente après 13 passages sur œufs (Tagaya, Kitamura & Sano, 1961). Elle présente une importante délétion dans la région terminale gauche de son génome, où sont situés les gènes impliqués dans la gamme d'hôtes du virus et sa résistance à l'interféron (Ishii et al., 2002).

Les informations dont on dispose actuellement au sujet des souches MVA, LC16m8 et VACV DI sont encourageantes et ces recherches doivent être poursuivies et développées.

Le génie génétique permet d'insérer, de supprimer ou d'interrompre des gènes en des points déterminés du génome dans le but de produire des vaccins plus sûrs et plus immunogènes (Moss, 1996 ; Jacobs et al., 2009). On peut atténuer un virus par la délétion des gènes qui interviennent dans la modulation immunitaire, l'étendue de la gamme d'hôtes ou le métabolisme des nucléotides. Le NYVAC est l'un des mutants atténués du VACV les mieux caractérisés, dont 18 des cadres de lecture ouverts sont délétés (Tartaglia et al., 1992) ; il y a aussi un autre mutant délété pour le gène *E3L* que l'on peut encore administrer par scarification (Jentarra et al., 2008). Le NYVAC fortement atténué est moins immunogène que les souches vaccinales (Midgley et al., 2008) et il pourrait nécessiter l'administration de doses plus importantes de virus. L'immunité protectrice obtenue après la vaccination pourrait être accrue par une inactivation plus sélective des gènes impliqués dans l'échappement à la réponse immunitaire ou par l'expression de cytokines qui potentialisent des éléments déterminés de cette réponse.

1.8 Vaccins antivarioliques constitués de sous-unités protéiques ou d'ADN

Un autre moyen de susciter une immunité protectrice contre la variole consiste à utiliser des protéines virales purifiées produites par des organismes recombinés ou de l'ADN exprimant ces protéines. Ces dernières années, on a progressé dans l'identification des protéines virales qui suscitent une immunité protectrice contre les orthopoxvirus (Moss, 2010). Les anticorps dirigés contre les protéines du virion neutralisent l'infectiosité du virus dans des cultures tissulaires, et des études ont montré que des animaux vaccinés au moyen d'associations de protéines membranaires – notamment les protéines A33, B5, L1 et H3 – sont protégés contre une infection d'épreuve par un poxvirus virulent (Fogg et al., 2004 ; Davies et al., 2005 ; Heraud et al., 2006 ; Xiao et al., 2007 ; Buchman et al., 2010). La vaccination au moyen de la protéine virale qui se lie à l'interféron de type I a également permis de protéger des souris contre une ectromélie (variole de la souris) mortelle. Les protéines immunomodulatrices virales constituent donc une autre possibilité pour l'élaboration de vaccins à base de protéines (Xu et al., 2008).

Les vaccins sous-unités sont plus sûrs que le vaccin utilisant un VACV infectieux. Toutefois, cette autre méthodologie de vaccination est limitée du fait qu'on n'est pas en mesure actuellement d'apporter la preuve que ces vaccins seraient efficaces contre une flambée de variole.

1.9 Vaccination après exposition

La vaccination après exposition à une infection par le virus variolique pourrait réduire efficacement le nombre de victimes de la variole (Mortimer, 2003). Plusieurs études ont été consacrées à l'évaluation de cette possibilité en utilisant des modèles animaux. La plupart de ces études sont arrivées à la conclusion que le vaccin devrait être administré au plus tard un à deux jours après exposition à un poxvirus virulent pour protéger le sujet contre une issue fatale (Staib et al., 2006 ; Samuelsson et al., 2008 ; Paran et al., 2009). Fait intéressant, le vaccin MVA a suscité une réponse protectrice plus rapide que la souche NYCBH chez un modèle soumis à une infection d'épreuve par un orthopoxvirus simien, probablement en raison de la dose plus élevée utilisée dans cet essai (Earl et al., 2008).

1.10 Les futurs enjeux de la vaccination antivariolique

Devant le risque d'un acte terroriste consistant dans la dissémination délibérée de virus varioliques, quelques pays ont entrepris de fabriquer des vaccins antivarioliques afin de reconstituer leurs réserves (Rosenthal et al., 2001) et l'OMS a constitué des réserves de vaccin antivariolique. Ces vaccins ont généralement été préparés en culture tissulaire plutôt que sur des animaux afin de respecter les normes vaccinales actuelles. Comme ils sont similaires au vaccin antivariolique classique, il est probable que ces vaccins auront la même efficacité et produiront la même proportion d'effets indésirables. La production d'immunoglobulines antivaccine ou le développement d'autres méthodologies comme l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre des constituants déterminés du virus pourraient vraisemblablement jouer un rôle important dans le traitement de tout effet indésirable de la vaccination.

Il est nécessaire de pouvoir disposer de vaccins antivarioliques plus sûrs en raison de la fréquence inacceptable des effets indésirables postvaccinaux et de la proportion importante de la population humaine pour qui la vaccination antivariolique est contre-indiquée. Ce besoin devrait pouvoir être satisfait dans une certaine mesure par les VACV fortement ou modérément atténués qui sont en voie d'être homologués, comme le MVA ou le LC16m8. Par ailleurs, les données issues de la recherche sur le VACV peuvent être utilisées pour créer des souches virales que l'on pourra atténuer de manière rationnelle en les modifiant génétiquement de manière à réduire leur capacité de réplication, de propagation et de modulation de la réponse immunitaire de l'hôte. Il est possible d'évaluer sur des modèles

animaux la protection conférée par les nouveaux vaccins et de s'assurer de leur innocuité et de leur immunogénicité par des essais cliniques sur des sujets humains.

L'une des difficultés à faire homologuer ces nouveaux vaccins antivarioliques tient non seulement à leur coût élevé, mais encore à l'incapacité dans laquelle on se trouve de démontrer qu'ils confèrent une immunité protectrice contre la variole humaine. La variole ayant été éradiquée, on ne peut pas vérifier l'efficacité des nouveaux vaccins contre la maladie naturelle. À défaut, on doit alors comparer ces vaccins aux vaccins antivarioliques classiques en effectuant des tests sur des modèles de substitution de la variole humaine tels que l'orthopoxvirose murine chez la souris ou l'orthopoxvirose simienne chez les primates. Une autre démarche consiste à utiliser comme marqueurs la réactivité aux antigènes du virus variolique ou la neutralisation de l'infectiosité de ce virus en culture tissulaire (Damon et al., 2009). Notre connaissance des paramètres immunologiques qui sont en corrélation avec la protection contre les poxvirus virulents est encore limitée, mais elle a progressé au cours des dernières années et elle pourrait nous permettre d'établir des critères sur la base desquels comparer les vaccins classiques aux vaccins antivarioliques de nouvelle génération (Putz et al., 2006 ; Kennedy et al., 2009). Quoi qu'il en soit, l'utilisation de virus varioliques vivants pour des études de neutralisation *in vitro* ou encore pour des études sur des primates non humains permettrait de renforcer la confiance dans la capacité de ces vaccins à protéger contre la variole.

Abréviations

ADN	acide désoxyribonucléique
CVA	virus de la vaccine Ankara cultivé sur membrane chorioallantoïdienne
MVA	virus de la vaccine Ankara modifié
NYCBH	New York City Board of Health
OMS	Organisation mondiale de la Santé
OPV	orthopoxvirus
VACV	virus de la vaccine

Références bibliographiques

- Antoine G et al. (1998). The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: comparison with other orthopoxviruses. *Virology*, 244: 365–396.
- Arness MK et al. (2004). Myopericarditis following smallpox vaccination. *American Journal of Epidemiology*, 160: 642–651.
- Baxby D (1981). *Jenner's smallpox vaccine : the riddle of vaccinia virus and its origin*. einemann Educational Books, London.
- Buchman GW et al. (2010) A protein-based smallpox vaccine protects non-human primates from a lethal monkeypox virus challenge. *Vaccine*, 28: 6627–6636.
- Carroll MW, Moss B (1997). Host range and cytopathogenicity of the highly attenuated MVA strain of vaccinia virus: propagation and generation of recombinant viruses in a nonhuman mammalian cell line. *Virology*, 238: 198–211.
- Damon IK et al. (2009). Evaluation of smallpox vaccines using variola neutralization. *The Journal of General Virology*, 90: 1962–1966.
- Davies DH et al. (2005). Vaccinia virus H3L envelope protein is a major target of neutralizing antibodies in humans and elicits protection against lethal challenge in mice. *Journal of Virology*, 79: 11724–11733.
- Downie AW (1939). A study of the lesions produced experimentally by cowpox virus. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 48: 361–379.
- Earl PL et al. (2004). Immunogenicity of a highly attenuated MVA smallpox vaccine and protection against monkeypox. *Nature*, 428: 182–185.
- Earl PL et al. (2008). Rapid protection in a monkeypox model by a single injection of a replication-deficient vaccinia virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105: 10889–10894.
- Eckart RE et al. (2004). Incidence and follow-up of inflammatory cardiac complications after smallpox vaccination. *Journal of the American College of Cardiology*, 44: 201–205.
- Fenner F et al. (1988). *Smallpox and its eradication*. World Health Organization, Geneva.
- Fogg C et al. (2004). Protective immunity to vaccinia virus induced by vaccination with multiple recombinant outer membrane proteins of intracellular and extracellular virions. *Journal of Virology*, 78: 10230–10237.
- Frey SE et al. (2009). Comparison of the safety and immunogenicity of ACAM1000, ACAM2000 and Dryvax in healthy vaccinia-naive adults. *Vaccine*, 27: 1637–1644.
- Garcel A et al. (2009). Phenotypic and genetic diversity of the traditional Lister smallpox vaccine. *Vaccine*, 27: 708–717.
- Halloran ME et al. (2002). Containing bioterrorist smallpox. *Science*, 298: 1428–1432.
- Hashizume S et al. (1985). Properties of attenuated mutant of vaccinia virus, LC16m8, derived from Lister strain. In: Quinnan GV, ed. *Vaccinia virus as vectors for vaccine antigens*. Elsevier Science Publishing Co Inc, New York, 87–99.
- Henderson DA (2009). *Smallpox – the death of a disease*. Prometheus Books, Amherst, New York.
- Heraud JM et al. (2006). Subunit recombinant vaccine protects against monkeypox. *Journal of Immunology*, 177: 2552–2564.

- Ishii K et al. (2002). Structural analysis of vaccinia virus DIs strain: application as a new replication-deficient viral vector. *Virology*, 302: 433–444.
- Jacobs BL et al. (2009). Vaccinia virus vaccines: past, present and future. *Antiviral Research*, 84: 1–13.
- Jenner E (1801). *The origin of the vaccine inoculation*. DN Shury, London.
- Jentarra GM et al. (2008). Vaccinia viruses with mutations in the E3L gene as potential replication-competent, attenuated vaccines: scarification vaccination. *Vaccine*, 26: 2860–2872.
- Kaplan EH, Craft DL, Wein LM (2002). Emergency response to a smallpox attack: the case for mass vaccination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99: 10935–10940.
- Kennedy RB et al. (2009). The immunology of smallpox vaccines. *Current Opinion in Immunology*, 21: 314–320.
- Kenner J et al. (2006). LC16m8: an attenuated smallpox vaccine. *Vaccine*, 24: 7009–7022.
- Kidokoro M, Tashiro M, Shida H (2005). Genetically stable and fully effective smallpox vaccine strain constructed from highly attenuated vaccinia LC16m8. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102: 4152–4157.
- Kretzschmar M et al. (2006). Frequency of adverse events after vaccination with different vaccinia strains. *PLoS Medicine*, 3: e272.
- Lane JM et al. (1969). Complications of smallpox vaccination, 1968. National surveillance in the United States. *The New England Journal of Medicine*, 281: 1201–1208.
- Li G et al. (2006). Genomic sequence and analysis of a vaccinia virus isolate from a patient with a smallpox vaccine-related complication. *Virology Journal*, 3 :88.
- Mayr A (2003). Smallpox vaccination and bioterrorism with pox viruses. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 26: 423–430.
- Mayr A, Hochstein-Mintzel V, Stickl H. (1975). Abstammung, eigenschaftennund Verwendung des attenuierten Vaccinia-stammes MVA [Passage history, properties and applicability of the attenuated vaccinia virus strain MVA]. *Infection*, 3: 6–16.
- Midgley CM et al. (2008). Vaccinia virus strain NYVAC induces substantially lower and qualitatively different human antibody responses compared with strains Lister and Dryvax. *Journal of General Virology*, 89: 2992–2997.
- Mortimer PP (2003). Can postexposure vaccination against smallpox succeed? *Clinical Infectious Diseases*, 36: 622–629.
- Moss B (1996). Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93: 11341–11348.
- Moss B (2010). Smallpox vaccines: targets of protective immunity. *Immunological Reviews*, 239, in press.
- Osborne JD et al. (2007). Genomic differences of Vaccinia virus clones from Dryvax smallpox vaccine: the Dryvax-like ACAM2000 and the mouse neurovirulent Clone-3. *Vaccine*, 25: 8807–8832.

- Paran N et al. (2009). Postexposure immunization with modified vaccinia virus Ankara or conventional Lister vaccine provides solid protection in a murine model of human smallpox. *The Journal of Infectious Diseases*, 199: 39–48.
- Porco TC et al. (2004). Logistics of community smallpox control through contact tracing and ring vaccination: a stochastic network model. *BMC Public Health*, 4: 34.
- Putz MM et al. (2006). Quantification of antibody responses against multiple antigens of the two infectious forms of Vaccinia virus provides a benchmark for smallpox vaccination. *Nature Medicine*, 12 :1310–1315.
- Rosenthal SR et al. (2001). Developing new smallpox vaccines. *Emerging Infectious Diseases*, 7: 920-926.
- Saijo M et al. (2006). LC16m8, a highly attenuated vaccinia virus vaccine lacking expression of the membrane protein B5R, protects monkeys from monkeypox. *Journal of Virology*, 80: 5179-5188.
- Samuelsson C et al. (2008). Survival of lethal poxvirus infection in mice depends on TLR9, and therapeutic vaccination provides protection. *The Journal of Clinical Investigation*, 118: 1776-1784.
- Smith GL, McFadden G (2002). Smallpox: anything to declare? *Nature Reviews Immunology*, 2: 521-527.
- Staib C et al. (2006). Short-term, but not post-exposure, protection against lethal orthopoxvirus challenge after immunization with modified vaccinia virus Ankara. *The Journal of General Virology*, 87: 2917–2921.
- Stittelaar KJ et al. (2001). Safety of modified vaccinia virus Ankara (MVA) in immunosuppressed macaques. *Vaccine*, 19: 3700–3709.
- Sutter G, Moss B (1992). Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89: 10847-10851.
- Tagaya I, Kitamura T, Sano Y (1961). A new mutant of dermovaccinia virus. *Nature*, 192: 381-382.
- Tartaglia J et al. (1992). Highly attenuated poxvirus vectors. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 8: 1445–1447.
- Tulman ER et al. (2006). Genome of horsepox virus. *Journal of Virology*, 80: 9244–9258.
- Vollmar J et al. (2006). Safety and immunogenicity of IMVAMUNE, a promising candidate as a third generation smallpox vaccine. *Vaccine*, 24: 2065–2070.
- Wilck MB et al. (2010) Safety and immunogenicity of modified vaccinia Ankara (ACAM3000): effect of dose and route of administration. *The Journal of Infectious Diseases*, 201: 1361–1370. Erratum in : *The Journal of Infectious Diseases*, 2010, 202: 179.
- Xiao Y et al. (2007). A protein-based smallpox vaccine protects mice from vaccinia and ectromelia virus challenges when given as a prime and single boost. *Vaccine*, 25: 1214–1224.
- Xu RH et al. (2008). The orthopoxvirus type I IFN binding protein is essential for virulence and an effective target for vaccination. *Journal of Experimental Medicine*, 205: 981–992.

2. Tests pour le diagnostic de la variole (virus variolique) au laboratoire

Inger Damon,¹ Hermann Meyer² et Sergei Shchelkunov³

¹ Poxvirus and Rabies Branch, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta (États-Unis d'Amérique)

² Institut de Microbiologie de la Bundeswehr, Munich (Allemagne)

³ Département de Recherche génomique, Centre de Recherche d'État en Virologie et Biotechnologie VECTOR, Koltsovo, région de Novossibirsk (Fédération de Russie)

Les observations et les conclusions qui figurent dans le présent rapport n'engagent que leurs auteurs et ne représentent pas nécessairement la position officielle des Centers for Disease Control and Prevention.

Résumé d'orientation

Importance pour la santé publique

Le virus variolique est l'agent étiologique de la variole, maladie dont l'Assemblée mondiale de la Santé a déclaré l'éradication en 1980. Si l'on considère que ce virus pourrait servir d'arme de guerre biologique ou être utilisé à cette fin par des terroristes, c'est parce qu'il peut causer une morbidité et une mortalité élevées et que, la vaccination antivariolique systématique étant largement interrompue depuis les années 1970, la majorité de la population humaine lui est désormais sensible (Henderson et al., 1999). Étant donné qu'un diagnostic de variole a des conséquences sérieuses même s'il s'agit d'un diagnostic erroné, il est nécessaire de pouvoir identifier un cas de variole rapidement, de manière fiable et sans ambiguïté. Il faut pour cela pouvoir également exclure à coup sûr toute autre pathologie présentant des analogies cliniques avec cette dernière. La valeur prédictive d'un diagnostic positif (également dénommée valeur prédictive positive) est extrêmement basse dans le cas d'une maladie dont la prévalence est faible ; il faut donc avoir recours à des stratégies qui améliorent la valeur prédictive positive.

Bilan des progrès réalisés

Entre 2000 et 2010, des progrès remarquables ont été accomplis en ce qui concerne les moyens de diagnostic cliniques et biologiques de la variole. Le présent chapitre fait l'historique des méthodes utilisées pour le diagnostic de la variole et récapitule les tests basés sur l'acide nucléique viral, la sérologie et la recherche des protéines qui ont été développés à cet égard depuis l'année 2000. Les nouvelles technologies ont stimulé les voies de recherche empruntées par de nombreux investigateurs. Les stratégies basées sur la recherche de l'acide nucléique viral, en particulier, font de plus en plus appel aux techniques d'amplification génique en temps réel (PCR) à haut débit et, dans certains cas, aux plates-formes de puces à ADN.

Résultats et implications

On a mis au point un grand nombre de tests basés sur l'acide nucléique viral mais les techniques de diagnostic fondées sur l'immunologie ou les protéines restent peu nombreuses. Tous les tests relatifs au virus variolique ou aux autres poxvirus – y compris ces nouveaux tests – sont à caractère heuristique ; aucun d'entre eux n'a encore été l'objet d'un examen complet à des fins réglementaires ou soumis à une procédure d'autorisation. Au moment de la rédaction du présent chapitre, on débat encore de la nécessité éventuelle de disposer de virus varioliques vivants en vue de soumettre ces tests aux examens prescrits par la réglementation. Un nécessaire de diagnostic basé sur l'acide nucléique viral est disponible dans le commerce ; il est toutefois destiné à être utilisé à des fins de recherche et non pour le diagnostic de la variole.

2.1 Introduction

Le présent chapitre est consacré aux techniques de laboratoire applicables au diagnostic clinique de la variole. Il n'aborde pas la question de la recherche du virus dans l'environnement. Il expose les méthodes de collecte et de manipulation des échantillons et, après avoir donné un rapide aperçu des tests de diagnostic utilisés antérieurement, il s'attarde sur les tests basés sur l'acide nucléique viral et la sérologie. Le système basé sur une source de désorption/ionisation laser assistée par une matrice (MALDI) qui a été récemment mis au point n'est pas examiné dans le présent exposé ; il s'agit en effet d'une technologie qui n'est utilisée que dans de rares laboratoires et dont on poursuit actuellement le développement.

Le virus variolique (en abrégé VARV) est l'agent étiologique de la variole. On estime qu'il pourrait servir d'arme de guerre biologique ou être utilisé à cette fin par des terroristes parce qu'il peut causer une morbidité et une mortalité élevées et que, la vaccination antivariolique systématique étant largement interrompue depuis les années 1970, la majorité de la population humaine lui est désormais sensible (Henderson et al., 1999). Vu les conséquences sérieuses d'un diagnostic de variole, même s'il s'agit d'un diagnostic erroné, il est nécessaire de pouvoir identifier un cas de variole rapidement, de manière fiable et sans ambiguïté. Il faut pour cela pouvoir également exclure à coup sûr toute autre pathologie présentant des analogies cliniques avec cette dernière. Avant son éradication en 1980, il était relativement facile de reconnaître la variole sur le plan clinique, même s'il arrivait parfois qu'on la confonde avec d'autres affections exanthématisques (Damon & Esposito, 2003 ; Shchelkunov, Marennikova & Moyer, 2005). Il arrivait souvent, par exemple, qu'une varicelle produisant une sévère éruption cutanée due au virus varicello-zonateux soit prise pour une variole. Parmi les autres maladies ou troubles pouvant être confondus avec la variole à son stade vésiculeux figurent l'orthopoxvirose simienne, une infection généralisée par le virus de la vaccine, un zona disséminé dû au virus varicello-zonateux, une infection généralisée par le virus de l'herpès, certaines réactions médicamenteuses éruptives, l'érythème polymorphe, les gastro-entérites virales, la syphilis secondaire, la gale, les piqûres d'insectes, l'impétigo et le molluscum contagiosum. D'autres maladies peuvent également être confondues avec une variole hémorragique, à savoir une leucémie aiguë, une méningococcémie ou un purpura thrombopénique idiopathique. À titre de mesure permettant d'éviter ce genre d'erreur de diagnostic, un centre collaborateur de l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) – les Centers for Disease Control and Prevention (CDC) – a élaboré, en collaboration avec de nombreuses autres organisations professionnelles, un algorithme pour évaluer le risque de variole chez un malade.¹

La valeur prédictive positive – c'est-à-dire la proportion de vrais positifs parmi l'ensemble des tests positifs – varie en fonction de la prévalence de la maladie ; elle est différente de la sensibilité et de la spécificité qui ne dépendent pas de la prévalence de la maladie et sont le reflet des propriétés du test lui-même. On peut donc, pour confirmer le diagnostic des cas suspects, améliorer la valeur prédictive positive en examinant des échantillons prélevés sur ceux de ces malades qui présentent les symptômes voulus sur le plan clinique et en utilisant divers moyens de diagnostic dont les sources d'erreur sont indépendantes et qui s'appuient sur de multiples cibles pour reconnaître la maladie.

2.2 Collecte et manipulation des échantillons

Tout cas suspect de variole doit immédiatement être notifié aux autorités sanitaires locales ou centrales.

¹ Voir <http://emergency.cdc.gov/agent/smallpox/diagnostic/riskalgorithm/> pour consulter l'algorithme et obtenir des informations complémentaires.

Conformément aux recommandations internationales,² les travaux sur le virus variolique doivent s'effectuer dans des laboratoires agréés par l'OMS opérant au niveau 4 de sécurité biologique. En 2010, il y avait deux centres collaborateurs de l'OMS ayant la capacité de manipuler des virus varioliques vivants – l'un sis aux CDC d'Atlanta (États-Unis) et l'autre au Centre de Recherche d'État en Virologie et Biotechnologie VECTOR (SRC VB VECTOR) de Koltsovo (Fédération de Russie). Des informations sur les précautions à prendre pour la collecte et la manipulation des échantillons sont disponibles sur le site Internet des CDC, actuellement sous la rubrique « Guide D – spécimen collection and transport guidelines » du plan d'action en cas de variole.³

Il faut au moins deux à quatre croûtes cicatricielles ou fragments prélevés sur les vésicules (ou les deux) pour effectuer les examens de laboratoire. Pour séparer les croûtes de la peau intacte sous-jacente, on peut utiliser un scalpel ou une aiguille N° 26, et chaque échantillon doit être conservé dans un récipient distinct afin d'éviter toute contamination croisée. On a constaté la coexistence possible de maladies infectieuses éruptives, notamment la varicelle ou l'orthopoxvirose simienne. Lorsqu'on effectue un prélèvement sur une lésion, il faut veiller à collecter à la fois le liquide vésiculaire et la peau qui la recouvre. Une fois que l'on a retiré cette peau et qu'on l'a placée dans le récipient à échantillons, il faut frotter vigoureusement la base de la vésicule avec un applicateur en bois ou un écouvillon en polyester ou en coton. Le produit visqueux ainsi recueilli peut être appliqué sur une lame de microscope propre et séché à l'air. On peut faire une empreinte en exerçant une pression progressive sur une lame propre que l'on maintient sur la lésion ouverte. Si l'on dispose d'une installation de microscopie électronique, on peut appliquer une série de trois grilles d'observation sur la lésion (côté brillant sur la vésicule ouverte), en exerçant successivement une pression faible, modérée et forte (Hazelton & Gelderblom, 2003). Il faut laisser sécher à l'air les lames de verre ou les grilles d'observation au microscope électronique pendant une dizaine de minutes, puis les placer dans un porte-lames ou une boîte à grilles en vue de leur transport jusqu'au laboratoire.

D'autres techniques d'échantillonnage des lésions, notamment la conservation du prélèvement sur un papier filtre approprié, sont en cours d'évaluation. La conservation des échantillons dans un milieu de transport (comme on le fait par exemple pour les herpétoviridés) est à éviter, principalement du fait que le milieu entraîne la dilution de l'échantillon. Il existe des recommandations particulières pour l'échantillonnage en vue d'un examen au microscope électronique et la préparation des échantillons.⁴

Une biopsie des lésions peut également permettre de recueillir du matériel biologique qui convienne à l'examen direct du virus. On peut effectuer une ponction-biopsie de 3 à 4 mm, couper l'échantillon en deux parties que l'on placera l'une dans le formol en vue d'un test immunohistochimique et l'autre dans un récipient à échantillons. Les échantillons obtenus par écouvillonnage sanguin ou pharyngé sur des cas suspects de variole au cours de la phase prodromique fébrile ou au début de la phase éruptive constituent également une source potentielle de virus. En outre, on peut prélever du sérum sur les patients en vue de tests sérologiques destinés à confirmer le diagnostic viral ou pour poser un diagnostic rétrospectif. Il faut prélever cinq à dix millilitres de sérum le plus précocement possible dans le cours de la maladie, puis à nouveau trois à quatre semaines plus tard.

Exception faite des grilles d'observation au microscope électronique et des tissus fixés au formol qu'il faut maintenir à la température ambiante, les échantillons contenant le virus doivent être conservés à -20°C ou sur de la carboglace jusqu'à leur arrivée à destination. La

² <http://www.who.int/csr/disease/smallpox/SummaryrecommandationsMay08.pdf>.

³ <http://emergency.cdc.gov/agent/smallpox/response-plan/#guided>.

⁴ <http://www.bt.cdc.gov/agent/smallpox/lab-testing/pdf/em-rash-protocol.pdf>.

température ordinaire du réfrigérateur (4°C) est acceptable si la durée de conservation est inférieure à sept jours.

Emballage et transport des échantillons cliniques

Les échantillons cliniques doivent être emballés et transportés conformément aux normes internationales applicables à l'emballage et au transport des substances infectieuses.

Tous les échantillons cliniques doivent être transportés dans un emballage triple (OMS, 2008a). Les échantillons cliniques doivent être considérés comme des substances infectieuses de la catégorie A et classées sous le numéro ONU 2814. On pourra trouver sur le site Internet de l'OMS des conseils pratiques pour se mettre en conformité avec la réglementation relative à l'ensemble des modes de transport national ou international des substances infectieuses et des échantillons prélevés sur des malades.⁵

2.3 Isolement du virus

L'utilisation d'embryons de poulet pour le diagnostic des poxvirus a été décrite pour la première fois en 1937 et c'est depuis lors un outil diagnostique précieux. Les seuls poxvirus dont on sait qu'ils infectent l'homme et provoquent l'apparition de pustules sur la membrane chorioallantoïdienne des œufs de poule sont quatre orthopoxvirus : le virus variolique, le virus de l'orthopoxvirose simienne, le virus de l'orthopoxvirose bovine et le virus de la vaccine (en abrégé VACV). Les pustules observées chez des embryons de 12 jours incubés à 34,5-35°C présentent des différences morphologiques qui se sont révélées utiles pour la différenciation des espèces d'orthopoxvirus. C'est pourquoi le test sur membrane chorioallantoïdienne a beaucoup été utilisé, et avec succès, tout au long de la campagne d'éradication de la variole.

Malgré l'existence de nouvelles méthodes de diagnostic, l'isolement du virus reste la méthode idéale. De plus, la culture du virus est la seule méthode dont on dispose pour produire suffisamment de virus vivants en vue d'examens ultérieurs. Bien que le virus variolique se multiplie de manière satisfaisante dans l'embryon de poulet, la culture cellulaire constitue généralement une option plus simple. Ce virus peut être multiplié dans diverses lignées cellulaires connues, notamment les suivantes :

- Vero, BSC-1 et CV-1 (cellules de rein de singe vert africain)
- LLC-MK2 (cellules de rein de singe rhésus)
- Fibroblastes pulmonaires embryonnaires humains
- HeLa (cellules cancéreuses ovariennes humaines)
- Cellules fibroblastiques d'embryon de poulet
- MRC-5 (cellules fibroblastiques diploïdes humaines).

On observe un effet cytopathique au bout d'un à deux jours, en fonction de la quantité de matériel infectieux présente dans l'inoculum initial ; si cette quantité est faible, on ne peut pas distinguer de plages avant trois ou quatre jours.

2.4 Microscopie électronique

La microscopie électronique est considérée comme une méthode de choix pour le diagnostic des poxviroses au laboratoire en raison de la morphologie caractéristique du virion, du grand nombre de particules virales généralement présentes dans les lésions produites par ces

⁵ <http://www.who.int/ihr/biosafety/publications/en/index.html>.

infections et par la relative facilité à obtenir des échantillons. Après être devenue d'usage courant au cours des années 1950, la microscopie électronique à transmission a été largement utilisée pendant la période d'éradication de la variole. Le diagnostic clinique des poxviroses humaines est rare de nos jours, de sorte que c'est sans doute la microscopie électronique qui est susceptible de fournir l'une des premières indications au sujet de la cause d'une maladie éruptive inconnue (Hazelton & Gelderblom, 2003).

Le virion des orthopoxvirus a la forme d'une petite brique couverte d'un réseau irrégulier de tubules semblables à de petits bouts de ruban. Ses dimensions vont de 250 nm x 290 nm à 280 nm x 350 nm. Leur morphologie ne permet pas de distinguer les unes des autres les différentes espèces d'orthopoxvirus mais ceux-ci se distinguent facilement des herpétoviridés, ce qui est important pour le diagnostic différentiel chez l'homme (par exemple pour distinguer une orthopoxvirose d'une varicelle due au virus varicello-zonateux). Comme les poxvirus sont étroitement associés à la matrice cellulaire, les échantillons doivent subir une préparation adéquate afin que l'on puisse examiner le virus au microscope électronique. Antérieurement, on broyait dans un mortier les croûtes ou les fragments hachés provenant des lésions avec du sable stérile ou on pulvérisait l'échantillon après congélation rapide dans l'azote liquide. Actuellement, il existe dans le commerce des dispositifs tubulaires (tubes à matrice de lyse associés à des broyeurs à billes ou à des malaxeurs) qui sont plus avantageux car ils permettent de normaliser la marche à suivre et d'éviter les contaminations croisées. Deux cycles de congélation-décongélation ou une sonication (ou les deux) facilitent la désagrégation des cellules dans un dispositif tubulaire fermé. L'utilisation d'un sonificateur à sonde « cup-horn » permet de libérer de la matrice cellulaire un nombre encore plus important de virions. Il faut une concentration de 10^5 particules virales par ml pour que l'examen visuel des virions permette de poser le bon diagnostic.

La préparation et l'examen des échantillons demandent de la patience et de l'expérience. Même si l'on trouve rapidement des particules virales en forme de petites briques caractéristiques des poxvirus, il est utile de continuer à scruter l'échantillon car d'autres virus peuvent également être présents. Selon le nombre de particules, l'examen d'un échantillon peut prendre une trentaine de minutes, de sorte qu'il peut falloir jusqu'à deux heures après réception des échantillons pour avoir le résultat de la microscopie électronique. On peut trouver sur Internet la description des méthodes d'évaluation par coloration négative ainsi que des images de particules virales en coloration négative.⁶

2.5 Tests de diagnostic basés sur l'examen du génome ou d'éléments du génome

Le développement rapide qu'a connu la recherche sur les acides nucléiques au cours des dernières années a ouvert un grand nombre de voies pour la recherche et l'identification des virus au moyen de leur ADN (acide désoxyribonucléique). Les techniques de séquençage nucléotidique ont été automatisées et sont devenues économiquement abordables, ce qui signifie que des techniques telles que l'amplification génique par la PCR, la PCR en temps réel, les micropuces et, dans une moindre mesure, le séquençage du génome ne sont plus désormais réservées à un petit nombre de laboratoires spécialisés.

2.5.1 Les travaux sur l'ADN du virus variolique

La distribution, la synthèse et la manipulation de l'ADN du virus variolique sont régies par toute une série de règles (OMS, 2008b). Il est rigoureusement interdit de détenir à un moment quelconque des clones contenant plus de 20 % du génome du virus variolique en dehors des deux centres collaborateurs de l'OMS pour la variole et les autres poxviroses. Toute demande en vue de manipuler de l'ADN variolique comportant plus de 500 nucléotides doit obligatoirement passer par le Siège de l'OMS et le laboratoire demandeur n'est pas

⁶ <http://www.bt.cdc.gov/agent/smallpox/lab-testing/pdf/em-rash-protocol.pdf>.

autorisé à distribuer cet ADN à des tierces parties. Par ailleurs, l'ADN du virus variolique ne doit pas être utilisé pour procéder à des insertions dans le virus de la vaccine ou dans tout autre poxvirus, et aucun autre orthopoxvirus ne doit être manipulé dans un laboratoire où de l'ADN variolique est présent. On peut utiliser de l'ADN variolique ne comportant pas plus de 500 paires de bases comme témoin positif dans les nécessaires d'amplification génique (PCR) à vocation diagnostique sans autorisation préalable, mais il est tout de même souhaitable de prévenir l'OMS en pareil cas. De même, la production de micropuces à ADN sur lesquelles des oligonucléotides (moins de 80 paires de bases) sont fixés par liaisons covalentes et sont par conséquent difficiles à réassembler par des ligatures peut être pratiquée sans l'autorisation de l'OMS. Globalement, ces oligonucléotides pourraient couvrir la totalité du génome.

2.5.2 Polymorphisme de longueur des fragments de restriction

La technique du polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) repose sur le fait que le génome d'agents pathogènes même très étroitement apparentés est caractérisé par des variations au niveau des séquences nucléotidiques. Concrètement, la technique RFLP consiste à isoler le virus à identifier, à extraire son ADN et à effectuer sa digestion par une endonucléase de restriction ou par une batterie de ces enzymes. La digestion produit des fragments d'ADN que l'on sépare ensuite en fonction de leur taille par électrophorèse afin de les visualiser. Théoriquement, chaque souche donne lieu à un arrangement des bandes qui lui est propre et constitue son empreinte génétique. Pour un nouveau protocole expérimental, on peut utiliser un grand nombre d'enzymes de restriction différentes. On obtient alors plusieurs empreintes génétiques moléculaires que l'on peut analyser, ce qui permet de déterminer ainsi quelle est la meilleure combinaison d'enzymes à utiliser pour différencier des souches ou des isoléments.

On a utilisé la technique RFLP avec l'enzyme de restriction HindIII pour distinguer les différentes espèces d'orthopoxvirus (Mackett & Archard, 1979 ; Esposito & Knight, 1985) ; la technique RFLP oblige toutefois à cultiver les virus pendant une longue période afin d'obtenir suffisamment d'ADN de bonne qualité.

2.5.3 Amplification génique (PCR)

La PCR permet de produire de grandes quantités d'ADN à partir d'un mélange complexe de séquences hétérogènes. Tout produit d'amplification génique ainsi obtenu possède par définition une taille caractéristique ; pour en confirmer l'identité, on utilise généralement les moyens suivants : sondes d'hybridation ADN, digestats d'ADN obtenus au moyen d'endonucléases de restriction ou encore – plus couramment – séquençage direct. On peut améliorer la sensibilité d'une réaction PCR en utilisant une deuxième série d'amorces pour amplifier un sous-fragment du premier produit de la PCR ; cette technique, appelée PCR nichée ou emboîtée, a toutefois l'inconvénient de prendre beaucoup de temps et elle peut aussi donner de faux positifs. De ce fait, il vaut mieux l'éviter pour le diagnostic de routine.

La PCR ne fait aucune distinction entre les virus viables et non viables ou entre les éléments complets ou incomplets de l'ADN génomique, ce qui risque de compliquer l'interprétation des résultats. En outre, lorsqu'on effectue une PCR, il importe d'utiliser des témoins positifs et des témoins négatifs pour valider les résultats. L'utilisation d'un témoin positif facilite l'élimination des faux négatifs (c'est-à-dire au cas où la PCR elle-même n'a pas fonctionné correctement) et celle d'un témoin négatif aidera à éliminer les faux positifs (c'est-à-dire au cas où les échantillons sont tous contaminés par l'ADN viral ou la matrice). Moyennant ces précautions, la PCR est une option réaliste pour le diagnostic. Elle présente des avantages en termes de rapidité, de sensibilité et de spécificité qui contrebalancent désormais largement le coût de l'équipement nécessaire, et l'on a défini des modes opératoires qui permettent d'éviter le risque d'une contamination qui conduirait à des faux positifs. La PCR

est actuellement la méthode de choix pour l'identification du virus variolique à des fins diagnostiques.

Il existe, pour la PCR applicable à l'identification et à la différenciation des orthopoxvirus, des protocoles expérimentaux qui reposent sur les séquences des gènes codant pour l'hémagglutinine (HA) (Ropp et al., 1995), le modificateur B de la réponse cytokine (CrmB) (Loparev et al., 2001) et la protéine des corps d'inclusion type A (Meyer, Ropp & Esposito, 1997). Dans ces protocoles, on effectue la PCR en utilisant des amorces qui sont supposées amplifier un segment d'ADN présent dans tout orthopoxvirus. L'amplicon est digéré au moyen d'une endonucléase de restriction appropriée, puis séparé par électrophorèse en gel pour différencier les espèces en comparant les profils des fragments aux profils RFLP des virus de référence. Toutefois, en analysant une importante série d'isolements issus d'une espèce d'orthopoxvirus, on a constaté une hétérogénéité dans l'arrangement des fragments de restriction, ce qui rend l'interprétation des résultats assez ambiguë (Meyer et al., 1999).

Pour différencier les espèces d'orthopoxvirus en une seule réaction, on a récemment mis au point un test basé sur la PCR multiplexe. Cette méthode consiste à utiliser des amorces nucléotidiques uniques pour déterminer à quelle espèce appartiennent les orthopoxvirus. On utilise donc quatre paires d'amorces (trois paires correspondant respectivement au virus variolique, au virus de l'ectromélie et au virus de la variole bovine, et une paire spécifique du genre) pour produire des amplicons de différentes longueurs qui sont spécifiques de chaque espèce d'orthopoxvirus (Shchelkunov, Gavrilova & Babkin, 2005). La paire spécifique du genre sert de témoin interne à la PCR relativement à la présence d'ADN orthopoxviral dans l'échantillon. On a évalué la spécificité et la sensibilité de cette méthode à l'aide de l'ADN de 57 souches d'orthopoxvirus, et notamment de l'ADN tiré de croûtes cicatricielles prélevées sur les lésions cutanées de sujets ayant contracté la variole durant la période 1970-1975 et qui étaient détenues dans la collection russe de virus varioliques.

2.5.4 Amplification génique – polymorphisme de longueur des fragments de restriction

Pour avoir une connaissance générale du génome viral dans son entier sans avoir à le séquencer en totalité, on a utilisé une variante de la technique RFLP. Elle consiste à commencer par effectuer une PCR préliminaire destinée à amplifier des régions couvrant l'ensemble du génome. On utilise ensuite les amplicons obtenus comme matrice ADN pour la RFLP. Cette variante de la RFLP, appelée PCR-RFLP, présente une grande sensibilité pour l'identification des agents pathogènes. On l'a utilisée pour distinguer plusieurs espèces d'orthopoxvirus, parmi lesquelles le virus variolique (Li et al., 2007). Elle a été également appliquée à l'analyse de 45 virus varioliques provenant des CDC et de 21 de ces virus provenant du SRC VB VECTOR (Babkina et al. 2004 a, b ; Li et al., 2007) choisis en fonction de leurs différentes origines géographiques et années d'isolement. On a utilisé 20 paires d'amorces consensus pour produire 20 amplicons chevauchants couvrant 99,9 % du génome du virus variolique. Un dendrogramme composite de tous les profils RFLP des amplicons a permis de différencier les souches de virus de la variole majeure et celles de virus de la variole mineure, et on a observé que les souches étaient généralement regroupées en fonction de leur origine géographique, de leurs antécédents épidémiologiques ou des deux à la fois. Les avancées permises par les différentes techniques de RFLP sont impressionnantes, mais le séquençage de l'ADN progresse à un rythme tel qu'il pourrait en remettre en question l'utilité dans un proche avenir.

2.5.5 PCR en temps réel

Les techniques classiques de PCR font désormais place à la PCR en temps réel. Contrairement à la PCR classique, la PCR en temps réel combine l'amplification et la détection de l'ADN cible dans un même réacteur, ce qui dispense des longues opérations à effectuer après la PCR et réduit le risque de contamination croisée. En outre, la PCR en temps réel fournit des données quantitatives. La mise au point récente d'appareils à PCR

portables et de réactifs lyophilisés (Aitichou et al., 2008) ouvre des perspectives passionnantes, à savoir qu'il devrait être possible, en cas de flambée, de poser rapidement un diagnostic (en moins de deux heures, par exemple) sur le terrain.

Les nombreux avantages de la PCR en temps réel l'ont amenée à faire son apparition dans le domaine du diagnostic des orthopoxviroses où on peut l'utiliser soit pour identifier la variole à la fois rapidement et sans ambiguïté, soit pour distinguer la variole des autres maladies éruptives. Cela étant, le criblage de vastes collections de souches d'orthopoxvirus est essentiel pour prouver l'utilité des tests élaborés sur la base de ces techniques et établir un bilan des résultats. D'une façon générale et quel que soit le test pratiqué, on échantillonne moins de 0,1 % du génome pour obtenir un résultat. Un auteur a indiqué que des mésappariements au niveau des sondes lui ont permis de distinguer le virus variolique d'autres orthopoxvirus en analysant la courbe de fusion (Espy et al., 2002), mais, avec l'adjonction de nouvelles séquences d'orthopoxvirus dans la GenBank, les sondes révèlent une identité entre le virus de la variole du chameau et certaines souches de virus de la variole bovine, ce qui signifie qu'il ne serait pas possible d'identifier le virus variolique avec certitude. Il importera donc, à mesure que l'on obtiendra des informations complémentaires sur les virus apparentés, de réexaminer périodiquement les amorces et les sondes de PCR – *in silico*, sinon par des tests pratiques en laboratoire – afin d'évaluer leur sensibilité et leur spécificité effectives.

Un test de criblage pour l'identification de l'ADN du virus variolique au moyen de la plateforme de PCR en temps réel LightCycler a été mis au point et élaboré, conformément aux bonnes pratiques de fabrication, sous la forme d'un nécessaire de diagnostic, avec des réactifs normalisés (Olson et al., 2004). En se fondant sur un seul mésappariement nucléotidique, entraînant une substitution unique d'acide aminé sur un total de 64 souches de virus variolique, on a élaboré une paire de sondes d'hybridation avec une sonde de révélation spécifique qui permet de différencier le virus variolique des autres orthopoxvirus par analyse de la courbe de fusion. On a fait la démonstration de l'applicabilité de cette méthode en amplifiant 180 souches appartenant à diverses espèces d'orthopoxvirus (virus variolique, virus de l'orthopoxvirose simienne, virus de la vaccine, virus de la variole du chameau et virus de l'ectromélie); il a été constaté qu'avec le virus variolique, la température de fusion était sensiblement différente de celle observée avec les autres souches d'orthopoxvirus. Sur des échantillons prélevés sur des donneurs et contenant des quantités déterminées de virus (Schmidt et al., 2005), un test présentant une limite de détection de 11 copies d'ADN par réaction permet de détecter dans de bonnes conditions de fiabilité la présence d'ADN orthopoxviral dans ces échantillons virémiques. Grâce à la sensibilité de ce test, la détection précoce d'une virémie variolique chez des donneurs permettrait probablement de prévenir la dispersion d'agents viraux par transfusion sanguine à la suite d'un acte de bioterrorisme.

Il existe un autre test très sensible et très spécifique pour la détection rapide de l'ADN du virus variolique, qui utilise les plates-formes SmartCycler et LightCycler (Kulesh et al., 2004). Ce test est fondé sur la chimie « TaqMan », le gène de l'hémagglutinine orthopoxvirale étant utilisé comme séquence cible. Ce test a été évalué dans une étude en aveugle portant sur 322 échantillons codés qui comportaient l'ADN génomique de 48 isollements différents de virus variolique et 25 souches différentes autres que le virus variolique. Une autre méthode (Nitsche, Ellerbrok & Pauli, 2003) consiste à détecter simultanément les régions génomiques correspondant au genre *Orthopoxvirus* et celles qui sont spécifiques de l'espèce *variola*, ce qui pourrait être un avantage pour l'analyse des mélanges de virus comportant des virus varioliques. Dans ce test, c'est avec le virus variolique qu'on observe la température de fusion la plus élevée, cette température étant plus basse pour tout autre variant. D'autres tests fondés sur la PCR en temps réel ont été décrits ou sont encore en cours de mise au point dans divers laboratoires internationaux. On notera qu'il peut y avoir une inhibition de la PCR susceptible de conduire à des faux négatifs, mais on peut y obvier en utilisant des témoins internes appropriés. On pourra se reporter au Tableau 2.1 qui récapitule les tests de

détection du virus variolique fondés sur la PCR en temps réel récemment publiés avec les modalités de leur validation.

Il va sans dire que tout résultat d'un test PCR positif pour le virus variolique doit être confirmé par amplification d'autres parties du génome. La pratique de tests multiples portant sur diverses portions du génome, en plus des tests de recherche et d'identification des virus non axés sur l'ADN, renforcera la confiance dans le diagnostic de la variole au laboratoire. C'est particulièrement le cas aujourd'hui, l'absence de maladie naturelle faisant nécessairement tendre la valeur prédictive positive vers zéro.

Tableau 2.1 Tests basés sur la PCR en temps réel pour la détection du virus variolique

Référence	Gène cible (nomenclature des gènes du VACV-Copenhague)	Méthode	Validation avec l'ADN génomique du VARV	Observations
Espy et al., 2002	HA/A56R	LightCycler avec sondes d'hybridation ; l'analyse de la courbe de fusion permet de distinguer le VARV des autres OPV	Non Validation à l'aide de fragments clonés d'ADN du VARV	Plusieurs souches de CPXV et de CMLV présentent des températures de fusion identiques à celle du VARV
Ibrahim et al., 2003	HA/A56R	TaqMan, clivage de la sonde spécifique du VARV	Oui	—
Panning et al., 2003	HA/A56R	LightCycler avec sondes d'hybridation ; l'analyse de la courbe de fusion permet de distinguer le VARV des autres OPV	Non On a utilisé un segment d'ADN construit artificiellement	Plusieurs souches de CPXV présentent des températures de fusion identiques à celle du VARV
Nitsche, Ellerbrok & Pauli, 2004	Test 1 : Rpo18 Test 2 : VETF Test 3 : A13L (VARV) Test 4 : A13L (nVAR-OPX)	LightCycler avec sondes d'hybridation ; l'analyse de la courbe de fusion permet de distinguer le VARV des autres OPV	Oui Toutefois, les données présentées indiquent l'utilisation de fragments de VARV synthétisés artificiellement	—
Kulesh et al., 2004	Test 1 : B10R Test 2 : B9R Test 3 : HA/A56R	TaqMan, sondes spécifiques du VARV	Oui	Tests 1 et 2 : quelques souches de CPXV sont amplifiées Test 3 : l'acide nucléique cible est le même que celui qui est indiqué dans Ibrahim et al. (2003), mais avec une sonde un peu plus courte
Olson et al., 2004	14kD/A27L	LightCycler avec sondes d'hybridation ; l'analyse de la courbe de fusion permet de distinguer le VARV des autres OPV	Oui	Le test est disponible dans le commerce : RealArt Orthopoxvirus LC Kit (Qiagen, Hilden, Allemagne)
Carletti et al., 2005	CrmB	LightCycler avec sondes d'hybridation ; l'analyse de la courbe de fusion permet de distinguer entre les OPV et les herpétoviridés	Oui Toutefois, les données présentées indiquent l'utilisation de fragments synthétiques de VARV	Une identification spécifique doit être effectuée par une analyse des amplicons de la PCR au moyen d'enzymes de restriction
Fedele et al., 2006	CrmB	Deux sondes TaqMan ; une des sondes est spécifique du VARV	Non On a utilisé un segment d'ADN construit artificiellement	—
Scaramozzino et al., 2007	14kD/A27L	Deux sondes TaqMan ; une des sondes est spécifique du VARV	Oui	—
Aitichou et al., 2008	HA/A56R	Deux sondes TaqMan ; une des sondes est spécifique du VARV	Non Validation à l'aide de fragments clonés d'ADN du VARV	—

Tableau 2.1 Tests basés sur la PCR en temps réel pour la détection du virus variolique (*suite*)

Référence	Gène cible (nomenclature des gènes du VACV-Copenhague)	Méthode	Validation avec l'ADN génomique du VARV	Observations
Putkuri et al., 2009	HA/A56R	LightCycler avec sondes d'hybridation ; l'analyse de la courbe de fusion permet de distinguer le VARV du virus de la variole mineure	Non Validation à l'aide de fragments d'ADN du VARV obtenus artificiellement	—
Loveless et al., 2009	B9R/B10R	LightCycler avec sondes d'hybridation ; l'analyse de la courbe de fusion permet de distinguer le VARV des autres OPV	Non Validation à l'aide de fragments d'ADN du VARV obtenus artificiellement	—

Abréviations : CMLV, virus de la variole du chameau ; CPXV, virus de la variole bovine ; CrmB, modificateur B de la réponse cytokine ; HA, hémagglutinine ; nVar-OPX, orthopoxvirus non variolique ; PCR, amplification génique ; VACV, virus de la vaccine ; VARV, virus variolique ; VETF, facteur de transcription précoce du virus.

2.5.6 Analyse avec des micropuces à oligonucléotides

Un grand nombre des problèmes évoqués précédemment qui se posent lorsqu'on cherche à identifier l'espèce des virus peuvent être résolus par hybridation de l'ADN sur des micropuces à oligonucléotides, que l'on qualifie souvent aussi de microréseaux d'oligonucléotides. La première méthode consiste à hybrider un échantillon d'ADN amplifié marqué au moyen d'un fluorophore avec des sondes ADN oligonucléotidiques immobilisées sur une micropuce tridimensionnelle dans une matrice en gel de polyacrylamide (microréseaux de composés immobilisés dans un gel [MAGIchip]). Les sondes identifient les sites du gène du CrmB viral qui sont propres à l'espèce. On a analysé au total 59 échantillons d'ADN orthopoxviral représentant six espèces différentes et l'on n'a observé aucune discordance entre les résultats fournis par l'hybridation et ceux qui ont été obtenus par les méthodes classiques (Lapa et al., 2002).

Un autre type de micropuce à oligonucléotides a été mis au point en utilisant de simples lames de verre et la souche indienne du virus variolique. Le gène cible est le *G3R*, qui code pour une protéine qui se lie aux chimiokines (Laassri et al., 2003). Cette méthode d'analyse par micropuce permet de détecter simultanément et de différencier quatre espèces d'orthopoxvirus pathogènes pour l'homme et de les distinguer du virus varicello-zonateux. Les auteurs ont analysé 49 échantillons de nature connue ou dissimulée d'ADN orthopoxviral, représentant différentes espèces d'orthopoxvirus et deux souches de virus varicello-zonateux. La micropuce à oligonucléotides a permis une identification correcte et fiable de tous les échantillons.

Pour assurer la robustesse et la redondance du test, la micropuce contient plusieurs sondes oligonucléotidiques uniques spécifiques de chaque espèce virale. Cette nouvelle technique ne prend que trois heures à exécuter et on peut l'utiliser en parallèle pour analyser des échantillons multiples. L'analyse simultanée de gènes multiples peut encore accroître la fiabilité de ce test.

Il y a encore une autre méthode utilisant une micropuce qui permet la détection et l'identification simultanées de six espèces d'orthopoxvirus (VARV, MPVX, CPXV, CMLV, VACV et ECTV). Cette méthode permet aussi de différencier les différentes espèces d'orthopoxvirus du virus varicello-zonateux ainsi que des virus herpétiques HSV-1 et HSV-2 (Ryabinin et al., 2006). On a utilisé les séquences des gènes *B29R* et *B19R* de la souche Copenhague de virus de la vaccine afin d'identifier les gènes correspondant chez différentes souches d'orthopoxvirus. On a ensuite fait usage de celles-ci pour élaborer les sondes

oligonucléotidiques spécifiques d'espèce de la micropuce. Le *B29R*, qui code pour une protéine liant les chimiokines CC, a été identifié chez 86 espèces d'orthopoxvirus. Le *B19R*, qui code pour une protéine liant l'interféron de type I, a été identifié chez 72 espèces d'orthopoxvirus. La micropuce contenait également plusieurs oligosondes destinées à l'identification du virus varicello-zonateux, ainsi que des virus herpétiques HSV-1 et HSV-2.

2.5.7 Séquençage

Le séquençage des divers amplicons PCR à des fins diagnostiques permet, par comparaison avec les banques de données correspondantes, d'attribuer un échantillon à des espèces virales apparentées connues. Les séquences du gène de l'hémagglutinine de plus de 200 orthopoxvirus sont disponibles et se sont révélées utiles pour les études phylogénétiques. Ces études confirment la notion actuelle d'espèce établie qui, historiquement, avait été proposée sur la base des différents phénotypes de chaque espèce d'orthopoxvirus.

Au total, 45 isollements de virus varioliques obtenus entre 1940 et 1977 dans diverses conditions épidémiologiques ont été séquencés (Esposito et al., 2006). Le génome est constitué d'ADN linéaire comportant environ 186 paires de kilobases, fermé aux extrémités par des liaisons covalentes. Vu la faible diversité des séquences, il y a probablement très peu de différence dans la teneur des isollements en gènes fonctionnels. Cela rend d'autant plus probable l'aptitude des méthodes de détection basées sur la séquence génomique à identifier efficacement une souche réémergente de virus variolique. Par ailleurs, cette faible diversité des séquences est rassurante du point de vue de la défense biologique car elle indique qu'en surveillant une ou plusieurs sources de flambées infectieuses, la probabilité de reconnaître la présence de virus varioliques est élevée. La possibilité de repérer la présence du virus pourrait avoir, en tant que telle, un effet dissuasif sur l'utilisation délibérée de cet agent. Outre les méthodes précitées, on a mis au point, pour l'identification des agents pathogènes, et notamment le virus variolique, un test à code-barres biologique fondé sur les technologies de séquençage. Ce test a été évalué sur un fragment synthétique de virus variolique d'une longueur correspondant à 30 nucléotides (He et al., 2008).

On peut craindre, sans nul doute, que les biotechnologies permettent de construire de dangereux agents pathogènes en utilisant le matériel génétique de micro-organismes présents dans la nature. La comparaison des séquences montre que le virus de la variole du chameau et le taterapoxvirus sont les orthopoxvirus les plus proches du virus variolique, et il suffirait de quelques milliers de mutations pour convertir leur ADN en ADN variolique (Sanchez-Seco et al., 2006).

Les séquences génomiques des poxvirus sont accessibles sur Internet.⁷ La totalité des huit genres de la sous-famille des *Chordopoxvirinae* est représentée, avec 49 séquences de virus varioliques.

Il est certain que les progrès réalisés dans les techniques de séquençage en feront de précieux outils de police scientifique si la variole venait à réapparaître, car le séquençage est une manière d'identifier clairement une souche virale. L'interprétation des résultats de ces analyses de police scientifique basées sur l'identification des séquences devra être replacée dans le contexte des mutations qui ont pu s'accumuler à l'occasion de l'utilisation de diverses techniques de propagation virale (par exemple multiplication sur l'animal, sur membrane chorioallantoïdienne ou en culture tissulaire).

⁷ <http://www.poxvirus.org>.

2.6 Tests de diagnostic basés sur les protéines

Un certain nombre de laboratoires évaluent diverses préparations anticorales en vue d'une utilisation pour la détection des orthopoxvirus par capture antigénique (Czerny, Meyer & Mahnel, 1989), mais les CDC ont développé de leur côté un anticorps monoclonal qui se révèle être spécifique du virus variolique. Il n'existe actuellement, pour la détection des orthopoxvirus, qu'un seul test de diagnostic de nature protéique fondé sur l'utilisation de sérums polyclonaux antiviral variolique. Le pouvoir de caractérisation de ce test est limité, mais il peut être intéressant de l'utiliser sur le terrain pour la détection des orthopoxvirus afin d'évaluer sa sensibilité et sa spécificité cliniques.

Les espèces du genre *Orthopoxvirus* sont les seules à produire un antigène HA détectable par des tests d'hémadsorption et d'hémagglutination à l'aide d'érythrocytes de poulet appropriés. Si le sérum d'un patient provoque l'inhibition de l'hémadsorption ou de l'hémagglutination, c'est le signe d'une infection par un orthopoxvirus. Ces tests, de même que les tests de diffusion en gel et de fixation du complément, étaient des éléments classiques des méthodes de diagnostic en usage antérieurement à l'éradication (c'est-à-dire avant les années 1970). Ces méthodes ne sont plus utilisées de façon systématique à l'heure actuelle, mais elles pourraient constituer des compléments intéressants à réévaluer.

2.7 Tests de diagnostic basés sur la sérologie

Lorsque l'on ne dispose pas d'échantillons de virus, la mise en évidence d'anticorps dirigés contre le virus au moyen du test de neutralisation ou d'autres méthodes peut constituer la seule possibilité de définir la cause de la maladie. Ce qui est souvent réclamé dans le cadre de la vigilance face au bioterrorisme, c'est un test permettant d'évaluer le degré de protection résiduelle résultant des vaccinations antérieures. Il n'existe cependant pas de test immunologique utilisable de manière systématique pour déterminer le degré de protection d'une personne contre une orthopoxvirose. Une telle protection nécessite l'action concertée de réponses immunitaires humorales et à médiation cellulaire. La présence d'anticorps neutralisants indique généralement que le sujet a guéri d'une infection, mais pas forcément qu'il bénéficie d'une protection prolongée contre une infection ultérieure.

Des anticorps neutralisants dirigés contre les virus de la variole humaine, de l'orthopoxvirose simienne, de la variole bovine ou de la vaccine peuvent être décelables dès les six premiers jours suivant une infection ou une vaccination. Le test de neutralisation basé sur l'utilisation de sérums d'animaux ou de sujets humains infectés est efficace de 50 à 95 %. On a pu déceler des anticorps neutralisants plus de 20 ans après une vaccination à l'aide du virus de la vaccine ou une infection naturelle par un autre orthopoxvirus humain (Putz et al., 2005). Dans le test de neutralisation, on considère habituellement que si le titre des anticorps sériques a quadruplé entre la phase aiguë et la phase de convalescence, on a affaire à une infection par un poxvirus. Plus récemment, on est parvenu à mieux caractériser les effets neutralisants des anticorps dirigés contre les deux formes infectieuses du virus. Ces deux formes infectieuses (la forme mature et la forme extracellulaire) ont des structures membranaires différentes et les protéines présentes à la surface de leur membrane (qui sont reconnues par le système immunitaire) sont également différentes. On a caractérisé les réponses neutralisantes à un certain nombre de protéines de la forme mature mais, autant qu'on sache, il n'y a qu'une seule protéine de la forme extracellulaire (B5) qui provoque une réponse anticorpale neutralisante.

Les méthodes sérologiques actuellement utilisées pour la recherche des anticorps portent notamment sur la détection des anticorps dirigés contre les orthopoxvirus humains. Il s'agit entre autres, du test de neutralisation, du test d'inhibition de l'hémagglutination, du test ELISA (test d'immunoabsorption avec couplage avec une enzyme) ou de l'immunotransfert (Western blot) (Putz et al., 2006). On a récemment décrit un test utilisant une immunoglobuline M (IgM) anti-orthopoxvirus qui pourrait permettre de mieux analyser les

flambées d'orthopoxviroses, souvent même de manière semi-rétrospective (Karem et al., 2005). Cette technique a l'avantage de mettre en évidence des infections ou des maladies récentes dues à un orthopoxvirus. Sa sensibilité et sa spécificité pour le diagnostic d'une orthopoxvirose récente (évaluées au cours de la flambée d'orthopoxvirose simienne qui a eu lieu aux États-Unis) sont de l'ordre de 95 % entre le 4^e et le 56^e jour suivant l'apparition de l'éruption. Moyennant une surveillance épidémiologique appropriée, ces tests devraient être utiles à l'évaluation de l'incidence de la maladie, mais les réactions croisées qui existent entre les anticorps dirigés contre les différentes espèces de chaque genre de poxvirus font que ces tests sérologiques ne peuvent pas être spécifiques d'une espèce virale donnée (Trojan et al., 2007). Il existe d'autres tests immunoenzymatiques basés sur des cultures tissulaires, des tests de réduction des microplages, des analyses utilisant la « cellomique » ou la cytométrie en flux (FACS) pour l'évaluation de la réponse sérologique neutralisante au virus (Eyal et al., 2005 ; Earl, Americo & Moss, 2003 ; Borges et al., 2008 ; Johnson et al., 2008).

Bien que les réponses immunitaires à médiation cellulaire jouent un rôle important dans les infections à poxvirus et qu'elles soient jugées déterminantes pour l'immunité à long terme, la mesure systématique de la réponse cellulaire T n'est actuellement ni fiable, ni reproductible. On a récemment mis au point une PCR en temps réel qui permet d'évaluer la réponse T CD8+ après vaccination par le virus de la vaccine ; elle pourrait constituer un moyen supplémentaire d'évaluation de l'infection variolique. Pour l'instant, toutefois, ce test n'est pas spécifique – même pas pour les orthopoxvirus - car il mesure simplement la réponse en interféron gamma.

2.8 Quelques réflexions en guise de synthèse

Si le nombre de tests de diagnostic basés sur l'acide nucléique viral pour l'identification des orthopoxvirus, y compris le virus variolique, s'est remarquablement accru, il n'en va pas de même des tests fondés sur l'immunologie, les protéines virales ou les virions entiers dont l'expansion est restée très limitée. Tous les tests mis au point à ce jour sont de nature heuristique ; aucun d'entre eux n'a encore été l'objet d'un examen complet à des fins réglementaires ou soumis à une procédure d'autorisation. On s'interroge actuellement sur le point de savoir dans quelle mesure il pourrait être nécessaire de disposer de virus vivants en vue de soumettre ces tests aux examens prescrits par la réglementation. Il existe bien dans le commerce un test basé sur l'ADN viral, mais c'est un test à vocation purement heuristique qui n'a pas été mis au point en vue du diagnostic. Il existe également dans le commerce un nécessaire qui permet l'identification des espèces du genre *Orthopoxvirus* par capture antigénique, mais lui aussi n'a été développé qu'à des fins de recherche. Au nombre des outils de recherche dont on dispose actuellement figurent les réactions PCR classiques ainsi que les tests d'identification des différentes espèces d'orthopoxvirus reposant sur le séquençage ou le polymorphisme de longueur des fragments de restriction. Tous les tests sérologiques destinés à évaluer les réponses immunitaires humores (IgG, IgM, neutralisation, etc.) sont à caractère heuristique et les réactifs nécessaires peuvent ne pas être disponibles partout. Il existe un nombre déterminé de centres collaborateurs de l'OMS pour les poxvirus et la variole et d'autres laboratoires spécialisés (appartenant à des universités ou au secteur public) qui pourraient disposer des divers moyens et compétences nécessaires à l'identification des poxvirus et au diagnostic de la variole.

Il est conseillé de procéder à un examen comparatif rigoureux des méthodes utilisées pour le développement des tests. Ceux-ci doivent également être examinés avant d'acquiescer le statut de tests de diagnostic clinique. Il va falloir disposer d'ADN provenant du virus variolique pour évaluer la sensibilité et la spécificité des tests basés sur l'acide nucléique viral, notamment à mesure que les plates-formes actuelles de diagnostic vont tomber en désuétude. Il faut déterminer quel est le matériel biologique (par exemple le génome intégral, les amplicons, les plasmides) qui est le mieux adapté à cette fin. L'examen et la mise au point des tests de diagnostic clinique vont nécessiter des études sur des virus infectieux pour

que l'on puisse déterminer quelles sont les meilleures techniques de préparation et d'extraction (notamment dans le cas des tests par capture antigénique et des tests utilisant l'acide nucléique viral) ; certaines d'entre elles pourraient être effectuées avec d'autres orthopoxvirus infectieux.

Abréviations

ADN	acide désoxyribonucléique
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CMLV	virus de la variole du chameau
CPXV	virus de la variole bovine
CrmB	modificateur B de la réponse cytokine
ECTV	virus de l'ectromélie
HA	hémagglutinine
HSV	virus de l'herpès
MPVX	virus de l'orthopoxvirose simienne
OMS	Organisation mondiale de la Santé
OPV	orthopoxvirus
PCR	amplification génique
RFLP	polymorphisme de longueur des fragments de restriction
SRC VB VECTOR	Centre de Recherche d'État en Virologie et Biotechnologie VECTOR
VACV	virus de la vaccine

Références bibliographiques

- Aitichou M et al. (2008). Dual-probe real-time PCR assay for detection of variola or other orthopoxviruses with dried reagents. *Journal of Virological Methods*, 153: 190–195.
- Babkina IN et al. (2004a). [Comparative restriction enzyme analysis of the genome in variola virus strains from the Russian collection]. *Molekuliarnaia biologii*, 38: 429–436.
- Babkina IN et al. (2004b). Phylogenetic comparison of the genomes of different strains of variola virus. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 398: 316–319.
- Borges MB et al. (2008). Accuracy and repeatability of a micro plaque reduction neutralization test for vaccinia antibodies. *Biologicals*, 36: 105–110.
- Carletti F et al. (2005). Rapid, differential diagnosis of orthopox- and herpesviruses based upon real-time PCR product melting temperature and restriction enzyme analysis of amplicons. *Journal of Virological Methods*, 129: 97–100.
- Czerny CP, Meyer H, Mahnel H (1989). Establishment of an ELISA for the detection of orthopox viruses based on neutralizing monoclonal and polyclonal antibodies. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B*. 36: 537–546.
- Damon IK, Esposito JJ (2003). Poxviruses that infect humans. In: Murray PR, EJ Baron, JH Jorgensen, MA Pfaller, MH Tenover, MH Tenover, eds. *Manual of clinical microbiology*, 8th ed. ASM Press, Washington, DC, 1583–1591.
- Earl PL, Americo JL, Moss B (2003). Development and use of a vaccinia virus neutralization assay based on flow cytometric detection of green fluorescent protein. *Journal of Virology*, 77: 10684–10688.
- Esposito JJ, Knight JC (1985). Orthopoxvirus DNA : a comparison of restriction profiles and maps. *Virology*, 143: 230–251.
- Esposito JJ et al. (2006). Genome sequence diversity and clues to the evolution of variola (smallpox) virus. *Science*, 313: 807–812.
- Espy MJ et al. (2002). Detection of smallpox virus DNA by LightCycler PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 40: 1985–1988.
- Eyal O et al. (2005). Development of a tissue-culture-based enzyme-immunoassay method for the quantitation of anti-vaccinia-neutralizing antibodies in human sera. *Journal of Virological Methods*, 130: 15–21.
- Fedele CG et al. (2006). Use of internally controlled real-time genome amplification for detection of variola virus and other orthopoxviruses infecting humans. *Journal of Clinical Microbiology*, 44: 4464–4470.
- Hazelton PR, Gelderblom HR (2003). Electron microscopy for rapid diagnosis of infectious agents in emergent situations. *Emerging Infectious Diseases*, 9: 294–303.
- He M et al. (2008). Rapid bio-barcode assay for multiplex DNA detection based on capillary DNA Analyzer. *Journal of Virological Methods*, 151: 126–131.

- Henderson DA et al. (1999). Smallpox as a biological weapon: medical and public health management. Working Group on Civilian Biodefense. *Journal of the American Medical Association*, 281: 2127–2137.
- Ibrahim MS et al. (2003). Real-time PCR assay to detect smallpox virus. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 3835–3839.
- Johnson MC et al. (2008). A rapid, high-throughput vaccinia virus neutralization assay for testing smallpox vaccine efficacy based on detection of green fluorescent protein. *Journal of Virological Methods*, 150: 14–20.
- Karem KL et al. (2005). Characterization of acute-phase humoral immunity to monkeypox: use of immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assay for detection of monkeypox infection during the 2003 North American outbreak. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 12: 867–872.
- Kulesh DA et al. (2004). Smallpox and pan-orthopox virus detection by real-time 3'-minor groove binder TaqMan assays on the roche LightCycler and the Cepheid smart Cycler platforms. *Journal of Clinical Microbiology*, 42 :601–609.
- Laassri M et al. (2003). Detection and discrimination of orthopoxviruses using microarrays of immobilized oligonucleotides. *Journal of Virological Methods*, 112: 67–78.
- Lapa S et al. (2002). Species-level identification of orthopoxviruses with an oligonucleotide microchip. *Journal of Clinical Microbiology*, 40: 753–757.
- Li Y et al. (2007). Orthopoxvirus pan-genomic DNA assay. *Journal of Virological Methods*, 141: 154–165.
- Loparev VN et al. (2001). Detection and differentiation of old world orthopoxviruses: restriction fragment length polymorphism of the crmB gene region. *Journal of Clinical Microbiology*, 39: 94–100.
- Loveless BM et al. (2009). Differentiation of Variola major and Variola minor variants by MGB-Eclipse probe melt curves and genotyping analysis. *Molecular and Cellular Probes*, 23: 166–170.
- Mackett M, Archard LC (1979). Conservation and variation in orthopoxvirus genome structure. *The Journal of General Virology*, 45 :683–701.
- Meyer H, Ropp SL, Esposito JJ (1997). Gene for A-type inclusion body protein is useful for a polymerase chain reaction assay to differentiate orthopoxviruses. *Journal of Virological Methods*, 64: 217–221.
- Meyer H et al. (1999). Characterization of orthopoxviruses isolated from man and animals in Germany. *Archives of Virology*, 144: 491–501.
- Nitsche A, Ellerbrok H, Pauli G (2004). Detection of orthopoxvirus DNA by real-time PCR and identification of variola virus DNA by melting analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 42: 1207–1213.
- Olson VA et al. (2004). Real-time PCR system for detection of orthopoxviruses and simultaneous identification of smallpox virus. *Journal of Clinical Microbiology*, 42: 1940–1946.

- OMS (Organisation mondiale de la Santé) (2008a). Guide pratique sur l'application du règlement relatif au transport des matières infectieuses 2009-2010. Genève, Organisation mondiale de la Santé (WHO/HSE/EPR/2008.10).
- OMS (Organisation mondiale de la Santé) (2008b). Recommandations de l'OMS relatives à la distribution, à la manipulation et à la synthèse de l'ADN du virus variolique, mai 2008. *Relevé épidémiologique hebdomadaire*, 83: 393-395.
- Panning M et al. (2004). Rapid detection and differentiation of human pathogenic orthopox viruses by a fluorescence resonance energy transfer real-time PCR assay. *Clinical Chemistry*, 50: 702–708.
- Putkuri N et al. (2009). Detection of human orthopoxvirus infections and differentiation of smallpox virus with real-time PCR. *Journal of Medical Virology*, 81: 146–152.
- Putz MM et al. (2005). Prevalence of antibodies to vaccinia virus after smallpox vaccination in Italy. *The Journal of General Virology*, 86: 2955–2960.
- Putz MM et al. (2006). Quantification of antibody responses against multiple antigens of the two infectious forms of vaccinia virus provides a benchmark for smallpox vaccination. *Nature Medicine*, 12: 1310–1315.
- Ropp SL et al. (1995). PCR strategy for identification and differentiation of small pox and other orthopoxviruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 33: 2069–2076.
- Ryabinin VA et al. (2006). Microarray assay for detection and discrimination of orthopoxvirus species. *Journal of Medical Virology*, 78: 1325–1340.
- Sanchez-Seco MP et al. (2006). Detection and identification of orthopoxviruses using a generic nested PCR followed by sequencing. *British Journal of Biomedical Science*, 63: 79–85.
- Scaramozzino N et al. (2007). Real-time PCR to identify variola virus or other human pathogenic orthopox viruses. *Clinical Chemistry*, 53: 606–613.
- Schmidt M et al. (2005). Nucleic acid test screening of blood donors for orthopoxviruses can potentially prevent dispersion of viral agents in case of bioterrorism. *Transfusion*, 45: 399–403.
- Shchelkunov SN, GavriloVA EV, Babkin IV (2005). Multiplex PCR detection and species differentiation of orthopoxviruses pathogenic to humans. *Molecular and Cellular Probes*, 19: 1–8.
- Shchelkunov SN, Marennikova SS, Moyer RW (2005). *Orthopoxviruses pathogenic for humans*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- Trojan A et al. (2007). Real time PCR for the assessment of CD8+ T cellular immune response after prophylactic vaccinia vaccination. *Journal of Clinical Virology*, 40: 80–83.

3. Génomique de la variole

Grant McFadden,¹ David Evans,² Sergei Shchelkunov³ et Inger Damon⁴

¹ Department of Molecular Genetics and Microbiology, College of Medicine, University of Florida, Gainesville, États-Unis d'Amérique

² School of Clinical and Laboratory Sciences, Faculty of Medicine and Dentistry, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada

³ Département de Recherche en Génomique, Centre de Recherche d'État en Virologie et Biotechnologie VECTOR, Koltsovo, région de Novossibirsk, Fédération de Russie

⁴ Poxvirus and Rabies Branch, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, États-Unis d'Amérique

Les observations et les conclusions qui figurent dans le présent rapport n'engagent que leurs auteurs et ne représentent pas nécessairement la position officielle des Centers for Disease Control and Prevention.

Résumé d'orientation

Importance pour la santé publique

Grâce aux nouvelles technologies, notre connaissance de la génomique du virus variolique a connu des améliorations de nature fondamentale. Elles ont ouvert de nouvelles voies pour la détection et l'identification du virus et permis de faire la lumière sur l'histoire évolutive des infections varioliques et les causes de leur gravité. Toutefois, s'agissant du contrôle de l'accès au matériel génétique du virus variolique, ces nouvelles technologies de la biologie de synthèse posent des problèmes qui n'avaient pas été prévus. Le présent chapitre donne un aperçu des dernières découvertes relatives à la génomique du virus variolique et explique comment les nouvelles technologies de synthèse du génome pourraient permettre de déjouer les stratégies mises en place pour confiner cet agent.

Bilan des progrès réalisés

La séquence complète de l'ADN (acide désoxyribonucléique) du génome de deux virus varioliques étroitement apparentés a été publiée pour la première fois au début des années 1990. Un programme renforcé de recherche sur la variole, qui a été approuvé par l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) et a débuté en 2000, a conduit à la publication d'informations quasiment complètes sur le génome de 48 isolements géographiquement distincts de virus variolique. Ces données peuvent être exploitées en vue d'avoir une meilleure connaissance de l'évolution du virus variolique, de mettre au point de meilleurs moyens de diagnostic et (parallèlement aux études biostructurales) d'obtenir des indications sur la sensibilité des cibles visées par les antiviraux. En travaillant sur des gènes clonés du virus variolique, les chercheurs ont acquis une connaissance plus approfondie des interactions et de l'activité des diverses protéines virales qui leur permet de mieux comprendre comment le virus provoque une maladie chez l'homme.

Ce chapitre récapitule également les informations dont on dispose au sujet du génome viral et montre de quelle manière elles ont été exploitées pour étudier les liens qui existent entre le virus variolique et d'autres poxvirus animaux, suivre l'évolution du virus au cours des épidémies de maladie humaine et développer des tests de diagnostic. Les utilisations futures de ce matériel génomique sont également discutées à la lumière des nouvelles technologies de synthèse de l'ADN.

Résultats et implications

Les données génomiques qui ont été rendues publiques sont utilisées par de nombreux scientifiques internationaux pour élaborer des tests de diagnostic présentant une sensibilité élevée. Les nouvelles informations concernant les relations entre le virus variolique et les autres orthopoxvirus sont également importantes pour se faire une idée de l'intérêt et des faiblesses des modèles animaux utilisés dans la recherche sur la variole humaine. Grâce au développement remarquable qu'ont connu les technologies de synthèse, de séquençage et de clonage de l'ADN, il est désormais techniquement possible de synthétiser *ab initio* le génome du virus variolique dans son intégralité, uniquement à partir des séquences rendues publiques, et de reconstituer des virus infectieux à l'aide des techniques existantes de la biologie moléculaire.

Il faut que les futures stratégies de défense biologique soient élaborées en réfléchissant aux meilleures manières de réguler les technologies actuelles de la biologie moléculaire.

3.1 Le génome du virus variolique

La séquence complète de l'ADN (acide désoxyribonucléique) du génome de deux virus varioliques étroitement apparentés a été publiée au début des années 1990. En 2006, on a effectué une étude comparative systématique portant sur la séquence génomique intégrale d'un certain nombre d'isollements géographiquement distincts de virus variolique, obtenus à travers le monde (Esposito et al., 2006). Les caractéristiques générales du génome générique de ce virus sont indiquées sur la Figure 3.1 et l'analyse des relations cladiques entre les isollements séquencés est illustrée par la Figure 3.2. Sur le plan technique, il n'y a qu'une seule souche de virus variolique (Bangladesh, 1975) dont le génome ait été intégralement séquencé ; c'est la seule souche de virus variolique dont on ait officiellement publié les séquences terminales des extrémités du génome (Massung et al., 1994). Les séquences terminales, qui ont une configuration en épingle à cheveux, sont très proches des séquences orthologues en épingle à cheveux du virus de la vaccine. Lorsque nous parlons des « séquences génomiques complètes du virus variolique », il s'agit de séquences représentant l'intégralité du génome à part quelques différences d'une souche à l'autre qui pourraient être liées aux épingles à cheveux terminales et à la séquence adjacente. Bien qu'on en ait jamais donné la preuve formelle, on suppose que la séquence terminale en épingle à cheveux est soit identique, soit intégralement substituable, aux séquences terminales des autres souches de virus variolique.

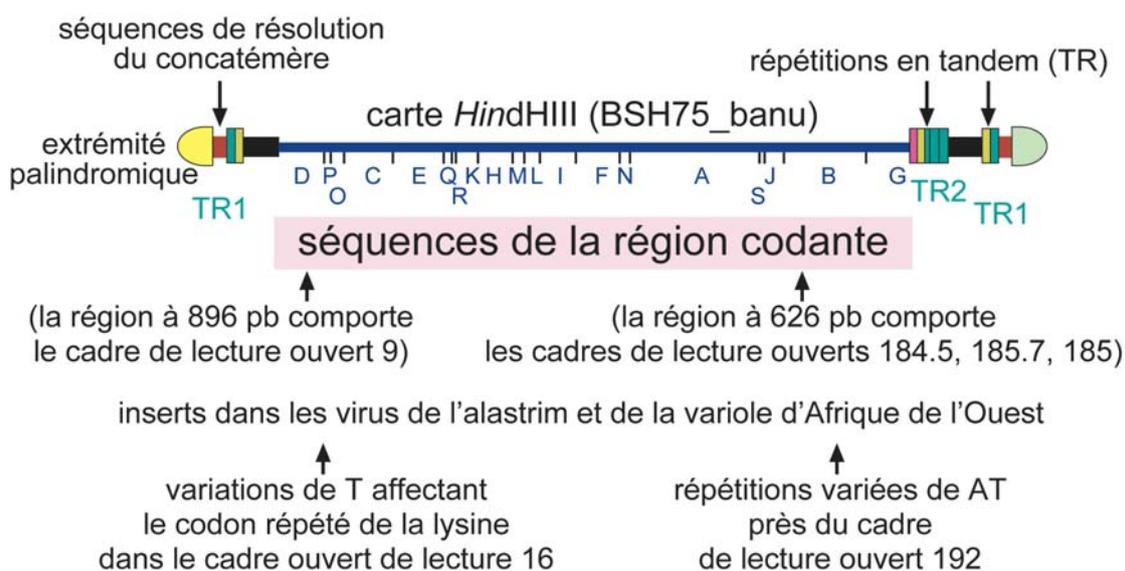


Figure 3.1 Le génome du virus de la variole

pb, paire de bases

Source : Esposito JJ et al. (2006). Reproduction autorisée.

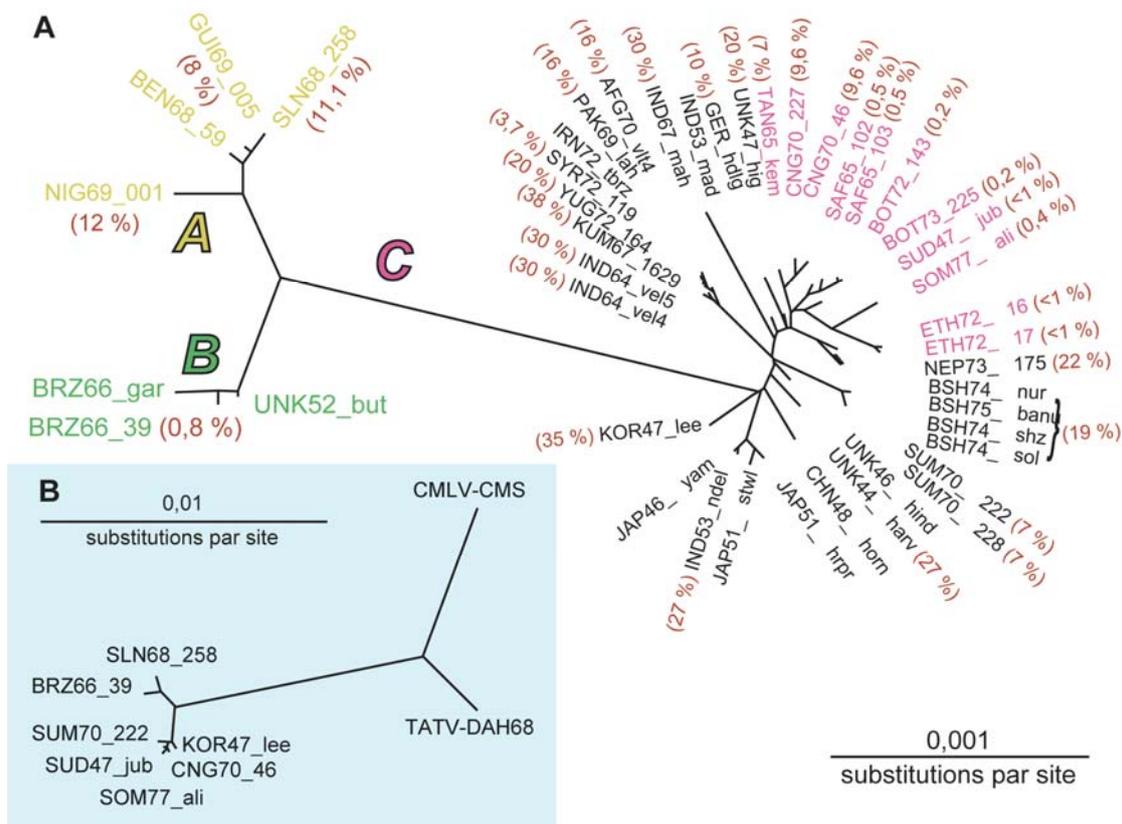


Figure 3.2 Relations cladiques entre les isolements séquencés de virus variolique

Relations phylogénétiques entre les isolements séquencés du virus variolique. (A) Un phylogramme de consensus non raciné obtenu par alignement de 65 kilopaires de bases appartenant aux séquences du milieu de la région codante de 45 virus varioliques révèle trois clades de haut niveau qui représentent des agrégats d'isolements originaires d'Afrique de l'Ouest (clade A, orange), d'Amérique du Sud (clade B, vert) et d'Asie (clade C, amarante). Le clade asiatique contient un sous-groupe de variants africains non originaires d'Afrique de l'Ouest (violet) qui divergent en types viraux dont les taux de létalité sont faibles ou moyens. Les taux de létalité associés à quelques isolements sont indiqués en rouge et certains d'entre eux sont analysés dans le texte de l'article. (B) Un arbre de consensus raciné qui utilise les séquences du milieu de la région codante du virus de la variole du chameau (CMLV)-CMS70 et du virus du taterapox (TATV)-DAH68 alignées avec un sous-ensemble de virus varioliques représentatifs de l'arbre en A. Source : Esposito JJ et al. (2006). Reproduction autorisée.

La banque de données rassemblant les séquences génomiques du virus variolique s'est rapidement enrichie au cours de la dernière décennie grâce aux progrès continus accomplis par les technologies de séquençage de l'ADN et par la bioinformatique. L'une des deux premières séquences du génome viral à avoir été publiées a été déterminée par la méthode chimique de Maxam et Gilbert (Shchelkunov, Blinov & Sandakhchiev, 1993a, b ; Shchelkunov et al., 1993), mais toutes les autres séquences l'ont été par la méthode de séquençage aléatoire automatique de Sanger (Massung et al., 1993, 1994) ou par des techniques d'extension d'amorce (Esposito et al., 2006). Les puces à ADN se sont également révélées des outils intéressants pour le reséquençage et l'identification rapides des souches de virus variolique (Sulaiman et al., 2007 ; Sulaiman, Sammons & Wohlhueter, 2008). Ces avancées technologiques ont considérablement amélioré l'exactitude et la rapidité du séquençage et permis d'en réduire spectaculairement le coût. Avec les technologies actuelles, on peut par exemple séquencer en quelques jours n'importe quel génome avec une redondance de lecture d'environ 25 fois pour un coût de moins de US \$1000.

Ces séquences génomiques nous donnent de nombreuses indications sur la génétique du virus variolique, sur ses relations avec les autres orthopoxvirus et sur ses interactions coévolutives avec son hôte humain (Gubser et al., 2004 ; Shchelkunov, Marennikova & Moyer, 2005). On les a également utilisées pour mettre au point des tests de diagnostic

permettant de distinguer le virus variolique des autres orthopoxvirus présents dans les échantillons biologiques (Li et al., 2007b ; Sulaiman et al., 2007 ; Sulaiman, Sammons & Wohlhueter, 2008). Grâce à ces séquences, ainsi qu'aux séquences géniques connues et à ce que l'on sait de la sensibilité des autres orthopoxvirus aux antiviraux, on est fondé à penser que toutes les souches de virus variolique pourraient être sensibles à des médicaments tels que le ST-246 ou le CMX001, un dérivé du cidofovir. Les progrès accomplis dans le domaine du diagnostic et des antiviraux sont évoqués dans le chapitre 6 du présent rapport.

Grâce au développement remarquable qu'ont connu les technologies de synthèse, de séquençage et de clonage de l'ADN, il est désormais techniquement possible de synthétiser *ab initio* le génome du virus variolique dans son intégralité, uniquement à partir des séquences rendues publiques, et de reconstituer des virus infectieux à l'aide des techniques classiques de la biologie moléculaire. Dans ces conditions, il pourrait ne plus être possible d'éliminer la menace d'une réémergence du virus variolique vivant en tant qu'entité biologique, même si l'on procède à la destruction des stocks de virus qui sont détenus par les centres collaborateurs de l'Organisation mondiale de la Santé situés aux États-Unis et en Fédération de Russie.

Les génomes de tous les isollements de virus variolique qui ont été séquencés jusqu'ici sont très proches les uns des autres, pour une part parce que la dérive génétique due à l'évolution est beaucoup plus lente chez les poxvirus que chez beaucoup d'autres virus (notamment les virus à ARN [acide ribonucléique] comme le virus de l'immunodéficience humaine et le virus de la grippe). Les génomes des virus varioliques qui ont été séquencés ont une longueur d'environ 185 kilobases et contiennent tous environ 200 cadres de lecture ouverts. Ces cadres de lecture ouverts expriment des protéines qui ressemblent plus ou moins à celles qu'expriment d'autres orthopoxvirus, comme le virus de la variole du chameau, le virus de la variole de la gerbille (taterapox), le virus de l'orthopoxvirose simienne, le virus de la variole bovine et le virus de la vaccine (que l'on a utilisé comme vaccin pour l'éradication de la variole). Comme chez tous les poxvirus, le génome viral est constitué d'ADN double brin, avec des extrémités en épingle à cheveux et des séquences terminales inversées répétées (TIR). Contrairement à la plupart des autres poxvirus, les séquences TIR du virus variolique ne codent pas pour des protéines virales, de sorte que tous les cadres de lecture ouverts du virus variolique sont présents sous la forme d'une seule copie. On pense que le rôle des extrémités en épingle à cheveux est strictement limité à la réplication du génome et consiste à assurer la synthèse complète de la totalité des séquences de l'ADN viral au cours du cycle de multiplication du virus. Il est donc vraisemblable que les extrémités en épingle à cheveux soient fonctionnellement interchangeables d'un poxvirus à l'autre.

Dans la région centrale du génome du virus variolique sont regroupés environ 90 gènes hautement conservés qui sont orthologues de gènes présents dans le génome d'autres chordopoxvirus (Gubser et al., 2004). On suppose que ces gènes conservés codent pour les éléments essentiels à la réplication des poxvirus, à l'expression des gènes et à la morphogénèse du virion. Les gènes qui codent pour certains aspects uniques de la biologie du virus variolique, comme la virulence, les déterminants anti-immunitaires et les marqueurs pathogénétiques, ont tendance à se regrouper davantage vers les extrémités du génome. C'est dans les régions du génome les plus proches des séquences TIR que l'on observe la plus grande variation dans les séquences des diverses souches de virus variolique, avec des différences dans le taux de létalité (Shchelkunov, Massung & Esposito et al., 1995 ; Massung et al., 1996 ; Shchelkunov et al., 2000 ; Esposito et al., 2006). Environ 90 % des gènes du virus variolique ont de clairs orthologues dans le génome d'autres poxvirus, encore que des versions tronquées du restant puissent se retrouver dans au moins un autre orthopoxvirus. Du point de vue génétique, les deux orthopoxvirus les plus proches du virus variolique, avec 98 % de nucléotides identiques sur les 110 kilobases centrales du génome, sont le virus de la variole du chameau et celui de la variole de la gerbille. La distance

généétique entre le virus variolique et l'orthopoxvirus simien, le virus de la variole bovine et celui de la vaccine est beaucoup plus grande (Shchelkunov et al., 2001 ; Gubser et al., 2004 ; Meyer et al., 2005 ; Shchelkunov, Marennikova & Moyer, 2005).

Parmi les 48 isollements de virus variolique qui ont été séquencés et enregistrés dans les bases de données publiques,⁸ certaines paires de génomes se différencient par des polymorphismes nucléotidiques simples (SNP) concernant jusqu'à 700 nucléotides et ces différences peuvent comporter jusqu'à 90 insertions/délétions (indels). Le spectre complet des variations génétiques du virus variolique – plus de 1700 SNP et 4800 indels – a été établi ; globalement, toutefois, les séquences se caractérisent surtout par leur grande similitude. La liste de ces isollements séquencés (dont l'un a été séquencé à deux reprises, avec un total de 49 entrées sur la base de données) figure à la fin du présent chapitre (Tableau 3.1).

Les isollements de virus variolique qu'il a été décidé de séquencer ont été choisis de manière à représenter un échantillon large et diversifié des souches archivées, tant sur le plan de l'origine géographique que des propriétés cliniques. Le séquençage des isollements de virus variolique qui restent encore dans les archives permettrait probablement de découvrir de nouvelles variations génétiques : environ 550 de ces isollements sont détenus aux États-Unis par les Centers for Disease Control and Prevention et en Fédération de Russie par le Centre de Recherche d'État en Virologie et Biotechnologie VECTOR. Ces informations complémentaires au sujet des variations affectant les séquences pourraient être intéressantes en vue d'études d'épidémiologie moléculaire ou de « police scientifique » plus pointues sur le virus. En revanche, il est peu probable que ces nouveaux séquençages puissent apporter quelque chose en ce qui concerne le développement de vaccins ou de tests de diagnostic. Si les séquences des protéines virales qui sont la cible des médicaments et des agents thérapeutiques en cours de mise au point sont plus diverses que celles qui figurent dans la base de données actuelle, le complément d'information apporté par le séquençage des virus encore archivés pourrait nous permettre de savoir si les stocks de virus non encore séquencés présentent des polymorphismes de pharmacorésistance. De toute façon, comme on s'est largement axé, pour développer des médicaments, sur des gènes viraux relativement bien conservés d'une souche à l'autre de virus variolique et d'autres orthopoxvirus, il est probable que ces compléments d'information sur les séquences n'auraient, en soi, qu'un modeste intérêt scientifique.

L'étude des protéines exprimées par les divers virus varioliques à partir des données fournies par le séquençage de l'ADN a permis de mieux en éclaircir la biologie (Dunlop et al., 2003). Par exemple, les protéines pour lesquelles codent plusieurs gènes viraux, et qui ont été exprimées ou synthétisées en laboratoire, interagissent avec des éléments spécifiques du système immunitaire humain, comme le complément, l'interleukine-18, l'interféron gamma, le facteur de nécrose tumorale, les chimiokines et diverses voies de signalisation cellulaire (Seregin et al., 1996 ; Rosengard et al., 2002 ; Esteban, Nuara & Buller, 2004 ; Kim et al., 2004 ; Alejo et al., 2006 ; Gileva et al., 2006 ; Liszewski et al., 2008 ; Yadav et al., 2008). Plus récemment, dans le but de se faire une idée de la manière dont nombre de protéines du virus variolique pourraient interagir physiquement avec l'ensemble des protéines humaines, des chercheurs ont utilisé le système du double hybride en levure pour procéder au criblage systématique, vis-à-vis du protéome humain complet, de toutes les protéines propres au virus variolique non présentes chez le virus de la vaccine. Cette étude a révélé l'existence de nombreuses interactions nouvelles entre les protéines humaines et celles du virus variolique, et notamment la présence chez le virus variolique d'une nouvelle famille de protéines capables d'inhiber une importante cascade de signalisation inflammatoire chez l'homme qui est médiée par le facteur nucléaire kappa B (Mohamed et al., 2009). Il est tout à fait probable qu'une étude plus poussée des protéines exprimées

⁸ <http://www.poxvirus.org> ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>.

par le virus variolique permettra de faire davantage la lumière sur les processus fondamentaux de signalisation innée de la réponse immunitaire dans les cellules humaines et conduira à la découverte d'autres interactions entre le virus et son hôte.

3.2 L'évolution de la variole

Tous les poxvirus continuent de diverger les uns par rapport aux autres selon des mécanismes génétiques comportant des mutations ponctuelles, des insertions, des délétions, divers types de recombinaisons ou encore la perte ou l'acquisition de gènes entiers (Smith, Chan & Howard, 1991 ; Shchelkunov & Totmenin, 1995 ; McLysaght, Baldi & Gaut, 2003 ; Gubser et al., 2004 ; Babkin & Shchelkunov, 2008). Les données de séquençage génomique dont on dispose montrent qu'il existe plusieurs groupes distincts de virus varioliques. Selon la méthode d'analyse utilisée, ces groupes peuvent être considérés soit comme trois clades distincts, soit comme deux clades majeurs, dont l'un contient deux sous-groupes (Esposito et al., 2006 ; Li et al., 2007). Dans le premier groupe figurent des isolements de variole majeure d'origine asiatique qui provoquent une forte mortalité et des isolements originaires d'Afrique (notamment d'Afrique orientale, centrale et australe) qui sont d'une létalité variable. Le deuxième groupe est formé de virus de la variole mineure (alastrim) originaires d'Amérique du Sud, avec des taux de létalité plus faibles. Les isolements très proches qui appartiennent au troisième groupe proviennent d'Afrique de l'Ouest et provoquent une maladie de gravité moyenne. Ces études de séquençage donnent un certain nombre d'indications importantes sur la propagation de la variole dans l'ensemble du monde et sur la façon dont la variole majeure et la variole mineure ont commencé à diverger l'une par rapport à l'autre jusqu'à leur éradication en 1977 à l'issue de la campagne d'éradication menée par l'OMS.

Selon la manière dont les données de séquençage sont corrélées avec les études de cas et les archives, on estime que le virus variolique a divergé à partir d'un poxvirus ancestral, probablement présent chez des rongeurs africains, il y a entre 16 000 et 68 000 ans (Li et al., 2007a). Les premiers cas cliniques ont été observés en Chine et peut-être en Inde. La maladie s'est ensuite propagée au bassin méditerranéen et à l'Europe, pour finalement faire son apparition dans le Nouveau-Monde au XVI^e siècle. Bien que les documents historiques ne permettent pas de dater avec exactitude les premières flambées de variole dans des populations humaines, une étude analytique de l'évolution du virus variolique a permis d'estimer à quelle période le virus variolique a émergé, en se fondant sur des cas dont les dates et les lieux étaient documentés (Babkin & Shchelkunov, 2006 ; Shchelkunov, 2009). Lors de cette étude, on a analysé la longue région centrale conservée du génome orthopoxviral (environ 102 kilobases), ainsi que huit gènes de l'ARN polymérase à sous-unités multiples provenant de divers genres de poxviridés. En se basant sur la date du passage de la variole de l'Afrique de l'Ouest en Amérique du Sud, date qui est connue (XVI^e-XVIII^e siècles), et sur les données faisant état de relations phylogénétiques étroites entre les isolements ouest-africains et sud-américains modernes du virus variolique, on a calculé que le taux moyen d'accumulation des mutations chez ces virus à ADN était de 10⁻⁶ substitutions nucléotidiques par site et par an. En supposant que ce taux ait été relativement constant au fil du temps, on peut considérer que les orthopoxvirus ont divergé d'un virus ancestral pour donner les genres actuellement connus il y a au moins 130 000 ans. Selon ce résultat, le virus variolique a commencé à évoluer de manière indépendante il y a 3400 (±800) ans, très probablement au moment où il est passé pour la première fois d'un rongeur inconnu à l'homme (Babkin & Shchelkunov, 2008).

On ignore encore quel est le virus ancestral à partir duquel les orthopoxvirus actuels ont évolué. Les meilleurs éléments d'appréciation dont on dispose donnent à penser que les souches existantes de virus de la variole bovine sont plus proches de ce virus ancestral dont dérivent probablement les orthopoxvirus actuels, car c'est le virus de la variole bovine qui contient le plus grand nombre de gènes variables, dont certains sont très proches des orthologues du virus variolique (Shchelkunov et al., 1998). Il est également intéressant de

constater que tous les autres génomes connus d'orthopoxvirus, y compris celui du virus variolique, contiennent un certain nombre de gènes qui, comparativement au génome plus important de la variole bovine, ont été fragmentés ou inactivés. On ignore si la première souche de virus variolique qui ait fait son apparition dans des populations humaines était un virus de la variole majeure ou de la variole mineure, mais il est clair que ces souches connaissaient un processus d'évolution divergente au moment où la variole a été éradiquée (Esposito et al., 2006 ; Li et al., 2007a).

Les poxvirus ont tendance à évoluer beaucoup plus lentement que nombre d'autres virus, probablement en raison de la grande fidélité de l'ADN polymérase poxvirale, l'enzyme qui a pour fonction de copier l'information génétique virale au cours du cycle de réplication. D'une façon générale, les virus à ARN évoluent plus rapidement, car la fréquence de leurs mutations est beaucoup plus élevée que celle des virus à ADN et des organismes eucaryotes et aussi du fait qu'ils sont dépourvus d'exonucléase réparatrice. Il est toutefois difficile de calculer la vitesse de dérive génétique du virus variolique au fil du temps et nous nous fions davantage aujourd'hui aux relations phylogénétiques tirées des similitudes entre les virus isolés au cours du XX^e siècle eu égard aux séquences des paires de bases de leurs acides nucléiques et à celles des acides aminés de leurs protéines. Nous comprenons encore mal comment le virus variolique a évolué pour devenir un agent pathogène spécifique de l'espèce humaine. Ses cousins génétiques les plus proches, à savoir le virus de la variole de la gerbille et celui de la variole du chameau, ont également une petite gamme d'hôtes, alors que des poxvirus dont le génome est le plus grand (comme le virus de la variole bovine) ont tendance, dans le milieu naturel, à présenter la gamme d'hôtes la plus large.

3.3 Technologies portant sur le génome des poxvirus

Les études comparatives portant sur le génome donnent des indications importantes sur les produits géniques encodés par les poxvirus qui pourraient être à l'origine de la virulence du virus variolique, mais elles ne peuvent à elles seules expliquer les causes de la variole. Des technologies plus récentes de manipulation génétique et de synthèse des gènes ont apporté des lumières sur les propriétés biologiques du virus variolique et sur les produits géniques qui sont codés par son génome. C'est ainsi que les petites protéines de régulation du complément du virus variolique et du virus vaccinal diffèrent de seulement 11 résidus d'acides aminés, différence suffisamment faible pour qu'il puisse y avoir conversion du gène du virus de la vaccine en son homologue du virus variolique par mutagenèse ponctuelle dirigée (Rosengard et al., 2002). Cependant, c'est là une méthode plus laborieuse que la synthèse chimique de ce gène, laquelle est accessible à tout laboratoire au prix d'une dépense modeste. L'un des avantages particuliers de la synthèse tient à ce que la séquence de l'ADN peut être modifiée comme on le souhaite. La modification la plus courante consiste à optimiser le choix des codons dans le gène modifié afin de rendre plus efficace l'expression des protéines recombinantes dans les systèmes d'expression habituels. Ces travaux ont eu une retombée inattendue, à savoir la création de clones d'ADN qui pourraient ne pas tomber sous le coup des réglementations nationales concernant la possession et la manipulation de l'ADN du virus variolique. Cela tient au fait que, même si ces gènes codent pour une protéine du virus variolique, l'ADN, lui, n'est rigoureusement – et sans doute aussi légalement parlant – plus de l'ADN variolique.

Le coût de la synthèse génique baisse rapidement par suite des améliorations qui ne cessent d'être apportées aux moyens d'assemblage de longues constructions exemptes d'erreurs (Czar et al., 2009). Selon certaines estimations, ce coût est en train d'être divisé par deux et la longueur des constructions géniques que l'on parvient à obtenir double tous les deux à trois ans. On a eu recours à la synthèse génique par exemple pour synthétiser *de novo* des virus poliomyélitiques infectieux et pour ressusciter la souche de virus grippal responsable de la pandémie de 1918 (Cello, Paul & Wimmer, 2002 ; Tumpey et al., 2005). La capacité de synthétiser n'importe quel gène sur commande peut faire craindre que toute personne possédant les compétences techniques nécessaires à la synthèse de l'ADN soit

capable de reconstruire un orthopoxvirus vivant en procédant de la même manière. Ce ne serait pas une tâche aussi aisée que pour le virus poliomyélique (qui ont pour génome un ARN monobrin à polarité positive), étant donné que l'ADN des poxvirus nus n'est pas infectieux et que le génome des orthopoxvirus est environ 25 fois plus grand ; toutefois, on dispose de toutes les techniques nécessaires à la synthèse du génome intact d'un orthopoxvirus et à son utilisation pour créer un virus vivant. En 2002, on a obtenu un virus vaccinal infectieux à partir d'un génome viral intégral cloné dans un chromosome bactérien artificiel (Domi & Moss, 2002). De plus, il a été possible d'assembler et d'activer des virus de la vaccine en utilisant des mélanges de fragments d'ADN transfectés dans des cellules qui avaient préalablement été infectées par un leporipoxvirus auxiliaire (Yao & Evans, 2003). Dans cette dernière étude, l'ADN utilisé était constitué d'un mélange de fragments obtenus au moyen de l'amplification génique ainsi que de fragments de restriction du virus de la vaccine. Cela étant, même si de telles manipulations se heurtent à un certain nombre de problèmes techniques (notamment des mutations accidentelles), il n'y a aucune raison de penser que l'on ne pourrait pas utiliser des fragments entièrement synthétiques pour faire renaître des virus varioliques vivants. On estime qu'à l'heure actuelle la synthèse de tous les clones nécessaires coûterait moins de US \$200 000 et ce coût pourrait encore se réduire dans l'avenir.

Pour créer un virus variolique ou un virus qui lui ressemble, la synthèse *de novo* n'est pas le seul moyen disponible. Bien que les recommandations actuelles de l'OMS interdisent les manipulations génétiques sur le virus variolique, il ne fait aucun doute que les nombreuses méthodes utilisées pour modifier génétiquement des poxvirus pourraient servir à modifier la virulence de n'importe lequel de ces virus, y compris le virus variolique. C'est ainsi par exemple que l'on peut facilement modifier le génome d'un poxvirus par recombinaison homologue et introduire sans difficulté des marqueurs de pharmacorésistance dans des souches normalement pharmacosensibles. De même, l'insertion de gènes immunorégulateurs appartenant à l'hôte pourrait modifier la virulence des poxvirus ou la sensibilité de l'infection à une vaccination antérieure. Les virus hybrides représentent également un danger potentiel et ils seraient beaucoup plus faciles à assembler qu'un virus variolique sauvage. On a montré, il y a près de 50 ans, que des orthopoxvirus recombinants étaient viables et qu'il était possible de produire un tel virus recombinant par co-infection de cellules associant le virus variolique et le virus de la variole du lapin (qui est une souche du virus vaccinal) (Bedson & Dumbell, 1964a) ou le virus de la variole bovine (Bedson & Dumbell, 1964b). On ignore si ces hybrides de laboratoire pourraient être pathogènes pour l'espèce humaine et on ne peut pas le vérifier. Le virus du fibrome malin du lapin, qui résulte d'une recombinaison entre des leporipoxvirus inoffensifs (virus du fibrome de Shope) et virulents (virus du myxome), conserve une grande part de la virulence du virus du myxome dont il dérive (Ogpenorth et al., 1992). De fait, selon une analyse, la souche alastrim du virus variolique pourrait être un hybride naturel issu d'une recombinaison entre des souches ouest-africaines et asiatiques du virus variolique (Esposito et al., 2006). Il n'existe pas à l'évidence d'obstacle technique ou biologique au remplacement d'un gène orthopoxviral par un autre, à l'insertion d'un gène propre aux orthopoxvirus pathogènes dans le virus de la vaccine, au remplacement de parties homologues d'un génome par des segments synthétiques copiés sur un autre virus ou encore à la production de virus hybrides (par exemple un hybride du virus de l'orthopoxvirose simienne et du virus de la variole du chameau) avec l'idée d'obtenir un profil potentiel de virulence capable de reproduire celui du virus variolique. Il est certain que l'idée de pouvoir agencer comme l'on veut des gènes viraux à l'intérieur d'orthopoxvirus recombinants n'incite guère à l'optimisme, notamment si l'on s'avisait d'introduire, par manipulation génétique, les allèles de pharmacorésistance des gènes visés dans un virus reconstitué.

3.4 Lignes directrices applicables au génome des virus varioliques

Les avancées des techniques génomiques analysées plus haut nécessitent la réévaluation et l'actualisation des stratégies actuelles pour le confinement du virus variolique. Ces

stratégies ont été élaborées dans les années 1980 et fréquemment revues depuis lors. C'est parce qu'il n'est pas exclu que des poxvirus puissent être obtenus à partir d'ADN cloné en utilisant des méthodes de réactivation qu'aucun laboratoire autre que les deux centres collaborateurs de l'OMS n'est autorisé à détenir plus de 20 % du génome du virus variolique et que toute manipulation de l'ADN de ce virus doit être géographiquement isolée des travaux impliquant le stockage ou la multiplication d'autres poxvirus. La réglementation actuelle est axée, avec raison, sur la restriction, par des moyens physiques ou administratifs, de l'accès au virus vivant ou à des fragments clonés du génome variolique : ces mesures restent certainement valables et doivent être maintenues, de même que l'interdiction de toute activité consistant par exemple à introduire délibérément des gènes du virus variolique dans d'autres poxvirus. Cela étant, lorsque ces procédures ont été élaborées, personne ne pouvait prévoir que, 25 ans plus tard, les progrès accomplis dans le séquençage des génomes et la synthèse des gènes permettraient de rendre des fragments importants du virus variolique accessibles à toute personne connectée à Internet et capable de se procurer un synthétiseur d'ADN. Cette personne pourrait même être un chercheur bien intentionné, peu familiarisé avec la variole et qui n'ait pas conscience des règles particulières qui régissent l'accès aux gènes du virus variolique.

Ce problème a été débattu par un certain nombre d'auteurs, et notamment par des chercheurs qui travaillent dans le secteur de la « biologie de synthèse ». En 2007, les problèmes liés aux avancées des technologies de synthèse de l'ADN ont été évoqués et une proposition portant sur la gestion de la sécurité biologique a été formulée (Bügl et al., 2007). Autant que les auteurs du présent chapitre le sachent, ces propositions n'ont pas été prises en compte dans la politique officielle des États Membres ; en revanche, un certain nombre d'entreprises commerciales qui opèrent dans ce secteur les ont adoptées en tant que principes de gestion. La société GENEART par exemple, qui est leader dans la synthèse génique à grande échelle, utilise le système BLAST pour filtrer toutes les demandes qui lui sont adressées en les comparant aux listes d'agents pathogènes sous contrôle – notamment le virus variolique et celui de l'orthopoxvirose simienne – établies par le Groupe d'Australie.⁹ Les clients qui demandent des synthèses de gènes pouvant être rapprochés d'agents figurant sur ces listes doivent décliner leur identité et fournir les documents d'importation et d'exportation nécessaires.

Les auteurs du présent chapitre recommandent avec force que les entreprises et les institutions qui offrent de tels services respectent les principes directeurs de la surveillance. Ce type de surveillance ne s'étend toutefois pas aux scientifiques qui synthétisent des gènes avec leur propre appareillage. Il pourrait être bon d'étudier la possibilité d'introduire des éléments non modifiables dans les synthétiseurs géniques du commerce afin d'empêcher ce type d'activité, tout comme de nombreuses photocopieuses actuelles sont dotées de puces préemptives qui empêchent de photocopier les billets de banque.

En définitive, les technologies génomiques ont également bouleversé nos connaissances sur les relations évolutives entre les orthopoxvirus, avec les conséquences que cela entraîne pour le confinement des virus très proches du virus variolique. La plupart des éléments des politiques actuelles de confinement du virus ont été élaborés alors que la relation génétique entre le virus variolique et d'autres poxvirus animaux (comme le virus de l'orthopoxvirose simienne), encore incertaine, constituait un problème très concret pour les autorités sanitaires. On admet depuis longtemps que le virus de l'orthopoxvirose simienne est un agent pathogène zoonotique qui mérite une attention particulière mais on sait aussi que le virus de la variole de la gerbille et celui de la variole du chameau sont en fait les plus proches cousins du virus variolique, la génomique permettant de déterminer avec précision quels sont leurs différences génétiques. La souche Congo du virus variolique par exemple, comporte environ 8 gènes qui sont absents du virus de la variole du chameau, ce dernier en

⁹ <http://www.australiagroup.net>.

ayant environ 16 qui ne se retrouvent pas chez le virus variolique. On ne possède guère de données qui permettraient de penser que les virus de la variole de la gerbille et de la variole du chameau de type sauvage constituent par eux-mêmes une grave menace pour la santé humaine, cependant, comme la recherche va continuer à nous donner de nouvelles indications sur les fonctions de ces gènes, il serait sage de s'interroger à l'avenir sur la politique à suivre en matière de bioconfinement et de recherche dans le cas des orthopoxvirus qui présentent une parenté étroite avec le virus variolique.

Tableau 3.1 Séquences génomiques des souches de virus variolique qui figurent dans les bases de données publiques

Virus variolique	Description du conservatoire	Année d'isolement	Origine des échantillons	Séquences déterminées	Séquences de la région codante	ORF présumées	Numéro d'accèsion à GenBank
BEN68_59	V68-59, Dahomey	1968	Bénin	187 070	185 591	205	DQ441416
BOT72_143	V72-143	1972	Botswana	185 931	184 186	203	DQ441417
BOT73_225	V73-225	1973	Botswana	185 931	184 126	201	DQ441418
CNG70_46	V70-46 Kinshasa	1970	Région du Congo	186 553	184 140	203	DQ437583
CNG70_227	V74-227 Gispén Congo 9	1970	Région du Congo	186 652	184 093	200	DQ441423
ETH72_16	Eth16 R14-1X-72 Addis	1972	Éthiopie	186 648	184 152	202	DQ441424
ETH72_17	Eth17 R14-1X-72 Addis	1972	Éthiopie	186 648	184 152	201	DQ441425
GUI69_005	V69-005 Guinée	1969	Guinée	186 883	185 579	204	DQ441426
NIG69_001	Importé du Nigéria	1969	Niger	186 942	185 707	205	DQ441434
SAF65_102	102 Natal, Ingwavuma	1965	Afrique du Sud	186 050	184 315	200	DQ441435
SAF65_103	103 T'vaal, Nelspruit	1965	Afrique du Sud	185 881	184 148	202	DQ441436
SLN68_258	V68-258	1969	Sierra Leone	187 014	185 763	204	DQ441437
SOM77_ali	V77-2479 dernier cas	1977	Somalie	186 231	184 155	202	DQ437590
SOM77_1252	V77-1252	1977	Somalie	184 191	—	—	DQ441438
SOM77_1605	V77-1605	1977	Somalie	184 170	—	—	DQ441439
SUD47_jub	Juba (phénotype alastrim))	1947	Soudan	186 284	184 208	201	DQ441440
SUD47_rum	Rumbeç	1947	Soudan	186 415	—	—	DQ441441
TAN65_kem	Kembula	1965	Tanzanie ^a	185 826	184 085	198	DQ441443
AFG70_vlt4	Variolator-4	1970	Afghanistan	185 855	184 062	203	DQ437580
BSH74_nur	Nur Islam	1974	Bangladesh	186 293	183 534	196	DQ441420
BSH74_shz	Shahzaman	1974	Bangladesh	186 293	183 534	197	DQ441421
BSH74_sol	Solaiman	1974	Bangladesh	186 293	183 534	197	DQ441422
BSH75_banu	V75-550 reséquence	1975	Bangladesh	185 976	183 562	201	DQ437581
CHN48_horn	China Horn Sabin lab	1948	Chine	186 668	184 188	204	DQ437582
IND53_mad	Kali-Muthu-Madras	1953	Inde	186 108	184 173	201	DQ441427
IND53_ndel	New Delhi	1953	Inde	186 662	184 178	201	DQ441428
IND64_vel4	7124 Vellore	1964	Inde	186 677	184 051	205	DQ437585
IND64_vel5	7125 Vellore	1964	Inde	186 127	184 058	202	DQ437586
IND67_mah	Vector Maharastra E6	1967	Inde	185 578	184 151	198	NC_001611

Tableau 3.1 Séquences génomiques des souches de virus variolique qui figurent dans les bases de données publiques (*suite*)

Virus variolique	Description du conservatoire	Année d'isolement	Sample origin	Sequences determined	Coding region sequences	Putative ORFs	GenBank accession number
JAP46_yam	Yamada MS-2A Tokyo	1946	Japon	186 662	184 178	203	DQ441429
JAP51_hrpr	Harper Masterseed	1951	Japon	186 180	184 179	202	DQ441430
JAP51_stwl	Stillwell Masterseed	1951	Japon	186 115	184 798	201	DQ441431
KOR47_lee	Lee Masterseed	1947	Corée ^b	186 383	184 102	203	DQ441432
KUW67_1629	K1629	1967	Koweït	185 853	184 060	199	DQ441433
NEP73_175	V73-175	1973	Népal	185 654	183 517	202	DQ437588
PAK69_lah	Rafiq Lahore	1969	Pakistan	185 865	184 072	203	DQ437589
SUM70_222	V70-222	1970	Sumatra	185 449	184 197	202	DQ437591
SUM70_228	V70-228	1970	Sumatra	185 405	184 564	199	DQ441442
SYR72_119	V72-119	1972	Syrie ^c	185 853	184 060	203	DQ437592
GER58_hdlg	Heidelberg, d'origine indienne	1958	Allemagne	184 900	184 168	201	DQ437584
UNK44_harv	Harvey Middlesex	1944	Royaume-Uni	185 771	184 184	203	DQ441444
UNK46_hind	Hinden	1946	Royaume-Uni	186 096	184 093	198	DQ441445
UNK47_hig	Higgins Staffordshire	1947	Royaume-Uni	185 026	184 225	200	DQ441446
UNK52_but	Butler alastrim	1952	Royaume-Uni	188 251	185 845	207	DQ441447
YUG72_164	Yougoslavie, originaire d'Iraq	1972	Yougoslavie ^b	185 851	184 058	201	DQ441448
BRZ66_39	V66-39 alastrim	1966	Brésil	188 062	185 725	207	DQ441419
BRZ66_gar	Garcia alastrim	1966	Brésil	186 986	185 846	207	Y16780

ORF, open reading frame (cadre de lecture ouvert).

^a Maintenant République-Unie de Tanzanie.

^b Nom actuel du pays inconnu.

^c Maintenant République arabe syrienne.

Abréviations

ADN acide désoxyribonucléique

ARN acide ribonucléique

Indels insertions/délétions

OMS Organisation mondiale de la Santé

ORF cadre de lecture ouvert (*open reading frame*)

SNP polymorphisme nucléotidique simple (*single nucleotide polymorphism*)

TIR séquences terminales inversées répétées (*terminal inverted repeat*)

Références bibliographiques

- Alejo A et al. (2006). A chemokine-binding domain in the tumor necrosis factor receptor from variola (smallpox) virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103: 5995–6000.
- Babkin IV, Shchelkunov SN (2006). [The time scale in poxvirus evolution]. *Molekuliarnaia biologiya*, 40§ 20–24.
- Babkin IV, Shchelkunov SN (2008). [Molecular evolution of poxviruses]. *Genetika*, 44: 1029-1044.
- Bedson HS, Dumbell KR (1964a). Hybrids derived from the viruses of alastrim and rabbit pox. *The Journal of Hygiene*, 62: 141–146.
- Bedson HS, Dumbell KR (1964b). Hybrids derived from the viruses of variola major and cowpox. *The Journal of Hygiene*, 62: 147–158.
- Bügl H et al. (2007). DNA synthesis and biological security. *Nature Biotechnology*, 25: 627-629.
- Cello J, Paul AV, Wimmer E (2002). Chemical synthesis of poliovirus cDNA: generation of infectious virus in the absence of natural template. *Science*, 297: 1016–1018.
- Czar MJ et al. (2009). Gene synthesis demystified. *Trends in Biotechnology*, 27: 63–72.
- Domi A, Moss B (2002). Cloning the vaccinia virus genome as a bacterial artificial chromosome in *Escherichia coli* and recovery of infectious virus in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99: 12415–12420.
- Dunlop LR et al. (2003). Variola virus immune evasion proteins. *Microbes and Infection*, 5: 1049–1056.
- Esposito JJ et al. (2006). Genome sequence diversity and clues to the evolution of variola (smallpox) virus. *Science*, 313: 807–812.
- Esteban DJ, Nuara AA, Buller RM (2004). Interleukin-18 and glycosaminoglycan binding by a protein encoded by variola virus. *The Journal of General Virology*, 85: 1291–1299.
- Gileva IP et al. (2006). Properties of the recombinant TNF-binding proteins from variola, monkeypox, and cowpox viruses are different. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1764: 1710–1718.
- Gubser C et al. (2004). Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis. *The Journal of General Virology*, 85: 105–117.
- Kim M et al. (2004). Biochemical and functional analysis of smallpox growth factor (SPGF) and anti-SPGF monoclonal antibodies. *The Journal of Biological Chemistry*, 279: 25838–25848.
- Li Y et al. (2007a). On the origin of smallpox: correlating variola phylogenics with historical smallpox records. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104: 15787–15792.

- Li Y et al. (2007b). Orthopoxvirus pan-genomic DNA assay. *Journal of Virological Methods*, 141: 154–165.
- Liszewski MK et al. (2008). Smallpox inhibitor of complement enzymes (SPICE): regulation of complement activation on cells and mechanism of its cellular attachment. *Journal of Immunology*, 181: 4199–4207.
- Massung RF et al. (1993). Potential virulence determinants in terminal regions of variola smallpox virus genome. *Nature*, 2366: 748–751.
- Massung RF et al. (1994). Analysis of the complete genome of smallpox variola major virus strain Bangladesh-1975. *Virology*, 201: 215–240.
- Massung RF et al. (1996). Terminal region sequence variations in variola virus DNA. *Virology*, 221: 291–300.
- McLysaght A, Baldi PF, Gaut BS (2003). Extensive gene gain associated with adaptive evolution of poxviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100: 15655–15660.
- Meyer H et al. (2005). Variola and camelpox virus-specific sequences are part of a single large open reading frame identified in two German cowpox virus strains. *Virus Research*, 108: 39–43.
- Mohamed MR et al. (2009). Proteomic screening of variola virus reveals a unique NFkappaB inhibitor that is highly conserved among pathogenic orthopoxviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106: 9045–9050.
- Opgenorth A et al. (1992). Deletion of the growth factor gene related to EGF and TGF alpha reduces virulence of malignant rabbit fibroma virus. *Virology*, 186: 175–191.
- Rosengard AM et al. (2002). Variola virus immune evasion design: expression of a highly efficient inhibitor of human complement. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99: 8808–8813.
- Seregin SV et al. (1996). Comparative studies of gamma-interferon receptor-like proteins of variola major and variola minor viruses. *FEBS Letters*, 382: 79–83.
- Shchelkunov SN (2009). How long ago did smallpox virus emerge? *Archives of Virology*, 154: 1865–1871.
- Shchelkunov SN, Blinov VM, Sandakhchiev LS (1993a). Genes of variola and vaccinia viruses necessary to overcome the host protective mechanisms. *FEBS Letters*, 319: 80–83.
- Shchelkunov SN, Blinov VM, Sandakhchiev LS (1993b). Ankyrin-like proteins of variola and vaccinia viruses. *FEBS Letters*, 319: 163–165.
- Shchelkunov SN, Marennikova SS, Moyer RW (2005). *Orthopoxviruses pathogenic for humans*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- Shchelkunov SN, Massung RF, Esposito JJ (1995). Comparison of the genome DNA sequences of Bangladesh-1975 and India-1967 variola viruses. *Virus Research*, 36: 107–118.
- Shchelkunov SN, Totmenin AV (1995). Two types of deletions in orthopoxvirus genomes. *Virus Genes*, 9: 231–245.

- Shchelkunov SN et al. (1993). Comparison of the genetic maps of variola and vaccinia viruses. *FEBS Letters*, 327: 321–324.
- Shchelkunov SN et al. (1998). The genomic sequence analysis of the left and right species-specific terminal region of a cowpox virus strain reveals unique sequences and a cluster of intact ORFs for immunomodulatory and host range proteins. *Virology*, 243: 432–460.
- Shchelkunov SN et al. (2000). Alastrim smallpox variola minor virus genome DNA sequences. *Virology*, 266: 361–386.
- Shchelkunov SN et al. (2001). Human monkeypox and smallpox viruses: genomic comparison. *FEBS Letters*, 509: 66–70.
- Smith GL, Chan YS, Howard ST (1991). Nucleotide sequence of 42 kbp of vaccinia virus strain WR from near the right inverted terminal repeat. *The Journal of General Virology*, 72: 1349–1376.
- Sulaiman IM, Sammons SA, Wohlhueter RM (2008). Smallpox virus resequencing GeneChips can also rapidly ascertain species status for some zoonotic non-variola orthopoxviruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 46: 1507–1509.
- Sulaiman IM et al. (2007). GeneChip resequencing of the smallpox virus genome can identify novel strains : a biodefense application. *Journal of Clinical Microbiology*, 45: 358–363.
- Tumpey TM et al. (2005). Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus. *Science*, 310: 77–80.
- Yadav VN et al. (2008). Identification of hot spots in the variola virus complement inhibitor (SPICE) for human complement regulation. *Journal of Virology*, 82: 3283–3294.
- Yao XD, Evans DH (2003). High-frequency genetic recombination and reactivation of orthopoxviruses from DNA fragments transfected into leporipoxvirus-infected cells. *Journal of Virology*, 77: 7281–7290.

4. La situation des conservatoires de virus variolique et d'ADN viral des centres collaborateurs de l'OMS

Evgeny Stavskiy,¹ Christine Hughes² et Inger Damon²

¹ Département de Recherche en Génomique, Centre de Recherche d'État en Virologie et Biotechnologie VECTOR, Koltsovo, région de Novossibirsk, Fédération de Russie

² Poxvirus and Rabies Branch, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, États-Unis d'Amérique

Les observations et les conclusions qui figurent dans le présent rapport n'engagent que leurs auteurs et ne représentent pas nécessairement la position officielle des Centers for Disease Control and Prevention.

Résumé d'orientation

Le présent chapitre dresse un bilan succinct de la situation (en janvier 2010) des stocks de virus variolique vivant et d'ADN (acide désoxyribonucléique) viral eu égard également – le cas échéant – à l'utilisation et à la distribution de fragments de gènes du virus variolique conformément aux recommandations de l'Organisation mondiale de la Santé (OMS).

En 1976, alors que les efforts déployés pour éradiquer la variole connaissaient un succès croissant, le service chargé à l'OMS de l'éradication de la variole s'est engagé dans un certain nombre de tentatives en vue de réduire les stocks de virus variolique détenus dans les laboratoires. Il s'en est suivi que le nombre de laboratoires déclarant spontanément détenir des stocks de virus variolique à la Commission mondiale pour la Certification de l'Éradication de la Variole est tombé de 75 à 7 en décembre 1979, puis à 4 en 1981. Les stocks restants étaient situés en Afrique du Sud, aux États-Unis, en Fédération de Russie et au Royaume-Uni.

En 1982, les stocks de Porton Down (Royaume-Uni) ont été transférés aux États-Unis et plus précisément aux Centers for Disease Control and Prevention (CDC) d'Atlanta, Georgia. Les stocks de virus détenus par l'Afrique du Sud, qui étaient conservés à l'Institut national de Virologie de Sandringham, ont été détruits en 1983 (mais l'Afrique du Sud détient encore des fragments clonés, non infectieux, du virus variolique).

En mai 1996, l'Assemblée mondiale de la Santé a, dans sa résolution WHA33.4, entériné les recommandations relatives à la période postérieure à l'éradication de la variole. Cette résolution précisait que les conservatoires de virus variolique restants devaient être situés dans un nombre limité de lieux. Depuis lors, la collection a été réduite et elle se limite actuellement aux stocks détenus par deux laboratoires : le centre collaborateur OMS pour la variole et les autres poxviroses sis aux CDC et le centre collaborateur OMS pour le diagnostic des orthopoxviroses et conservatoire des souches et de l'ADN du virus variolique, sis au Centre de Recherche d'État en Virologie et Biotechnologie VECTOR (SRC VB VECTOR) de Koltsovo, région de Novossibirsk (Fédération de Russie).

Ces deux laboratoires font des rapports annuels qui sont soumis au Secrétariat de l'OMS. Ces rapports portent sur l'utilisation de virus vivants et sur la situation des conservatoires. Depuis 2000, ces rapports sont également présentés oralement lors des réunions annuelles du Comité consultatif OMS de la Recherche sur le Virus variolique, qui ont pour objet de passer en revue les travaux effectués avec des virus varioliques vivants. Des résumés de ces communications peuvent être consultés en ligne, en se connectant au site de l'OMS sur la Toile.¹⁰

¹⁰ <http://www.who.int/csr/disease/smallpox/research/en/index.html>.

4.1 Introduction

En 1976, alors que le succès des efforts déployés pour éradiquer la variole était de plus en plus patent, le service chargé à l'OMS de l'éradication de la variole s'est engagé dans un certain nombre de tentatives en vue de réduire les stocks de virus variolique détenus dans les laboratoires. Il s'en est suivi que le nombre de laboratoires déclarant spontanément détenir des stocks de virus variolique à la Commission mondiale pour la Certification de l'Éradication de la Variole est tombé de 75 en 1976 à 7 en décembre 1979, puis à 4 en 1981. Les stocks restants étaient situés en Afrique du Sud, aux États-Unis, en Fédération de Russie et au Royaume-Uni.

En 1982, les stocks de virus variolique détenus à Porton Down (Royaume-Uni) ont été transférés au centre collaborateur OMS pour la variole et les autres orthopoxviroses des Centers for Disease Control and Prevention (CDC) d'Atlanta, Georgia (États-Unis).

En 1983, les stocks de virus qui étaient conservés à l'Institut national de Virologie de Sandringham (Afrique du Sud) ont été détruits (mais l'Afrique du Sud détient encore des fragments clonés, non infectieux, du virus variolique).

En mai 1996, l'Assemblée mondiale de la Santé a, dans sa résolution WHA33.4, entériné les recommandations relatives à la période postérieure à l'éradication de la variole. Ces recommandations précisait que les conservatoires de virus variolique restants devaient être situés dans un nombre limité de lieux. Depuis lors, la collection a été réduite et elle se limite actuellement aux stocks détenus par deux laboratoires :

- le centre collaborateur OMS pour la variole et les autres poxviroses sis aux CDC d'Atlanta, Georgia (États-Unis) ;
- le centre collaborateur OMS pour le diagnostic des orthopoxviroses et conservatoire des souches et de l'ADN du virus variolique, sis au Centre de Recherche d'État en Virologie et Biotechnologie VECTOR (SRC VB VECTOR, désigné dans le présent chapitre par « VECTOR ») de Koltsovo, région de Novossibirsk (Fédération de Russie).

4.2 La situation des conservatoires de souches de virus variolique et d'acide nucléique viral établis au centre collaborateur OMS de la Fédération de Russie

4.2.1 L'état de la collection de souches de virus variolique et de son conservatoire

La collection de virus variolique de la Fédération de Russie a débuté au milieu des années 1950, à l'Institut Mechnikov de Recherche sur les Vaccins et les Sérums (Moscou). Elle s'est poursuivie à l'Institut de Recherche sur les Préparations virales (IRPV) où le centre collaborateur de l'OMS pour la variole et les maladies infectieuses apparentées a commencé ses travaux en 1967. Cette collection a été utilisée pour des études diagnostiques dans le cadre du Programme mondial d'éradication de la variole tout au long de son existence. Entre 1960 et 1975, plus de la moitié des 120 souches et isollements de virus variolique présents dans la collection a été étudiée en détail au moyen de marqueurs biologiques classiques ; les souches restantes avaient été reconnues comme des souches de virus variolique lors de leur isolement, mais elles n'ont pas été étudiées en détail.

Le transfert de la collection de souches de virus variolique de l'IRPV au VECTOR a été organisé par un décret conjoint du Ministère de la Santé et des Industries médicales, du Ministère de l'Éducation et de la Science, du Comité d'État pour la Surveillance sanitaire et épidémiologique (Goskomsanepidnadzor) de la Fédération de Russie et par le RAMS N 187/123/105/71 du 8 septembre 1994. Cette décision a été confirmée par la *Déclaration conjointe sur le transfert de la collection de virus variolique de l'Institut de Recherche sur les Préparations virales RAMS au SRC NPO VECTOR de la Fédération de Russie* en date du

27 septembre 1994. Conformément au décret N 725-47 pris le 24 juin 1996 par le Gouvernement de la Fédération de Russie, la collection de micro-organismes du VECTOR, y compris la collection de souches de virus variolique, a été incluse dans la liste des collections officielles de la Fédération de Russie. Cet état de choses a été confirmé par le décret ministériel N 33 du Ministère de la Santé et de l'Industrie médicale de la Fédération de Russie daté du 21 août 1996.

Le 19 juin 1997, l'OMS a officiellement pris acte de la création, dans les locaux du VECTOR, du centre collaborateur pour le diagnostic des orthopoxvirus et conservatoire des souches et l'ADN du virus variolique (lettre de l'OMS datée du 19 juin 1997 et envoi des documents N LTS S2/180/4 et LTS S2/286/3). Cette opération a été lancée au niveau national par le décret N 300 du Ministère de la Santé de la Fédération de Russie, daté du 9 octobre 1997. Elle a été confirmée ultérieurement par le Service fédéral de surveillance chargé de la protection des droits du consommateur et du bien-être humain (Rospotrebnadzor) (document N° 772, daté du 16 novembre 2005). Au niveau international, le droit de conserver la collection de souches de virus variolique dans les locaux du VECTOR a été reconnu par la résolution WHA49.10 de l'Assemblée mondiale de la Santé et confirmé ultérieurement par les résolutions WHA52.10, WHA55.15 et WHA60.1 de cette même Assemblée.

La mise en place de cette collection de virus variolique au centre collaborateur de l'OMS et les travaux expérimentaux qui en font usage respectent les prescriptions nationales et internationales ainsi que les recommandations de la Commission mondiale de l'OMS. Les instructions qui encadrent la recherche ainsi que les procédures de maintenance et de contrôle ont été établies sur la base des documents indiqués plus haut. Des plans ont également été établis en ce qui concerne les mesures antiépidémiques ainsi que les dispositions à prendre en cas d'accident, et des équipes d'intervention ont été constituées pour faire face à tout accident ou situation d'urgence.

Entre 1995 et 2009, des experts de l'OMS ont procédé à six inspections dans les locaux du VECTOR afin de déterminer dans quelles conditions de sécurité biologique et physique les travaux sur le virus variolique sont effectués. Ces experts ont confirmé que ces conditions sont conformes aux prescriptions internationales.

Les fonctionnaires qui ont la charge de la collection de virus variolique du VECTOR ont été nommés par le Directeur général de l'établissement. Le transfert de responsabilité lorsque ces fonctionnaires se sont remplacés l'un l'autre – par suite de changements d'ordre hiérarchique – s'est effectué dans le cadre d'un état des lieux par la commission, avec approbation des déclarations de transfert par le Directeur général de l'établissement. Au moment de la rédaction du présent chapitre (2010), la collection comportait 120 souches (Tableau 4.1), originaires d'Asie, d'Afrique, des Amériques, de la Méditerranée orientale et de l'Europe.

Tableau 4.1 Répartition géographique de l'origine des souches de virus variolique détenues au VECTOR

Distribution géographique des isolements par Région OMS	Pays où les souches ont été isolées ^a	Nombre de souches
Asie du Sud-Est	Bangladesh	3
	Inde	13
	Indonésie	10
	Népal	8
Afrique	Botswana	7
	Burundi	1
	Congo	6
	Éthiopie	12
	Kenya	4
	Rwanda	6
	Somalie	3
	Soudan	1
	Tanzanie ^b	8
	Zaïre ^c	1
Amériques	Brésil	8
Méditerranée orientale	Koweït	3
	Oman	4
	Pakistan	14
Europe	URSS ^d	7
	Royaume-Uni	1
Total		120

OMS, Organisation mondiale de la Santé.

^a Les noms des pays sont ceux qui étaient utilisés lors de l'isolement des souches.

^b Maintenant République-Unie de Tanzanie.

^c Maintenant République démocratique du Congo.

^d Maintenant Fédération de Russie.

Les recherches sur le virus variolique vivant sont effectuées dans les laboratoires d'un bâtiment du VECTOR spécialement aménagé à cet effet – il s'agit d'un bâtiment séparé, comportant quatre étages, dont la superficie totale de plancher est de 6330 m². Ce bâtiment est situé sur un terrain gardé, dont les accès sont contrôlés 24 heures sur 24 par des gardes armés, par le personnel de service et par des systèmes de sécurité spécialement conçus. La collection demeure en permanence dans un conservatoire gardé, spécialement destiné aux travaux sur le virus variolique. L'accès au conservatoire fait l'objet d'instructions et de règles particulières qui exigent notamment la présence permanente de deux membres du personnel. Le conservatoire et les congélateurs à -70°C qui abritent la collection sont surveillés en permanence et équipés de systèmes d'alarme appropriés avec divers niveaux de redondance dans ces systèmes et équipements.

Les cultures de virus variolique sont conservées sous différentes formes :

- à l'état congelé
 - œufs de poule embryonnés (sur la membrane chorioallantoïdienne) (MCA)
 - homogénéisats de membrane chorioallantoïdienne d'œufs de poule embryonnés
 - lysats de cellules infectées par le virus variolique
- échantillons lyophilisés
- croûtes cicatricielles prélevées sur des malades de la variole.

Les tubes hermétiques contenant les souches congelées, les ampoules hermétiques contenant les cultures lyophilisées et les tubes hermétiques contenant les croûtes

cicatricielles prélevées sur des malades de la variole sont tous conservés au congélateur, à l'abri de l'air dans des récipients métalliques étanches à -70°C. Tous les travaux sur le virus de la variole sont effectués dans le bâtiment réservé à cette fin, dans des installations présentant le niveau 4 de sécurité biologique. En 2009, on a réduit au minimum le nombre de flacons de verre contenant des souches de virus variolique et leur contenu a été transvasé dans des flacons cryogéniques en polypropylène dans le but d'améliorer la sécurité des conditions de travail.

La collection de la Fédération de Russie comporte 120 souches. Une analyse de viabilité effectuée sur 59 souches de cette collection de virus variolique a révélé que 32 d'entre elles étaient viables (voir le Tableau 4.2). Il est proposé de procéder également à une analyse de viabilité sur les 61 autres isollements de virus variolique. On conserve également l'ADN (acide désoxyribonucléique) pleine longueur de 39 souches – 32 souches viables et 6 souches non viables figurant au Tableau 4.2, ainsi que celui d'une autre souche (Ind-70). L'ADN de la souche Ind-70 a été extrait du matériel biologique conservé à l'état congelé, sans obtention préalable du virus sur membrane chorioallantoïdienne d'œufs de poule embryonnés (voir le Tableau 4.3).

Le virus variolique a été extrait des cultures conservées en diluant le matériel biologique dans un milieu nutritif dont on a ensuite préparé une série de dilutions au dixième que l'on a placées sur la membrane chorioallantoïdienne d'œufs de poule embryonnés âgés de 12 jours. Après incubation à 34,5°C ($\pm 0,5^\circ\text{C}$) pendant trois jours, les œufs embryonnés ont été ouverts et on a compté le nombre de lésions spécifiques (pustules) présentes sur la membrane chorioallantoïdienne afin de déterminer l'activité biologique (titre) de la culture.

Aucun virus variolique viable n'a été décelé après infection d'œufs embryonnés au moyen du matériel biologique préparé à partir des homogénéisats de membrane chorioallantoïdienne conservés à l'état congelé dans la collection de virus variolique de la Fédération de Russie. On a tenté de procéder à des passages successifs sur une couche monocellulaire de cellules en culture Vero, mais aucun virus viable n'a été décelé, même après trois passages successifs « en aveugle » suivis de l'inoculation d'homogénéisats de ces cellules à la membrane chorioallantoïdienne d'œufs embryonnés. Les échantillons initiaux ainsi que les échantillons de travail ont néanmoins été conservés en vue d'études ultérieures (basées par exemple sur la génétique moléculaire). Les résultats obtenus incitent à penser que certaines des cultures conservées à l'état congelé pourraient avoir perdu leur activité biologique (c'est-à-dire leur infectiosité).

Des virus varioliques viables ont été trouvés dans la totalité des échantillons biologiques lyophilisés (voir le Tableau 4.2). Les cultures de ces souches ont été produites sur une couche monocellulaire de cellules Vero afin d'obtenir le matériel biologique nécessaire aux travaux ultérieurs d'isolement de l'ADN. Dans ce mode opératoire, on a utilisé du matériel biologique conservé dans la collection et provenant de passages antérieurs, afin d'éviter des passages supplémentaires du virus variolique.

Tableau 4.2 Viabilité des souches de virus variolique détenues par le VECTOR

N°	Souche de virus variolique	Forme sous laquelle le matériel est conservé ^a	Titre (unités formatrices de pustules/ml)
1	M-Abr-60	Lyophilisé	$1,5 \times 10^6$
2	Aziz	Lyophilisé	$0,9 \times 10^6$
3	M-Sok-60	Lyophilisé	$1,2 \times 10^6$
4	M-Sur-60	Lyophilisé	$2,5 \times 10^6$
5	Semat	Lyophilisé	$1,0 \times 10^6$
6	12/62	Lyophilisé	$9,6 \times 10^5$
7	Ind-4a	Lyophilisé	$1,5 \times 10^7$
8	Helder	Lyophilisé	$1,8 \times 10^6$
9	Rw-18	Lyophilisé	$1,3 \times 10^5$
10	M-N-60	Lyophilisé	$8,1 \times 10^4$
11	22/62	Lyophilisé	$3,0 \times 10^6$
12	Mary	Lyophilisé	$2,0 \times 10^6$
13	M-A-60	Lyophilisé	$1,0 \times 10^3$
14	M-BI-60	Lyophilisé	$3,0 \times 10^6$
15	Butler	Lyophilisé	$8,0 \times 10^5$
16	6-58	Lyophilisé	$7,0 \times 10^5$
17	Ngami	Lyophilisé	$6,1 \times 10^7$
18	Kuw-5	Lyophilisé	$2,9 \times 10^6$
19	Ind-3a	Lyophilisé	$7,2 \times 10^7$
20	Congo-2 ^b	Lyophilisé	$8,8 \times 10^7$
21	Congo-9 ^b	Lyophilisé	$8,7 \times 10^7$
22	Taj Barin	Lyophilisé	$5,5 \times 10^5$
23	Wsim Ahmed	Lyophilisé	$4,4 \times 10^5$
24	13/62	Lyophilisé	$1,3 \times 10^6$
25	M-Gavr-60	Lyophilisé	$9,6 \times 10^5$
26	India 378	Croûtes cicatricielles	$0,8 \times 10^{3c}$
27	Khateen	Croûtes cicatricielles	$5-10^c$
28	India 71	Croûtes cicatricielles	$5-10^c$
29	Brazil 128	Croûtes cicatricielles	$5-10^c$
30	Brazil 131	Croûtes cicatricielles	$5-10^c$
31	Aslam	Croûtes cicatricielles	$1,5 \times 10^{3c}$
32	Zaire 1028	Croûtes cicatricielles	Matériel isolé lors du deuxième passage en culture cellulaire VERO
33	Dub-1	Membrane chorioallantoïdienne congelée	Matériel non isolé
34	Dub-3	Membrane chorioallantoïdienne congelée	Matériel non isolé
35	Dub-4	Membrane chorioallantoïdienne congelée	Matériel non isolé
36	Dub-5	Membrane chorioallantoïdienne congelée	Matériel non isolé
37	Kuw-28	Membrane chorioallantoïdienne congelée	Matériel non isolé
38	Kuw-29	Membrane chorioallantoïdienne congelée	Matériel non isolé

Tableau 4.2 Viabilité des souches de virus variolique détenues par le VECTOR (*suite*)

N°	Souche de virus variolique	Forme sous laquelle le matériel est conservé ^a	Titre (unités formatrices de pustules/ml)
39	Indon-1	Membrane chorioallantoïdienne congelée	Matériel non isolé
40	Indon-2	Membrane chorioallantoïdienne congelée	Matériel non isolé
41	Indon-3	Membrane chorioallantoïdienne congelée	Matériel non isolé
42	Indon-4	Membrane chorioallantoïdienne congelée	Matériel non isolé
43	Indon-5	Membrane chorioallantoïdienne congelée	Matériel non isolé
44	Indon-6	Membrane chorioallantoïdienne congelée	Matériel non isolé
45	Indon-7	Membrane chorioallantoïdienne congelée	Matériel non isolé
46	Indon-8	Membrane chorioallantoïdienne congelée	Matériel non isolé
47	Indon-9	Membrane chorioallantoïdienne congelée	Matériel non isolé
48	Indon-10	Membrane chorioallantoïdienne congelée	Matériel non isolé
49	Nepal 21	Croûtes cicatricielles	Matériel non isolé
50	India 164	Croûtes cicatricielles	Matériel non isolé
51	India 294	Croûtes cicatricielles	Matériel non isolé
52	Nepal 89	Croûtes cicatricielles	Matériel non isolé
53	Rais	Croûtes cicatricielles	Matériel non isolé
54	Ethiopia 142	Croûtes cicatricielles	Matériel non isolé
55	Ethiopia 182	Croûtes cicatricielles	Matériel non isolé
56	Abd. Jalil	Membrane chorioallantoïdienne congelée	Matériel non isolé
57	Abid	Homogénéisat de MCA	Matériel non isolé
58	Nep-67	Membrane chorioallantoïdienne congelée	Matériel non isolé
59	Nepal-53	Membrane chorioallantoïdienne congelée	Matériel non isolé

^a Tout le matériel biologique, quelle que soit la forme sous laquelle il est conservé, est placé dans des récipients hermétiques maintenus à -70°C.

^b La culture a été préparée en 1966 après le premier passage, sur membrane chorioallantoïdienne d'œufs embryonnés, du virus isolé à partir des croûtes prélevées sur les malades.

^c La concentration biologique est exprimée en unités formatrices de pustules par mg.

Bien que tous les isollements primaires effectués à partir des croûtes cicatricielles des malades soient conservés dans des conditions équivalentes à la température de -70°C, des virus viables n'ont été isolés que sur 7 des 14 isollements étudiés. Contrairement au mode opératoire suivi pour les échantillons lyophilisés, on a procédé à des passages successifs de plusieurs souches sur une couche monocellulaire de cellules VERO pour isoler le matériel viral provenant des croûtes cicatricielles. On a fait macérer les croûtes pendant 12 heures dans 0,5 ml de milieu RPMI-1640 à la température de 4°C, puis on les a broyées. L'homogénéisat ainsi obtenu a été utilisé pour infecter la couche monocellulaire. Une fois infectées, les couches monocellulaires ont été incubées à 34,5°C ($\pm 0,5^\circ\text{C}$) jusqu'à ce qu'apparaissent les signes d'effet cytopathique caractéristiques du virus variolique. Ces signes se sont généralement manifestés le deuxième jour suivant l'infection. Le troisième jour, les cellules ont été raclées, puis remises en suspension dans une petite quantité de milieu, détruites par congélation-décongélation, additionnées d'une solution de glycérol à 10 % et, enfin, recongelées. Ce mode opératoire a permis d'obtenir la quantité de matériel viral nécessaire, et des préparations d'ADN de 27 souches de virus variolique ont été isolées

en quantité suffisante pour effectuer une réaction de polymérisation en chaîne à longs fragments (longue PCR ou LPCR).

Les conditions de conservation de la collection de virus variolique et les travaux qui sont effectués sur les souches de ce virus dans les locaux du VECTOR étaient donc conformes aux prescriptions nationales et internationales ainsi qu'aux recommandations de l'OMS. En résumé, 59 des 120 souches de virus variolique détenues par ce centre collaborateur de l'OMS ont fait l'objet d'une analyse de viabilité et 32 d'entre elles se sont révélées viables. Aucune étude de viabilité n'a encore été effectuée sur les 61 autres souches. Les souches de la collection sont conservées et manipulées dans des conditions contrôlées approuvées par l'OMS, à l'intérieur d'un bâtiment spécialement réservé aux travaux sur le virus variolique.

4.2.2 L'état de la collection d'ADN du virus variolique détenue par le VECTOR et de son conservatoire

Des travaux portant sur l'organisation structurale et fonctionnelle du génome des orthopoxvirus sont effectués par le VECTOR depuis 1991. Le séquençage intégral du génome (à l'exclusion des épingles à cheveux terminales) de la souche India-1967, une souche de virus variolique très virulente, a été mené à bien en 1992. Pour la première fois, on a mis le point final à la carte génétique du virus variolique et une analyse approfondie de la structure du génome a été effectuée. Entre 1993 et 1995, le VECTOR, en collaboration avec les CDC, a séquencé le génome de la souche Garcia-1966, une souche de faible virulence. Les travaux en vue d'isoler l'ADN génomique du virus variolique à partir de la collection de souches ont commencé en 2001. Au cours des dernières années, une collection de 39 préparations d'ADN appartenant à différentes souches de virus variolique a été créée au VECTOR.

En 1986, lors de sa quatrième réunion, le Comité spécial de l'OMS sur les Orthopoxviroses a décidé d'éliminer toutes les collections de souches de virus varioliques et de leur ADN génomique. Cela étant, il a alors été jugé nécessaire de conserver le matériel génétique de divers isolements de virus variolique sous une forme fiable et biologiquement sûre, car ces derniers sont extrêmement importants pour les recherches futures. Actuellement l'ADN du virus variolique est réparti dans un triple conservatoire :

- un conservatoire pour l'ADN génomique du virus variolique ;
- un conservatoire pour les collections d'amplicons (qui correspondent chacun à une souche déterminée de virus variolique et qui sont affectés d'un bref nom de code et d'un numéro de série) ;
- un conservatoire pour les collections de plasmides recombinants (avec un nom de code et un numéro de série).

L'unité de compte utilisée au conservatoire international d'ADN variolique du VECTOR est constituée d'un microflacon de plastique étiqueté.

Le conservatoire est situé dans un bâtiment gardé spécialement destiné aux travaux sur le virus variolique. Il est surveillé et équipé d'un système de contrôle automatique de la température et d'un système d'alarme. Il abrite 5438 flacons, détaillés comme suit :

- 197 flacons contenant l'ADN pleine longueur du virus variolique (39 souches différentes de ce virus) sous forme de solution, conservés à +4°C ;
- 1446 flacons comprenant 17 collections d'amplicons avec des fragments d'ADN du virus variolique, conservés à -70°C ; chaque collection contient des amplicons et des fragments du génome d'une seule souche de virus variolique, sous la forme de trois séries répétitives :
 - la première série est sous la forme d'un précipité alcoolique ;
 - la deuxième série est sous la forme d'un précipité alcoolique ;

- la troisième série est sous la forme d'une solution dans un mélange LPCR ;
- 3795 flacons comprenant 16 collections de plasmides recombinants avec des fragments d'ADN, conservés à -70°C ; chaque collection contient des plasmides recombinants et des fragments du génome d'une seule souche de virus variolique sous la forme de trois séries répétitives :
 - la première série est sous la forme d'une solution tamponnée avec du tris-EDTA ;
 - la deuxième série est sous la forme d'un précipité alcoolique ;
 - la troisième série est sous la forme d'un précipité alcoolique.

Il n'y a eu aucun transfert de fragments d'ADN du virus variolique à quelque organisme extérieur que ce soit.

Isolement de l'ADN du virus variolique cultivé en culture cellulaire

Des préparations d'ADN pleine longueur du virus variolique sont conservées à +4°C au conservatoire du VECTOR, dans des microflacons de plastique étiquetés. Actuellement, des préparations d'ADN de 39 souches de virus variolique originaires de diverses régions géographiques sont conservées dans 197 flacons, comme indiqué au Tableau 4.3.

Tableau 4.3 Inventaire de l'ADN pleine longueur du virus variolique

N°	Souche	Répartition par Région OMS	Pays d'origine de la souche ^a	Année d'isolement
1	Brazil 128	AMR	Brésil	Inconnue
2	Brazil 131	AMR	Brésil	Inconnue
3	Congo-2	AFR	Congo	1970
4	Congo-9	AFR	Congo	1970
5	Butler	EUR	Grande-Bretagne ^b	1952
6	Ind-4a	SEAR	Inde	1967
7	Ind-3a	SEAR	Inde	1967
8	Ind-70	SEAR	Inde	1975
9	India 164	SEAR	Inde	1975
10	India 71	SEAR	Inde	1975
11	India 378	SEAR	Inde	1975
12	Indon-3	SEAR	Indonésie	1971
13	Indon-9	SEAR	Indonésie	1971
14	Kuw-29	EMR	Koweït	1967
15	Kuw-5	EMR	Koweït	1967
16	Nepal 89	SEAR	Népal	Inconnue
17	6-58	EMR	Pakistan	1958
18	Wsim Ahmed	EMR	Pakistan	1970
19	Rais	EMR	Pakistan	1970
20	Khateen	EMR	Pakistan	1970
21	Taj Barin	EMR	Pakistan	1970
22	Aslam	EMR	Pakistan	1970
23	Aziz	EMR	Pakistan	1970
24	Rw-18	AFR	Rwanda	1970
25	Mary	AFR	Tanzanie ^c	1962
26	13/62	AFR	Tanzanie ^c	1962
27	Helder	AFR	Tanzanie ^c	1962
28	22/62	AFR	Tanzanie ^c	1962
29	12/62	AFR	Tanzanie ^c	1962
30	Semat	AFR	Tanzanie ^c	1962

Tableau 4.3 Inventaire de l'ADN pleine longueur du virus variolique (*suite*)

N°	Souche	Répartition par Région OMS	Pays d'origine de la souche ^a	Année d'isolement
31	Ngami	AFR	Tanzanie ^c	1962
32	M-Gavr-60	EUR	URSS ^d	1960
33	M-BI-60	EUR	URSS ^d	1960
34	M-Sok-60	EUR	URSS ^d	1960
35	M-Abr-60	EUR	URSS ^d	1960
36	M-N-60	EUR	URSS ^d	1960
37	M-Sur-60	EUR	URSS ^d	1960
38	M-A-60	EUR	URSS ^d	1960
39	Zaire 1028	AFR	Zaire ^e	Inconnue

AFR, Région africaine de l'OMS ; AMR, Région OMS des Amériques ; EMR : Région OMS de la Méditerranée orientale ; EUR, Région européenne de l'OMS ; SEAR : Région OMS de l'Asie du Sud-Est.

^a Les noms des pays sont ceux qui étaient utilisés au moment de l'isolement de la souche.

^b Maintenant Royaume-Uni.

^c Maintenant République-Unie de Tanzanie.

^d Maintenant Fédération de Russie.

^e Maintenant République démocratique du Congo.

Conservation du matériel génétique des différentes souches de virus variolique provenant de la collection de la Fédération de Russie

Conservatoire des collections d'amplicons d'ADN du virus variolique

La méthode LPCR a permis de créer un conservatoire d'amplicons de génomes complets du virus variolique ainsi que la collection de plasmides hybrides porteurs de fragments d'ADN viral variolique. Cette méthode a été utilisée pour la conservation du matériel génétique du virus variolique. Les séquences génomiques du virus variolique dont la liste figure au Tableau 4.3 peuvent se conserver pendant une longue période sous une forme biologique sûre. On a ainsi la possibilité d'étudier l'organisation génétique des souches de virus variolique et d'élaborer des méthodes modernes pour l'identification rapide du virus variolique et des autres orthopoxvirus.

Les collections certifiées d'amplicons d'ADN viral variolique comportent actuellement des préparations de 17 souches virales (voir le Tableau 4.4). Des informations concernant le nombre de flacons que comprennent les collections de ces amplicons sont données au Tableau 4.5. La dégradation de l'ADN des collections d'amplicons n'a pas été étudiée.

Tableau 4.4 ADN du virus variolique utilisé pour constituer les collections d'amplicons

Région où la souche a été isolée	Pays ^a où la souche a été isolée	Souche	Année de l'isolement	N° dans la collection du conservatoire	Type épidémiologique du virus
AFR	Rwanda	Rw-18	1970	MA 13	Variole majeure
AFR	Tanzanie ^b	13/62	1962	MA 9	Variole majeure
AFR	Tanzanie ^b	12/62	1962	MA 10	Variole majeure
AFR	Tanzanie ^b	Helder	1962	MA 12	Variole majeure
AFR	Tanzanie ^b	Mary	1962	MA 15	Variole majeure
AFR	Tanzanie ^b	Ngami	1962	MA 16	Variole majeure
AMR	Brésil	Brazil 131	Inconnue	MA 6	Variole mineure alastrim
EMR	Pakistan	Aziz	1970	MA 8	Variole majeure
EMR	Pakistan	6-58	1958	MA 11	Variole majeure
EMR	Pakistan	Taj Barin	1970	MA 14	Variole majeure
EMR	Pakistan	Wsim Ahmed	1970	MA 17	Variole majeure
EUR	URSS ^c	M-A-60	1960	MA 1	Variole majeure
EUR	URSS ^c	M-Abr-60	1960	MA 2	Variole majeure
EUR	URSS ^c	M-BI-60	1960	MA 3	Variole majeure
EUR	URSS ^c	M-Gavr-60	1960	MA 4	Variole majeure
EUR	URSS ^c	M-N-60	1960	MA 5	Variole majeure
SEAR	Inde	India 71	1975	MA 7	Variole majeure

AFR, Région africaine de l'OMS ; AMR, Région OMS des Amériques ; EMR : Région OMS de la Méditerranée orientale ; EUR, Région européenne de l'OMS ; SEAR : Région OMS de l'Asie du Sud-Est.

^a Les noms des pays sont ceux qui étaient utilisés au moment de l'isolement de la souche.

^b Maintenant République-Unie de Tanzanie.

^c Maintenant Fédération de Russie.

Création de bibliothèques de clones de fragments pleine longueur d'ADN génomique du virus variolique

Conserver l'information génétique sous la forme d'une collection d'amplicons comporte des inconvénients, à savoir le risque de dégradation des produits de la LPCR au bout d'une longue période de stockage et l'impossibilité de maintenir une collection complète d'amplicons en l'absence d'ADN génomique variolique. Pour pallier ces inconvénients, on peut conserver l'information génétique sous la forme de plasmides recombinants porteurs de fragments d'ADN viral, appelés « bibliothèques de clones » dans le présent document.

On a proposé une formule consistant à procéder au clivage des amplicons LPCR à l'aide d'endonucléases de restriction et à cloner les fragments d'ADN ainsi obtenus dans *Escherichia coli* en utilisant des plasmides comme vecteurs. Cela permettrait de constituer des bibliothèques de clones de fragments d'ADN à partir desquelles on pourrait facilement et rapidement produire des constructions plasmidiques en quantités voulues. L'utilisation de souches d'*E. coli* dotées d'un système de réparation déficient permet de réduire au minimum l'accumulation d'erreurs au cours de la réplication. Bien que cette approche demande plus de travail que les méthodes classiques, elle pourrait permettre de conserver de façon fiable et sûre les fragments d'ADN viral pendant une longue période. Les séquences de l'ADN génomique variolique pourraient alors être conservées indéfiniment sous forme de plasmides recombinants biologiquement sûrs. En outre, comme on l'a expliqué plus haut, on aurait alors la possibilité d'étudier l'organisation génétique des souches de virus variolique et de mettre au point des méthodes modernes d'identification rapide du virus. Ces plasmides pourraient également constituer une source de gènes viraux. Actuellement, les collections de plasmides certifiées contenant des fragments d'ADN représentent l'ADN de 16 souches de virus variolique (voir le Tableau 4.6). Des informations concernant le nombre de flacons que comprennent les collections sont données au Tableau 4.5.

Tableau 4.5 Inventaire des souches de virus variolique dont l'ADN a été utilisé pour la conservation du matériel génétique

Souche	Région où la souche a été isolée	Pays où la souche a été isolée ^a	Année de l'isolement	Type épidémiologique du virus	Conservatoire d'amplicons, nbre des flacons	Bibliothèque de clones de fragments, nbre des flacons
Congo-2	AFR	Congo	1970	Variole majeure		261
Rw-18	AFR	Rwanda	1970	Variole majeure	84	288
12/62	AFR	Tanzanie ^b	1962	Variole majeure	84	
13/62	AFR	Tanzanie ^b	1962	Variole majeure	84	273
Helder	AFR	Tanzanie ^b	1962	Variole majeure	84	
Mary	AFR	Tanzanie ^b	1962	Variole majeure	99	
Ngami	AFR	Tanzanie ^b	1962	Variole majeure	87	231
Brazil 128	AMR	Brésil	Unknown	Variole mineure alastrim		285
Brazil 131	AMR	Brésil	Unknown	Variole mineure alastrim	84	
Garcia-1966	AMR	Brésil	1966	Variole mineure alastrim		45
6-58	EMR	Pakistan	1958	Variole majeure	84	282
Aziz	EMR	Pakistan	1970	Variole majeure	84	
Taj Barin	EMR	Pakistan	1970	Variole majeure	84	288
Wsim Ahmed	EMR	Pakistan	1970	Variole majeure	84	213
Butler	EUR	Grande-Bretagne ^c	1952	Variole mineure alastrim		213
M-A-60	EUR	URSS ^d	1960	Variole majeure	84	246
M-Abr-60	EUR	URSS ^d	1960	Variole majeure	84	
M-BI-60	EUR	URSS ^d	1960	Variole majeure	84	288
M-Gavr-60	EUR	URSS ^d	1960	Variole majeure	84	276
M-Sur-60	EUR	URSS ^d	1960	Variole majeure		279
M-N-60	EUR	URSS ^d	1960	Variole majeure	84	
Ind-3a	SEAR	Inde	1967	Variole majeure		222
India 71	SEAR	Inde	1975	Variole majeure	84	
India-1967	SEAR	Inde	1967	Variole majeure		105

AFR, Région africaine de l'OMS ; AMR, Région OMS des Amériques ; EMR : Région OMS de la Méditerranée orientale ; EUR, Région européenne de l'OMS ; SEAR : Région OMS de l'Asie du Sud-Est.

^a Les noms des pays sont ceux qui étaient utilisés au moment de l'isolement de la souche.

^b Maintenant République-Unie de Tanzanie.

^c Maintenant Royaume-Uni.

^d Maintenant Fédération de Russie.

Tableau 4.6 Liste des divers ADN viraux utilisés pour créer le conservatoire de plasmides recombinants

Région où le virus variolique a été isolé	Pays où le virus variolique a été isolé ^a	Souche de virus variolique	Année de l'isolement	N° dans la collection du conservatoire	Type épidémiologique du virus
AFR	Tanzanie ^b	Ngami	1962	P 1	Variole majeure
AFR	Congo	Congo-2	1970	P 7	Variole majeure
AFR	Rwanda	Rw-18	1970	P 11	Variole majeure
AFR	Tanzanie ^b	13/62	1962	P 16	Variole majeure
AMR	Brésil	Brazil 128	Non déterminée	P 4	Variole mineure alastrim
AMR	Brésil	Garsia - 1966	1966	P 10	Variole mineure alastrim
EMR	Pakistan	Taj Barin	1970	P 3	Variole majeure
EMR	Pakistan	Wsim Ahmed	1970	P 6	Variole majeure
EMR	Pakistan	6-58	1958	P 13	Variole majeure
EUR	Grande-Bretagne ^c	Butler	1952	P 8	Variole mineure alastrim
EUR	URSS ^d	M-Sur-60	1960	P 2	Variole majeure
EUR	URSS ^d	M-BI-60	1960	P 12	Variole majeure
EUR	URSS ^d	M-A-60	1960	P 14	Variole majeure
EUR	URSS ^d	M-Gavr-60	1960	P 15	Variole majeure
SEAR	Inde	Ind-3a	1967	P 5	Variole majeure
SEAR	Inde	India - 1967	1967	P 9	Variole majeure

AFR, Région africaine de l'OMS ; AMR, Région OMS des Amériques ; EMR : Région OMS de la Méditerranée orientale ; EUR, Région européenne de l'OMS ; SEAR : Région OMS de l'Asie du Sud-Est.

^a Les noms des pays sont ceux qui étaient utilisés au moment de l'isolement de la souche.

^b Maintenant République-Unie de Tanzanie.

^c Maintenant Royaume-Uni.

^d Maintenant Fédération de Russie.

À la suite de ces travaux, un conservatoire a été constitué. Il comprend les collections suivantes :

- des préparations d'ADN de 39 souches de virus variolique ;
- des collections d'amplicons d'ADN de 17 souches de virus variolique ;
- des collections de plasmides contenant les fragments pleine longueur d'ADN génomique provenant de 16 souches de virus variolique de la collection de la Fédération de Russie et appartenant à deux types épidémiologiques isolés dans différentes régions.

Les auteurs du présent chapitre pensent que les collections de plasmides et d'amplicons devraient représenter chacune au moins six souches de virus variolique correspondant à différents sous-types biologiques (pour le virus de la variole majeure, de la variole mineure et de la variole mineure alastrim, six souches de chaque, soit 18 souches au total) pour être vraiment représentatives de la biodiversité complète du virus variolique. Il serait également raisonnable d'avoir des échantillons pleine longueur ou partiels d'ADN provenant de toutes les souches de virus variolique de la collection. Ces échantillons pourraient être conservés en toute sécurité dans une banque de matériel génétique variolique. La raison d'être de cette proposition, c'est que les conservatoires de la Fédération de Russie et des États-Unis comportent des cultures de virus variolique d'origine naturelle dont les analogues synthétiques ne seront probablement pas en mesure de reproduire toute la gamme des propriétés des virus naturels.

Les collections certifiées ont été placées dans le conservatoire international d'ADN du virus variolique sis au VECTOR. Le VECTOR procède chaque année à un inventaire des souches de virus variolique et de leur ADN, et il communique à l'OMS la liste des souches et des échantillons d'ADN viral établie à partir de cet inventaire, sous une forme convenue avec

l'Organisation. En tant que centre collaborateur de l'OMS, le VECTOR adresse également des rapports annuels à l'Organisation. Plusieurs sections de ces rapports traitent des travaux effectués en utilisant les collections de souches et d'ADN du virus variolique.

Pour toutes les expérimentations qui utilisent les collections de souches et d'ADN du virus variolique, la procédure est la suivante :

- les propositions de recherche portant sur les collections sont soumises à l'autorisation du sous-comité scientifique du Comité consultatif OMS de la Recherche sur le Virus variolique ;
- une fois autorisé par le sous-comité précité, le travail de recherche est entrepris ;
- les travaux effectués sont exposés sous la forme d'une communication orale lors de la présentation du rapport annuel qui a lieu à l'occasion de la réunion du Comité consultatif OMS de la Recherche sur le Virus variolique ;
- un rapport écrit sur les travaux effectués est ensuite communiqué au Secrétariat de l'OMS.

4.3 La situation des conservatoires de souches de virus variolique et d'acide nucléique viral établis au centre collaborateur OMS des États-Unis

Le conservatoire de virus variolique dont les États-Unis assurent la gestion au centre collaborateur OMS des CDC contient des collections de virus provenant du Japon, des Pays-Bas, du Royaume-Uni ainsi que des laboratoires du United States Army Medical Research Institute for Infectious Diseases (USAMRIID). Il contient également des collections qui étaient antérieurement détenues par les CDC et par l'American Type Culture Collection. Des échantillons de 451 isollements ou spécimens sont détenus sous leur forme originale, dans des locaux sécurisés. On estime que tout ce matériel biologique a été recueilli au cours des 50 ans qui ont précédé l'éradication de la variole.

Ces stocks de virus sont principalement constitués d'isollements effectués sur des sujets humains malades et d'échantillons répliqués des souches virales de référence. Cela étant, le conservatoire contient aussi quelques virus « hybrides » obtenus expérimentalement à partir du virus de la variole bovine, ainsi que des virus varioliques, des virus de la variole du lapin et des virus varioliques recombinants ou encore du matériel biologique non variolique donné par des laboratoires extérieurs, notamment des échantillons d'immunoglobuline antivaccin.

En 2000, on a établi une base de données électronique afin relier l'isolement d'un virus variolique à l'année et au lieu de sa découverte, aux données cliniques et épidémiologiques relatives au malade ou encore à la flambée dont provenait l'isolement. Cette base de données permet également de relier les données concernant les passages subis par l'échantillon au nom qui figure sur son récipient et d'orienter le choix des divers isollements en vue d'une étude plus approfondie. Pour rassembler ces données, on a étudié :

- d'une part :
 - les documents écrits accompagnant les échantillons
 - les rapports établis antérieurement par l'OMS au sujet du statut de ce matériel
 - les archives de l'OMS à Genève
 - des publications
- d'autre part, les demandes d'information émanant des laboratoires des pays donateurs.

Finalement, on a obtenu des informations sur environ 360 échantillons distincts de virus variolique provenant des diverses collections originales. Pour 142 échantillons au total, on a pu connaître le pays et l'année où l'isolement avait été effectué ainsi que les passages subis par ce matériel biologique ; pour huit autres, on a également eu connaissance du pays et de l'année d'isolement (mais sans obtenir de renseignements sur les passages subis par le matériel biologique en question) ; pour 163 autres, aucune donnée relative au pays ou à l'année où ils avaient été isolés n'a pu être obtenue. Parmi ces derniers, il y avait 19 croûtes cicatricielles primaires provenant de divers malades et trois stocks provenant de variolateurs.

Depuis l'année 2000, le Comité consultatif OMS de la Recherche sur le Virus variolique ayant donné son approbation, un sous-ensemble de ce matériel biologique est soumis à des études complémentaires consistant en une analyse génomique complète. Quarante-six isolements ont été choisis en vue du séquençage de leur génome ; il s'agit notamment d'échantillons provenant de la même flambée ou de flambées présentant un lien épidémiologique, ou encore de flambées « sans lien » apparent (Esposito et al., 2006 ; Li et al., 2007). Si l'on a séquencé ces échantillons-là, c'est parce qu'on avait le sentiment qu'ils constituaient, au sein de la collection des CDC, la source la plus importante de diversité virale (eu égard au pays et à l'année où l'isolement avait été effectué ou encore au petit nombre de passages subis). Parmi les isolements séquencés, il y en avait un certain nombre qui provenaient de cas qui avaient été décrits, d'un point de vue clinique ou épidémiologique, comme des cas de « variole majeure » ou de « variole mineure » ou encore qui étaient considérés biologiquement ou épidémiologiquement comme des cas d'alastrim. La majorité des isolements séquencés provenaient de cas décrits comme des cas de variole majeure. Il y avait une corrélation entre la variabilité génétique de ces isolements et leur origine géographique, mais pas de corrélation temporelle. C'est ainsi par exemple que des isolements obtenus à 30 ans d'intervalle dans la Corne de l'Afrique étaient regroupés avec les isolements non originaires d'Afrique de l'Ouest. Deux des virus hybrides ont été séquencés afin de déterminer dans quelle mesure des méthodes telles que la polymérisation en chaîne longue (LPCR) et le polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) permettaient d'identifier des événements de recombinaison. Ultérieurement, on a effectué une caractérisation biologique complémentaire des isolements de virus variolique (Olson et al., 2009) afin d'obtenir des données génétiques et biologiques applicables à l'analyse et à l'évaluation scientifiques des moyens thérapeutiques et prophylactiques susceptibles d'être utilisés contre le virus de la variole.

Les stocks du CDC utilisés depuis l'année 2000 pour des recherches essentielles en santé publique, qui ont été proposées à l'OMS et approuvées par elle, sont constitués de virus varioliques qui ne diffèrent pas de la souche mère d'ensemencement de plus d'un passage.

Tableau 4.7 Répartition géographique de l'origine des souches de virus variolique détenues aux CDC

Région géographique où a été isolée la souche	Pays où a été isolée la souche ^a	Nombre de souches
Afrique	Afrique centrale (pays non précisé)	2
	Afrique de l'Ouest (pays non précisé)	1
	Afrique du Sud	9
	Botswana	6
	Dahomey ^b	2
	Djibouti	1
	Éthiopie	11
	Gabon	1
	Ghana	2
	Guinée	1
	Haute-Volta ^c	1
	Kenya	12
	Mali	3
	Niger	2
	Nigéria	5
	Ouganda	2
	Sierra Leone	4
	Somalie	7
	Soudan	2
Tanzanie	10	
Togo	2	
Zaire ^d	9	
Asie	Bangladesh	20
	Chine	4
	Corée ^e	3
	Japon	3
	Inde	25
	Indonésie	12
	Népal	5
Amérique du Nord	États-Unis	1
Amérique du Sud	Brésil	15
Europe	Allemagne	1
	Italie	1
	Pays-Bas	2
	Royaume-Uni	30
	Yougoslavie ^e	1
Moyen-Orient	Iran	3
	Koweït	3
	Pakistan	12
	Syrie ^f	1
Inconnue		214
Total		451

^a Les noms des pays sont ceux qui étaient utilisés au moment de l'isolement de la souche.

^b Maintenant Bénin.

^c Maintenant Burkina Faso.

^d Maintenant République démocratique du Congo.

^e Nom actuel du pays inconnu.

^f Maintenant République arabe syrienne.

Une partie minimale du matériel biologique détenu par le conservatoire a été utilisée pour des travaux expérimentaux. Le Tableau 4.8 donne la liste des souches de virus variolique qui ont été utilisées aux fins d'études et qui, par suite, ont été multipliées en culture tissulaire. La majeure partie du matériel biologique analysé s'est révélée viable, encore que certaines souches aient dû subir un passage « en aveugle » pour que l'on puisse récupérer des virus viables. Avant 2000, l'expérimentation portait essentiellement sur quatre souches, qui avaient été multipliées pour produire du matériel d'ensemencement, des stocks de travail ainsi que de l'acide nucléique en vue du criblage d'antiviraux ou à des fins de séquençage. En 2010, la quantité de matériel d'ensemencement, de matériel de travail et de prélèvements de plages (mesurée en nombre de « tubes ») était 22 fois supérieure à la quantité détenue en 2000. Ce matériel biologique a été ou est utilisé pour le criblage d'antiviraux *in vitro*, pour des épreuves virulentes sur l'animal, pour des études d'extrapolation de l'efficacité vaccinale *in vitro* ou encore pour le séquençage. En outre, on conserve 4209 échantillons issus de six épreuves virulentes sur l'animal effectuées afin d'évaluer l'efficacité des antiviraux. Ces échantillons seront conservés jusqu'à ce qu'il ait été répondu de manière satisfaisante à toutes les questions ou préoccupations pertinentes des organismes de réglementation (par exemple la Food and Drug Administration pour ce qui est des États-Unis). L'augmentation d'un facteur 22 de la quantité de matériel d'ensemencement, de matériel de travail et de prélèvements de plages résulte, pour 46 %, de la constitution d'aliquotes à usage unique destinées au criblage des antiviraux ou à des études sur l'efficacité des vaccins. Ces aliquotes de faible titre à usage unique permettent de mieux uniformiser l'expérimentation et de limiter le nombre de cycles de congélation-décongélation auxquels est soumis le virus.

Seuls les membres du personnel des CDC qui sont dûment autorisés ont accès à ce matériel biologique. Toutes ces personnes ont reçu une formation pratique complète en matière de sécurité et de sûreté biologiques. L'accès au conservatoire est encore plus restreint. Un inventaire du matériel biologique est effectué chaque année et la pratique actuelle consiste, une fois l'inventaire achevé, à munir les boîtes d'un indicateur d'effraction.

Tableau 4.8 Sélection du stock de travail des CDC : identification du matériel viral varicelleux viable

Isolement	Laboratoire d'origine	Date d'isolement	Pays ^a	Région	Passages originaux antérieurs	Situation actuelle
Minnesota 124	USAMRIID	5 févr. 1939	États-Unis	Amérique du Nord	123 MCA (Nelson), Deterick 1 MCA = 124 MCA (26 mars 1958)	Matériel d'ensemencement (E124;BSC40p2)
Yamada MS-2(A) Tokyo strain	USAMRIID	1946	Japon	Asie	2 MCA (Hahon), Detrick 2 MCA = 4 MCA (3 nov. 1958)	Matériel d'ensemencement (E4;BSC40p2)
Kim E-316 (2), Souche mère	USAMRIID	1946	Corée ^b	Asie	2 MCA (Kempe), Detrick 1 MCA = 3 MCA (18 févr. 1958)	Non viable
Hinden	Porton Down, Royaume-Uni	1946	Royaume-Uni	Europe	E2	Matériel d'ensemencement (E2;BSC40p2)
Harvey	Porton Down, Royaume-Uni	1946	Royaume-Uni, importé	Europe	E1	Matériel d'ensemencement (E1; BSC40p2)
Lee, Souche mère	USAMRIID	1947	Corée ^b	Asie	2 MCA (Kempe), Detrick 2 MCA = 4 MCA (15 sept. 1958)	Matériel d'ensemencement (E4;BSC40p2)
Juba	Porton Down, Royaume-Uni	7 oct. 1947	Soudan	Afrique	E8	Matériel d'ensemencement (E8;BSC40p2)
Rumbec	Porton Down, Royaume-Uni	1947	Soudan	Afrique	E7	Matériel d'ensemencement (E7;BSC40p2)
Higgins	Porton Down, Royaume-Uni	5 avr. 1947	Staffordshire, Royaume-Uni	Europe	Inconnus	Matériel d'ensemencement (?;BSC40p2)
Horn (Sabin Lab)	USAMRIID	Avant 1948	Chine	Asie	2 (?) MCA (Shabel), Detrick 2 MCA = 4 MCA (4 juin 1959)	Matériel d'ensemencement (E4;BSC40p2)
Harper, Souche mère	USAMRIID	Avant 1951	Japon	Asie	3 MCA (Hahon), 2 MCA Detrick = 5 MCA (25 juil. 1958)	Matériel d'ensemencement (E5;BSC40p2)
Stillwell, Souche mère	USAMRIID	Avant 1951	Japon	Asie	6MCA (Hahon)	Matériel d'ensemencement (E6, BSC40p2)
BUT (Butler)	Porton Down, Royaume-Uni	1952	Royaume-Uni	Europe	E8	Matériel d'ensemencement (E8;BSC40p2)
Kali-Muthu M 50	USAMRIID	5 sept. 1953	Inde	Asie	Matériel orig. #2228 dans homogénéisat de croûtes de Locke du 13 janv. 1958	Matériel d'ensemencement (BSC40p3)
New Delhi	USAMRIID	1953	Inde	Asie	2 MCA (Kempe), Detrick 3 MCA = 5 MCA (23 juin 1959)	Matériel d'ensemencement (E5;BSC40p2)
Nigeria – Kudano	Porton Down, Royaume-Uni	Juin 1961	Nigéria	Afrique	Croûte	Non viable

Tableau 4.8 Sélection du stock de travail des CDC : identification du matériel viral variolique viable (*suite*)

Isolement	Laboratoire d'origine	Date d'isolement	Pays ^a	Région	Passages originaux antérieurs	Situation actuelle
696 Madras DJB	Porton Down, Royaume-Uni	1963	Inde	Asie	Croûte	Non viable
7125	Porton Down, Royaume-Uni	1964	Inde	Asie	E4	Matériel d'ensemencement (E4; BSC40p2)
7124	Porton Down, Royaume-Uni	1964	Inde	Asie	E4	Matériel d'ensemencement (E4; BSC40p2)
102	Porton Down, Royaume-Uni	12 avr. 1965	Afrique du Sud	Afrique	E1	Matériel d'ensemencement (E1;BSC40p2)
103	Porton Down, Royaume-Uni	14 avr. 1965	Afrique du Sud	Afrique	E1	Matériel d'ensemencement (E1, BSC40p2)
Kembula	Porton Down, Royaume-Uni	Sept. 1965	Tanzanie ^c	Afrique	Croûte	Matériel d'ensemencement (BSC40p2)
Garcia, Brésil (Mineure)	CDC	1966	Brésil	Amérique du Sud	E3 1.00E-01	Stock de travail (E3;BSC40p3)
v66-39	CDC	5 ju 1966	Brésil	Amérique du Sud	E1 de l'isol. de S. Silva/J. Noble jour 4 de l'éruption	Matériel d'ensemencement (E1; BSC40p2)
K1629	Porton Down, Royaume-Uni	6 mai 1967	Koweït	Moyen-Orient	E5	Matériel d'ensemencement (E5;BSC40p2)
V68-59	CDC	10 avr. 1968	Dahomey ^d	Afrique	E1	Matériel d'ensemencement (E1;BSC40p2)
Rafiq Lahore	Porton Down, Royaume-Uni	3 mars 1969	Pakistan	Asie	Croûte	Matériel d'ensemencement (BSC40p3)
V68-258	CDC	2 janv. 1969	Sierra Leone	Afrique	E4 1.00E-01	Matériel d'ensemencement (E4;BSC40p2)
Congo V70-46	CDC	12 mars 1970	Zaire ^e	Afrique	E1 1.00E-01	Stock de travail (E1;BSC40p3)
Variolateur afghan 4	Porton Down, Royaume-Uni	18 mars 1970	Afghanistan	Moyen-Orient	Croûte	Matériel d'ensemencement (BSC40p2)
V70-222	CDC	17 oct. 1970	Indonésie	Asie	E1 1.00E-01	Matériel d'ensemencement (E1;BSC40p2)
V70-228	CDC	26 oct. 1970	Indonésie	Asie	E1 1.00E-01	Matériel d'ensemencement (E1; BSC40p2)

Tableau 4.8 Sélection du stock de travail des CDC : identification du matériel viral variolique viable (*suite*)

Isolement	Laboratoire d'origine	Date d'isolement	Pays ^a	Région	Passages originaux antérieurs	Situation actuelle
V72-119	CDC	6 avr. 1972	Syrie ^f	Moyen-Orient	E1 1.00E-01	Matériel d'ensemencement (E1;BSC40p2)
V72-143	CDC	26 avr. 1972	Botswana	Afrique	E1 1.00E-01	Matériel d'ensemencement (E4; BSC40p2)
Eth16 R14-1X-72	Porton Down, Royaume-Uni	29 août 1972	Éthiopie	Afrique	Croûte	Matériel d'ensemencement (BSC40p3)
Eth17 R14-1X-72	Porton Down, Royaume-Uni	29 août 1972	Éthiopie	Afrique	Croûte	Matériel d'ensemencement (BSC40p3)
V73-225	CDC	8 oct. 1973	Botswana	Afrique	E1 1.00E-01	Matériel d'ensemencement (E1;BSC40p2)
V73-175	CDC	26 juil. 1973	Népal	Asie	E1 1.00E-01	Matériel d'ensemencement (E1; BSC40p2)
Nur Islam	Porton Down, Royaume-Uni	1974	Bangladesh	Asie	Croûte	Matériel d'ensemencement (BSC40p2)
Shahzaman	Porton Down, Royaume-Uni	1974	Bangladesh	Asie	Croûte	Matériel d'ensemencement (BSC40p3)
Solaiman	Porton Down, Royaume-Uni	1974	Bangladesh	Asie	Croûte	Matériel d'ensemencement (BSC40p2)
BSH V75-550 'Bangladesh'	CDC	24 nov. 1975	Bangladesh	Asie	E1 1.00E-01	Stock de travail (BSC40p6)
V77-1252	CDC	19 mai 1977	Somalie	Afrique	E1 1.00E-01	Matériel d'ensemencement (E1, BSC40p2)
V77-1605	CDC	9 août 1977	Somalie	Afrique	E1 1.00E-01	Matériel d'ensemencement (E1; BSC40p2)
V77-2479 (Ali Maow Maalin) 'Somalia'	CDC	10 nov. 1977	Somalie	Afrique	E2 1.00E-02	Stock de travail (E2; BSC40p3)
AR1, recombinant alastrim/variole du lapin	Porton Down, Royaume-Uni	Données publiées en 1964	Souche de laboratoire	Sans objet	Inconnus	Extraits d'acide nucléique

Tableau 4.8 Sélection du stock de travail des CDC : identification du matériel viral variolique viable (*suite*)

Isolement	Laboratoire d'origine	Date d'isolement	Pays ^a	Région	Passages originaux antérieurs	Situation actuelle
VC13, recombinant var/variole bovine	Porton Down, Royaume-Uni	Données publiées en 1964	Souche de laboratoire	Sans objet	Inconnus	Extraits d'acide nucléique
Heidelberg	USAMRIID	Inconnue	Allemagne	Europe	Detrick ISOL (croûte), 1 stock MCA date 24 mai 1960	Matériel d'ensemencement (E1;BSC40p2)
Congo 9 (Gispen) V74-227	CDC	1974	Zaïre ^e	Afrique	E1 1.00E-01	Matériel d'ensemencement (E1;BSC40p2)
Northern Indian (Inde du Nord), Souche mère	USAMRIID	Inconnue	Inde du Nord	Asie	30 MCA (Nelson), Detrick 3 MCA = 33 MCA (14 juil. 1958)	Non viable
Iran 2602	Porton Down, Royaume-Uni	Inconnue	Iran	Moyen-Orient	E5	Matériel d'ensemencement (E5;BSC40p2)

MCA : membrane chorioallantoïdienne ; CDC, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia ; USAMRIID, United States Army Medical Research Institute for Infectious Diseases.

^a Les noms des pays sont ceux qui étaient utilisés au moment de l'isolement de la souche.

^b Nom actuel du pays inconnu.

^c Maintenant République-Unie de Tanzanie.

^d Maintenant Bénin.

^e Maintenant République démocratique du Congo.

^f Maintenant République arabe syrienne.

À l'heure actuelle, les CDC détiennent de l'acide nucléique du virus variolique représentatif des génomes qui ont été séquencés et quelques autres virus. Ce matériel biologique, dont les Tableaux 4.9 et 4.10 donnent la description, est détenu sous la forme de matériel génomique pleine longueur ainsi que sous la forme de collections plasmidiques ou d'amplicons LPCR. Il est référencé dans une base de données sécurisée dont l'accès est protégé par un mot de passe et seuls quelques participants au programme peuvent y accéder. Actuellement, sont archivés les plasmides ou les amplicons LPCR représentant neuf des souches séquencées provenant de la collection du centre collaborateur OMS situé aux États-Unis. À noter que les 47 virus de la collection qui ont été séquencés ont tous été utilisés pour valider des tests de diagnostic basés sur l'acide nucléique viral. Il pourrait s'avérer nécessaire de produire des fragments génomiques plasmidiques, LPCR ou autres, représentatifs des différents génomes dans l'éventualité de la destruction des stocks de virus variolique et de l'ADN viral intact. Dans la recherche des meilleurs moyens d'archiver ce matériel biologique, il faut tenir compte du taux de mutation imputable aux stratégies d'amplification génique, de la stabilité des diverses méthodes d'archivage génomique et du travail qu'impliquent les diverses méthodes possibles.

Tableau 4.9 Liste des ADN pleine longueur du virus variolique détenus aux CDC

N°	Souche	Région	Pays d'origine ^a	Année d'isolement
1	102	Afrique	Natal, Ingwavuma, Afrique du Sud	1965
2	103	Afrique	Transvaal, Nelspruit, Afrique du Sud	1965
3	66-39	Amérique du Sud	Brésil	1966
4	68-59	Afrique	Dahomey ^b	1968
5	68-258	Afrique	Sierra Leone	1969
6	69-1	Afrique	Niger	1969
7	69-5	Afrique	Guinée	1969
8	70-222	Asie	Indonésie	1970
9	70-228	Asie	Indonésie	1970
10	7124	Asie	Inde	1964
11	7125	Asie	Inde	1964
12	72-119	Moyen-Orient	Syrie ^c	1972
13	72-143	Afrique	Botswana	1972
14	72-164	Europe	Yougoslavie ^d	1972
15	73-175	Asie	Népal	1973
16	73-225	Afrique	Botswana	1973
17	74-227	Afrique	Zaïre ^e	1974
18	77-1252	Afrique	Somalie	1977
19	77-1605	Afrique	Somalie	1977
20	Variolateur afghan 4	Moyen-Orient	Afghanistan	1970
21	AR1	Sans objet	Souche de laboratoire	Publication en 1964
22	Ashiq	Moyen-Orient	Pakistan	1969
23	Aslam	Moyen-Orient	Pakistan	1969
24	BSH	Asie	Bangladesh	1975
25	Bombay	Asie	Inde	1958
26	Brazil Garcia	Amérique du Sud	Brésil	1966
27	Butler	Europe	Royaume-Uni	1952
28	Congo V70-46	Afrique	Zaire ^e	1970
29	Djib	Afrique	Djibouti	1971
30	ETH 16	Afrique	Éthiopie	1972
31	ETH 17	Afrique	Éthiopie	1972

Tableau 4.9 Liste des ADN pleine longueur du virus variolique détenus aux CDC (*suite*)

N°	Souche	Région	Pays d'origine ^a	Année d'isolement
32	Farid	Moyen-Orient	Pakistan	1969
33	Harper	Asie	Japon	1951
34	Harvey	Europe	Royaume-Uni	1946
35	Heidelberg	Europe	Allemagne	Inconnue
36	Higgins	Europe	Royaume-Uni	1947
37	Hinden	Europe	Royaume-Uni	1947
38	Horn	Asie	Chine	pre-1948
39	Iran 2602	Moyen-Orient	Iran	Inconnue
40	Juba	Afrique	Soudan	1947
41	Kembula	Afrique	Tanzanie ^f	1965
42	K1629	Moyen-Orient	Koweït	1967
43	Kali Mathu	Asie	Inde	1953
44	A. Mannan	Asie	Bangladesh	1974
45	Minnesota 124	Amérique du Nord	États-Unis	1939
46	Misba	Moyen-Orient	Pakistan	1970
47	M.S. Lee	Asie	Corée ^d	1947
48	New Delhi	Asie	Inde	1953
49	Nigeria Kudano	Afrique	Nigéria	1961
50	Nur Islam	Asie	Bangladesh	1974
51	Parker	Europe	Royaume-Uni	1978
52	Parvin	Asie	Bangladesh	1974
53	Rafiq Lahore	Moyen-Orient	Pakistan	1969
54	Ramjan	Moyen-Orient	Pakistan	1970
55	Rafiq	Moyen-Orient	Pakistan	1969
56	Shahzaman	Asie	Bangladesh	1974
57	Solomain	Asie	Bangladesh	1974
58	Somalie	Afrique	Somalie	1977
59	Stillwell	Asie	Japon	1951
60	VC13	Sans objet	Souche de laboratoire	Publication en 1964
61	Yamada	Asie	Japon	1946

^a Les noms des pays sont ceux qui étaient utilisés au moment de l'isolement de la souche.

^b Maintenant Bénin.

^c Maintenant République arabe syrienne.

^d Nom actuel du pays inconnu.

^e Maintenant République démocratique du Congo.

^f Maintenant République-Unie de Tanzanie.

Tableau 4.10 Liste des souches de virus variolique des CDC utilisées pour créer des collections d'amplicons et de plasmides

Région géographique où la souche a été isolée	Pays où la souche a été isolée	Souche	Année de l'isolement	Type épidémiologique	Type de collection	Nombre de flacons
Asie	Bangladesh	BSH	1974	Variole majeure	Plasmides	250
Europe	Royaume-Uni	Butler	1952	Variole mineure alastrim	Plasmides	110
Afrique	République démocratique du Congo	Congo	1970	Variole majeure	Plasmides	180
Amérique	Brésil	Brazil Garcia	1966	Variole mineure alastrim	Plasmides	135
Europe	Royaume-Uni	Harvey	1946	Variole majeure	Plasmides	100
Asie	Chine	Horn	pre-1948	Variole majeure	Amplicons	48
Asie	Inde	7124	1964	Variole majeure	Amplicons	134
Asie	Népal	73–175	1973	Variole majeure	Amplicons	127
Afrique	Somalie	Somalia	1977	Variole majeure	Plasmides	100

Les CDC ont fourni des fragments de virus variolique à un certain nombre de chercheurs extérieurs conformément aux protocoles approuvés par l'OMS et les CDC/Département de la Santé et des Services humains des États-Unis (HHS) concernant la distribution de l'acide nucléique du virus variolique et en application des recommandations formulées par l'OMS au sujet de son usage.¹¹ Ces fournitures sont indiquées au Tableau 4.11.

¹¹ <http://www.who.int/csr/disease/smallpox/research/en/index.html>.

Tableau 4.11 Fragments de virus variolique fournis à des chercheurs extérieurs

Institut, pays	Autorisation de l'OMS accordée (oui/non)	Souche	Gène(s)	Date de la demande	Exécution achevée	Expédition
Cornell University, États-Unis	Oui	BSH75 Horn Heidelberg V73-175 102 Nur Islam Shahzaman Solaiman	RAP94 RPO147	20 janv. 2008	15 mai 2008	Date non disponible
University of Florida, États-Unis	Oui	Bangladesh	G1R	24 avr. 2007	10 juin 2008	24 juin 2008
University of Medicine and Dentistry of New Jersey, États-Unis	Oui	Bangladesh	D9R	12 juil. 2006	Date non disponible	30 janv. 2008
University of California, États-Unis	Oui	Bangladesh	D1L E7L A27L A39L B2L B3L B4L B9R B10R B14R B19R B20R B22R	3 août 2006	Oct. 2006	23 oct. 2006
NIH, États-Unis	Oui		A24R	20 avr. 2005	16 août 2005	Date non disponible
Instituto Cantonale di Microbiologia, Suisse	Oui	Bangladesh	J9R B10R B11R	29 avr. 2005	1 juin 2006	26 juil. 2006
USAMRIID, États-Unis	Oui	Bangladesh Garcia	M1R B6R A36R A31L	2 avr. 2004	1 juin 2006	Août 2006
University of Pennsylvania, États-Unis	Oui	Bangladesh	A31L A18L A36R B6R F8L I3L M1R C13L	26 janv. 2005	Date non disponible	Date non disponible

Tableau 4.11 Fragments de virus variolique fournis à des chercheurs extérieurs (*suite*)

Institut, pays	Autorisation de l'OMS accordée (oui/non)	Souche	Gène(s)	Date de la demande	Exécution achevée	Expédition
Myriad Genetics, Inc, États-Unis	Oui	Bangladesh	B8L C18L A27L A39L B4L B9R B11R:B10R B12R:B11R B14L B22R:B19R C13L:B20R B22R G3R:G1R, G2R	8 déc. 2004	Juin 2006	23 oct. 2006
Centro Nacional de Biotecnología, Espagne	Oui	Bangladesh	B8R B17R D7L G2R G3R A44L P1L D4R D15L A41L	23 juil. 2003	22 sept. 2004	20 juil. 2006
Finlande	Oui	Bangladesh	D12R B7R	7 sept. 2001	Date non disponible	Date non disponible
AFIP, Washington, DC, États-Unis	Oui	Bangladesh	L2R B8R G2R J7R E9L L6R A25R	Nov. 2001	19 févr. 2002	Date non disponible

Tableau 4.11 Fragments de virus variolique fournis à des chercheurs extérieurs (*suite*)

Institut, pays	Autorisation de l'OMS accordée (oui/non)	Souche	Gène(s)	Date de la demande	Exécution achevée	Expédition
USAMRIID, États-Unis	Oui	Bangladesh	D8L-D10L D16L-D18L	8 janv. 2002	22 févr. 2002	Date non disponible
		Bangladesh Garcia	C7L M1R I5R F8L A14L A26L-A28L A34R A36R-A37R A40R A47-A48L J6R-J7R B3L B9L-B10L B19L-B20L B22R G1R G3R-G4R B6R L2R B8R G2R J7R E9L L6R A25R A31L	Janv. 2005	Juin 2006	Août 2006
Dana-Farber Cancer Institute, Harvard Medical School, États-Unis	Oui	Bangladesh	D4R C9L A46R J7R B6R	Nov. 2001	Janv. 2002	Date non disponible
San Jose State University, États-Unis	Oui	Bangladesh	A41-A44	15 août 1996	Août 1997	Date non disponible
AFIP, États-Unis	Oui	Bangladesh	J7R E9L G1R	Janv. 1999	Févr. 1999	Date non disponible
DSTL, Porton Down, Royaume-Uni	Oui	V74-227 (Congo) Solaiman Butler	P1L (BSH homolog) C3L (BSH homolog) A14L (BSH homolog) A36R A38R B6R B17R	Oct. 2001	Date non disponible	29 avr. 2003

Tableau 4.11 Fragments de virus variolique fournis à des chercheurs extérieurs (*suite*)

Institut, pays	Autorisation de l'OMS accordée (oui/non)	Souche	Gène(s)	Date de la demande	Exécution achevée	Expédition
Harvard Medical School, États-Unis	Oui	Bangladesh	Gène TK	Janv. 2003	Date non disponible	8 mai 2003
INSERM, France	Oui	Bangladesh	Fragment Sacl Fragment BstEII D	Avr. 2003	Août 2004	27 août 2004
CRSSA Emile Pardé, France	Oui	Bangladesh Garcia	A31L K9R C9L	Juil. 2003	Oct. 2003	Févr. 2004
Université de l'Alberta, Canada	Oui	Bangladesh	E9L	Mai 2004	Mai 2004	24 août 2004
23 laboratoires aux États-Unis	Oui	Bangladesh	2 <500 inserts nucléotidiques	Date non disponible	Date non disponible	Date non disponible

AFIP, Armed Forces Institute of Pathology ; CRSSA : Centre de Recherche du Service de Santé des Armées ; DSTL, Defence Science and Technology Laboratory ; INSERM, Institut national de la Santé et de la Recherche médicale ; NIH, National Institutes of Health ; USAMRIID, United States Army Medical Research Institute for Infectious Diseases.

Des rapports écrits officiels concernant les conservatoires, leur usage et leur situation ont été communiqués à l'OMS en juin 1997 (rapport sur l'usage des conservatoires de 1979 à 1997) et en 1998. Depuis 1999, ces rapports ont été communiqués régulièrement sous forme résumée, sous forme de bases de données électroniques et de communications orales à l'occasion de la réunion du Comité spécial de l'OMS sur les Orthopoxviroses (1999) et, ultérieurement, lors des réunions annuelles du Comité consultatif OMS de la Recherche sur le Virus variolique (2000-2008). Les résumés les plus récents de ces rapports sont disponibles sur le site Internet de l'OMS.¹²

Aux CDC, tous les travaux portant sur des virus varioliques vivants sont effectués dans des installations opérant au niveau 4 de sécurité biologique, installations qui sont inspectées régulièrement par les autorités locales et fédérales (au niveau fédéral, dans le cadre du HHS Select Agent and Toxins Program) ainsi que par les autorités internationales (OMS), afin d'assurer le niveau le plus élevé possible en matière de sûreté et de sécurité biologiques.

¹² <http://www.who.int/csr/disease/smallpox/research/en/index.html>.

Abréviations

ADN	acide désoxyribonucléique
CDC	Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia
LPCR	réaction de polymérisation en chaîne longue
MCA	membrane chorioallantoïdienne
OMS	Organisation mondiale de la Santé
IRPV	Institut de Recherche sur les Préparations virales
VECTOR	Centre de Recherche d'État en Virologie et Biotechnologie de la Fédération de Russie

Références bibliographiques

Esposito JJ et al. (2006). Genome sequence diversity and clues to the evolution of variola (smallpox) virus. *Science*, 313: 807–812.

Li Y et al. (2007). On the origin of smallpox: correlating variola phylogenics with historical smallpox records. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104: 15787–15792.

Olson VA et al. (2009). Smallpox virus plaque phenotypes: genetic, geographical and case fatality relationships. *The Journal of General Virology*, 90: 792–798.

5. Modèles animaux et pathogenèse

Peter B. Jahrling¹

¹ Integrated Research Facility, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Frederick, États-Unis d'Amérique

Résumé d'orientation

Importance pour la santé publique

On s'accorde largement à reconnaître que le virus variolique est susceptible d'être utilisé comme arme terroriste. En outre, la réapparition de l'orthopoxvirose simienne en tant que problème de santé publique en République démocratique du Congo rend d'autant plus urgente la mise au point de contre-mesures, et en particulier de vaccins et d'antiviraux pour lutter contre ces orthopoxvirus. Il est généralement admis que des modèles animaux seront nécessaires pour démontrer l'efficacité de ces contre-mesures, aussi le présent chapitre est-il consacré à ceux de ces modèles qui peuvent être utiles à l'étude des orthopoxviroses.

Bilan des progrès réalisés

L'utilisation de modèles constitués de petits animaux pour étudier les virus de l'ectromélie (variole de la souris), de la variole bovine, de la variole du lapin et de la vaccine a permis d'éclairer la pathogénèse et l'immunologie des poxviroses. Les connaissances ainsi acquises ont servi de base à la conception d'études décisives portant sur des primates. C'est l'expérimentation sur des primates à l'aide de virus varioliques ou de virus de l'orthopoxvirose simienne qui est la plus utile pour la mise au point de moyens sûrs et efficaces pour contrer la variole humaine.

Les enjeux actuels

En combinant de diverses manières les doses de virus variolique et les voies d'exposition, on peut obtenir chez des primates (singes cynomolgus) des tableaux cliniques prévisibles qui reproduisent certaines caractéristiques de la variole humaine, mais pas toutes. Ces modèles doivent encore être améliorés mais ils ont tout de même permis de mettre en évidence l'efficacité de plusieurs antiviraux expérimentaux, notamment le cidofovir et le ST-246. Il est probable qu'on ne trouvera aucun ensemble de pathologies qui permettent d'établir un modèle capable de répondre simultanément à tous les critères énumérés dans la réglementation relative aux essais sur l'animal (« *Animal rule* ») de la Food and Drug Administration des États-Unis (US 21CFR310.610) ; différents modèles peuvent être nécessaires pour évaluer les différentes indications. Des études basées sur la télémétrie et l'imagerie médicale pourraient fournir des données pathophysiologiques susceptibles d'affiner encore nos modèles animaux. Il conviendrait également de s'intéresser tout particulièrement à la recherche de biomarqueurs qui pourraient être utilisés en clinique pour déclencher une intervention précoce, ce qui en augmenterait les chances de succès et faciliterait l'homologation des contre-mesures. Si une grande partie de ce travail de mise au point peut être effectuée en substituant d'autres orthopoxvirus au virus variolique pour les études sur rongeurs ou primates, ce n'est qu'en effectuant des tests d'efficacité sur des primates avec le virus variolique lui-même que l'on pourra renforcer la confiance dans la validité de ces contre-mesures.

5.1 Introduction

Bien que la variole ait été éradiquée, son virus reste un sujet de préoccupation pour la santé publique car des stocks clandestins pourraient se trouver aux mains de bioterroristes (Henderson et al., 1999). Si une attaque au moyen de ce virus venait à se produire dans la population humaine, les conséquences en seraient encore plus catastrophiques aujourd'hui qu'au siècle passé : en effet, les programmes de vaccination antivariolique ont été abandonnés partout dans le monde vers 1976, la prévalence des cas d'immunodépression a augmenté dans la population et la mobilité plus grande des personnes (notamment du fait du transport aérien intercontinental) a accéléré le rythme de propagation des virus à l'échelle planétaire. C'est pour toutes ces raisons que des investissements très importants sont consacrés à la mise au point de contre-mesures susceptibles de faire obstacle à la variole, notamment sous la forme de vaccins et de médicaments antiviraux (LeDuc & Jahrling, 2001).

Pour mettre au point et homologuer ces contre-mesures, il faudra disposer de modèles animaux sur lesquels mettre en évidence leur efficacité protectrice. Ces modèles devront reproduire fidèlement la maladie humaine et l'idéal serait qu'on puisse travailler sur eux avec le véritable agent étiologique, à savoir le virus variolique, plutôt qu'avec un virus de substitution. Certes, pour une part importante de ce travail de développement, on peut expérimenter sur des rongeurs et des primates avec d'autres orthopoxvirus, mais ce n'est qu'en effectuant des tests d'efficacité sur des primates avec le virus variolique lui-même que l'on pourra renforcer la confiance dans la validité des contre-mesures.

5.2 Modèles animaux

Le fait que le virus variolique n'est naturellement infectieux que pour l'espèce humaine fait obstacle à la mise au point de modèles animaux de la variole humaine utilisant ce virus. Expérimentalement, il est possible d'infecter divers animaux de laboratoire à l'aide du virus variolique, mais l'infection ne provoque pas de maladie systémique mortelle (Fenner et al., 1988), sauf chez des singes, comme l'ont montré de récentes études (Jahrling et al., 2004). Il est souhaitable de continuer à affiner le modèle primate de la variole humaine, notamment en ce qui concerne la voie d'exposition aérogène qui est la voie naturelle (USFDA, 2009).

Le présent chapitre s'intéresse aux modèles animaux d'orthopoxviroses qui pourraient se révéler prometteurs pour la mise au point de mesures destinées à contrer la variole. C'est l'utilisation du virus variolique ou de celui de l'orthopoxvirose simienne sur modèle primate qui offre le plus d'intérêt à cet égard et qui pourrait également donner des indications sur la pathophysiologie de la variole humaine. Cela étant, les études sur primates sont coûteuses et l'utilisation de virus varioliques exige de travailler au niveau de sécurité et de sûreté biologiques maximal (niveau 4, NSB-4). Le virus ne peut être détenu que dans les deux centres collaborateurs de l'OMS (Organisation mondiale de la Santé) désignés à cet effet – les Centers for Disease Control and Prevention (CDC) d'Atlanta aux États-Unis et le Centre de Recherche d'État en Virologie et Biotechnologie VECTOR en Fédération de Russie. Les restrictions sont moindres concernant le virus de l'orthopoxvirose simienne, mais les études sur ce virus obligent tout de même à travailler en milieu confiné au niveau 3 de sécurité biologique (NSB-3), et il est considéré par le Department of Health and Human Services des États-Unis comme un « Select Agent », ce qui signifie que son utilisation comporte des restrictions (US Department of Health and Human Services, 2005). Du fait de ces restrictions, l'utilisation de petits animaux pour modéliser les orthopoxviroses avec, notamment, le virus de l'ectromélie, le virus de la variole bovine, le virus de la variole du lapin et celui de la vaccine a toute sa place dans l'action menée pour élaborer des contre-mesures face aux agents pathogènes pour l'homme.

Il faut que les modèles animaux d'orthopoxviroses permettent d'étudier l'équilibre critique entre l'interaction directe du virus avec les cellules cibles de l'hôte et la réponse immunitaire protectrice. Plus que la majorité des autres virus pathogènes, les poxvirus expriment

diverses protéines immunomodulatrices ainsi que des inhibiteurs de l'apoptose qui sont susceptibles de faire pencher la balance en faveur de la virulence. Certaines de ces interactions entre le virus et son hôte peuvent être propres à une espèce et ne pas être généralisables avec certitude à d'autres espèces.

Pour une grande part, ce que l'on sait de la pathogenèse du virus variolique provient d'études sur le modèle souris-virus de l'ectromélie (Buller & Palumbo, 1991). Le virus de l'ectromélie est un agent pathogène naturel de la souris et, après sa découverte dans les années 1930, Fenner a utilisé ce modèle pour élucider la notion de virémie primaire et secondaire qui est l'équivalent d'une maladie exanthématique chez l'être humain (Fenner, 1948). Dans les années 1970, on a utilisé des modèles virus de l'ectromélie-souris pour mettre en évidence le rôle des cellules T et des macrophages dans l'immunité à médiation cellulaire et la guérison d'une affection aiguë. Au cours des années 1980, des infections de souris consanguines par le virus de l'ectromélie ont été utilisées pour identifier les déterminants génétiques de la résistance et de la sensibilité (Buller, 1985 ; Buller & Palumbo, 1991). Plus récemment, l'obtention de diverses souches de souris consanguines dites knock-out a facilité l'étude des relations virus-hôte.

Une description détaillée de l'immunobiologie des orthopoxviroses sortirait du cadre du présent chapitre.

La sensibilité au virus de l'ectromélie est déterminée par la génétique et celle-ci est complexe. La souche de souris C57BL/6 est relativement résistante avec une DL_{50} de plus de 10^6 unités formatrices de plages (UFP) par inoculation dans le coussinet plantaire. Pour la souche A/J en revanche, la DL_{50} est inférieure à 0,01 UFP (Buller, 1985). La résistance génétique est liée pour une part à la voie de l'exocytose granulaire des cellules T effectrices (Müllbacher et al., 1999). Comme les souris A/J, les souris des souches BALB/c et DBA/2 sont très sensibles à une exposition dermique au virus ou encore sous la forme d'aérosol. La résistance et la sensibilité peuvent également varier selon la souche virale.

Chez les souris sensibles au virus de l'ectromélie, l'infection est déclenchée par abrasion de la peau. Le virus se réplique localement puis migre vers les organes internes par les vaisseaux lymphatiques afférents, les ganglions lymphatiques drainant le site d'infection et le courant sanguin (virémie primaire). Le virus se multiplie dans les principaux organes, notamment le foie et la rate, ce qui entraîne une virémie secondaire en l'espace de quatre à cinq jours. Selon l'espèce murine utilisée, la réplication du virus dans la peau peut conduire à un exanthème dès les six premiers jours suivant l'exposition. Chez la souris A/J, la mort survient avant l'apparition de l'exanthème, par suite d'une nécrose hépatique massive. L'exposition à des aérosols conduit à une pneumopathie primitive sévère.

On a récemment fait appel à un modèle souris A/J-virus de l'ectromélie pour évaluer l'efficacité de divers analogues du cidofovir, un antiviral, contre une infection mortelle (Buller et al., 2004). Dans cette étude, le dérivé octadécyloxyéthylé du cidofovir, administré par voie orale, a protégé 100 % des souris soumises à une épreuve virulente sous forme d'aérosol à la dose mortelle de $2,3 \times 10^4$ UFP, et il a complètement bloqué la réplication virale dans la rate et le foie. Dans les mêmes conditions, le cidofovir non modifié n'a eu aucune efficacité.

Le virus de la vaccine infecte aussi la souris. L'issue de l'infection dépend du patrimoine génétique de la souris, de la souche de virus vaccinal, de la dose et de la voie d'exposition. L'infection de souris C57BL/6 au moyen de la souche vaccinale Western Reserve (WR) par voie intranasale avec des doses supérieures à 10^4 UFP est mortelle pour ces animaux (Brandt & Jacobs, 2001). Ce modèle a été utilisé pour montrer que le gène *E3L* du virus vaccinal, qui exprime la résistance à l'interféron (IFN) *in vitro*, est nécessaire à la pathogenèse chez l'animal intact. La souris BALB/c est un peu plus résistante au virus de la vaccine, encore qu'on n'ait pas publié de comparaison en tête à tête. Chez la souris BALB/c,

la létalité de l'infection par le virus vaccinal dépend de la dose : dans une étude, une dose de 10^7 UFP s'est révélée mortelle à 100 %, alors qu'une dose de 10^4 UFP n'a tué que 20 % des souris (Alcami & Smith, 1992). On a également utilisé des souris BALB/c pour classer les souches de virus vaccinal par ordre de virulence. La souche du New York City Board of Health (souche NYCBH), avec une DL_{50} par voie intranasale de $10^{4,0}$ UFP, se révèle plus virulente que la souche WR pour laquelle la DL_{50} est de $10^{4,8}$ UFP. Aucune des souches n'a provoqué de maladie mortelle par scarification caudale ou encore par les voies sous-cutanée et orale (Lee et al., 1992). Le virus de la vaccine dérivé de la vaccine de Wyeth s'est montré moins virulent par voie intranasale ($DL_{50} > 10^7$ UFP).

On a utilisé des souris glabres SKH-1 pour obtenir des infections dermiques par le virus de la vaccine. Le nombre de lésions cutanées donne une indication de la gravité de l'infection systémique. Ce modèle a été utilisé pour montrer que le cidofovir à 5 % en application topique permet de réduire efficacement tant les lésions cutanées que la charge virale pulmonaire, rénale et splénique (Quenelle, Collins & Kern, 2004).

L'infection de souris BALB/c par voie intranasale avec le virus vaccinal WR provoque une pneumopathie, une perte de poids et la mort. L'administration de cidofovir (100 mg/kg par voie intrapéritonéale) à partir du jour suivant l'exposition intranasale a protégé la totalité des souris traitées ; en revanche, les témoins sous placebo sont tous morts dans les huit jours suivant l'exposition. Le cidofovir a sensiblement amélioré le niveau de consolidation pulmonaire et réduit la charge virale hépatique, splénique et cérébrale. Les titres maximaux étaient 30 à 1000 fois plus faibles que chez les témoins sous placebo (Smee, Bailey & Sidwell, 2001).

Des études similaires ont été effectuées avec la souche Brighton Red de virus de la variole bovine qui, dans des conditions bien définies, est mortelle pour les souris BALB/c (Bray et al., 2000). Le tableau clinique et la létalité après administration en aérosol ou par exposition intranasale varient en fonction de l'âge et du poids des souris ; une dose de 2×10^6 UFP a été mortelle pour 100 % des souris âgées de 4 semaines, à échéance moyenne de 8 jours, alors que 50 % seulement des souris âgées de 7 semaines ont succombé. Les souris infectées ont succombé à une pneumonie virale bilatérale avec une charge pulmonaire virale supérieure à 10^9 UFP /g. Ce modèle a été utilisé pour tester l'efficacité de plusieurs traitements destinés à protéger contre une maladie systémique. Des souris traitées par une dose unique de cidofovir administrée par voie intrapéritonéale (100 mg/kg) ont été protégées à 100 % contre une épreuve virulente par voie intranasale ($2-5 \times 10^6$ UFP) lorsque le médicament était pris 4 jours avant l'exposition et jusqu'à 4 jours après. Cinq jours ou plus après l'exposition, le médicament s'est révélé moins efficace (Robbins et al., 2005). En revanche, l'immunoglobuline antivaccine s'est montrée totalement impuissante à réduire la mortalité. L'interféron α (5×10^7 U/kg) s'est montré efficace avant l'exposition et un jour après, mais pas plus tard. La vaccination des souris par scarification caudale protégeait les souris lorsqu'elle était pratiquée 8 jours avant l'épreuve virulente ; elle était moins efficace si l'on réduisait cet intervalle et sans effet lorsqu'on vaccinait 2 jours après l'épreuve virulente. Cette observation ne cadre pas avec les données épidémiologiques selon lesquelles le vaccin serait efficace chez les sujets humains jusqu'à 4 jours après l'exposition. Cette différence s'explique peut-être par la dose plus élevée utilisée pour l'épreuve virulente et montre combien il est risqué d'extrapoler à l'homme les résultats obtenus sur modèles rongeurs.

Bien que les modèles murins soient capables d'ouvrir des pistes importantes concernant la virulence et les réponses immunitaires protectrices, les interactions virus-hôte doivent être évaluées individuellement et ne sauraient être généralisées (Müllbacher et al., 2004). C'est ainsi par exemple que le besoin en interféron γ après infection n'est pas le même pour le virus de l'ectromélie que pour celui de la vaccine. Chez des souris infectées par le virus de l'ectromélie, le transfert d'immunosplénocytes provenant de souris knock-out pour le gène de l'interféron γ (c'est-à-dire qui n'expriment pas cet interféron gamma) réduit très efficacement

le titre viral dans le foie et la rate ; par contre, dans une expérience similaire, des splénocytes immuns vis-à-vis du virus vaccinal se sont révélés inefficaces (Müllbacher & Blanden, 2004). Par conséquent, malgré la similitude apparente de ces deux modèles d'orthopoxviroses, on constate que la résolution de l'infection met en jeu chez l'hôte des réponses immunitaires diverses et à peu près imprévisibles. Les lymphocytes T cytolytiques peuvent avoir des fonctions bénéfiques, nocives ou neutres (Müllbacher et al., 2004), et le poids respectif des unes et des autres est propre à chaque système virus-hôte. Ce genre de difficulté est à prendre au sérieux lorsqu'on étudie hors de leurs hôtes naturels des agents pathogènes spécialisés comme les orthopoxvirus.

Des lapins exposés au virus de la variole du lapin sous forme d'aérosol présentent un syndrome morbide qui rappelle celui qu'on observe chez des sujets humains atteints de variole (Lancaster et al., 1966 ; Westwood et al., 1966). Dans ces études, la souche Utrecht de virus de la variole du lapin s'est montrée un peu plus virulente que la souche du Rockefeller Institute. La souche Utrecht a déterminé une infection mortelle chez des lapins blancs New Zealand, la mort survenant 7 à 12 jours après l'exposition. Des doses plus élevées se sont révélées encore plus foudroyantes alors qu'une seule particule virale ou guère plus avait suffi à provoquer l'infection. Les lapins restaient généralement en bonne santé pendant la période d'incubation de 4 à 6 jours, après quoi ils devenaient fébriles, s'affaiblissaient, perdaient rapidement du poids et présentaient d'abondantes décharges purulentes au niveau des yeux et du nez. Un érythème luisant a fait son apparition sur les lèvres et la langue en même temps qu'une éruption cutanée généralisée allant de quelques lésions dispersées à des lésions confluentes. Dans certains cas, la mort est survenue avant l'apparition de l'éruption. Les lésions se présentaient au début sous la forme de papules rouges évoluant ensuite vers des pseudo-pustules au contenu caséux. La mort est généralement survenue avant que de véritables croûtes cicatricielles ne se forment et elle s'est annoncée par une chute rapide de la température corporelle. Une charge virale importante a été observée dans tous les tissus viscéraux, culminant entre le 5^e et le 8^e jour, avec des titres de 10^8 UFP/g dans le poumon et de 10^7 UFP/g dans la rate et les surrénales. Dans certains cas, on a constaté une corrélation entre la mort prématurée des lapins et des anomalies de la coagulation sanguine (Boulter, Maber & Bowen, 1961), qui était analogues à la forme hémorragique de la variole humaine (Martin, 2002). Certaines constatations incitent également à penser que les lapins ne deviennent contagieux qu'aux stades tardifs de la maladie, malgré la présence de virus dans les liquides rhinopharyngés aux stades précoces, comme on l'observe dans la variole humaine.

Plus récemment, on a observé que l'inoculation intradermique du virus à des lapins débouchait sur un tableau clinique similaire (Adams, Rice & Moyer, 2007). Une dose de virus de 1×10^2 UFP administrée par voie intradermique provoque une infection systémique, mais il faut une dose plus élevée (5×10^3 UFP) pour entraîner la mort. Au départ, il y a une enflure au niveau du point d'injection suivie d'une nécrose dans les cinq jours qui suivent l'infection. La fièvre s'installe le 3^e jour, puis le rythme respiratoire s'accélère le 4^e jour. Le 7^e jour, on observe des lésions secondaires, notamment des décharges au niveau des yeux et du nez, qui s'accompagnent d'une perte de poids. Peu de temps avant la mort, le rythme respiratoire ralentit et la fréquence cardiaque augmente, puis une détresse respiratoire apparaît vers le 7^e ou le 8^e jour. Il y a des parallèles entre l'orthopoxvirose du lapin et la variole humaine.

Faute de réactifs et de souches consanguines de lapins, il est difficile de procéder à une analyse poussée de ces événements immunologiques ; c'est pourquoi on donne la préférence aux modèles murins. Cela dit, on peut maintenant étudier les gènes de virulence par manipulation génétique du virus de la variole du lapin et voir comment ces souches modifiées se comportent chez le lapin (McFadden, 2005a). De même, on pourrait éventuellement poursuivre le développement du modèle lapin/variole du lapin pour tester des agents thérapeutiques et des vaccins expérimentaux contre la variole humaine, ce qui serait un premier pas en vue de la priorisation des essais de ces agents sur les modèles primates existants.

Il importe de distinguer le virus de la variole du lapin, qui est une souche de virus vaccinal appartenant au genre *Orthopoxvirus*, du virus du myxome, qui appartient à un autre genre, celui des lépovipoxviridés. Bien que le virus du myxome provoque chez le lapin blanc New Zealand une maladie mortelle similaire en bien des points à la variole du lapin, ce virus est plus lointain des agents pathogènes humains, et il est donc moins intéressant comme modèle pour l'étude de la variole humaine que les systèmes dont il a été question plus haut.

Le virus de l'orthopoxvirose simienne (variole du singe) est un important agent pathogène de l'homme qui produit des signes et des symptômes analogues à ceux de la variole, encore que son potentiel de transmission interhumaine soit moindre (Fine et al., 1988 ; Jezek et al., 1988). On est fondé à penser que les souches de ce virus qui sont originaires d'Afrique de l'Ouest sont moins virulentes que celles qui se manifestent sporadiquement en Afrique centrale, en particulier en République démocratique du Congo (McFadden, 2005b). Les termes de « variole du singe » ou d'« orthopoxvirose simienne » ne semblent guère appropriés puisque le virus a pour réservoirs naturels des rongeurs et notamment des écureuils (Khodakevich, Jezek & Kinzanzka, 1986 ; Charatan, 2003). En 2003, ce virus a été importé par inadvertance aux États-Unis avec une cargaison de rongeurs originaires de la République du Ghana parmi lesquels se trouvait un rat géant de Gambie infecté (Perkins, 2003 ; Ligon, 2004). Le rat a infecté un certain nombre de chiens de prairie qui étaient détenus au même endroit, et il en est résulté la contamination en chaîne de centaines de ces animaux et une propagation du virus qui a fait au moins 75 cas humains dans 11 États. Cette flambée d'orthopoxvirose simienne a suscité un regain d'intérêt pour le virus, non seulement en vue d'utiliser la maladie comme substitut à la variole mais aussi pour cette pathologie en elle-même.

L'infection expérimentale d'écureuils terrestres avec la souche États-Unis d'orthopoxvirus simien a entraîné la mort en 6 à 9 jours de tous les animaux exposés à une dose de $10^{5.1}$ UFP par voie intrapéritonéale ou de $10^{6.1}$ UFP par voie intranasale (Tesh et al., 2004). On a fait état d'infections systémiques à forte charge virale, et les principales observations histologiques consistaient en une nécrose hépatique centrolobulaire, une nécrose de la rate et une inflammation interstitielle du tissu pulmonaire. Il n'est pas exclu que l'on puisse développer un modèle écureuil/orthopoxvirus simien intéressant pour tester l'efficacité des contre-mesures visant à combattre l'orthopoxvirose simienne et la variole humaine. Les chiens de prairie qui étaient impliqués dans la flambée d'orthopoxvirose simienne survenue aux États-Unis présentaient une consolidation pulmonaire, une hypertrophie des ganglions lymphatiques et des plages multifocales au niveau des parois des voies digestives (Langohr et al., 2004). Il y a eu des percées récentes dans la mise au point de modèles pour l'étude de l'orthopoxvirose simienne chez l'homme basés sur le chien de prairie (Knight, 2003 ; Hutson et al., 2009) ou encore sur d'autres modèles rongeurs, notamment le loir africain du genre *Graphiurus* (Schultz et al., 2009).

L'existence dans le commerce de diverses souches de souris offre des possibilités plus étendues pour tester les contre-mesures. On a récemment indiqué que des souris C57BL/6 dépourvues du gène STAT1 étaient sensibles à de faibles doses d'orthopoxvirus simien administrées par voie intranasale et qu'elles se sont montrées utiles pour tester l'efficacité de deux antiviraux, le CMX001 (ou HDP-cidofovir) et le ST-246, administrés le jour de l'infection (Stabenow et al., 2010). Plus récemment encore, on a montré que la souche commerciale de souris consanguines CAST/EiJ était sensible à l'infection par l'orthopoxvirus simien administré par voie intranasale, la DL_{50} étant de 680 UFP (Americo, Moss & Earl, 2010). Ces souris se sont même révélées encore plus sensibles (DL_{50} de 14 UFP) lorsque le virus était inoculé par voie intrapéritonéale. Les souris CAST/EiJ sont immunologiquement compétentes et elles présentent des avantages importants pour l'évaluation des contre-mesures destinées à combattre les orthopoxviroses – en effet, elles sont homogènes sur le plan génétique, on peut les trouver dans le commerce et il existe également des réactifs immunologiques pour évaluer la réponse de l'hôte.

On a utilisé diverses voies pour infecter des primates avec des orthopoxvirus simiens : aérosol (Zaucha et al., 2001), injection intramusculaire (Wenner et al., 1969), instillation intratrachéenne et intrabronchique ou encore injection intraveineuse (Stittelaar et al., 2006). La plupart des premières études portaient sur des macaques cynomolgus, soit *Macaca iris*, soit *M. fascicularis* (Hahon, 1961), mais les singes rhésus (*M. mulatta*) pourraient également convenir (Hooper et al., 2004). L'exposition à des aérosols est la méthode la plus appropriée pour modéliser une exposition primaire consécutive à une attaque au moyen d'une arme biologique. La transmission naturelle de l'orthopoxvirus simien (et du virus variolique) s'effectue probablement par une combinaison d'expositions : à des aérosols, à des fomites ou encore par contact au niveau des muqueuses. Les travaux comportant une exposition à des aérosols doivent s'effectuer au niveau 4 de confinement biologique dans une enceinte de sécurité biologique de classe III, et cette voie d'exposition est plus difficile à contrôler qu'une exposition par voie intraveineuse.

L'infection expérimentale de singes cynomolgus au moyen d'aérosols d'orthopoxvirus simiens (dose inhalée calculée : 3×10^4 UFP) a entraîné la mort de cinq animaux sur six (un mort par jour les jours 9, 11 et 12 et deux morts le jour 10), la mort survenant dans un délai moyen de 10,4 jours. Les singes présentaient une forte fièvre ($>39^\circ\text{C}$), un léger exanthème, de la toux et une leucocytose avec une monocytose absolue et relative (Jahrling, Zaucha & Huggins, 2000). On a isolé le virus dans les cellules de la couche leucocytaire des animaux fébriles et, à l'autopsie, des titres élevés de virus ($>10^6$ UFP/g) ont été observés dans le poumon et la rate (Zaucha et al., 2001). D'après les examens histopathologiques, la mort était due à une grave bronchopneumonie fibrinonécrotique. L'analyse immunohistochimique a révélé la présence d'abondants antigènes viraux dans des échantillons d'épithélium trachéen et de tissu interstitiel avoisinant. Les paramètres cliniques mesurés chez ces singes exposés à l'orthopoxvirus simien sous forme d'aérosol se succèdent comme chez les malades humains, mais à un rythme plus rapide (Bremner & Henderson, 2002).

L'exposition de macaques cynomolgus à l'orthopoxvirus simien en utilisant la voie intraveineuse a également entraîné une infection systémique uniforme dont la gravité était fonction de la dose (Stittelaar et al., 2006 ; Huggins & Jahrling, observations inédites). Les singes cynomolgus infectés par voie intraveineuse avec une dose de 10^7 UFP (souches Zaïre 79 et CDC V79-1-005) ont fait une fébricule qui a commencé le jour 3, des lésions pustuleuses apparaissant du jour 4 au jour 5. La mort est survenue à partir du jour 8 et en moyenne au bout de 12 jours, soit 4 à 8 jours après le début de l'éruption. Ce délai est plus court que celui qui est observé chez les cas humains d'orthopoxvirose simienne (10 à 14 jours). Sur les 12 animaux infectés, 11 sont morts (92 %) alors que, parmi les cas humains, le taux de létalité est de 10 %. Des lésions pustuleuses ont été observées chez tous les animaux et l'éruption a été qualifiée de « grave » selon le système de cotation de l'OMS (plus de 250 lésions). L'atteinte était totale au niveau des mains, des pieds, de la bouche et du palais mou. On a observé la même progression typique dans le développement des lésions chez tous les singes, et ceux qui ont survécu suffisamment longtemps ont fini par présenter des croûtes cicatricielles. Tous les animaux ont perdu du poids. Les examens de laboratoire n'ont rien révélé de particulier si ce n'est une élévation de l'azote uréique et de la créatinine du sang peu de temps avant la mort.

À l'autopsie, les organes présentaient d'importantes lésions anatomopathologiques macroscopiques et ils étaient également fortement affectés par la multiplication du virus. Les titres viraux relevés dans le poumon, le foie et la rate dépassaient 10^8 UFP/g et, dans le sang, on a mesuré un titre de 10^5 UFP/ml pour le virus, qui était associé aux cellules. Le plasma était exempt de virus infectieux. Au niveau du rein, les titres viraux dépassaient légèrement les titres sanguins, ce qui donne à penser que le rein est un site de réplication virale. Dans le cerveau, on n'a pas décelé de charge virale importante (supérieure à celle du sang cérébral).

Pour déterminer l'effet d'une dose infectieuse sur la progression de la maladie, on a procédé avec des doses plus faibles respectivement égales à 10^5 et 10^6 UFP. Ces doses moindres n'ont pas entraîné la mort mais tous les animaux sont tombés malades et ont présenté des lésions. L'éruption, évaluée en fonction du nombre de lésions selon le système de cotation de l'OMS, allait de bénigne (à la dose de 10^5 UFP) à modérée (à la dose de 10^6 UFP) ou grave (à la dose de 10^7 UFP). Les animaux infectés présentaient une augmentation importante du nombre de globules blancs, mais sans lien avec la dose. On a également constaté une chute des plaquettes liée à la dose, la thrombocytémie passant par un minimum du jour 2 au jour 8, après quoi le nombre de plaquettes a retrouvé sa valeur normale. La fonction pulmonaire ne présentait pas d'altération sensible aux doses les plus faibles. Une fébricule ($<38,5^\circ\text{C}$) a été observée chez tous les animaux les jours 3 et 4. Des lésions pustuleuses ont fait leur première apparition entre les jours 4 et 5 et leur taille a continué à augmenter jusqu'aux jours 10 à 12, puis elles ont disparu au bout des deux semaines suivantes chez les animaux survivants. Chez les animaux qui avaient été infectés par une dose mortelle de virus (10^7 UFP ou davantage), on a pu dénombrer plus de 1500 lésions. Dans le sang total, une amplification génique (PCR) quantitative a permis de détecter, 24 heures après l'infection, une charge virale qui a atteint plus de 10^7 génomes par millilitre avant la mort. Chez les animaux survivants – ceux qui avaient reçu des doses infectieuses plus faibles ou qui avaient été traités avec succès soit par un vaccin, soit par un antiviral –, la charge virale n'a jamais dépassé 10^6 génomes par ml. Le taux d'albumine a diminué en fonction de la dose, tombant à 15 mg/ml chez les singes infectés par une dose de 10^7 UFP, mais les protéines sériques totales sont restées dans les limites normales.

Le modèle orthopoxvirus simien/singe avec épreuve virulente en intraveineuse (en abrégé MPVX-IV) a été utilisé pour évaluer l'efficacité d'un vaccin candidat antivariolique, le virus de la vaccine Ankara modifié et fortement atténué (MVA). Dans cette étude, le vaccin MVA a été comparé à un vaccin homologué, le Dryvax, et également utilisé en association avec lui (Earl et al., 2004). Des singes ont été vaccinés soit avec le MVA, soit avec le Dryvax puis, à la huitième semaine, ils ont reçu un rappel de MVA ou de Dryvax ; après quoi, au cours de la seizième semaine, ils ont été soumis à une épreuve virulente consistant à leur injecter des orthopoxvirus simiens par voie intraveineuse. Les témoins sous placebo ont présenté plus de 500 lésions pustuleuses et sont tombés gravement malades. Deux sur six sont morts. En revanche, aucun des singes qui avaient reçu le vaccin Dryvax ou MVA/Dryvax n'a été malade. Les singes du groupe MVA/MVA sont restés en bonne santé tout en présentant tout de même une moyenne de 16 lésions. Aucun des animaux vaccinés ne présentait de virémie importante, la détection du virus s'effectuant par une PCR quantitative (Kulesh et al., 2004), alors que les témoins sous placebo avaient un titre viral sanguin supérieur à 10^8 génomes par ml. Pendant la vaccination des singes, on a observé que le MVA donnait lieu, dans les 10 jours suivant la vaccination, à des titres ELISA plus élevés que le Dryvax. Pour déterminer dans quelle mesure la réponse immunitaire au MVA était suffisante pour être aussi rapidement protectrice, les singes ont été vaccinés avec une dose unique de MVA ou de Dryvax, puis soumis le 10^e jour à une épreuve virulente. Contrairement aux témoins, qui ont présenté plus de 500 lésions chacun et sont tombés gravement malades, aucun des singes qui avaient été vaccinés avec le MVA ou le Dryvax n'a été malade. Les animaux des deux groupes ont présenté des lésions isolées (trois à six par animal). Le MVA et le Dryvax ont tous deux limité la réplication virale à des taux plus faibles que la virémie provoquée artificiellement par l'épreuve virulente avec l'orthopoxvirus simien. Le Dryvax a conféré une solide protection contre une épreuve virulente au moyen d'un aérosol d'orthopoxvirus simiens lors d'études d'efficacité visant à comparer le Dryvax à un virus de la vaccine propagé en culture tissulaire (Jahrling, 2002). Plus récemment, une étude a montré que le MVA conférait également à des macaques cynomolgus une solide protection contre des épreuves virulentes à l'aide de doses mortelles d'orthopoxvirus simiens administrés par la voie respiratoire (Stittelaar et al., 2005).

Des singes rhésus ont été soumis à des épreuves virulentes par voie IV du même genre afin d'évaluer une stratégie vaccinoire à base d'ADN (acide désoxyribonucléique) reposant sur une combinaison de quatre gènes du virus vaccinal (*L1R*, *A27L*, *A33R* et *B5R*). Les résultats obtenus sont prometteurs (Hooper et al., 2004). Il y a peu, ces gènes ont été exprimés dans un réplikon d'alphavirus avec des résultats tout aussi prometteurs (Hooper et al., 2009).

Il y a une certaine réticence à admettre la validité du modèle d'épreuve virulente par voie IV sous prétexte que, pour cette épreuve, il faudrait utiliser la voie « naturelle ». On peut rétorquer que la protection contre une dose intraveineuse massive constitue un critère très exigeant et devrait permettre de déterminer si le produit testé sera efficace contre une infection par une voie périphérique. Cela étant, du fait des réserves exprimées et aussi parce que l'épreuve virulente par voie IV met la barre trop haut pour l'évaluation des antiviraux, on explore d'autres modalités d'exposition, utilisant notamment la voie intratrachéenne. Comme la courbe dose-réponse est très pentue, utiliser la voie intraveineuse pour administrer le virus est avantageux pour étalonner la dose d'inoculum. Des voies d'exposition aérogènes ou par contact avec les muqueuses nécessiteraient un nombre plus élevé d'animaux.

En dépit de ces faiblesses, le modèle MPVX-IV a été utilisé pour mettre en évidence l'efficacité d'un certain nombre d'antiviraux, dont le cidofovir (Wei et al., 2009) et le ST-246 (Jordan et al., 2009). Ces études sortent du cadre de ce chapitre.

Il y a peu, d'autres modèles primates utilisant des épreuves virulentes avec d'autres orthopoxvirus ont été étudiés. L'infection de singes ouistitis (*Callithrix jacchus*) par le virus de la variole bovine (Kramski et al., 2010) constitue une piste prometteuse. Lorsque des ouistitis sont soumis par voie intranasale à une épreuve virulente avec une dose de virus de la variole bovine ne dépassant pas 5×10^2 UFP, ils développent une infection mortelle dont les signes progressent un peu comme ceux de la variole humaine. Bien que le ouistiti soit plus éloigné de l'homme que le macaque et qu'il ne soit pas facile encore de se procurer les réactifs immunologiques voulus, cette espèce paraît prometteuse pour la mise au point de futurs modèles.

Pour être en mesure de prouver de façon convaincante l'efficacité protectrice des vaccins et des antiviraux contre la variole, il faut disposer d'un modèle animal dans lequel le virus variolique provoque une maladie similaire à la variole humaine (USFDA, 2002, 2008, 2009). Comme le virus variolique est spécifique de l'espèce humaine, il n'est pas surprenant que les tentatives en vue d'infecter des rongeurs ou des lapins avec ce virus et de provoquer chez eux une maladie aient échoué (Marennikova, 1979). De fait, même chez les primates, les premières expériences avec le virus variolique n'ont abouti qu'à produire des infections bénignes et spontanément résolutive. Des macaques cynomolgus, exposés à des aérosols contenant 2×10^8 unités formatrices de pustules ont présenté une éruption au bout d'une période d'incubation de 6 jours. Le virus s'est répliqué dans le poumon avec des sites secondaires de multiplication dans les ganglions lymphatiques avant l'apparition de la virémie (Hahon, 1961). Dans une même étude (Westwood et al., 1966), 109 singes rhésus ont été exposés au virus ; tous sont devenus fébriles le cinquième jour et une éruption est apparue entre le jour 7 et le jour 11, mais seuls deux animaux sont morts. Des macaques à bonnet (*Macaca radiata*) se sont également montrés résistants à la maladie après une infection (Rao et al., 1968) et aucun des 14 singes n'a succombé. Les auteurs de cette étude ont toutefois montré qu'un traitement par la cortisone rendait les animaux sensibles à la maladie et, sur 16 animaux traités, 14 sont morts, ainsi qu'une guenon non traitée mais qui était gravide. Dans les populations humaines, c'est chez les femmes enceintes que la variole entraîne la mortalité la plus élevée (Rao et al., 1963).

Il apparaît donc, à la lumière des archives, qu'aucun modèle animal n'a encore donné satisfaction pour l'étude de la pathogenèse de la variole humaine (US Institute of Medicine, 1999). On sait toutefois que, chez le macaque, la contamination produit des lésions cutanées avec des signes d'infection systémique, et on a également utilisé un modèle primate pour

obtenir l'homologation du MVA en Allemagne dans les années 1960 (Hochstein-Mintzel et al., 1975). Il était donc rationnel d'expérimenter d'autres souches de virus variolique à des doses plus élevées et en utilisant diverses voies d'exposition afin de tenter de modéliser une variole mortelle. En exposant des singes cynomolgus à un aérosol contenant soit la souche Yamada, soit la souche Lee de virus variolique ($10^{8,5}$ UFP), on a bien obtenu une infection mais pas de maladie grave (LeDuc & Jahrling, 2001). En revanche, l'exposition des singes aux souches Harper ou India 7124 par la voie intraveineuse a entraîné une mortalité aiguë (Jahrling et al., 2004). La mortalité était moindre avec des doses inférieures à 10^9 UFP et plus la dose était faible, plus les paramètres quantifiables de la gravité de la maladie diminuaient.

Chez les singes morts à la suite d'une infection par le virus variolique, les lésions terminales évoquent le stade terminal de la variole humaine. Nous n'avons qu'une idée imprécise de pathophysiologie de la variole humaine car la maladie a été éradiquée avant que les outils modernes de la virologie et de l'immunologie aient été mis au point. Les modèles primates peuvent toutefois nous inciter à reprendre l'étude des échantillons archivés en utilisant des techniques modernes comme l'immunohistochimie ou les micropuces d'ADNc, déjà utilisées lors d'études sur des modèles primates (Jahrling et al., 2004 ; Rubins et al., 2004). Une récente analyse de tous les rapports anatomopathologiques publiés en langue anglaise au cours des 200 dernières années (Martin, 2002) incite à penser qu'en général, des patients dont l'état général était bon par ailleurs et qui ont succombé à la variole sont morts par suite d'une insuffisance rénale, d'un choc consécutif à une déplétion volumique, ou de problèmes d'oxygénation et de ventilation résultant d'une pneumopathie virale et d'une obstruction des voies aériennes. La dégénérescence des hépatocytes peut avoir détérioré dans une certaine mesure l'état des malades mais la cause de la mort n'était généralement pas attribuable à une insuffisance hépatique.

Comme on l'a indiqué plus haut, les lésions terminales observées chez les singes à qui on avait inoculé le virus variolique ressemblent aux lésions anatomopathologiques relevées chez les sujets humains (Jahrling et al., 2004). Après une contamination expérimentale, on a pu évaluer un certain nombre de paramètres à divers intervalles de temps précédant la mort. Chez les singes à qui le virus avait été inoculé par voie intraveineuse, on a pu mettre en évidence une virémie artificielle immédiatement après l'inoculation. Après une phase d'éclipse de plusieurs jours, le virus présent dans le sang n'était associé qu'aux monocytes. Les animaux qui ont succombé présentaient une hyperleucocytose, une thrombocytopenie et une élévation de la créatinine sérique. La forte charge virale présente dans les tissus avait déterminé un dysfonctionnement des organes et l'insuffisance des divers systèmes. La distribution des antigènes viraux (déterminée par immunohistochimie) était en corrélation avec la présence de particules virales répliquantes (détermination par microscopie électronique) et avec les lésions anatomopathologiques relevées dans les tissus lymphoïdes, la peau, la muqueuse buccale, les voies digestives, l'appareil reproducteur et le foie. Les signes histologiques d'une tendance aux hémorragies étaient corroborés par l'élévation des d-dimères. Il y a eu apoptose des cellules T dans les tissus lymphoïdes, probablement par suite de la réplication du virus dans les macrophages et de la tempête de cytokines (hypercytokinémie) qui en est résulté. La « toxémie », décrite par les cliniciens comme étant l'événement terminal de la variole humaine, résulte probablement tout autant d'une hyperstimulation des réponses immunitaires innées, notamment de l'interleukine-6 et de l'interféron γ , que des lésions directement infligées aux tissus cibles par le virus.

Des échantillons de sang périphérique prélevés sur les singes ont été analysés au moyen de micropuces d'ADNc conçues pour l'étude des modalités d'expression des gènes humains (Rubins et al., 2004). Le virus variolique a suscité des modalités d'expression génique spectaculaires et chronologiquement coordonnées (des caractéristiques qui correspondent à une réponse interféron), une prolifération cellulaire et l'expression d'immunoglobulines, en corrélation avec la dose de virus et la modulation de la réponse immunitaire de l'hôte. Ce qui est surprenant, c'est qu'il n'y a pratiquement pas eu de réponse sous la forme du facteur de

nécrose tumorale α -facteur nucléaire kappa B (NF- κ B), ce qui incite à penser que les produits géniques du virus variolique pourraient supprimer ce type de réponse. Les modèles simiens ne permettent de se faire qu'une idée approximative de l'interaction entre le virus variolique et le système immunitaire humain, mais l'extrapolation à l'homme à partir de primates est moins sujet à caution qu'à partir de rongeurs. Des recherches intensives sont menées sur la question de savoir si le modèle singe/orthopoxvirus simien permet de mieux modéliser la variole humaine que le modèle singe/virus variolique. Ces deux modèles primates pourraient ouvrir des pistes à l'élaboration de stratégies sur le plan du diagnostic, de la prophylaxie et de la thérapie.

5.3 Conclusions

Il est généralement admis que les modèles primates utilisant soit l'orthopoxvirus simien, soit le virus variolique reproduisent quelques-unes des caractéristiques de la maladie humaine, mais pas toutes. Une infection par ces virus communiquée par voie intraveineuse donne lieu à une série de manifestations morbides qui sont similaires à celles que l'on observe dans la maladie humaine (Bremner & Henderson, 2002), mais sur un rythme plus rapide en raison de l'absence de phase prodromique. Comme chez les sujets humains, une fois la virémie secondaire établie, la fièvre s'installe et elle est suivie de l'apparition de macules, de papules, de vésicules, de pustules et finalement de croûtes, si le malade ne succombe pas à la maladie. On peut prolonger le cours de la maladie expérimentale en réduisant la dose inoculée par voie intraveineuse ; une réduction d'un facteur 10 fait passer la mortalité de 100 % à environ 33 % et augmente la durée moyenne de survie avant l'issue fatale. Cette mortalité de 33 % après contamination par le virus variolique est très proche de celle qui est observée chez les cas humains de variole mais, si l'on utilise ce modèle pour évaluer l'efficacité des contre-mesures, il faut s'appuyer sur d'autres critères que la réduction de la mortalité. Les critères de substitution actuellement retenus sont la virémie et la numération des lésions, qui constituent des mesures approximatives de la gravité de la maladie. Il faudra encore du temps pour définir un ensemble de critères de substitution qui reflètent avec plus d'exactitude la pathophysiologie de la maladie et le retour à la normale. Il pourrait s'agir par exemple de batteries de marqueurs biologiques et de modalités d'expression protéique englobant l'ensemble du génome, que l'on utiliserait parallèlement à l'imagerie médicale (résonance magnétique nucléaire, tomographie à émission de positrons, tomographie d'émission monophotonique assistée par ordinateur et tomographie assistée par ordinateur).

Une fois que les données des expérimentations antérieures auront été examinées de façon approfondie, on pourra commencer à aller plus avant avec les modèles primates améliorés. Ces expérimentations sont notamment celles qui portent sur des doses plus faibles de virus administrées par diverses autres voies (intra-bronchique ou intratrachéenne) ou sous d'autres formes (aérosols, gouttelettes).

Il est probable qu'on ne trouvera aucune combinaison de pathologies qui débouche sur un modèle capable de répondre simultanément à tous les critères d'un modèle idéal de variole : il faudra sans doute utiliser différents modèles pour évaluer les diverses indications. Des études basées sur la télémétrie et l'imagerie médicale pourraient fournir des données pathophysiologiques valables. S'il est indiqué de continuer à investir dans certains modèles déterminés, il conviendrait également de s'intéresser tout particulièrement à la recherche de biomarqueurs qui pourraient être utilisés en clinique pour déclencher une intervention précoce, ce qui en augmenterait les chances de succès.

Abréviations

ADN	acide désoxyribonucléique
IP	intrapéritonéale (voie)
IV	intraveineuse (voie)
MVA	virus vaccinal modifié Ankara
MPVX-IV	modèle d'orthopoxvirose simienne avec épreuve virulente intraveineuse
OMS	Organisation mondiale de la Santé
PCR	amplification génique
UFP	unité formatrice de plages
WR	Western Reserve

Références bibliographiques

- Adams MM, Rice AD, Moyer RW (2007). Rabbitpox virus and vaccinia virus infection of rabbits as a model for human smallpox. *Journal of Virology*, 81: 11084–11095.
- Alcami A, Smith GL (1992). A soluble receptor for interleukin-1 beta encoded by vaccinia virus: a novel mechanism of virus modulation of the host response to infection. *Cell*, 71: 153–167.
- Americo JL, Moss B, Earl PL (2010). Identification of wild-derived inbred mouse strains highly susceptible to monkeypox virus infection for use as small animal models. *Journal of Virology*, 84: 8172–8180.
- Boulter EA, Maber HB, Bowen ET (1961). Studies on the physiological disturbances occurring in experimental rabbit pox: an approach to rational therapy. *British Journal of Experimental Pathology*, 42: 433–444.
- Brandt TA, Jacobs BL (2001). Both carboxy- and amino-terminal domains of the vaccinia virus interferon resistance gene, E3L, are required for pathogenesis in a mouse model. *Journal of Virology*, 75: 850–856.
- Bray M et al. (2000). Cidofovir protects mice against lethal aerosol or intranasal cowpox virus challenge. *The Journal of Infectious Diseases*, 181: 10–19.
- Breman JG, Henderson DA (2002). Diagnosis and management of smallpox. *The New England Journal of Medicine*, 346: 1300–1308.
- Buller RM (1985). The BALB/c mouse as a model to study orthopoxviruses. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 122: 148–153.
- Buller RM, Palumbo GJ (1991). Poxvirus pathogenesis. *Microbiological Reviews*, 55: 80-122.
- Buller RM et al. (2004). Efficacy of oral active ether lipid analogs of cidofovir in a lethal mousepox model. *Virology*, 318: 474–481.
- Charatan F (2003). US doctors investigate more than 50 possible cases of monkeypox. *British Medical Journal*, 326: 1350.
- Earl PL et al. (2004). Immunogenicity of a highly attenuated MVA smallpox vaccine and protection against monkeypox. *Nature*, 428: 182–185.
- Fenner F (1948). The clinical features and pathogenesis of mousepox (infectious ectromelia of mice). *Journal of Pathology and Bacteriology*, 60: 529–552.
- Fenner F et al. (1988). *Smallpox and its eradication*. World Health Organization, Geneva.
- Fine PE et al. (1988). The transmission potential of monkeypox virus in human populations. *International Journal of Epidemiology*, 17: 643–650.
- Hahon N (1961). Smallpox and related poxvirus infections in the simian host. *Bacteriological Reviews*, 25: 459–476.
- Henderson DA et al. (1999). Smallpox as a biological weapon: medical and public health management. Working Group on Civilian Biodefense. *The Journal of the American Medical Association*, 281: 2127–2137.

- Hochstein-Mintzel V et al. (1975). [An attenuated strain of vaccinia virus (MVA). Successful intramuscular immunization against vaccinia and variola]. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene*, 230: 283–297.
- Hooper JW et al. (2004). Smallpox DNA vaccine protects nonhuman primates against lethal monkeypox. *Journal of Virology*, 78: 4433–4443.
- Hooper JW et al. (2009). Molecular smallpox vaccine delivered by alphavirus replicons elicits protective immunity in mice and non-human primates. *Vaccine*, 28: 494–511.
- Hutson CL et al. (2009). A prairie dog animal model of systemic orthopoxvirus disease using West African and Congo Basin strains of monkeypox virus. *The Journal of General Virology*, 90: 323–333.
- Jahrling P (2002). Medical countermeasures against the re-emergence of smallpox virus. In: Knobler SL, Mahmoud AAF, AM, LA Pray, eds. *Biological threats and terrorism: assessing the science and response capabilities*. National Academy Press, Washington, 50–53.
- Jahrling PB, Zaucha GM, Huggins JW (2000). Countermeasures to the reemergence of smallpox virus as an agent of bioterrorism. ASM Press, Washington, DC.
- Jahrling PB et al. (2004). Exploring the potential of variola virus infection of cynomolgus macaques as a model for human smallpox. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101: 15196–15200.
- Jezek Z et al. (1988). Human monkeypox: secondary attack rates. *Bulletin of the World Health Organization*, 66: 465–470.
- Jordan R, et al. (2009). ST-246 antiviral efficacy in a nonhuman primate monkeypox model: determination of the minimal effective dose and human dose justification. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53: 1817–1822.
- Khodakevich L, Jezek Z, Kinzanzka K (1986). Isolation of monkeypox virus from wild squirrel infected in nature. *Lancet*, 1: 98–99.
- Knight J (2003). Prairie-dog model offers hope of tackling monkeypox virus. *Nature*, 423: 674.
- Kramski M et al. (2010). A novel highly reproducible and lethal nonhuman primate model for orthopox virus infection. *PLoS One*, 5: e10412.
- Kulesh DA et al. (2004). Smallpox and pan-orthopox virus detection by real-time 3'-Mineure groove binder TaqMan assays on the roche LightCycler and the Cepheid smart Cycler platforms. *Journal of Clinical Microbiology*, 42: 601–609.
- Lancaster MC et al. (1966). Experimental respiratory infection with poxviruses. II. Pathological studies. *British Journal of Experimental Pathology*, 47: 466–471.
- Langohr IM et al. (2004). Extensive lesions of monkeypox in a prairie dog (*Cynomys* sp). *Veterinary Pathology*, 41: 702–707.
- LeDuc JW, Jahrling PB (2001). Strengthening national preparedness for smallpox: an update. *Emerging Infectious Diseases*, 7: 155–157.
- Lee MS et al. (1992) Molecular attenuation of vaccinia virus: mutant generation and animal characterization. *Journal of Virology*, 66: 2617–2630.

- Ligon BL (2004). Monkeypox: a review of the history and emergence in the Western hemisphere. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, 15: 280–287.
- Marennikova SS (1979). Field and experimental studies of poxvirus infections in rodents. *Bulletin of the World Health Organization*, 57: 461–464.
- Martin DB (2002). The cause of death in smallpox: an examination of the pathology record. *Military Medicine*, 167: 546–551.
- McFadden G (2005a). Gleevec casts a pox on poxviruses. *Nature Medicine*, 11: 711–712.
- McFadden G (2005b). Poxvirus tropism. *Nature Reviews Microbiology*, 3: 201–213.
- Müllbacher A, Blanden RV (2004). T-cell-mediated control of poxvirus infection in mice. *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, 36: 39–55.
- Müllbacher A et al. (1999). Granzymes are the essential downstream effector molecules for the control of primary virus infections by cytolytic leukocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96: 13950–13955.
- Müllbacher A et al. (2004). Can we really learn from model pathogens? *Trends in Immunology*, 25: 524–528.
- Perkins S (2003). Monkeypox in the United States. *Contemporary Topics in Laboratory Animal Science*, 42: 70, 72.
- Quenelle DC, Collins DJ, Kern ER (2004). Cutaneous infections of mice with vaccinia or cowpox viruses and efficacy of cidofovir. *Antiviral Research*, 63: 33–40.
- Rao AR et al. (1963). Pregnancy and smallpox. *Journal of the Indian Medical Association*, 40: 353–363.
- Rao AR et al. (1968). Experimental variola in monkeys. I. Studies on disease enhancing property of cortisone in smallpox. A preliminary report. *The Indian Journal of Medical Research*, 56: 1855–1865.
- Robbins SJ et al. (2005). The efficacy of cidofovir treatment of mice infected with ectromelia (mousepox) virus encoding interleukin-4. *Antiviral Research*, 66: 1–7.
- Rubins KH et al. (2004). The host response to smallpox: analysis of the gene expression program in peripheral blood cells in a nonhuman primate model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101: 15190–15195.
- Schultz DA et al. (2009). Experimental infection of an African dormouse (*Graphiurus kelleni*) with monkeypox virus. *Virology*, 383: 86–92.
- Smee DF, Bailey KW, Sidwell RW (2001). Treatment of lethal vaccinia virus respiratory infections in mice with cidofovir. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*, 12: 71–76.
- Stabenow J et al. (2010). A mouse model of lethal infection for evaluating prophylactics and therapeutics against monkeypox virus. *Journal of Virology*, 84: 3909–3920.
- Stittelaar KJ et al. (2005). Modified vaccinia virus Ankara protects macaques against respiratory challenge with monkeypox virus. *Journal of Virology*, 79: 7845–7851.
- Stittelaar KJ et al. (2006). Antiviral treatment is more effective than smallpox vaccination upon lethal monkeypox virus infection. *Nature*, 439: 745–748.

- Tesh RB et al. (2004). Experimental infection of ground squirrels (*Spermophilus tridecemlineatus*) with monkeypox virus. *Emerging Infectious Diseases*, 10: 1563-1567.
- US Department of Health and Human Services (2005). *Possession, transfer, and use of select agents and toxins*. 42 CFR Parts 72 and 73. Federal Register, Volume 70, No.52: 13294–13325.
- USFDA (United States of America Department of Health and Human Services Food and Drug Administration) (2002). *Guidance for industry. Recommendations for deferral of donors and quarantine and retrieval of blood and blood products in recent recipients of smallpox vaccine (vaccinia virus) and certain contacts of smallpox vaccine recipients*. Washington, DC.
- USFDA (United States of America Department of Health and Human Services Food and Drug Administration) (2008). *Animal models — essential elements to address efficacy under the animal rule*. Concept Paper. Washington, DC (<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm072214.pdf>, last accessed November 2010).
- USFDA (United States of America Department of Health and Human Services Food and Drug Administration) (2009). *Guidance for industry. Animal models – essential elements to address efficacy under the animal rule*. US Institute of Medicine (1999). Summary and conclusions. In: *Assessment of future scientific needs for live variola virus*. National Academies Press, Washington, DC, 79–86.
- Wei H et al. (2009). Coadministration of cidofovir and smallpox vaccine reduced vaccination side effects but interfered with vaccine-elicited immune responses and immunity to monkeypox. *Journal of Virology*, 83: 1115–1125.
- Wenner HA et al. (1969). Studies on the pathogenesis of monkey pox. II. Dose-response and virus dispersion. *Archiv für die gesamte Virusforschung*, 27: 166–178.
- Westwood JC et al. (1966). Experimental respiratory infection with poxviruses. I. Clinical virological and epidemiological studies. *British Journal of Experimental Pathology*, 47: 453–465.
- Zaucha GM et al. (2001). The pathology of experimental aerosolized monkeypox virus infection in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Laboratory Investigation* 81: 1581–1600.

6. La mise au point d'antiviraux pour le traitement de la variole – la situation des agents thérapeutiques constitués de petites molécules

John W. Huggins¹ et Nina Tikunova²

¹ United States Army Medical Research Institute of Infectious Diseases, Fort Detrick, États-Unis d'Amérique

² Centre de Recherche d'État en Virologie et Biotechnologie VECTOR, Koltsovo, région de Novossibirsk, Fédération de Russie

Les observations et les conclusions qui figurent dans le présent rapport n'engagent que leurs auteurs et ne représentent pas nécessairement la position officielle des Forces armées ou du Département de la Défense des États-Unis, ni celle du Centre de Recherche d'État en Virologie et Biotechnologie VECTOR.

Résumé d'orientation

Importance pour la santé publique

En raison des événements graves et parfois mortels liés à l'administration des vaccins antivarioliques actuels, il est extrêmement peu probable qu'on procède à une vaccination antivariolique généralisée avant que n'éclate la première flambée de variole. Dans ces conditions, si la variole vient à réapparaître, il pourrait être nécessaire de traiter un grand nombre de cas au moyen d'antiviraux avant que des campagnes de vaccination massives aient le temps d'apporter une immunité protectrice suffisante.

Pour lutter contre la variole, on n'avait naguère d'autre solution que de vacciner et d'administrer un traitement de soutien aux personnes infectées, dont les chances de mourir pouvaient être de 30 %. Toutefois, l'expérience acquise dans le combat mené contre l'épidémie actuelle de grippe H1N1 montre que, tout comme la vaccination, les traitements antiviraux peuvent jouer un rôle important dans l'action de santé publique, tant pour juguler les flambées que pour réduire la mortalité des personnes contaminées.

Le projet décrit dans le présent chapitre a été mis sur pied dans le but de pouvoir utiliser, pour traiter les cas cliniques de variole, deux antiviraux oraux homologués dont les modes d'action sont différents. Pour pouvoir être utilisés en cas de flambée épidémique, ces produits doivent avoir été approuvés par les autorités de réglementation pharmaceutique. Cette autorisation réglementaire constitue également la preuve que les produits sont efficaces et elle est nécessaire aux responsables de la santé publique qui élaborent les stratégies de lutte. Étant donné que la variole humaine, due au virus du même nom, a été éradiquée à la suite d'une campagne de vaccination de masse, le seul moyen de mettre en évidence l'efficacité de ces antiviraux est d'utiliser des modèles animaux (des primates non humains) infectés par le virus variolique.

Bilan des progrès réalisés

La mise au point de toute thérapie antivirale est un processus long et difficile qui, pour beaucoup d'infections virales, s'est soldé par un échec, notamment dans le cas du rhume banal. Dans le cas de la variole, de grands progrès ont été accomplis durant la phase initiale de recherche de molécules actives et un certain nombre de candidats potentiels doivent maintenant être évalués sur des modèles animaux.

Trois composés – le cidofovir, le ST-246 et le CMX001 – qui inhibent la réplication du virus variolique dans des cultures cellulaires et dans de multiples modèles animaux (utilisant des orthopoxvirus de substitution) se sont vu attribuer le statut de « nouveau médicament expérimental » (investigational new drug-IND) par la Food and Drug Administration des États-Unis (USFDA) pour le traitement des orthopoxviroses. Les premières études sur des sujets humains sont en cours. Deux de ces composés (le cidofovir et le ST-246) se sont montrés actifs dans un modèle primate de virus variolique à issue fatale ; quant au troisième, c'est une prodrogue du cidofovir administrable par voie orale. Le ST-246 et le CMX001 sont en cours de développement et les essais cliniques ont commencé.

Travaux complémentaires nécessitant l'utilisation de virus varioliques vivants en vue de l'obtention d'un antiviral homologué pour le traitement de la variole

Même si les résultats obtenus jusqu'ici sont prometteurs, l'industrie du médicament fourmille d'exemples qui montrent qu'à l'issue de leur développement, moins de 35 % des composés qui font l'objet d'essais d'innocuité élargis (phase II de la FDA) obtiennent une autorisation de mise sur le marché. Passer du stade de « nouveau médicament expérimental » à l'utilisation effective du nouveau produit prend cinq à sept ans en moyenne.

Comme le virus variolique a été éradiqué de la population humaine, il n'est pas possible de procéder aux essais cliniques d'efficacité habituels. Pour des raisons d'éthique, on ne peut pas non plus effectuer des essais cliniques sur des sujets humains, de sorte que, pour vérifier l'efficacité d'un antiviral, il faut s'en remettre aux dispositions de l'« *Animal rule* » de la FDA (US 21CFR310.610). Vu les incertitudes de l'« *Animal rule* » et du fait qu'en ce qui concerne la variole, aucun antiviral n'a pour l'instant été homologué pour quelque indication que ce soit (traitement ou chimioprophylaxie), il est difficile de savoir combien de temps il faudra et quelles données seront nécessaires pour obtenir une AMM. Ces données impliqueront vraisemblablement des travaux sur le virus variolique, mais pas seulement. Les études sur modèles animaux pour appuyer les indications conformément aux dispositions de l'« *Animal rule* » seront soumises à un examen et à une analyse scientifique aussi approfondis que pour les essais cliniques sur l'homme, essais qui sont destinés à faire autoriser, par d'autres filières d'homologation, des produits ayant d'autres types d'indications.

Ailleurs qu'aux États-Unis, l'homologation de ces produits est entourée des mêmes incertitudes, à tout le moins.

On pourrait avancer que des études sur le virus variolique vivant devront rester envisageables jusqu'à ce qu'un nombre suffisant de médicaments, dotés de modes d'action différents, aient reçu l'autorisation réglementaire de mise sur le marché et puissent être utilisés partout dans le monde pour combattre toute flambée de variole.

Un rapport émanant de l'Institut de Médecine des Académies nationales et intitulé *Live variola virus: considerations for continuing research* (Le virus variolique vivant : considérations relatives à la poursuite de la recherche) conclut que « la raison la plus impérieuse de conserver pendant une longue période des stocks de virus variolique vivant tient au rôle essentiel qu'ils peuvent jouer dans l'identification et le développement d'antiviraux en prévision d'une importante flambée de variole ».

6.1 Introduction

Lorsqu'ont été lancées les campagnes de vaccination de masse destinées à éradiquer la variole naturelle, la thérapie antivirale était encore balbutiante. Les médicaments dont on disposait à cette époque, notamment des thiosemicarbazones comme la méthisazone (Marboran) et le M&B7714, un composé voisin, s'étaient révélés sans effet thérapeutique ou prophylactique lors d'essais effectués sur le terrain (Rao, McFadzean & Squires, 1965 ; Rao, McFadzean & Kamalakshi, 1966 ; Rao et al., 1966). Ces molécules ont été retirées du marché depuis lors. La cytosine arabinoside (ara-C) (Dennis et al., 1974) et l'adénosine arabinoside (ara-A) (Koplan et al., 1975) n'ont pas permis de faire reculer la mortalité. Une analyse des résultats de ces travaux a été publiée (Smee & Sidwell, 2003).

La mise au point de médicaments antivarioliques est un processus complexe, long et coûteux. En ce qui concerne la découverte de nouveaux médicaments, c'est essentiellement dans des laboratoires universitaires, des laboratoires publics et dans ceux de quelques petites firmes pharmaceutiques que des progrès ont été accomplis. Pour mettre au point un produit qui ait un effet thérapeutique, il faut commencer par trouver une molécule qui inhibe sélectivement la réplication du virus en culture cellulaire. La découverte d'un tel composé oriente les travaux des chimistes organiciens qui vont s'efforcer de synthétiser des molécules de structure analogue parmi lesquelles on recherchera ensuite celle qui est la plus active. La phase suivante est souvent de nature pharmacochimique et consiste à modifier systématiquement la structure de la molécule et à évaluer ensuite l'activité antivirale du dérivé obtenu jusqu'à l'obtention du composé le plus actif qui constitue alors la « tête de série ». Les travaux publiés portent en majorité sur cette phase initiale.

Il arrive souvent que cette molécule initiale n'ait pas toutes les propriétés souhaitées pour un médicament, c'est-à-dire être peu toxique, convenir à une prise par voie orale, résister à l'inactivation métabolique, être suffisamment soluble et présenter encore bien d'autres caractéristiques nécessaires au succès du traitement. Pendant la phase de développement, le pharmacochimiste va s'efforcer de modifier la structure de la molécule pour lui conférer les propriétés souhaitées, par exemple une meilleure solubilité, tout en éliminant certains aspects indésirables comme la toxicité, souvent d'ailleurs au prix d'une réduction de l'activité thérapeutique. Des études pluridisciplinaires complexes sur l'animal, menées dans le respect des bonnes pratiques de laboratoire (BPL), sont ensuite nécessaires pour élucider le métabolisme du composé et déterminer sa pharmacocinétique ainsi que sa répartition tissulaire et sa toxicité. Ces propriétés doivent être examinées chez plusieurs espèces en procédant à une série de tests relativement normalisés ainsi qu'à des études spécifiques destinées à s'assurer que le composé est suffisamment sûr pour commencer à être administré à des sujets humains.

À ce stade, une longue série d'évaluations, qui constituent la phase microbiologique, doivent être pratiquées sur des cultures cellulaires et des modèles animaux. Ces évaluations fournissent des informations sur l'aptitude du composé à inhiber la réplication du virus et permettent de savoir, sur la base de ces données préliminaires, dans quelle mesure il est capable de faire reculer la morbidité et la mortalité imputables à la maladie. Jointes aux résultats des études pharmacocinétiques sur la même espèce animale, ces études vont permettre d'avoir une idée de la concentration minimum pour que le composé reste actif et, en les rapprochant des résultats de la phase I des études sur l'homme nécessaires pour tout nouveau médicament expérimental (IND), elles fourniront une première estimation de la dose correspondante pour les sujets humains.

Aux États-Unis, toute administration d'un médicament potentiel à des sujets humains nécessite une demande d'autorisation dans le cadre des prescriptions réglementaires relatives aux nouveaux médicaments expérimentaux (IND). Cette demande doit être accompagnée de la communication officielle des études mentionnées plus haut, accompagnées d'informations sur la méthode de synthèse et les procédures appliquées

dans le cadre du contrôle de qualité. Il faut plusieurs années pour mener à bien les études nécessaires pour obtenir un IND et elles doivent être achevées avant que le composé soit évalué chez des sujets humains. Moins de 10 à 25 % des composés à qui un IND est attribué finissent par obtenir une autorisation de mise sur le marché.

Les études de phase I sur des sujets humains commencent avec un petit nombre de personnes et une concentration du produit très inférieure (d'au moins un facteur 10) à celle susceptible d'avoir un effet toxique quelconque. On augmente ensuite progressivement la concentration tout en étudiant la pharmacocinétique ainsi que la répartition du composé, jusqu'à ce que l'on obtienne, sur la base d'études précliniques, la bonne valeur de la dose. Si le médicament expérimental se révèle sans danger aux doses censées avoir un effet thérapeutique, une étude d'innocuité de plus grande envergure est effectuée en accroissant de plus en plus l'effectif des sujets. Pour finir, les études sont étendues à des groupes de population particuliers qui sont candidats au traitement, notamment ceux qui présentent des pathologies qui compliquent la situation. Dans le cas de la variole, il ne serait pas souhaitable d'exclure des études quelque groupe de population que ce soit, et les groupes visés sont les enfants, les adolescents, les adultes et les personnes âgées, ainsi que les sujets présentant des pathologies susceptibles d'avoir un effet sur la concentration du médicament, par exemple une pathologie rénale ou hépatique. À la fin, il faudra évaluer l'innocuité sur plusieurs centaines de sujets (une étude comportant 600 sujets permettra de mettre en évidence un événement indésirable au niveau de 1 %).

Traditionnellement, les données d'efficacité exigées par la Food and Drug Administration des États-Unis (FDA) en vue d'une autorisation de mise sur le marché proviennent d'essais cliniques « bien contrôlés » effectués sur des sujets humains et qui sont considérés comme essentiels. Dans le cas de médicaments destinés à traiter une affection hautement pathogène comme la variole, une telle exigence ne peut pas être satisfaite. Pour régler ce problème, la FDA a publié une directive communément appelée « *Animal rule* » (FDA, 2009). Il s'agit d'une disposition réglementaire qui permet de mettre en évidence l'efficacité d'un produit en utilisant un ou plusieurs modèles animaux capables de reproduire convenablement les aspects essentiels de la maladie et chez lesquels une réduction similaire de l'ampleur de la maladie humaine devrait faire reculer la morbidité et/ou la mortalité. Il en résulte toutefois plusieurs difficultés supplémentaires pour le développement du médicament. La recherche, chez l'espèce utilisée pour les tests d'efficacité, de la dose équivalente à la dose humaine devient encore plus déterminante, car cela conditionne la dose qui sera retenue pour les sujets humains. Il est également difficile d'extrapoler à l'homme la marge thérapeutique obtenue dans les modèles actuels primates/virus variolique et il est possible que les modèles existants sous-estiment, du fait de leur sévérité, le dernier délai d'institution du traitement.

Dans le cas de la variole, ce que l'on attend d'un traitement efficace, c'est qu'il réduise la mortalité lorsqu'il est administré après l'apparition des lésions (le seul critère de diagnostic pratique pendant une grosse flambée). Cette considération élimine les médicaments qui ne réduisent que la morbidité et, compte tenu des modèles actuels de l'infection par le virus variolique, elle exige davantage du médicament.

Sauf dans le cas d'études limitées effectuées aux deux centres collaborateurs de l'Organisation mondiale de la Santé (les Centers for Disease Prevention and Control aux États-Unis et le Centre de Recherche d'État en Virologie et Biotechnologie VECTOR [SRC VB VECTOR] en Fédération de Russie), la recherche de médicaments contre le virus variolique utilise des virus de substitution en raison de l'accessibilité restreinte du virus variolique et des difficultés que comportent les travaux de ce genre dans des installations au niveau 4 de sécurité biologique (NSB-4). La plupart des travaux de recherche ont porté sur des virus de substitution très voisins, le virus de la vaccine et le virus de la variole bovine, avec aussi quelques études de criblage à l'aide du virus de l'ectromélie et le virus de la variole du lapin. Ces derniers présentent moins de risques sur le plan biologique et peuvent

être manipulés dans des conditions de sécurité biologique de niveau 2 (NSB-2). Les composés qui se révèlent très actifs sur ces modèles sont ensuite essayés contre l'orthopoxvirus simien et, pour un très petit nombre d'entre eux, contre le virus variolique.

De nombreux laboratoires participent à l'effort de recherche en vue de découvrir des antiviraux actifs contre les orthopoxvirus. En 2009, une recherche bibliographique au moyen du système PubMed en utilisant les termes « orthopoxvirus (OPV) » et « antiviral » a permis de répertorier 1041 publications. La plupart d'entre elles ne portent que sur les étapes préliminaires du travail de recherche et sont nombreuses à utiliser le virus de la vaccine comme premier crible *in vitro*, comme cela a été suggéré (De Clercq, 2001). D'autres équipes utilisent systématiquement le virus de la variole bovine ; selon une étude du United States Army Medical Research Institute for Infectious Diseases (USAMRIID) portant sur plus de 500 composés, c'est ce virus qui, de tous les virus susceptibles d'être manipulés dans des installations NSB-2, permet le mieux de prédire l'activité du virus variolique (Huggins, observation inédite, 2003). Plusieurs auteurs ont passé en revue les résultats qui ont été publiés (Goebel et al., 1982 ; Bray et al., 2000 ; De Clercq, 2001 ; Baker, Bray & Huggins, 2003 ; Keith et al., 2003 ; Kern, 2003 ; Smee & Sidwell, 2003 ; De Clercq et al., 2005 ; Smee, 2008) et le lecteur est invité à se reporter à leurs articles pour plus de détails sur des composés déterminés. Ces auteurs examinent l'activité de certaines classes de composés, souvent en les regroupant en fonction du mode d'action qui leur est attribué.

6.2 Recherche de médicaments

Les orthopoxvirus sont de grands virus à ADN (acide désoxyribonucléique) double brin qui se multiplient exclusivement dans le cytoplasme et utilisent des enzymes codées dans leur génome pour la réplication de leur ADN. En raison de sa complexité, la réplication des orthopoxvirus offre un certain nombre de cibles à l'action des antiviraux. Le génome des orthopoxvirus possède une partie centrale fortement conservée qui code pour la machinerie nécessaire à la réplication virale ; les deux extrémités, plus variables, codent pour les protéines qui déterminent la virulence et la gamme d'hôtes. Le génome du virus de la variole humaine code pour un grand nombre de protéines capables d'altérer la capacité de l'hôte à reconnaître l'infection et à déclencher les mécanismes qui lui permettraient normalement de la repousser. C'est la machinerie responsable de la réplication virale qui constitue la cible la plus souvent visée dans la conception rationnelle d'antiviraux car elle est fortement conservée chez les orthopoxvirus, ce qui permet d'utiliser des virus de substitution comme ceux de la vaccine ou de la variole bovine dans les premières phases du processus. Par ailleurs, l'ADN polymérase virale partage, avec d'autres virus à ADN comme les herpétoviridés par exemple, une importante similitude séquentielle au niveau de son site actif.

6.2.1 Les thiosemicarbazones

Les thiosemicarbazones constituent la première classe de composés à s'être révélés actifs contre les orthopoxvirus (Bauer, 1955). L'utilisation de la méthisazone dans le traitement de la variole est évoquée à la section 6.1. Dans des tests basés sur une inhibition de 50 %, la méthisazone a fait preuve d'une activité antivirale modérée vis-à-vis du virus variolique (Baker, Bray & Huggins, 2003), mais elle n'a pu inhiber 80 % de sa réplication qu'à la concentration tolérable la plus élevée (Huggins, observation inédite, 2003). Un grand nombre de composés ont été évalués *in vitro* et quelques-uns sur modèles murins ; ils se sont montrés modérément actifs, mais aucun d'entre eux n'a atteint un stade avancé d'évaluation sur des primates.

6.2.2 Évaluation des nouveaux médicaments autorisés ou expérimentaux

Les médicaments actuellement autorisés par la FDA ont fait l'objet d'une évaluation systématique *in vitro* en présence de virus de la vaccine et de virus de la variole bovine

(Kern, 2003). Il s'agit notamment de molécules actives contre les herpétoviridés, le virus de l'hépatite B (virus à ADN) et le virus de l'immunodéficience humaine (un virus à ARN [acide ribonucléique]), d'inhibiteurs nucléosidiques ou non nucléosidiques de la transcriptase inverse, d'inhibiteurs de protéases et de plusieurs composés ayant le statut de nouveau médicament expérimental (IND). Une grande partie des composés actifs ont également été testés contre le virus variolique et le virus de l'orthopoxvirose simienne (Goebel et al., 1982 ; Baker, Bray & Huggins, 2003). Kern et al. (2002) ont découvert plusieurs composés présentant une activité intéressante, notamment des substances déjà connues comme le cidofovir et l'adéfovir dipivoxil (bis-POM PMEA), mais, selon Baker, Bray & Huggins, ce dernier composé serait moins actif. Deux produits topiques, l'idoxuridine et la trifluridine, se sont révélés actifs mais ils ne peuvent pas être administrés par voie orale en raison de leur toxicité. On a procédé à l'évaluation d'une bibliothèque de molécules comportant la plupart des médicaments autorisés sans pouvoir identifier de nouveaux candidats (Huggins, résultats inédits tirés du programme de criblage de l'USAMRIID, 2005).

6.2.3 Phosphonates nucléosidiques acycliques

Les inhibiteurs nucléosidiques acycliques de l'ADN polymérase – comme l'acyclovir, le penciclovir et le ganciclovir, ainsi que leurs prodrogues administrables par voie orale – ont tout d'abord été mis au point pour combattre les herpétoviridés. Ils doivent subir une première phosphorylation par une thymidine kinase ou une protéine kinase virales encodées, puis une phosphorylation ultérieure par les kinases cellulaires pour produire le triphosphate doté d'activité antivirale. La thymidine kinase du cytomégalovirus humain (CMVH) n'est pas capable de phosphoryler ces composés, de sorte qu'on a été amené à développer une classe de phosphonates nucléosidiques acycliques. Ces composés sont l'équivalent d'un monophosphate nucléosidique, mais ils comportent un phosphonate chimiquement résistant non reconnu par les phosphatases qui, normalement, élimineraient un monophosphate circulant. La solution a consisté à substituer une liaison phosphonate stable (P-C) qui n'est pas coupée par les hydrolases cellulaires à la liaison phosphate (P-O-C) plus labile (De Clercq, 2003 ; Helliott et al., 2003 ; Keith et al., 2003). Comme dans le cas du CMVH, la thymidine kinase orthopoxvirale ne phosphoryle pas les nucléosides acycliques, mais le cidofovir (HPMPC) et son analogue cyclique (le HPMPC cyclique) se sont révélés tous les deux actifs *in vitro* contre tous les orthopoxvirus testés, y compris le virus variolique (Baker, Bray & Huggins, 2003). Le cidofovir est le premier composé qui se soit montré protecteur sur un modèle virus variolique/primate et il se révèle également protecteur sur divers modèles constitués de petits animaux (voir la liste dans le Tableau 3 de l'article de Smees – [Smees, 2008]). Le cidofovir en intraveineuse (vistide) est autorisé pour le traitement de la rétinite à CMVH à raison de 5 mg/kg une fois par semaine ; sa situation actuelle est examinée dans les sections 6.5 et 6.9.

Le cidofovir, qui est capté par pinocytose et nécessite une administration en bolus comportant un risque de néphrotoxicité, pose des problèmes d'absorption qui ont pu être résolus grâce aux dérivés lipidiques synthétisés par Hostetler et ses collègues (Painter & Hostetler, 2004). Ces analogues lipidiques sont efficacement résorbés par le truchement des chylomicrons et ils sont biodisponibles par voie orale (Kern et al., 2002 ; Keith et al., 2004 ; Painter & Hostetler, 2004 ; Beadle et al., 2006 ; Lebeau et al., 2006). On a évalué toute une série de ces analogues lipidiques et sélectionné l'hexadécyloxypropylcidofovir, désigné ultérieurement sous le nom de CMX001, en vue d'une évaluation approfondie (voir le Tableau 4 dans Smees, 2008, pour consulter la liste partielle des évaluations publiées). Le CMX001 est examiné séparément dans les sections 6.6 et 6.9.

6.2.4 Inhibiteurs de l'inosine monophosphate déshydrogénase

Les inhibiteurs de l'inosine monophosphate déshydrogénase comprennent notamment la ribavirine, le premier analogue nucléosidique à large spectre (Sidwell et al., 1972). Comme plusieurs autres membres de cette classe de composés, la ribavirine est active contre le

virus de la vaccine chez la souris et contre le virus de la variole du lapin chez le lapin. Elle ne confère cependant aucune protection contre l'orthopoxvirus simien sur modèle primate (Huggins, observations inédites, 2001) lorsqu'elle est administrée en prophylaxie à une dose, par une voie et selon une posologie qui permettent de protéger les primates contre une infection par le virus Junin (McKee et al., 1988) et par le virus de Lassa (Jahrling et al., 1980 ; Stephen & Jahrling, 1979). Des analogues plus récents – le FICAR, l'EICAR, la tiazofurine (active contre le virus variolique *in vitro*) et le sélénezole – se sont montrés actifs chez la souris contre une infection par le virus de la variole bovine (Huggins, observation inédite, 2003), mais ils n'ont pas été évalués sur modèles primates (modèles dans lesquels la ribavirine se montre inactive) et l'on ne pense pas qu'ils puissent être actifs.

6.2.5 Inhibiteurs de la S-adénosylhomocystéine hydrolase

On pense que les inhibiteurs de la S-adénosylhomocystéine hydrolase inhibent les orthopoxvirus en bloquant, lors de la méthylation de la coiffe, une étape particulière de ce processus (enzyme de coiffage de l'ARNm) qui est nécessaire à la réplication virale (pour les structures, se reporter à la Figure 4 de l'article [De Clercq, 2001]). Deux membres de cette classe de composés, la 3-déazaneplanocine A et la 3-déazaneplanocine A carbocyclique, figurent parmi les inhibiteurs les plus actifs du virus variolique (Baker, Bray & Huggins, 2003) et se révèlent également actifs contre les infections intranasales par le virus de la variole bovine (Baker, Bray & Huggins, 2003). Malgré l'activité modérée dont ces deux composés ont fait preuve dans ce modèle (Huggins, résultats inédits, 2003), ils n'ont pas été soumis à une évaluation plus approfondie.

6.2.6 Inhibiteurs de l'orotidine-5'-monophosphate décarboxylase

La pyrazofurine, qui est le prototype des inhibiteurs de l'orotidine-5'-monophosphate décarboxylase, est l'un des antiviraux les plus actifs *in vitro*, mais il se révèle toxique chez l'animal. Beaucoup d'efforts ont été faits sur le plan pharmacochimique pour tenter de séparer la fraction antivirale de la molécule de celle qui est responsable de sa toxicité, mais ils n'ont pas été couronnés de succès. Ce produit doit donc être considéré comme un médicament anticancéreux dont la toxicité est importante (Huggins, observation inédite tirée du programme de criblage de l'USAMRIID, 2001).

6.2.7 Inhibiteurs de la thymidylate synthétase

Bien que le virus de la vaccine ne possède pas de gène codant pour la thymidylate synthétase, des inhibiteurs de cette enzyme – des composés de la 2'-désoxyuridine substitués en position 5 – (pour les structures, se reporter à la Figure 9 de l'article [De Clercq, 2001] et au Tableau 1 du même article pour l'activité *in vitro*) – se sont montrés actifs chez des souris infectées au moyen du virus de la vaccine par scarification caudale. La catabolisation rapide de ces composés en métabolites inactifs limite les possibilités de la 5-iododésoxyuridine et des composés apparentés. Récemment toutefois, un analogue 4'-thio (le SRI-21950) a permis de résoudre ce problème d'instabilité métabolique et il a parfaitement protégé des souris contre des infections par le virus de la vaccine ou celui de la variole bovine (Kern et al., 2009).

6.2.8 Composés qui entravent le processus d'assemblage du virus

Parmi les composés qui bloquent certaines étapes du processus d'assemblage des orthopoxvirus figurent la rifampicine et la N_1 -isonicotinoyl- N_2 -3-méthyl-4-chlorobenzoylhydrazine (IMCBH). La rifampicine interagit avec un polypeptide de 65 kilodaltons codé par le gène *D13L* du virus de la vaccine (Sodeik et al., 1994) et l'IMCBH a pour cible une protéine de 37 kilodaltons codée par le gène *F13L* du même virus, laquelle est un constituant de l'enveloppe externe des virus extracellulaires ou des virus extracellulaires enveloppés (Schmutz et al., 1991). L'action de la rifampicine consiste à bloquer la formation de la

première forme infectieuse du virus, appelée virus intracellulaire mature (IMV) ou virus mature de sorte qu'aucun descendant infectieux ne peut se former. L'IMCBH, en revanche, agit en empêchant l'enveloppement des particules de virus intracellulaire mature par une double couche de membrane cellulaire provenant soit du réseau trans-golgien, soit des endosomes précoces, après transformation par l'insertion de plusieurs protéines virales. Même si le blocage de la morphogénèse virale à ce stade n'empêche pas la formation de particules virales matures infectieuses, il s'oppose au transport du virus hors de la cellule et en réduit notablement la propagation, qui s'effectue par le truchement de la forme extracellulaire enveloppée ou du virus extracellulaire.

ViroPharma et l'USAMRIID ont utilisé un système de criblage à haut débit très simple pour passer au crible le tiers du million de composés contenus dans leur bibliothèque, ce qui leur a permis d'identifier plusieurs classes d'agents actifs. Les molécules actives ont été testées sur des orthopoxvirus simiens. Finalement, au terme d'un effort considérable sur le plan pharmacochimique (Bailey et al., 2007), ils ont retenu un petit nombre de candidats, qui ont ensuite été soumis à un nouveau criblage, cette fois en présence du virus variolique (Yang et al., 2005). Le ST-246 a été sélectionné en vue d'un développement plus approfondi. Dans le Tableau 4 de son article de 2008, Smee donne une liste partielle des modèles animaux pour lesquels le ST-246 s'est révélé protecteur. Les progrès accomplis ultérieurement dans le développement de ce composé sont exposés dans les sections 6.7 et 6.9.

6.2.9 Les kinases de la famille Abl

Le glivec, autorisé pour le traitement de la leucémie myéloïde chronique chez l'homme, empêche les orthopoxvirus de sortir de la cellule. Chez des souris infectées par une dose de virus vaccinal entraînant une mortalité de 70 %, il s'est révélé protecteur et il a réduit d'un facteur 100 000 le titre du virus dans l'ovaire. Bien qu'il ne s'agisse pas d'un test sévère, le résultat donne à penser que le glivec et les composés apparentés devraient faire l'objet d'une évaluation plus poussée (McFadden, 2005 ; Reeves et al., 2005).

6.2.10 Les préparations immunologiques

On utilise les immunoglobulines humaines antivaccine dans la prophylaxie et le traitement d'un certain nombre de complications postvaccinatoires. Toutefois, comme ce produit a tous les inconvénients d'une préparation tirée de dons de sang, il serait préférable d'utiliser des anticorps recombinants humains spécifiques dirigés contre les orthopoxvirus, notamment des anticorps recombinants totalement humains (ou monoclonaux). Pour les obtenir, on associe les domaines variables des anticorps humains possédant l'activité visée aux domaines constants des immunoglobulines humaines de l'isotype voulu. Le stade crucial dans l'obtention d'anticorps recombinants totalement humains consiste dans le choix des domaines variables qui sont responsables de la spécificité, de l'affinité et des propriétés biologiques de l'anticorps. Une façon de procéder consiste à sélectionner les domaines variables à partir de bibliothèques combinatoires de mini-anticorps phagiques en utilisant les souches Ind3a et Butler de virus variolique. Lors d'études ultérieures, 34 anticorps construits au VECTOR ont été testés afin de déterminer leur aptitude à neutraliser l'infectiosité de ces souches Ind3a et Butler, et on a constaté que cinq anticorps scFv étaient capables de neutraliser le virus variolique (Tikunova, données inédites, 2006). Il a été confirmé que les anticorps totalement humains construits sur la base des domaines variables de quatre anticorps scFv se liaient au virus variolique et à d'autres orthopoxvirus et neutralisaient le virus variolique en culture cellulaire. Ces anticorps devront être évalués sur des modèles animaux d'infection par le virus variolique.

6.2.11 Composés divers

Une série d'analogues de l'adénosine-N1-oxyde actifs contre le virus de la vaccine – tant *in vitro* que chez des souris infectées par scarification caudale (Kwong et al., 1998) – ont été

évalués *in vitro* en présence de virus varioliques et de virus de la vaccine (Huggins, données inédites, 2002). La corrélation entre l'activité antivirus vaccinal et l'activité antivirus variolique était faible. Si l'on avait sélectionné un composé en vue d'un futur développement sur la seule base de son activité vis-à-vis du virus vaccinal, on aurait retenu une molécule 40 fois moins active que celle qui s'est montrée la plus active contre le virus variolique. C'est là un exemple tout à fait clair des risques que l'on prend en misant trop sur des virus de substitution si l'on n'a pas la certitude que les cibles sont identiques.

6.2.12 Composés dont la structure ne sera pas révélée avant un stade avancé de développement

Un certain nombre de laboratoires du secteur public (National Institutes of Allergy and Infectious Diseases, USAMRIID et VECTOR) ont participé aux premières phases de la recherche de composés actifs contre les orthopoxvirus en procédant au criblage d'un grand nombre de composés en présence d'orthopoxvirus de substitution, et les deux centres collaborateurs de l'OMS ont passé au crible des milliers de composés en présence du virus variolique en utilisant pour cela un test *in vitro* basé sur des cultures cellulaires. Les résultats de ces criblages ont été communiqués au Comité consultatif OMS de la Recherche sur le Virus variolique à l'occasion de ses réunions annuelles (OMS, 2001, 2002). La plupart des composés étaient dépourvus d'activité significative contre le virus variolique et n'ont pas été évalués plus avant. Un grand nombre de ceux qui avaient été testés au départ par rapport à leur activité antivirus variolique ont été identifiés au moyen du numéro attribué par le fournisseur et non par catégorie de substance chimique. La structure de tous les composés testés sur modèle animal eu égard à leur activité contre le virus variolique a été révélée, y compris dans le cas des trois composés en cours de développement clinique. La protection par un brevet varie d'un pays à l'autre, mais elle ne dure en général qu'un nombre déterminé d'années et, dans plusieurs pays, le compteur commence à tourner dès lors que la structure chimique est dévoilée publiquement. Cet état de choses peut avoir des conséquences fâcheuses, et notamment rendre plus difficile le développement d'un produit qui n'est pas protégé par un brevet bien précis. Il s'ensuit que l'industrie a parfois tendance à ne révéler la structure des produits en cours de développement que juste avant le début des essais cliniques sur des sujets humains (Huggins, résultats inédits ; US Institute of Medicine, 2009).

6.2.13 Méthodes d'inhibition de la réplication virale basées sur la biologie moléculaire, comme l'interférence par l'ARN

L'interférence par l'ARN est un mécanisme normalement utilisé par la cellule pour réguler l'expression des gènes, et aussi pour supprimer un ARN étranger (Fire et al., 1998). Pour pouvoir mettre ce mécanisme en pratique de manière à inhiber la réplication virale, il a fallu attendre que soient mis au point des systèmes de vectorisation permettant à l'interférence par l'ARN et aux petits ARN interférents d'échapper à une inactivation dans la circulation lors de leur délivrance aux cellules cibles (Nguyen et al., 2008). Alkhalil et al. (2009) ont récemment décrit l'inhibition de l'orthopoxvirus simien par des ARN interférents. Ce nouveau domaine de recherche est en expansion rapide et pourrait bien déboucher sur une nouvelle génération d'antiviraux.

6.3 Modélisation de la variole humaine et de l'orthopoxvirose simienne sur modèles primates

La mise au point d'un modèle primate pour modéliser l'infection par le virus variolique se révèle difficile. Les premiers travaux, qui remontent aux années 1960, n'ont pas permis d'obtenir un modèle acceptable (Hahon & Wilson, 1960 ; Hahon, 1961 ; Hahon & McGavran, 1961 ; Lancaster et al., 1966 ; Westwood et al., 1966), probablement du fait que le virus variolique n'infecte que l'espèce humaine. On n'a aucune preuve de l'existence d'infections naturelles par ce virus chez des primates non humains et l'on ne peut modéliser expérimentalement la variole humaine chez ces espèces qu'en administrant par voie

intraveineuses des doses 100 000 fois supérieures à la dose infectante estimative pour l'homme.

Pour pouvoir étudier la variole humaine par l'expérimentation animale, on a mis au point deux modèles animaux basés sur l'inoculation du virus variolique par voie intraveineuse à des singes cynomolgus. Chez l'homme, il y a corrélation entre l'ampleur (le nombre de lésions) de l'éruption caractéristique provoquée par la variole ou l'orthopoxvirose simienne et la gravité de la maladie. Le système de cotation de l'OMS permet d'établir différentes classes de gravité en fonction du nombre de lésions pustuleuses – une maladie classée comme « grave » est généralement associée à une forte mortalité alors que, si elle est classée comme « bénigne » ou « modérée », elle n'est généralement pas mortelle (Jahrling & Huggins, 2005). Une infection expérimentale par voie intraveineuse avec une dose de plus de 10^7 unités formatrices de plages (UFP) d'orthopoxvirus simien a permis de constituer un modèle léthal qui reproduit fidèlement la pustulose exanthématique caractéristique de la variole humaine et de l'orthopoxvirose simienne. Des études du même genre avec une dose de 10^8 UFP (2×10^9 génomes) de virus variolique souche Harper ont permis d'obtenir une pustulose exanthématique similaire, avec plus de 1000 lésions (classée comme « grave » selon la cotation de l'OMS) et une mortalité de 33 % (jours 11 et 13) chez le singe cynomolgus – c'est-à-dire le même taux de mortalité que celui de la variole humaine. En augmentant d'un facteur 10 la dose de virus variolique utilisée pour les épreuves virulentes (c'est-à-dire en passant à 1×10^9 UFP ou 2×10^{10} génomes), on a provoqué une maladie aiguë dont le taux de létalité était de 100 % (délai moyen de survenue de la mort : 4 jours) et qui reproduisait plus fidèlement une variole hémorragique. Au moment de la mort, les titres de virus dans les organes étaient 1000 à 10 000 fois plus élevés que chez les singes infectés par des doses virales 10 fois moindres (Jahrling et al., 2004 ; Rubins et al., 2004). On a constaté que, dans les deux modèles, la mortalité dépend de la dose virale infectante, qui est en corrélation avec le nombre de lésions. Les auteurs du présent chapitre émettent l'hypothèse que l'infection par voie intraveineuse provoque une virémie secondaire artificielle, qui esquivé la période d'incubation et entraîne une augmentation rapide de la charge virale ainsi que la prompte apparition de la maladie.

Le point important, sur le plan de la santé publique, c'est qu'il faut avoir des critères de diagnostic réalistes pour définir les interventions thérapeutiques dans la perspective du traitement d'un grand nombre de cas. On est donc amené à prendre comme point de départ du traitement le moment où l'éruption, la maladie et les lésions font leur apparition, en se basant sur les symptômes cliniques. À ce stade, cependant, tous les organes présentent déjà une charge virale de plus de 10^6 génomes par gramme de tissu lorsque le traitement est institué au 4^e jour de l'infection.

Il faut pouvoir mettre en évidence une efficacité décisive en mettant sur pied un essai qui fournisse des données indépendantes (c'est-à-dire non tributaires d'autres études) et soit susceptible de rivaliser, dans la mesure du possible, avec un essai de phase III sur des sujets humains, car les experts médicaux chargés d'examiner les données vont se baser sur cet essai pour évaluer l'efficacité du médicament, faute d'essais cliniques sur l'homme. Dans un rapport intitulé « *Le virus antivariolique vivant : considérations relatives à la poursuite de la recherche* » (Tableau 4-1), l'Institut de Médecine des États-Unis considère que le modèle primate non humain « est extrêmement utile dans la mesure où il laisse entrevoir les avantages probables des médicaments et des vaccins antivarioliques expérimentaux pour la population humaine » (US Institute of Medicine, 2009). Au nombre des études de base destinées à trouver, dans le cas d'un antiviral donné, une indication susceptible d'être autorisée pour la réduction de la mortalité variolique doivent obligatoirement figurer des études sur modèle primate/orthopoxvirus simien. Le seul modèle animal pour l'étude du virus variolique qui ait été mis au point jusqu'ici et soit ressemblant à la variole classique comporte un taux de mortalité de 33 %, et le seul laboratoire où puissent être menées des recherches sur le virus variolique ne peut héberger suffisamment de primates pour obtenir des résultats statistiquement significatifs (les conditions que doit remplir une étude pour donner meilleure

confiance dans ses résultats eu égard à la taille de l'échantillon sont les suivantes : 120 primates non humains, soit l'effectif nécessaire pour $P = 0,05$, test bilatéral avec une puissance de 79 %). Par conséquent, si l'on veut obtenir un résultat statistiquement significatif, il faut, pour prouver le recul de la mortalité, utiliser un modèle orthopoxvirus simien/primate très proche de la variole humaine qui comporte un taux mortalité supérieur à 90 %.

6.4 Données humaines pour valider les modèles animaux

Lorsque la variole a été éradiquée, la méthodologie moderne actuellement utilisée pour caractériser la pathogenèse des maladies était encore balbutiante. On ne possède donc guère de données humaines que l'on puisse comparer aux résultats des études pathogénétiques basées sur l'infection expérimentale de singes cynomolgus par le virus de la variole et celui de l'orthopoxvirose simienne. Devant la nécessité de disposer de telles données, la FDA a invité l'USAMRIID à se pencher sur l'histoire naturelle des cas humains d'orthopoxvirose simienne, l'affection actuellement la plus proche de la variole humaine, afin de valider un modèle animal qui réponde aux exigences d'efficacité prescrites par l'« *Animal rule* ». Cette étude est actuellement en cours à l'Hôpital général de référence de Kolé, district de Sankuru, en République démocratique du Congo. Elle est menée conjointement par l'Institut national de Recherche biomédicale de Kinshasa et par l'USAMRIID (Huggins, communication personnelle, 2010).

6.5 Le cidofovir en intraveineuse

Le cidofovir injectable (vistide) a été autorisé par la FDA pour le traitement de la rétinite à CMV chez les malades présentant un syndrome d'immunodéficience acquise (sida). Cette petite molécule est un analogue nucléosidique qui inhibe sélectivement l'ADN polymérase virale et qui s'est montré uniformément actif contre 35 isollements de virus variolique sélectionnés pour représenter une zone géographique et une période de temps aussi larges que possible (LeDuc et al., 2002). Cet antiviral a permis de réduire d'un facteur 1000 à 100 000 la réplication du virus variolique en culture cellulaire (Baker, Bray & Huggins, 2003). On a étudié l'efficacité du cidofovir sur des souris BALB/c infectées par le virus de la variole bovine afin d'évaluer sur de petits animaux les nouvelles thérapies contre les orthopoxviroses virulentes. Une injection intramusculaire de cidofovir à la dose de 100 mg/kg les jours 0, 2 ou 4 après l'infection par voie intrapéritonéale, intranasale ou par exposition à un aérosol a permis d'obtenir 90 à 100 % de survie dans des modèles par ailleurs uniformément létaux. Le traitement administré le jour 0 a réduit la charge virale pulmonaire maximale d'un facteur 10 à 100, diminué la gravité de la pneumonie virale et évité l'hémorragie pulmonaire (Bray et al., 2000).

Deux modèles primates de prophylaxie après exposition ont été utilisés pour mettre en évidence l'efficacité de cet antiviral. Le premier d'entre eux était un modèle lésionnel léthal utilisant l'orthopoxvirus simien dans lequel l'évaluation de l'efficacité reposait sur la réduction de la mortalité, du nombre de lésions et de la charge virale. Le deuxième était un modèle lésionnel utilisant le virus variolique, dans lequel l'évaluation de l'efficacité était basée sur la réduction du nombre de lésions et de la charge virale. Dans ces deux modèles, le traitement a commencé 24 heures après l'infection, alors que la réplication avait déjà produit plus de 10^4 génomes par gramme de tissu dans tous les organes. Pour déterminer dans quelle mesure un modèle lésionnel pouvait être traité avec succès, on a utilisé le modèle léthal orthopoxvirus simien/primate/voie intraveineuse – qui modélise le mieux une infection par le virus variolique – dans lequel on a produit une infection au moyen d'une dose de 10^8 UFP : on a constaté que la prophylaxie par le cidofovir conférait une protection complète aux animaux. Les singes traités par cet antiviral n'ont présenté aucun signe de maladie et la réplication du virus dans le sang a été contenue ; en revanche, les animaux sous placebo présentaient plus de 850 lésions et une charge virale dans le sang supérieure à 10^7 génomes/ml ; ces animaux sont morts le 12^e jour. Les études avec l'orthopoxvirus simien

montrent que le doublement de la dose de cidofovir (quatre fois la dose autorisée chez l'homme) permet de mieux juguler la réplication, mais une dose aussi élevée n'est pas autorisée pour traiter la rétinite à CMVH chez les malades du sida. Le cidofovir peut présenter une néphrotoxicité non négligeable – nécessitant une hydratation préalable par perfusion, l'administration de probénécide et une nouvelle hydratation après l'injection – qui constituerait une charge importante pour les équipes médicales pendant une flambée. Il y a des controverses sur le point de savoir si une dose plus élevée que la dose autorisée serait tolérée, mais on ne connaît aucun groupe de malades à qui cette dose plus élevée serait suffisamment bénéfique pour justifier une évaluation chez l'homme.

On a ensuite évalué l'efficacité du cidofovir contre le virus variolique dans le modèle de prophylaxie après exposition. Des groupes de trois singes cynomolgus ont été traités les jours 0, 1 ou 2 et comparés à des singes sous placebo. Parmi ceux-ci, un singe sur trois (33 %) est mort et, chez tous les trois, la maladie a été extrêmement grave. Chez aucun des singes traités par le cidofovir il n'y a eu de mort ou de maladie grave. Comparativement aux animaux sous placebo, le nombre de lésions et la charge virale étaient réduits chez tous les singes traités par l'antiviral ($P < 0,01$). Le modèle de variole hémorragique a été utilisé pour démontrer le succès de la prophylaxie par le cidofovir, mais le caractère irrésistible de l'infection fait que ce modèle n'est pas valable pour déterminer l'efficacité du traitement contre la variole classique.

Ces résultats ont fait la preuve que le cidofovir administré avant l'apparition de l'éruption – mais pas après (données non présentées) – peut éviter une issue fatale. Cela étant, pour obtenir un résultat optimal, il a fallu une dose de 20 mg/kg. La question de savoir quel est l'équivalent exact, pour un sujet humain, de la dose trouvée chez le singe cynomolgus n'est pas totalement tranchée, mais cette dose de 20 mg/kg est de toute façon supérieure à la dose de 5 mg/kg qui est autorisée pour le traitement de la rétinite à CMVH chez l'homme. Les données d'innocuité limitées dont on dispose à propos des sujets humains donnent à penser qu'une dose de 10 mg/kg pourrait être tolérée, mais les études d'innocuité qu'il faudrait faire pour le vérifier ne sauraient être justifiées du fait qu'il n'y a aucun groupe de malades auxquels une dose plus élevée serait susceptible d'apporter un bénéfice qui l'emporte sur le risque de néphrotoxicité. Il n'est donc pas possible d'obtenir les données d'innocuité qui seraient nécessaires pour défendre l'autorisation d'une dose plus élevée. Il est important de noter que, dans ces modèles, on va à l'échec si l'on intervient après l'apparition des lésions. Ces deux modèles peuvent donner lieu à une maladie plus grave que la variole, notamment du fait que le processus morbide est accéléré ; cela dit, il est possible que le cidofovir permette de traiter efficacement la variole, mais on n'a pas encore réussi à mettre au point des modèles symptomatiques moins sévères dans lesquels on puisse mettre en évidence l'efficacité du cidofovir après l'apparition des lésions.

6.6 Le CMX001 par voie orale

Le cidofovir est capté par pinocytose et il nécessite une perfusion intraveineuse qui peut se révéler néphrotoxique. Son analogue lipidique, le 1-O-hexadécyloxypropyl-cidofovir (HDP-cidofovir, CMX001), est biodisponible par voie orale et aucune néphrotoxicité n'a été observée lors des études toxicologiques précliniques ou des essais sur des sujets humains (Kern et al., 2002 ; Keith et al., 2004 ; Painter & Hostetler, 2004 ; Beadle et al., 2006 ; Lebeau et al., 2006) ; le CMX001 est également examiné à la section 6.9. En ce qui concerne le mode d'action de cette molécule, c'est le reste lipidique du CMX001 qui est responsable de ses propriétés pharmacocinétiques dans les organes cibles, alors que l'activité antivirale est dévolue à la fraction nucléotidique. Alors que le cidofovir pénètre dans la cellule par le truchement de processus inefficaces, son conjugué est conçu pour agir comme la lysophosphatidylcholine, en empruntant les voies de pénétration des lipides naturels pour atteindre de fortes concentrations intracellulaires. Une fois que la molécule est à l'intérieur des cellules cibles, sa chaîne lipidique latérale est coupée, vraisemblablement par la phospholipase C, ce qui libère le cidofovir. La conversion du cidofovir en son dérivé

actif, à savoir le diphosphate de cidofovir, est un processus de phosphorylation en deux étapes catalysé par des kinases anaboliques intracellulaires. Le diphosphate de cidofovir exerce son action antivirale à l'intérieur de la cellule, en agissant comme un puissant inhibiteur compétitif et sélectif de la synthèse de l'ADN viral.

L'activité antivirale du CMX001 a été caractérisée vis-à-vis des orthopoxvirus tant *in vitro* qu'*in vivo* – chez la souris, le lapin et les primates non humains. *In vitro*, le CMX001 est actif contre le virus variolique à la concentration de 0,1 µM et contre les virus de la variole bovine, de la vaccine, de l'ectromélie et de la variole du lapin à des concentrations allant de 0,5 à 0,9 µM (Hostetler, 2009). Chez la souris, le CMX001 prévient efficacement la mortalité après infection intranasale avec un inoculum létal de virus de l'ectromélie, de la variole bovine, de la vaccine ou de l'orthopoxvirose simienne lorsqu'il est administré plusieurs jours après la contamination. La posologie efficace est de 1 mg/kg à 20 mg/kg une fois par jour pendant 5 jours. Une dose unique de 20 à 100 mg/kg peut également être efficace dans certains cas. Une étude sur modèle lapin a montré que le CMX001 prévient efficacement la mortalité après une infection létale par le virus de la variole du lapin. La dose efficace allait dans ce cas de 1 mg/kg deux fois par jour pendant 5 jours à 20 mg/kg une fois par jour pendant 5 jours. Une dose unique de 20 mg/kg est également efficace dans certains cas. Dans une étude récente randomisée, en aveugle et avec groupe placebo portant sur des lapins infectés par le virus de la variole du lapin et pendant laquelle les animaux avaient reçu, après l'apparition des lésions, trois doses de 20 mg/kg administrées tous les 2 jours (dose totale de 60 mg/kg), le schéma thérapeutique utilisé a conféré une protection statistiquement significative contre la mortalité après inoculation intradermique d'une dose létale de virus (11 survivants sur 12 dans le groupe traité par le CMX001 contre 2 survivants sur 12 dans le groupe placebo).

La métabolisation du CMX001 et l'exposition à ce composé étant différentes chez les primates non humains, les résultats des études sur le singe cynomolgus ne sont pas extrapolables à des patients humains. Cela étant, le cidofovir s'est révélé efficace dans des modèles simiens et les deux composés, cidofovir et CMX001, ont le même métabolite actif, à savoir le diphosphate de cidofovir. C'est ainsi que des singes infectés par une inoculation intraveineuse létale d'orthopoxvirus simiens ont été protégés d'une issue fatale par l'administration de cidofovir à la dose de 20 mg/kg les jours 1, 6 et 11 après l'infection ; il y a eu 7 survivants sur 8 animaux dans le groupe traité et 1 survivant sur 8 dans le groupe placebo (Huggins, résultats inédits, 2004).

Globalement, ces expérimentations animales à plusieurs volets sur le CMX001 et le cidofovir montrent que ces deux composés sont actifs contre diverses orthopoxviroses *in vivo* selon diverses modalités telles que traitement avant exposition ou traitement après exposition en présence d'une maladie symptomatique (c'est-à-dire après l'apparition des lésions). De plus, le cidofovir par voie intraveineuse peut être utilisé pour modéliser une exposition efficace de primates non humains à son métabolite diphosphaté, une évaluation directe du CMX001 n'étant pas possible chez ces animaux en raison de leur métabolisme différent. Pour cela, on déterminera le degré d'exposition systémique au CMX001 et/ou au cidofovir ainsi que les taux de diphosphate de cidofovir dans les mononucléaires du sang périphérique obtenus après administration lorsque la dose efficace est administrée selon le schéma voulu. Les études proposées seront effectuées sur des lapins infectés par la variole du lapin auxquels du CMX001 sera administré par voie orale, ainsi que sur des singes cynomolgus infectés par l'orthopoxvirus simien ou par le virus variolique et qui, eux, recevront du cidofovir par voie intraveineuse.

Pour déterminer la dose efficace équivalente chez l'homme, on s'appuiera sur la pharmacocinétique du CMX001 et/ou du cidofovir, ainsi que sur les taux intracellulaires de diphosphate de cidofovir dans les mononucléaires du sang périphérique de lapins en bonne santé ou infectés. Pour le traitement de la variole humaine, la dose et la posologie efficaces du CMX001 seront celles qui maintiennent, dans les mononucléaires du sang périphérique,

une concentration en diphosphate de cidofovir égale ou supérieure à la concentration efficace déterminée sur les modèles animaux pendant une durée correspondant au cours normal de la maladie.

Le CMX001 est bien absorbé par l'organisme humain, ce qui se traduit par des concentrations plasmatiques élevées. Un sujet humain présentant une infection évolutive par le virus de la vaccine a été traité avec succès grâce à un schéma thérapeutique comportant l'administration de CMX001. Pour plus de détails sur ce cas, on pourra consulter le site Internet de *Morbidity and Mortality Weekly Review*.¹³ Actuellement, le CMX001 est en phase II de développement clinique chez l'homme en vue du traitement des infections à virus BK et à CMVH. À ce jour, il a été administré à plus de 80 personnes – volontaires en bonne santé ou malades – dans le cadre de trois essais cliniques, sans que l'on observe de graves événements indésirables qui lui soient imputables.

6.7 Le ST-246 par voie orale

Le ST-246 ou técovirimat est une petite molécule qui manifeste une activité puissante et sélective contre toute une gamme d'orthopoxvirus, notamment l'orthopoxvirus simien, le virus de la variole du chameau, le virus de la variole bovine, le virus de l'ectromélie et le virus variolique (Yang et al., 2005 ; Bailey et al., 2007). Cet antiviral a pour cible un gène (le gène *V061* du virus de la variole bovine, le gène *F13L* du virus de la vaccine et, en ce qui concerne le virus de variole souche Bangladesh, le gène *C17L* du VARV-ORF-040) qui code pour une protéine majeure de l'enveloppe – la p37, présente sur la membrane externe du virus enveloppé extracellulaire (EEV). Cette protéine est nécessaire à la production de virus extracellulaires. En présence de ST-246, il y a inhibition de la formation des plages et des effets cytopathiques produits par le virus. En outre, des tests de production virale effectués en conditions de faible multiplicité d'infection ont montré que la production de virus extracellulaires est réduite d'un facteur 158 et celle de virus intracellulaires d'un facteur 11. Le ST-246 n'a pas provoqué de défaut dans la production de virus intracellulaires matures (IMV) mais le blocage de la formation de virus enveloppés extracellulaires a réduit la propagation du virus aux cellules saines. Le traitement par le ST-246 n'affecte pas la formation ni la morphologie des particules d'IMV, comme le montre l'examen au microscope électronique à transmission. *In vivo*, l'administration de ST-246 à des souris BALB/c les a protégées contre une infection létale par une dose intranasale égale à 10 DL₅₀ de virus vaccinal (souche J de l'International Health Department). Les souris traitées qui ont survécu à l'infection ont acquis une immunité protectrice et ont résisté à une épreuve virulente ultérieure avec une dose létale de virus vaccinal représentant 10 DL₅₀ (Yang et al., 2005). Administré deux fois par jour à la dose de 50 mg/kg à des souris ANC/R, le ST-246 a protégé ces animaux contre une infection létale par une dose intranasale de virus de l'ectromélie égale à 40 000 DL₅₀. Huit jours après l'infection, la charge virale infectieuse dans les tissus hépatiques, spléniques et pulmonaires était inférieure à la limite de détection (<10 UFP/ml) chez les animaux traités par le ST-246. En revanche, chez les animaux du groupe placebo, la charge virale moyenne dans les tissus hépatiques, spléniques et pulmonaires était respectivement égale à 6,2 x 10⁷, 5,2 x 10⁷ et 1,8 x 10⁵ UFP/ml. L'administration de ST-246 par voie orale a empêché l'apparition de lésions caudales provoquées par le virus vaccinal chez des souris NMRI à qui ce virus avait été inoculé dans la veine caudale. Administré par voie orale, le ST -246 a également protégé des écureuils terrestres à 13 bandes contre une épreuve virulente à l'aide d'orthopoxvirus simiens jusqu'à 3 jours après l'infection (Sbrana et al., 2007). Si l'on considère l'ensemble des résultats, il apparaît que la cible de l'action antivirale est bien la protéine p37 et qu'un inhibiteur de la formation du virus enveloppé extracellulaire peut protéger la souris contre une orthopoxvirose. Aux États-Unis, la société SIGA Technologies a obtenu le statut de nouveau médicament expérimental (*IND*) avec procédure accélérée (*Fast Track status*) pour le

¹³ <http://www.cdc.gov/mmwr/>.

ST-246 compte tenu du très bon profil d'innocuité de la molécule qui ressort des essais précliniques. (Cette procédure accélérée permet de soumettre à la FDA les résultats des essais cliniques à mesure qu'ils sont disponibles, au lieu d'attendre que les essais soient achevés.)

Pour déterminer l'activité du ST-246 administré en prophylaxie après exposition, on a utilisé des singes cynomolgus infectés par le virus variolique, car ce modèle animal ressemble d'assez près à la variole humaine. Dans le groupe placebo, la maladie était bien caractérisée avec 1250 lésions pustuleuses et un taux de mortalité de 33 %. L'administration de ST-246 par gavage a commencé 24 heures après l'infection dans le groupe traité, alors qu'il y avait déjà plus de 10^8 génomes/g dans la moelle osseuse, la rate, certains ganglions lymphatiques et le foie, et que la charge virale atteignait 10^4 - 10^6 génomes/g dans tous les tissus. Le traitement a fait obstacle à la maladie à en juger par l'absence complète de lésions (le meilleur indicateur prédictif de la gravité de la variole chez les sujets humains) et de tout signe clinique ou biologique important. Le titre viral mesuré dans le sang n'était pas augmenté par rapport à sa valeur avant traitement (10^6 génomes/ml) et le virus a été éliminé en 6 jours, contre 16 jours chez les animaux du groupe placebo (d'après des données rétrospectives) (Huggins et al., 2009).

Pour une autre évaluation du ST-246, on a eu recours à une infection de singes cynomolgus par l'orthopoxvirus simien, infection qui ressemble beaucoup à la variole humaine. Dans le groupe placebo, la maladie était bien caractérisée avec plus de 1500 lésions pustuleuses et une mortalité de 100 %. L'administration du ST-246 par gavage a commencé 24 heures après l'infection, alors qu'il y avait déjà plus de 10^7 génomes/g dans la moelle osseuse, la rate, certains ganglions lymphatiques et le foie et que la charge virale atteignait 10^5 - 10^6 génomes/g dans tous les tissus. Le traitement a fait obstacle à la maladie à en juger par l'absence complète de lésions et de tout signe clinique ou biologique important. Le titre viral mesuré dans le sang n'était pas augmenté par rapport à sa valeur avant traitement et le virus a été éliminé en 4 jours, contre 16 jours chez les animaux du groupe placebo ou ceux qui avaient été traités par du cidofovir en intraveineuse (d'après des données rétrospectives). Dans une expérience distincte, l'administration de ST-246 par gavage a commencé 3 jours après l'infection, alors qu'il y avait déjà plus de 10^8 génomes/g dans la moelle osseuse, la rate, certains ganglions lymphatiques et le foie et que la charge virale dépassait 10^6 génomes/g dans tous les tissus. Cette fois encore, le traitement a fait obstacle à la maladie, à en juger par l'absence complète de lésions chez deux singes sur trois – et, sur le troisième, moins de 5 % du nombre de lésions relevées chez les témoins (ces lésions n'ont pas progressé) – ainsi que par l'absence de tout signe clinique ou biologique important. Le titre viral mesuré dans le sang n'était pas augmenté par rapport à sa valeur avant traitement et le virus a été éliminé en 6 jours, contre 16 jours chez les animaux du groupe placebo (Jordan et al., 2009). À la dose de 10 mg/kg chez le singe (qui est équivalente à la dose qui est proposée pour des patients humains), le ST-246 permet de traiter avec succès une orthopoxvirose simienne après l'apparition des lésions. Les études initiales, qui ont été effectuées avec une dose de 300 mg/kg, ont donné des résultats encore plus spectaculaires.

Le ST-246 a été sélectionné parmi divers analogues à la suite de travaux de grande envergure destinés à optimiser l'activité et la stabilité de la molécule et consistant en tests de métabolisme hépatique portant sur la fraction S9. Le composé s'est fixé modérément aux protéines (à environ 80 % chez l'homme et environ 88 % chez le singe et la souris, de 0,03 μ M à 50 μ M). L'exposition était limitée par l'absorption, qui a réduit la biodisponibilité à environ 30 %. Malgré ces limitations, l'activité du composé est un facteur extrêmement important de son efficacité. La fixation aux protéines, l'absorption et l'excrétion des petites molécules varient d'une espèce à l'autre, et c'est un aspect qui peut avoir un impact considérable sur l'efficacité observée dans les modèles animaux et qui par conséquent en limite la valeur prédictive pour les sujets humains. Les problèmes inattendus qui surgissent du fait de ces différences montrent de façon concrète pourquoi une molécule active chez un petit rongeur n'aboutira pas forcément à un produit clinique utilisable.

6.8 Effet de l'administration d'antiviraux sur la protection conférée par le vaccin

6.8.1 Cidofovir et Dryvax

L'effet d'une administration concomitante de cidofovir et de Dryvax a été étudié sur la souris et le singe. Chez le macaque cynomolgus, la coadministration d'une dose unique de cidofovir (20 mg/kg) et de Dryvax a réduit la charge de virus de la vaccine ainsi que les effets indésirables du vaccin par rapport au vaccin seul. Cela dit, le cidofovir a eu également pour effet de réduire l'immunité à en juger d'après les réponses cellulaires et humorales, et il a amoindri la protection contre une épreuve virulente au moyen d'orthopoxvirus simiens (nbre de survivants/nbre total de sujets = 2/6 dans le groupe placebo, 6/6 dans le groupe Dryvax et 5/6 dans le groupe cidofovir + Dryvax) (Wei, 2009). Lorsque du Dryvax et du cidofovir (12,5 mg/kg) ont été administrés de façon concomitante à des souris A/NCR, on a constaté que les lésions étaient plus réduites et guérissaient plus vite que lorsque le vaccin était administré seul. Comme dans le cas de l'étude sur le singe, la réponse anticorpale était réduite mais, inversement, on ne constatait pas de réduction visible de la protection contre une épreuve virulente à l'aide d'un orthopoxvirus hétérologue (virus de l'ectromélie). Ces données révèlent de façon constante une réduction des titres d'anticorps lorsque le cidofovir est coadministré avec le Dryvax, comme on peut s'y attendre lorsqu'une molécule bloquant la réplication à un stade précoce du cycle viral est associée à un vaccin qui nécessite toute une série de réplifications avec les inoculums habituels. Il est prévu d'effectuer des études afin d'examiner l'effet que peut avoir le CMX001 sur la vaccination par la souche vaccinale Ankara modifiée (IMVAMUNE) administrée à haute dose, étant donné qu'il n'y a pas de réplication dans les cellules humaines.

6.8.2 ST-246 (técovirimat) et Dryvax ou ACAM2000

Des travaux ont montré que l'efficacité des vaccins Dryvax et ACAM2000 n'est pas compromise par un traitement au ST-246 administré au moment de la vaccination. Des souris immunocompétentes normales ont été vaccinées par le Dryvax (Grosenbach et al., 2008) ou par l'ACAM2000 (Berhanu et al., 2010) en utilisant les doses et la voie d'administration normales chez l'homme, puis traitées par du ST-246 immédiatement après la vaccination. Le traitement par le ST-246 a réduit la gravité des lésions vaccinales ainsi que la durée nécessaire à leur disparition. De plus, l'excrétion de virus au niveau des lésions était moindre (Berhanu et al., 2009). Il est possible que le ST-246 ait légèrement réduit les réponses immunitaires humorales, mais les réponses immunitaires cellulaires étaient par contre légèrement accrues. Les animaux vaccinés et traités par le ST-246 se sont révélés également protégés contre une épreuve virulente létale effectuée ultérieurement, tant lors d'études à court terme que d'études à long terme, ce qui montre clairement que le ST-246 n'a pas d'effet indésirable sur l'efficacité du vaccin. Dans le prolongement de ces études, une série de travaux a été entreprise à l'aide de nombreux modèles murins immunodéficients qui ont été vaccinés avec l'ACAM2000 en utilisant la dose et la voie d'administration habituelles pour des sujets humains, puis traités par le ST-246 (Behranu et al., 2010). Le ST-246 s'est montré efficace dans tous les modèles sauf ceux qui présentaient une absence totale d'immunité cellulaire (déficit combiné en CD4⁺ et CD8⁺). Le ST-246 a réduit les effets réactogènes du vaccin et la durée nécessaire à la disparition de la lésion vaccinale. L'excrétion de virus au niveau de la lésion a également été réduite par ce traitement. En ce qui concerne les modèles présentant une immunodéficiência partielle, la vaccination n'a pas eu d'effets indésirables et les animaux se sont montrés ensuite capables de résister à une épreuve virulente létale lors d'études à court et à long terme. Ces résultats montrent que, même en cas d'immunodéficiência partielle, le ST-246 améliore l'innocuité du vaccin tout en permettant de susciter de solides réponses immunitaires capables de protéger contre une épreuve virulente mortelle.

6.9 Médicaments en cours de développement clinique

Un rapport émanant de l'Institut de Médecine des États-Unis et intitulé *Live variola virus: considerations for continuing research* (Le virus variolique vivant : considérations relatives à la poursuite de la recherche) conclut que « la raison la plus impérieuse de conserver pendant une longue période des stocks de virus varioliques vivants tient au rôle essentiel qu'ils peuvent jouer dans l'identification et le développement d'antiviraux en prévision d'une importante flambée de variole » (US Institute of Medicine, 2009).

Bien que l'on ait découvert beaucoup de composés capables d'inhiber la réplication des orthopoxvirus dans de nombreux systèmes d'épreuve *in vitro* (y compris des tests limités sur le virus variolique), le nombre de ceux qui ont été testés sur de petits animaux – des souris, en général – est faible. Smee a récemment passé en revue les modèles animaux d'orthopoxviroses, des modèles murins principalement, utilisés pour évaluer l'activité antivirale de ces composés (Smee, 2008). Des informations utiles peuvent être tirées de ces modèles, mais ces expérimentations ne constituent que la première étape du complexe et long (plusieurs années) processus nécessaire pour obtenir l'autorisation d'un médicament.

La plupart des composés qui se révèlent protecteurs lors de l'expérimentation animale initiale finiront par poser à un moment ou à un autre un problème qui empêchera d'en faire des médicaments utiles : toxicité excessive, inactivation métabolique, incapacité à s'accumuler en quantité suffisante dans les tissus cibles, production économiquement irréalisable et bien d'autres problèmes encore.

À ce jour, trois composés ont atteint un stade de développement suffisant pour être évalués en tant que nouveaux produits expérimentaux (*IND* aux États-Unis) : le cidofovir, qui est autorisé pour le traitement de la rétinite à CMVH ; le CMX001, qui est une prodrogue lipidique du cidofovir ; et le ST-246. Ces trois molécules sont actives contre des orthopoxvirus de substitution chez un certain nombre de petits rongeurs et deux d'entre eux, le cidofovir et le ST-246, confèrent une protection contre le virus variolique sur modèles primates. Aucun d'eux n'a toutefois été autorisé pour le traitement de la variole car les évaluations nécessaires n'ont pas encore été menées à leur terme.

Comme des essais cliniques portant sur la variole seraient contraires à l'éthique, la FDA a mis au point, pour certains médicaments, un dispositif d'autorisation qui permet d'en évaluer l'efficacité sur des modèles animaux ; ce dispositif constitue ce que l'on appelle souvent l'« *Animal rule* ». Aux termes de cette disposition réglementaire, les études sur modèles animaux sont soumises à des analyses aussi approfondies et menées avec la même rigueur scientifique que les essais cliniques sur des sujets humains qui sont exigés à l'appui des demandes d'autorisation relatives à des produits ayant d'autres types d'indication et dont les procédures d'homologation sont différentes.

Selon le Centre pour l'Évaluation des Médicaments et la Recherche pharmaceutique de la FDA, il n'y a pas d'arguments convaincants pour justifier que cet organisme autorise une indication antivariolique en faisant l'impasse sur les données concernant le virus variolique lui-même. Cela signifie que la FDA pourrait ne pas accorder l'autorisation de mise sur le marché d'un médicament antivariolique au cas où elle n'aurait pas communication de données relatives à l'efficacité de ce produit obtenues sur des modèles animaux infectés par le virus variolique. Étant donné l'histoire naturelle unique et la virulence particulière de ce virus, les procédures d'autorisation d'un médicament pour des indications antivarioliques n'apparaissent ni claires ni uniformes, même avec un modèle sur lequel seraient effectuées des épreuves virulentes avec le virus variolique. Ailleurs qu'aux États-Unis, les organismes de réglementation pharmaceutique qui sont l'équivalent de la FDA sont même encore moins formalistes dans les avis qu'ils ont donnés. Certains promoteurs pourront opter pour la poursuite du développement de leur produit en vue du traitement d'autres pathologies tout en lui conservant le statut de nouveau médicament expérimental (*IND*) ou son équivalent

pour le traitement de la variole. Cela étant, utiliser un nouveau produit expérimental en situation d'urgence peut poser des problèmes compliqués d'un autre genre, notamment d'ordre logistique. Pour tenter de les résoudre en partie, la FDA est convenue d'une procédure d'utilisation en cas d'urgence, mais les modalités de sa mise en œuvre sont encore à l'étude.

La FDA a également publié des recommandations provisoires (USFDA, 2007) sur la manière d'utiliser l'« *Animal rule* ». Toutefois, pour des raisons qui tiennent essentiellement au manque d'informations détaillées au sujet de la variole humaine, la FDA ne s'est pas encore prononcée sur le point de savoir s'il existe un modèle animal de variole qui réponde aux prescriptions de l'« *Animal rule* ». Tout médicament autorisé aux termes de cette réglementation doit également être conforme à toutes les autres exigences de la procédure d'AMM, y compris la preuve de son innocuité pour l'homme. À moins que le médicament puisse également être utilisé pour traiter d'autres maladies que les orthopoxviroses, il doit être expérimenté sur des volontaires en bonne santé. Il ne peut donc s'agir que de médicaments dont les effets secondaires sont minimes car, dans le cas contraire, les sujets participant à l'expérimentation n'en tireraient aucun bénéfice. Un tel impératif limite sensiblement le nombre de médicaments expérimentaux susceptibles d'être développés. Dans le cas d'un malade de la variole pour qui le risque de décès est de 30 %, une certaine toxicité est tolérable, mais cette considération n'est plus de mise s'agissant des tests d'innocuité sur des sujets humains.

6.10 Durée de développement des agents thérapeutiques antivarioliques

Tous les tests d'efficacité des thérapies antivirales contre la variole doivent se conformer à l'« *Animal rule* », mais il est clair que le fait de se contenter de modèles animaux pour évaluer l'efficacité d'une molécule ne permet pas de raccourcir la procédure d'autorisation. En réalité, cela rend l'avancement de la procédure encore plus compliqué car la réglementation scientifique sur laquelle elle s'appuie est en pleine évolution. Il n'y a que deux médicaments qui aient été évalués à ce jour en vertu de l'« *Animal rule* », aussi est-il prématuré de chercher à déterminer le nombre et la nature des études qu'il faudra effectuer pour prouver l'efficacité des agents thérapeutiques antivarioliques. Bien des défis scientifiques devront encore être relevés pour répondre à ces questions, ce qui rend incertaine l'estimation du temps nécessaire pour obtenir l'homologation d'un tel agent.

Il y a également encore beaucoup d'incertitude quant à la combinaison de données *in vitro* et de données tirées de modèles animaux qui constituera une preuve d'efficacité suffisante. Les organismes de réglementation pharmaceutique donnent des indications sur la nature des études qui pourraient être utiles à l'évaluation d'un médicament expérimental, mais il leur est difficile de donner des directives précises ; en fait, ils ont plutôt tendance à demander au promoteur du médicament d'établir un plan de développement clinique du produit et de le leur soumettre. Dans certains domaines, lorsque plusieurs produits ont été autorisés pour traiter une maladie donnée, on a fini par entrevoir plus clairement la voie à suivre pour que la demande d'autorisation soit couronnée de succès. Cela étant, à part les indications données par la FDA à l'industrie, les ateliers qu'elle organise et les réunions privées entre la FDA et tel ou tel promoteur de médicament au sujet d'un produit donné (dont les résultats ne sont généralement pas rendus publics), on ne possède aucune expérience sur laquelle s'appuyer pour estimer le délai nécessaire à une homologation. D'ailleurs, la plupart des autres organismes de réglementation sont encore plus avarés de recommandations. Il appartiendra à chaque pays d'approuver l'utilisation d'un médicament donné. En fin de compte, c'est au promoteur du médicament qu'il incombe d'établir un plan de développement clinique qui va servir de guide pour la préparation du dossier de demande d'homologation, dossier qui doit apporter des preuves suffisantes de l'efficacité et de l'innocuité du produit en question. Pour faciliter les choses, la FDA a publié, au sujet des médicaments antivarioliques, la première version d'un document intitulé *Guidance to industry* (Guide pour l'industrie). L'agence va réunir un « Groupe consultatif de la FDA » constitué d'experts

techniques, afin de l'aider à déterminer à quelle combinaison de modèles animaux il va falloir faire appel en lieu et place des essais cliniques sur l'homme en vue des tests d'efficacité sur modèle animal/virus variolique. Ces essais sur l'animal devront être « bien contrôlés » : s'agissant d'expérimentation animale, cela veut dire qu'ils devront être conformes aux bonnes pratiques de laboratoire (BPL). Il est difficile de respecter les BPL dans un environnement au niveau 3 de sécurité biologique pour la manipulation d'orthopoxvirus simiens, mais c'est néanmoins possible (Huggins, données inédites, 2008). En revanche, il ne sera peut-être pas très commode de respecter totalement la réglementation BPL lors d'études sur le virus variolique au niveau 4 de sécurité biologique, du fait des restrictions imposées par le port d'un « scaphandre » de protection. En raison du nombre très important d'inconnues, on sera peut-être contraint, à un moment ou à un autre, d'effectuer des études complémentaires non prévues sur le virus variolique avant l'homologation définitive. La réglementation actuelle de la FDA prescrit de conserver pendant les deux années qui suivent l'autorisation de mise sur le marché le matériel biologique ayant servi aux études essentielles afin de permettre une réévaluation du médicament si des problèmes surgissent pendant son utilisation en clinique. On ignore comment cette règle s'appliquera dans le cas d'un médicament antivariolique.

À la lumière de l'expérience acquise dans l'industrie pharmaceutique, on estime que les médicaments qui sont admis aux essais de phase I ont environ 10 à 25 % de chances d'obtenir une autorisation, et la suite de la procédure prend habituellement 5 à 8 années supplémentaires. Face à de telles contraintes, il est remarquable que trois molécules aient bénéficié du statut de *nouveau médicament expérimental* (IND aux États-Unis) et que deux firmes collaborent avec la FDA pour déterminer la voie à suivre en vue d'une homologation. En étant réaliste, on peut dire qu'il faudra vraisemblablement au moins 5 à 10 ans pour cela, même si toutes les études sont couronnées de succès. Quoi qu'il en soit, il est capital que toutes les études voulues soit menées à bien non seulement pour l'obtention réglementaire de l'autorisation de mise sur le marché, mais aussi de manière à apporter aux responsables de la santé publique des informations suffisantes pour que les maigres ressources dont ils disposent puissent être affectées dans des conditions qui permettent de contenir au mieux toute épidémie et de réduire le plus possible la morbidité et la mortalité parmi les cas cliniques. Pour obtenir ces informations, on pourra être amené à effectuer des études complémentaires, notamment pour transposer des modèles animaux à l'homme les effets bénéfiques probables du traitement et également pour déterminer quel en sera vraisemblablement l'impact en termes de ressources médicales nécessaires.

6.11 Considérations finales

Dans beaucoup de cas, il n'existe pas d'antiviraux – même pas sous la forme de nouveaux médicaments expérimentaux – pour traiter les viroses, y compris des affections comme un rhume banal, alors qu'un médicament efficace pourrait être une énorme source de profit. Cela montre à l'évidence que mettre au point des antiviraux n'est pas chose facile.

Il est remarquable, dans ces conditions, que trois médicaments potentiels aient pu obtenir le statut de nouveau médicament expérimental (IND aux États-Unis) en vue du traitement des maladies dues aux orthopoxvirus, et que tous les trois aient été utilisés pour traiter des événements indésirables liés à la vaccination par le virus de la vaccine. Aucun d'entre eux en revanche n'a été utilisé pour traiter des cas humains d'orthopoxvirose simienne, et des données complémentaires sur leur innocuité seront encore nécessaires avant que l'on puisse étudier sans risque la possibilité de les utiliser dans les zones reculées où la transmission de cette orthopoxvirose se poursuit.

Beaucoup plus nombreux sont les composés qui semblent prometteurs, mais leur développement est moins avancé. Plusieurs centaines de molécules se sont révélées actives dans des tests en culture cellulaire et il y en a plus d'une bonne dizaine qui sont au stade de l'évaluation initiale sur de petits rongeurs. On est fondé à affirmer qu'il est essentiel de poursuivre les travaux sur ces composés tout en cherchant à découvrir de nouveaux

moyens pour inhiber la réplication virale. L'expérience acquise dans l'industrie montre qu'il est actuellement impossible de savoir si l'un ou l'autre des trois nouveaux composés expérimentaux finira par obtenir une autorisation de mise sur le marché et que, par voie de conséquence, nous devons encore redoubler d'efforts pour développer d'autres médicaments antivarioliques. Ces travaux devraient notamment porter sur les points suivants : utilisation d'orthopoxvirus de substitution, évaluation des composés prometteurs eu égard à leur activité vis-à-vis du virus variolique lui-même et – à un stade beaucoup plus tardif de leur développement, une fois qu'aura été établi l'équivalent chez le primate de la dose proposée pour l'homme – évaluation de leur efficacité vis-à-vis du virus variolique sur modèles primates, lorsqu'on sera en mesure de poser un diagnostic clinique et d'instituer un traitement.

Pour l'instant, il n'est pas possible de savoir s'il faudra encore travailler longtemps sur le virus variolique vivant. Ce qui est certain toutefois, c'est que ces travaux seront nécessaires jusqu'à ce qu'au moins deux médicaments soient autorisés pour le traitement des cas cliniques de variole.

La FDA a répété à plusieurs reprises qu'elle n'envisageait pas de procédure d'autorisation qui ne nécessite pas l'obtention de données d'efficacité sur un modèle infecté par le virus variolique. Vu l'impossibilité d'effectuer des essais cliniques de médicaments antivarioliques sur des sujets humains, les tests d'efficacité devront être effectués en conformité avec les prescriptions de l'« *Animal rule* » (US 21CFR310.610) ou selon la procédure fixée par les organismes de réglementation pharmaceutique d'autres pays en vue d'une autorisation de mise sur le marché sur leur territoire. Compte tenu des incertitudes qui entourent la mise en pratique de l'« *Animal rule* » du fait qu'elle n'a pas été souvent appliquée jusqu'ici et qu'aucun médicament antivariolique n'a encore été utilisé, il est difficile de pronostiquer de façon sûre dans quel délai et sur la base de quelles données la FDA donnera son feu vert. Il y a au moins autant d'incertitudes en ce qui concerne les autres pays.

Abréviations

ADN	acide désoxyribonucléique
ARN	acide oxyribonucléique
BPL	bonnes pratiques de laboratoire
CMVH	cytomégalovirus humain
CMX001	HDP-cidofovir, 1-O-hexadécyloxypropyl-cidofovir
EEV	virus enveloppé extracellulaire
HMPC	cidofovir
IMCBH	N_1 -isonitinoyl- N_2 -3-méthyl-4-chlorobenzoylhydrazine
IMV	virus mature intracellulaire
IND	investigational new drug (<i>nouveau médicament expérimental</i>)
IV	voie intraveineuse
NSB	niveau de sécurité biologique
OMS	Organisation mondiale de la Santé
sida	syndrome d'immunodéficience acquise
UFP	unité formatrice de plages
USAMRIID	United States Army Medical Research Institute for Infectious Diseases
USFDA	Food and Drug Administration des États-Unis d'Amérique
VECTOR	Centre de Recherche d'État en Virologie et Biotechnologie de la Fédération de Russie

Références bibliographiques

- Alkhalil A et al. (2009). Inhibition of monkeypox virus replication by RNA interference. *Virology Journal*, 6: 188.
- Bailey TR et al. (2007). N-(3,3a,4,4a,5,5a,6,6a-Octahydro-1,3-dioxo-4,6-ethenocycloprop[*f*]isoindol-2-(1H)-yl)carboxamides: identification of novel orthopoxvirus egress inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 50: 1442–1444.
- Baker RO, Bray M, Huggins JW (2003). Potential antiviral therapeutics for smallpox, monkeypox and other orthopoxvirus infections. *Antiviral Research*, 57: 13–23.
- Bauer DJ (1955). The antiviral and synergic actions of isatin thiosemicarbazone and certain phenoxypyrimidines in vaccinia infection in mice. *British Journal of Experimental Pathology*, 36: 105–114.
- Beadle JR et al. (2006). Synthesis and antiviral evaluation of alkoxyalkyl derivatives of 9-(S)-(3-hydroxy-2-phosphonomethoxypropyl)adenine against cytomegalovirus and orthopoxviruses. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49: 2010–2015.
- Berhanu A et al. Impact of ST-246 on ACAM2000 smallpox vaccine reactogenicity, immunogenicity, and protective efficacy in immunodeficient mice. *Vaccine*, doi: 10.1016/j.vaccine.2010.10.039.
- Berhanu A et al. (2009). ST-246 inhibits in vivo poxvirus dissemination, virus shedding, and systemic disease manifestation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(12): 4999–5009.
- Bray M et al. (2000). Cidofovir protects mice against lethal aerosol or intranasal cowpox virus challenge. *The Journal of Infectious Diseases*, 181: 10–19.
- De Clercq E (2001). Vaccinia virus inhibitors as a paradigm for the chemotherapy of poxvirus infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 14: 382–397.
- De Clercq E (2003). Clinical potential of the acyclic nucleoside phosphonates cidofovir, adefovir, and tenofovir in treatment of DNA virus and retrovirus infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 16: 569–596.
- De Clercq E et al. (2005). Antiviral potential of a new generation of acyclic nucleoside phosphonates, the 6-[2-(phosphonomethoxy)alkoxy]-2,4-diaminopyrimidines. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, 24: 331–341.
- Dennis DT et al. (1974). Failure of cytosine arabinoside in treating smallpox. A doubleblind study. *Lancet*, 2: 377–379.
- Fire A et al. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391: 806–811.
- Goebel RJ et al. (1982). Synthesis and antiviral activity of certain carbamoylpyrrolopyrimidine and pyrazolopyrimidine nucleosides. *Journal of Medicinal Chemistry*, 25: 1334–1338.
- Grosenbach DW et al. (2008). Immune responses to the smallpox vaccine given in combination with ST-246, a small-molecule inhibitor of poxvirus dissemination. *Vaccine*, 26(7): 933–946.

- Hahon N (1961). Smallpox and related poxvirus infections in the simian host. *Bacteriological Reviews*, 25: 459–476.
- Hahon N, McGavran MH (1961). Air-borne infectivity of the variola-vaccinia group of poxviruses for the cynomolgus monkey, *Macaca irus*. *The Journal of Infectious Diseases*, 109: 294–298.
- Hahon N, Wilson BJ (1960). Pathogenesis of variola in *Macaca irus* monkeys. *American Journal of Hygiene*, 71: 69–80.
- Helliot B et al. (2003). The acyclic nucleoside phosphonate analogues, adefovir, tenofovir and PMEDAP, efficiently eliminate banana streak virus from banana (*Musa* spp.). *Antiviral Research*, 59: 121–126.
- Hostetler KY (2009). Alkoxyalkyl prodrugs of acyclic nucleoside phosphonates enhance oral antiviral activity and reduce toxicity: current state of the art. *Antiviral Research*, 82(2): A84–A98.
- Huggins J et al. (2009). Nonhuman primates are protected from smallpox virus or monkeypox virus challenges by the antiviral drug ST-246. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53: 2620–2625.
- Jahrling PB, Huggins JW (2005). Orthopoxviruses. In: Swearingen JR, ed. *Biodefense: research methodologies and animal models*. CRC Press, Boca Raton, 207–226.
- Jahrling PB et al. (1980). Lassa virus infection of rhesus monkeys: pathogenesis and treatment with ribavirin. *The Journal of Infectious Diseases*, 141: 580–589.
- Jahrling PB et al. (2004). Exploring the potential of variola virus infection of cynomolgus macaques as a model for human smallpox. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101: 15196–15200.
- Jordan R et al. (2009). ST-246 antiviral efficacy in a nonhuman primate monkeypox model: determination of the minimal effective dose and human dose justification. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53: 1817–1822.
- Keith KA et al. (2003). Evaluation of nucleoside phosphonates and their analogs and prodrugs for inhibition of orthopoxvirus replication. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47: 2193–2198.
- Keith KA et al. (2004). Inhibitory activity of alkoxyalkyl and alkyl esters of cidofovir and cyclic cidofovir against orthopoxvirus replication in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48: 1869–1871.
- Kern ER (2003). In vitro activity of potential anti-poxvirus agents. *Antiviral Research*, 57: 35–40.
- Kern ER et al. (2002). Enhanced inhibition of orthopoxvirus replication in vitro by alkoxyalkyl esters of cidofovir and cyclic cidofovir. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46: 991–995.
- Kern ER et al. (2009). Activities of certain 5-substituted 4'-thiopyrimidine nucleosides against orthopoxvirus infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53: 572–579.
- Koplan JP et al. (1975). Treatment of variola major with adenine arabinoside. *The Journal of Infectious Diseases*, 131: 34–39.

- Kwong CD et al. (1998). Synthesis and antiviral evaluation of analogs of adenosine-N1-oxide and 1-(Benzyloxy)adenosine. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, 17: 1409-1443.
- Lancaster MC et al. (1966). Experimental respiratory infection with poxviruses. II. Pathological studies. *British Journal of Experimental Pathology*, 47: 466–471.
- Lebeau I et al. (2006). Activities of alkoxyalkyl esters of cidofovir (CDV), cyclic CDV, and (S)-9-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)adenine against orthopoxviruses in cell monolayers and in organotypic cultures. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50: 2525–2529.
- LeDuc JW et al. (2002). Smallpox research activities: US interagency collaboration, 2001. *Emerging Infectious Diseases*, 8: 743–745.
- McFadden G (2005). Gleevec casts a pox on poxviruses. *Nature Medicine*, 11: 711–712.
- McKee KT et al. (1988). Ribavirin prophylaxis and therapy for experimental argentine hemorrhagic fever. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 32: 1304–1309.
- Nguyen T et al. (2008). RNAi therapeutics: an update on delivery. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, 10: 158–167.
- OMS (Organisation mondiale de la Santé) (2001). Comité consultatif OMS de la Recherche sur le Virus variolique. Rapport de la deuxième réunion. Organisation mondiale de la Santé, Genève, 2: 1-10.
- OMS (Organisation mondiale de la Santé) (2002). Comité consultatif OMS de la Recherche sur le Virus variolique. Rapport de la quatrième réunion. Organisation mondiale de la Santé, Genève, 5.
- Painter GR, Hostetler KY (2004). Design and development of oral drugs for the prophylaxis and treatment of smallpox infection. *Trends in Biotechnology*, 22: 423–427.
- Rao AR, McFadzean JA, Kamalakshi K (1966). An isothiazole thiosemicarbazone in the treatment of variola major in man. A controlled clinical trial and laboratory investigations. *Lancet*, 1: 1068–1072.
- Rao AR, McFadzean JA, Squires S (1965). The laboratory and clinical assessment of an isothiazole thiosemicarbazone (M 2 b 7714) against pox viruses. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 130: 118–127.
- Rao AR et al. (1966). Assessment of an isothiazole thiosemicarbazone in the prophylaxis of contacts of variola major. *Lancet*, 1: 1072–1074.
- Reeves PM et al. (2005). Disabling poxvirus pathogenesis by inhibition of Abl-family tyrosine kinases. *Nature Medicine*, 11: 731–739.
- Rubins KH et al. (2004). The host response to smallpox: analysis of the gene expression program in peripheral blood cells in a nonhuman primate model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101: 15190–15195.
- Sbrana E et al. (2007). Efficacy of the antipoxvirus compound ST-246 for treatment of severe orthopoxvirus infection. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 76: 768–773.

- Schmutz C et al. (1991). A mutation in the gene encoding the vaccinia virus 37,000-M(r) protein confers resistance to an inhibitor of virus envelopment and release. *Journal of Virology*, 65: 3435–3442.
- Sidwell RW et al. (1972). Broad-spectrum antiviral activity of Virazole: 1-beta-Dribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide. *Science*, 177: 705–706.
- Smee DF (2008). Progress in the discovery of compounds inhibiting orthopoxviruses in animal models. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*, 19: 115–124.
- Smee DF, Sidwell RW (2003). A review of compounds exhibiting anti-orthopoxvirus activity in animal models. *Antiviral Research*, 57: 41–52.
- Sodeik B et al. (1994). Assembly of vaccinia virus: effects of rifampin on the intracellular distribution of viral protein p65. *Journal of Virology*, 68: 1103–1114.
- Stephen EL, Jahrling PB (1979). Experimental Lassa fever virus infection successfully treated with ribavirin. *Lancet*, 1: 268–269.
- USFDA (United States of America Food and Drug Administration) (2007). *Guidance for industry smallpox (variola) infection: developing drugs for treatment or prevention (draft guidance)*. Washington, DC, (<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm071179.pdf>, last accessed November 2010).
- USFDA (United States of America Food and Drug Administration) (2009). Subpart I. Approval of new drugs when human efficacy studies are not ethical or feasible. Section 310.610. Approval based on evidence of effectiveness from studies in animals. 21CFR340.610. In: *Application for FDA approval to market a new drug*, Volume 21CFR310.610. United States of America, Code of Federal Regulations, Washington, DC.
- US Institute of Medicine (2009). *Live variola virus: considerations for continuing research*. National Academy Press, Washington, DC.
- Wei H et al. (2009). Coadministration of cidofovir and smallpox vaccine reduced vaccination side effects but interfered with vaccine-elicited immune responses and immunity to monkeypox. *Journal of Virology*, 83: 1115–1125.
- Westwood JC et al. (1966). Experimental respiratory infection with poxviruses. I. Clinical virological and epidemiological studies. *British Journal of Experimental Pathology*, 47: 453–465.
- Yang G et al. (2005). An orally bioavailable antipoxvirus compound (ST-246) inhibits extracellular virus formation and protects mice from lethal orthopoxvirus challenge. *Journal of Virology*, 79: 13139–13149.