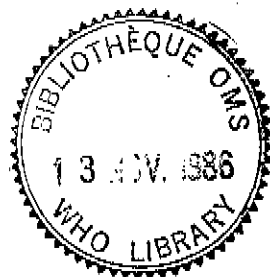




WORLD HEALTH ORGANIZATION
 ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE

PROGRAMME DE LUTTE CONTRE LES MALADIES DIARRHEIQUES



e 7780

WHO/CDD/IMV/86.1 ✓

ORIGINAL : ANGLAIS

7792

MISE AU POINT DE VACCINS CONTRE LES SHIGELLOSES *

Table des matières

	<u>Pages</u>
1. INTRODUCTION	2
2. EPIDEMIOLOGIE	2
3. PATHOGENIE ET SIGNES CLINIQUES DES SHIGELLOSES	3
4. IMMUNITE ENVERS LES SHIGELLOSES	3
5. DETERMINANTS DE LA VIRULENCE AYANT UN INTERET POSSIBLE POUR LA MISE AU POINT DE VACCINS	6
6. VACCINS CONTRE LES <u>SHIGELLA</u>	7
7. ESSAIS SUR LE TERRAIN DE VACCINS CONTRE LES <u>SHIGELLA</u>	9
8. RECOMMANDATIONS CONCERNANT LA RECHERCHE	11
9. LISTE DES PARTICIPANTS	12

* Résumé des discussions d'une réunion qui s'est tenue au National Institute of Cholera and Enteric Diseases, Calcutta, Inde, du 19 au 22 mai 1986. La réunion était organisée en collaboration avec cet Institut et avec le International Centre for Diarrhoeal Disease Research, Bangladesh, Dacca, Bangladesh.

The issue of this document does not constitute formal publication. It should not be reviewed, abstracted, quoted or translated without the agreement of the World Health Organization. Authors alone are responsible for views expressed in signed articles.

Ce document ne constitue pas une publication. Il ne doit faire l'objet d'aucun compte rendu ou résumé ni d'aucune citation ou traduction sans l'autorisation de l'Organisation mondiale de la Santé. Les opinions exprimées dans les articles signés n'engagent que leurs auteurs.

1. INTRODUCTION

Les dysenteries et les diarrhées dues aux Shigella sont des problèmes de santé publique majeurs dans les pays en développement. Shigella est un des cinq organismes pathogènes le plus fréquemment retrouvé chez l'enfant atteint de diarrhée ou de dysenterie aiguë (les autres étant les rotavirus, Escherichia coli, entéropathogène, E. coli et Campylobacter jejuni entérotoxigènes). Les infections à Shigella peuvent être à l'origine d'un certain nombre de complications sérieuses et de taux de mortalité élevés. Des épidémies sévères peuvent être dues à S. dysenteriae 1 (bacille de Shiga).

La mise au point de vaccins pour prévenir les shigelloses est particulièrement importante car les mesures actuelles de lutte contre ces infections, en particulier celles destinées au traitement des cas et à la maîtrise des épidémies, sont d'une efficacité limitée. Par exemple, des souches de Shigella, en particulier les souches épidémiques de S. dysenteriae 1, peuvent être résistantes à la plupart des antibiotiques existants, et même les antibiotiques appropriés peuvent ne pas provoquer d'amélioration clinique rapide ou éviter la mort quand la maladie est grave. Le traitement par réhydratation orale n'a également que peu d'intérêt pour les malades atteints de dysenterie, une déshydratation n'étant pas forcément un signe particulier de gravité. De plus, le traitement d'épisodes graves est coûteux en raison de la nécessité de soins spécialisés qui peuvent exiger l'emploi de nouveaux et coûteux antibiotiques. En dehors des vaccins, les mesures qui peuvent aider à prévenir les shigelloses portent sur l'interruption de la transmission du germe pathogène par l'amélioration de l'hygiène et des conditions sanitaires individuelles, et par la fourniture de quantités suffisantes d'eau pour usage domestique. Il est également probable que l'incidence ou la gravité de la maladie peut être réduite par des interventions non spécifiques comme la vaccination antirougeoleuse, des mesures pour améliorer la nutrition et vraisemblablement un apport supplémentaire de vitamine A.

Ce rapport examine à quoi ont abouti les efforts entrepris pour mettre au point des vaccins contre les shigelloses et énumère les sujets de recherche qui devraient être prioritaires. Il faut souhaiter que ces recommandations permettront de stimuler de nouvelles recherches qui aboutiront finalement à la mise au point de vaccins anti-Shigella efficaces. Le rapport est le troisième d'une série de mises au point sur ce sujet, publiées par l'OMS depuis 1980.^{1,2}

2. EPIDEMIOLOGIE

2.1 Shigellose endémique

La shigellose endémique, due avant tout à S. flexneri (dans les pays en développement) et à S. sonnei (dans les pays développés), est un problème mondial. Dans la plupart des pays en développement, la shigellose a un taux élevé de morbidité et, dans certains d'entre eux, la mortalité est également importante. Les enfants entre un et cinq ans sont particulièrement atteints. La transmission se fait avant tout de personne à personne; elle est plus forte quand l'hygiène personnelle et familiale est insuffisante; les aliments et l'eau peuvent également être des sources d'infection. Les taux d'infection secondaire au sein des familles affectées peuvent atteindre 30 à 50 %. On n'a pas découvert d'hôtes animaux naturels (à l'exclusion des singes rhésus en captivité) ni de réservoirs situés dans l'environnement.

¹ Infections intestinales dues à Campylobacter, Yersinia, Salmonella, et Shigella. Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé, 58: 519-537 (1980).

² Les diarrhées par envahissement : mise au point sur les diarrhées dues aux Shigella, à Campylobacter jejuni, et à Escherichia coli entéro-envahissante. Document OMS non publié CDD/BEI/82.4 (1982).

2.2 Shigellose épidémique et endémique

Une pandémie de shigellose due à S. dysenteriae 1 a commencé en 1969 en Amérique centrale et englobe maintenant une large région d'Afrique centrale et des pays appartenant, ou adjacents, au sous-continent indien. L'analyse des plasmides a montré que la pandémie n'est pas due à la diffusion d'un clone unique de S. dysenteriae 1, et les raisons pour lesquelles des foyers étendus sont apparus dans des sites géographiques séparés ne sont pas claires. Partout cependant, la souche est résistante à de nombreux antibiotiques, y compris ceux le plus fréquemment utilisés pour traiter la shigellose; par exemple, la souche actuellement prévalente au Bangladesh est résistante à la fois à l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole et à l'ampicilline.

2.3 Mesures de lutte

Actuellement, les seules mesures qui permettent de prévenir l'infection sont l'amélioration des conditions sanitaires et l'augmentation de l'approvisionnement en eau, qui agissent en réduisant la transmission fécale-orale. Particulièrement importantes sont celles comme le lavage des mains au savon et à l'eau après défécation et avant de toucher aux aliments, la propreté dans la préparation et la conservation des aliments, et l'élimination hygiénique des excréta. L'allaitement au sein permet, semble-t-il, de réduire la gravité des infections à Shigella chez les nouveau-nés et les jeunes enfants jusqu'à trois ans.

3. PATHOGENIE ET SIGNES CLINIQUES DES SHIGELLOSES

3.1 Pathogénie

La shigellose est la plus transmissible de toutes les maladies bactériennes intestinales : dix germes vivants peuvent déjà provoquer la maladie chez des adultes sains. On sait peu de chose sur la façon dont les Shigella (qui sont acido-sensibles) survivent dans le milieu gastrique, provoquent une diarrhée aqueuse, qui est un signe de la maladie dans certains cas, ou migrent de la lumière du gros intestin vers la surface épithéliale. Il est certain cependant que, pour provoquer une dysenterie, Shigella doit pénétrer dans les cellules épithéliales du côlon et s'y multiplier. Ce processus aboutit à la mort de ces cellules, à l'inflammation de la muqueuse, à des ulcérations et des hémorragies épithéliales qui caractérisent l'anatomopathologie de la maladie.

3.2 Signes cliniques

Les manifestations cliniques des shigelloses comprennent en général l'émission fréquente de selles contenant du sang et du mucus, de la fièvre, des douleurs abdominales et du ténesme. La maladie commence habituellement par une diarrhée aqueuse suivie après 24 à 48 heures par l'apparition de sang et de mucus dans les selles. Une déshydratation est possible, mais seulement dans une faible proportion de cas. Parmi les différentes complications qui peuvent survenir chez 15 à 30 % des cas hospitalisés, et particulièrement chez les enfants, il faut mentionner : une anorexie prolongée, une cachexie nutritionnelle, une entéropathie avec perte de protéines, le syndrome hémolytique et urémique, un état pseudoleucémique, des pneumonies, conjonctivites, arthrites, un iléus paralytique, un mégacôlon toxique, des perforations intestinales, un prolapsus rectal, et une diarrhée persistante. Les taux de mortalité dans les cas hospitalisés dus à S. dysenteriae 1 peuvent dépasser 10 % malgré un traitement par des méthodes recommandées. La maladie est particulièrement grave, et la mortalité élevée, quand elle se déclare après la rougeole ou quand il existe une malnutrition préexistante.

4. IMMUNITE ENVERS LES SHIGELLOSES

4.1 Protection due à une infection précédente

Il existe différents indices en faveur du caractère immunisant de la shigellose : données épidémiologiques, observations de volontaires, et études chez l'animal. Des études effectuées

dans un établissement de rééducation où des infections à S. sonnei et S. flexneri 2a sévissaient de façon endémique ont montré que les enfants dont l'hygiène personnelle était insuffisante présentaient un taux d'attaque élevé de shigellose pendant les 12 à 24 mois suivant leur admission. Ensuite, le taux d'attaque baissait brusquement et restait assez bas pendant la durée du séjour dans l'institution malgré une exposition continue à des enfants infectés et malades. Il semblait possible d'en conclure qu'après une ou plusieurs infections cliniques à Shigella les enfants étaient immunisés, au moins partiellement, envers une réinfection. De même, dans des régions d'endémicité, le fait que les shigelloses atteignent surtout les jeunes enfants semble indiquer qu'il existe une immunité acquise en rapport avec l'âge. Des études sur des volontaires ont montré que les jeunes adultes atteints de shigellose après une exposition initiale expérimentale étaient protégés contre la maladie lors d'une réexposition à la souche homologue (S. flexneri 2a), le taux d'efficacité protectrice de la première infection étant de 64 %. Cependant, il n'y avait pas de différence entre les volontaires réexposés et les témoins en ce qui concerne le taux d'excrétion de Shigella; il est possible que plus d'une exposition à Shigella soit nécessaire pour conférer un niveau élevé d'immunité. Finalement, des études effectuées chez des singes et des lapins ont montré l'existence d'une forte protection envers une réexposition homologue, 3 à 4 semaines après la première exposition virulente.

4.2 Mécanismes de l'immunité envers les shigelloses

L'immunité envers les shigelloses semble reposer, largement ou totalement, sur des mécanismes immunitaires locaux. L'immunisation parentérale provoque l'apparition de titres élevés d'anticorps circulants mais elle n'est pas en général protectrice. La plupart des exemples de protection par immunisation supposent la présentation des antigènes par voie orale ou entérique. Les mécanismes exacts de protection ne sont pas connus et peuvent dépendre d'anticorps locaux, d'une immunité muqueuse à médiation cellulaire, ou des deux. Il est vraisemblable que ces deux mécanismes s'opposent à la multiplication du petit inoculum ingéré primitivement, bien qu'on ne sache pas à quel niveau ceci se produit. Des anticorps envers la toxine Shiga ont-ils un rôle protecteur, particulièrement en cas d'infection par S. dysenteriae 1, ceci n'est pas certain.

4.3 Modèles animaux pour l'étude de la protection immunitaire

Parmi les modèles animaux qui ont été utilisés pour étudier l'immunité protectrice, il faut mentionner la kératoconjunctivite du cobaye (test de Séreny), l'exposition par voie orale de singes rhésus, et un modèle récemment mis au point d'exposition par voie orale du lapin. Ces deux modèles d'exposition par voie orale semblent préférables car ils impliquent l'existence d'une infection intestinale. Le modèle chez le singe a été extrêmement utilisé dans des études sur les vaccins. Ses avantages en sont la similitude de la maladie du singe et celle de l'homme, le fait que les singes captifs sont fortement sensibles aux infections par Shigella, et l'aptitude du modèle à mettre en évidence une protection induite par le vaccin. Ses inconvénients en sont le coût élevé des singes rhésus, les problèmes pratiques que pose leur manipulation, et l'effet possible, prêtant à confusion, d'une infection préalable à Shigella non reconnue.

Un modèle chez le lapin adulte a été mis au point pour les infections à S. flexneri; il nécessite un prétraitement des animaux par la tétracycline, l'administration par voie orale de bactéries résistantes à la tétracycline après neutralisation de l'acide gastrique, et l'administration intrapéritonéale d'une dose unique d'opium. Avec ce modèle, une colonisation dans le petit intestin peut être observée après inoculation de 10^6 - 10^9 bactéries viables et la mort a lieu après inoculation de 10^{10} bactéries. Une colonisation initiale confère une forte protection envers une colonisation ultérieure ou une exposition létale. Ce modèle devrait se montrer utile pour d'autres études sur l'immunité envers Shigella flexneri; mais il ne permet pas d'étudier l'immunité envers S. dysenteriae 1, car les souches testées ne colonisent que faiblement et ne provoquent pas la maladie.

4.4 Sérologie des infections à Shigella

Les shigelloses peuvent induire des réponses immunitaires à la fois humorales et à médiation cellulaire, et ces dernières peuvent être soit muqueuses soit générales. Jusqu'à présent, seules les réponses humorales ont été étudiées de façon approfondie. Les anticorps mesurés

ont été ceux dirigés contre le lipopolysaccharide (antigène-0) et la toxine Shiga. Les réponses aux protéines de la membrane externe (codées par le plasmide de virulence 140 Mda1) n'ont été étudiées que de façon limitée en utilisant la méthode d'immuno-transfert (Western blot).

4.4.1 Recherche des anticorps envers le LPS des Shigella

Les antigènes lipopolysaccharidiques (LPS) peuvent être préparés sous une forme pure et utilisés dans des tests immuno-enzymatiques (EIA) pour les déterminations d'anticorps spécifiques de classe, sensibles. Cependant, la plupart des antigènes-0 de Shigella, à l'exception de ceux de S. sonnei, donnent des réactions croisées avec ceux de certains E. coli, ce qui diminue leur spécificité.

L'antigène-0 de S. dysenteriae 1 est apparenté au groupe 1 d'E. coli 0, mais il semble ne l'être que faiblement avec d'autres E. coli ou d'autres entérobactéries. Il a été mis au point un EIA sensible et spécifique qui peut être utilisé à des fins séroépidémiologiques et pour étudier la réponse immunitaire aux vaccins candidats.

S. flexneri a une certaine parenté antigénique-0 avec d'autres entérobactéries, mais il existe également une réaction croisée très prononcée entre les sérotypes 1 à 5. De ce fait, les recherches d'anticorps spécifiques de sérotypes basés sur les antigènes LPS sont, à de rares exceptions près, impossibles. Cependant, un EIA pour S. flexneri a été mis au point; il est sensible et décèle facilement des réponses en anticorps après des infections naturelles. Cette méthode peut être utile pour évaluer l'immunogénicité de vaccins candidats contre S. flexneri.

S. sonnei a un antigène-0 unique qui jusqu'à présent ne semble être partagé que par un seul sérotype de Plesiomonas shigelloides. Il existe un EIA sensible et spécifique permettant d'évaluer l'immunogénicité de vaccins candidats et qui peut être utilisé dans des études séroépidémiologiques.

4.4.2 Réponses en anticorps circulants et intestinaux

Les études portant sur la classe Ig des anticorps sériques envers le LPS de Shigella chez l'homme montrent que la réponse en IgA présente un pic après deux à trois semaines et reste élevée pendant à peu près deux mois; la réponse en IgM suit une courbe semblable. A l'opposé, la réponse en IgG présente un pic après trois à six semaines et reste élevée pendant six à 12 mois après l'épisode diarrhéique.

Les réponses en anticorps intestinaux envers Shigella n'ont pas été très étudiées chez l'homme. Cependant, il a été montré chez le lapin que l'inoculation de S. flexneri vivant ou d'hybrides E. coli/S. flexneri dans les anses jéjunales Thiry-Vella induit une réponse marquée en IgA anti-LPS. Le fait que cette réponse puisse être rapidement renforcée par réinoculation après plusieurs mois est une autre preuve que le système intestinal des IgA possède une mémoire.

Peu d'études ont été effectuées sur la réponse en antitoxine Shiga après des infections par Shigella. Des investigations préliminaires, effectuées en utilisant un EIA pour détecter l'antitoxine Shiga, ont montré des réponses en anticorps dans le sérum de malades infectés par S. dysenteriae 1, mais pas dans celui de malades infectés par S. flexneri ou S. sonnei. Cependant, une autre étude effectuée en utilisant un test sensible et spécifique pour les antitoxines, basée sur la neutralisation de lésions de cellules HeLa en couche unique induites par des toxines, a montré la présence d'anticorps neutralisant les toxines dans le sérum des malades convalescents d'infections dues à S. flexneri et S. sonnei. La raison de cette discordance n'est pas connue et de nouvelles études sont nécessaires pour évaluer l'utilité de ces différents tests.

5. DETERMINANTS DE LA VIRULENCE AYANT UN INTERET POSSIBLE POUR LA MISE AU POINT DE VACCINS

Une très bonne connaissance des mécanismes de virulence de *Shigella*, et des antigènes spécifiques impliqués devrait faciliter la mise au point rationnelle de vaccins contre *Shigella*. Les événements clés de la pathogénie des shigelloses sont l'invasion cellulaire épithéliale, la multiplication intracellulaire des shigella, la mort de l'épithélium suivie par la diffusion bactérienne dans la muqueuse, et finalement la destruction tissulaire associée à une sévère inflammation locale. Ce que l'on sait actuellement de ces événements et du rôle pathogénique possible de la toxine Shiga est résumé ci-dessous.

5.1 Invasion des cellules épithéliales

Les données actuelles montrent qu'une variété de plasmides et de gènes chromosomiques déterminent l'aptitude de *Shigella* à envahir les cellules épithéliales intestinales, à s'y multiplier et finalement les détruire. Un gros plasmide (d'une taille de 120 à 140 Mdal, désigné comme le plasmide de virulence) est indispensable à tous les sérotypes de *Shigella* pour induire leur propre phagocytose par les cellules épithéliales et pour favoriser la rapide prolifération intracellulaire de la bactérie. Les mécanismes moléculaires impliqués dans la phagocytose de *Shigella* par les cellules épithéliales ne sont pas encore connus; cependant, plusieurs protéines de la membrane externe codées par le plasmide de virulence ont été identifiées et peuvent jouer des rôles clés dans le processus. Des faits récents montrent que le même plasmide code pour une activité hémolytique de contact qui provoque la lyse de la membrane de la vacuole phagocytique, libérant ainsi les bactéries dans le cytoplasme où elles sont capables de se multiplier rapidement et d'échapper à l'attaque des enzymes lysosomiques.

5.2 Envahissement bactérien de la muqueuse

Pour que les shigella envahissent la muqueuse, il faut que les bactéries survivent et se multiplient dans la lamina propria, processus qui conduit à une inflammation aiguë et à la destruction des tissus. On a identifié plusieurs segments chromosomiques qui codent particulièrement pour les fonctions bactériennes que l'on suppose être impliqués dans ces processus. Ces régions ont été associées à : i) la formation de l'antigène-O, ii) des systèmes de captage du fer de forte affinité, ou iii) la capacité d'induire une kératoconjunctivite chez le cobaye.

Deux locus chromosomiques déterminent la biosynthèse complète de l'antigène-O chez *S. flexneri*. Par ailleurs, l'antigène-O de *S. sonnei* est codé par le gros plasmide de virulence. Chez *S. dysenteriae* 1, l'expression complète de l'antigène-O nécessite à la fois un petit plasmide de 6 Mdal et un locus chromosomique. Le rôle de l'antigène-O de *Shigella* dans la virulence bactérienne n'a pas été totalement élucidé, mais les LPS lisses peuvent jouer un rôle important à la fois dans la survie intraluminale de *Shigella* et dans la protection de la bactérie, localisée dans les tissus, envers l'activité bactéricide du sérum.

5.3 La toxine Shiga

S. dysenteriae 1 tend à provoquer des dysenteries plus graves que les autres sérotypes de *Shigella* et produit également des taux élevés de toxine Shiga; on ne sait pas si ces deux caractéristiques de *S. dysenteriae* 1 ont une relation causale. La production de toxine Shiga n'a pas toujours été mise en évidence chez les autres *Shigella*, et lorsque ceci a été observé (pour certaines souches de *S. flexneri* 2a et de *S. sonnei*), le taux de toxine était 10 000 à 100 000 fois inférieur à celui mesuré avec *S. dysenteriae* 1.

La toxine Shiga produite par *S. dysenteriae* 1, qui inhibe la synthèse des protéines dans les cellules eucaryotiques, a été purifiée jusqu'à homogénéité et partiellement caractérisée. Elle est composée d'une sous-unité contenant un composant enzymatiquement actif et 5 ou 6 copies d'une sous-unité B d'un site de liaison; elle a trois activités biologiques : i) cytotoxicité pour certaines cellules eucaryotiques, ii) activité paralytique ou létale chez diverses espèces animales, et iii) entérotoxicité dans l'intestin grêle du lapin. Ces activités biologiques pourraient expliquer la plus grande sévérité de la maladie provoquée par *S. dysenteriae* 1, la diarrhée aqueuse qui peut se produire pendant les shigelloses, et les lésions de l'endothélium vasculaire du rein qui caractérisent le syndrome hémolytique et urémique qui complique parfois les shigelloses.

6. VACCINS CONTRE LES SHIGELLA

6.1 Historique

Au cours d'études effectuées dans les années 1940 et 1950, des vaccins parentéraux à base de cellules entières tuées de Shigella n'ont pu conférer de protection réelle lors d'exposition expérimentale de volontaires ou d'essais contrôlés de terrain dans des zones d'endémie; quelques essais effectués pour vacciner des singes par voie orale avec des Shigella tuées ont également donné des résultats peu concluants. Depuis le milieu des années 60, la recherche a été surtout centrée sur la mise au point de vaccins buccaux anti-Shigella vivants, et il en a été préparé plusieurs qui ont fait preuve d'innocuité dans des études cliniques; certains prévenaient également la shigellose après exposition expérimentale de volontaires, lors d'essais sur le terrain, ou dans les deux cas. Cependant, aucun n'était idéal : il fallait de trop nombreuses doses, des révertants génétiques apparaissaient parfois, et dans certaines populations, des effets secondaires (par exemple, des vomissements) ont été observés.

Grâce au génie génétique, on a pu analyser avec précision les déterminants importants de la pathogénicité et de l'immunogénicité bactérienne, à la fois aux niveaux moléculaire et génétique. Ceci devrait faciliter la création de souches bactériennes définies, ayant les propriétés considérées comme importantes pour un vaccin contre les shigelloses, et faisant preuve également d'innocuité, de stabilité génétique et d'immunogénicité avec un minimum de doses, et se prêtant à une production à large échelle et à la lyophilisation. Il serait en particulier souhaitable que de telles souches colonisent efficacement ou envahissent l'épithélium intestinal de telle manière que les antigènes soient effectivement présentés au tissu lymphoïde intestinal. Des souches vaccinales mises au point par ces méthodes pour d'autres maladies intestinales peuvent également se montrer des porteurs appropriés pour présenter les antigènes protecteurs de Shigella, ce qui permettrait d'obtenir des vaccins bivalents ou même polyvalents. Actuellement, les chercheurs utilisent des techniques de génie génétique pour mettre au point divers types de vaccins anti-Shigella.

Les vaccins anti-Shigella buccaux vivants, possibles, anciens et actuels, peuvent se répartir dans quatre grandes catégories :

- i) des mutants atténués de Shigella;
- ii) "des hybrides mutants" (Shigella atténué par incorporation de segments de gènes d'E. coli;
- iii) E. coli contenant des gènes de Shigella introduits;
- iv) d'autres bactéries porteuses (comme des Salmonella typhi atténuées) contenant des gènes codant pour la synthèse d'antigènes essentiels de Shigella.

Les plus intéressants de ces vaccins candidats sont brièvement décrits ci-dessous.

6.2 Mutants de Shigella atténués

6.2.1 Istrati T32

Cette souche est un mutant mis au point en Roumanie par passage répété d'une souche de S. flexneri 2a sur gélose; il lui manque le plasmide codant pour le pouvoir invasif et elle semble être génétiquement stable. De larges essais contrôlés sur le terrain, en Roumanie et en Chine, basés sur un schéma de vaccination comprenant 4 ou 5 doses contenant jusqu'à 3×10^{11} germes vivants par dose, ont montré que ce vaccin était dépourvu de toxicité et prévenait efficacement la shigellose clinique; on ne sait pas cependant si le vaccin serait efficace après lyophilisation. Dans certains essais sur le terrain, une protection réelle a été également observée envers des sérotypes autres que ceux de S. flexneri 2a, par exemple d'autres sérotypes de S. flexneri et de S. sonnei. Cette souche vaccinale mutante atténuée est largement utilisée en Roumanie où l'expérience montre que son efficacité peut être prolongée par des doses bisannuelles de rappel. Son inconvénient majeur est qu'elle nécessite des doses élevées multiples et des rappels fréquents.

6.2.2 Mutants streptomycino-dépendants

Des souches streptomycino-dépendantes (SmD) de divers sérotypes de S. flexneri et de S. sonnei ayant perdu leur pouvoir invasif ont été préparées en Yougoslavie; elles se sont montrées dépourvues de toxicité et protectrices par voie buccale chez des volontaires et dans des essais contrôlés de terrain effectués dans ce pays sur une large échelle. Après 4 à 5 doses contenant jusqu'à 5×10^{10} bactéries vivantes par dose, ces vaccins conféraient une protection spécifique de sérotype qui durait au moins six mois, mais moins d'un an; une seule dose de rappel par voie buccale, donnée après un an, maintenait la protection pendant une autre année. Des essais limités avec des vaccins SmD ont été également effectués sur le terrain aux Etats-Unis d'Amérique au début des années 70. Dans un essai portant sur des enfants placés en institution et qui étaient fortement exposés à Shigella, les vaccins ont été inefficaces. De plus, dans certains essais, il se produisait un retour à la streptomycino-indépendance, en particulier avec la souche de S. sonnei. Aucune autre étude de ces souches n'a été effectuée.

6.2.3 Nouveaux mutants atténués

De nouveaux mutants atténués de Shigella sont en cours de préparation, y compris des mutants auxotrophes aromatiques (aro^-) et des mutants dépourvus de galactose-épimérase (gal E). Ces vaccins diffèrent des mutants T32 et SmD par le fait qu'ils sont génétiquement définis et capables d'envahir les cellules épithéliales. Leur atténuation serait basée sur le fait qu'ils sont incapables de continuer à pousser dans les tissus hôtes. Une autre approche possible pour préparer des mutants de Shigella atténués serait de supprimer les gènes codant pour la production de la toxine Shiga, les systèmes de captation du fer de forte affinité, ou les deux, tout en retenant le plasmide qui code pour l'invasion épithéliale.

6.3 Vaccins hybrides mutants

En transférant à des Shigella pathogènes des segments de chromosomes spécifiques de E. coli K-12 (par exemple le segment xylose-rhamnose), on réduit très fortement leur virulence. Le transfert de ces segments dans des mutants de colonies atténuées de Shigella aboutit à une série de dérivés hybrides dépourvus de pouvoir invasif, relativement stables, de S. flexneri 2a et de S. dysenteriae 1, protégeant le singe contre la shigellose expérimentale. L'hybride de S. flexneri 2a s'est montré génétiquement stable et dépourvu de toxicité à la fois chez des adultes sains et chez des enfants sains placés en institution. Cependant, le degré de protection conférée observé chez des volontaires n'était pas statistiquement significatif, et il a été observé que la souche ne proliférait pas bien *in vivo*. L'hybride de S. dysenteriae 1, quoique génétiquement instable chez un des 145 volontaires, était remarquable en ce que sa colonisation intestinale était satisfaisante après une dose buccale unique. Aucun essai sur le terrain n'a été entrepris pour étudier l'efficacité de ces souches vaccinales.

6.4 E. coli avec gènes codant pour les antigènes de Shigella

Dans le milieu des années 70, des locus qui déterminent chez S. flexneri 2a les antigènes somatiques spécifiques de groupe et de type ont été transférés dans une souche E. coli 08 et l'hybride résultant, génétiquement stable et dépourvu de pouvoir invasif, qui exprimait l'antigène-O de Shigella, a été essayé comme vaccin vivant par voie buccale. Bien qu'il se soit montré protecteur chez des singes et dépourvu de toxicité chez des adultes, ce vaccin candidat n'a pas conféré de protection à des volontaires adultes dans des études d'exposition expérimentale.

Plus récemment, le plasmide 140 Mdal qui code pour l'invasion des cellules épithéliales a été transféré à E. coli K-12, en même temps que des gènes chromosomiques codant pour les antigènes-O spécifiques de groupe et de type de S. flexneri 2a. L'E. coli hybride qui en résulte exprime l'antigène-O lisse de S. flexneri 2a et envahit les cellules épithéliales mais ne provoque pas de sécrétion de liquide dans les anses ligaturées de l'intestin de lapin. Ce vaccin est à la fois dépourvu de toxicité et protecteur chez le singe. Des études cliniques d'innocuité et d'efficacité du vaccin chez des volontaires adultes sains sont en cours. Des souches analogues de E. coli K-12, exprimant d'autres antigènes-O de S. flexneri ou l'antigène-O de S. dysenteriae 1, ont également été préparées et des études chez des volontaires sont prévues.

6.5 Autres bactéries porteuses qui expriment les antigènes de Shigella

6.5.1 Hybrides de Salmonella typhi qui expriment les antigènes de Shigella

Des souches atténuées de S. typhi mises au point comme vaccin buccal vivant contre la fièvre typhoïde sont des porteuses possibles pour présenter des antigènes sélectionnés de Shigella aux tissus lymphoïdes hôtes. Des souches de ce type pourraient conférer une protection à la fois contre la fièvre typhoïde et les shigelloses. De telles souches atténuées de S. typhi, qui comprennent la Ty21a (un mutant gal E induit chimiquement) et la 541Ty (un mutant aro⁻, pur⁻ génétiquement défini) atteignent apparemment les tissus lymphoïdes intestinaux où elles stimulent les mécanismes immunitaires à médiation cellulaire, de même, à un degré variable, que les réponses en anticorps circulants et intestinaux locaux.

Un vaccin candidat (5076-IC) consiste en une Ty21a dans laquelle a été incorporé le plasmide 140 Mdal de S. sonnei, qui exprime l'antigène-O de S. sonnei (de même que celui de S. typhi). Chez des volontaires, ce vaccin bivalent est à la fois dépourvu de toxicité et efficace envers une exposition à S. sonnei. Cependant, l'efficacité variable des différents lots de vaccins a retardé le début des essais sur le terrain.

Si d'autres vaccins bactériens buccaux, efficaces, vivants sont mis au point, par exemple Vibrio cholerae atténué, ils pourraient se montrer utiles comme porteurs d'antigènes de Shigella.

6.5.2 Considérations générales sur l'efficacité de l'expression des antigènes de Shigella par des germes porteurs

Comme indiqué précédemment, il est vraisemblable qu'un seul, ou au plus quelques antigènes de Shigella, par exemple l'antigène-O, des protéines spécifiques de la membrane externe, et peut-être une anatoxine Shiga, sont nécessaires pour conférer une protection. Il est donc possible de construire une série de "cassettes" ou modules de plasmides hybrides codant pour ces antigènes, que l'on pourrait insérer dans des "systèmes de distribution d'antigènes" (par exemple E. coli ou des vaccins bactériens vivants hétérologues). Par exemple, les gènes chromosomiques et plasmidiques de S. dysenteriae 1 codant pour la synthèse de l'antigène-O ont été clonés et associés en un seul plasmide hybride, permettant ainsi d'obtenir un véhicule favorable au transfert des déterminants de cet antigène à diverses bactéries porteuses.

Des recherches plus approfondies sont cependant nécessaires pour définir quelles sont les conditions requises pour l'expression efficace de ces antigènes sous une forme immunogène optimale. Des problèmes de transcription et de traduction peuvent se poser qui pourraient demander que soient analysés et modifiés les mécanismes génétiques régulateurs en cause. De même, des germes porteurs peuvent ne pas s'assembler et ne pas présenter des antigènes hétérologues sous une forme immunogène optimale. En particulier, l'assemblage des antigènes-O hétérologues fonctionnels peut demander des manipulations génétiques supplémentaires pour obtenir un "noyau" LPS de remplacement sur lequel il serait possible de construire la nouvelle chaîne latérale-O. Il pourrait être également opportun d'éliminer ou de modifier l'expression des antigènes-O homologues de façon à ce qu'ils n'entrent pas en compétition avec le fragment hétérologue pour l'attachement au noyau. Une meilleure compréhension des interactions des protéines avec les autres constituants de la membrane bactérienne, comme le LPS et le peptidoglycane, est nécessaire, car elles peuvent jouer un rôle considérable dans la façon dont de tels antigènes sont assemblés à la surface bactérienne et ont une interaction avec le système immunitaire muqueux.

7. ESSAIS SUR LE TERRAIN DE VACCINS CONTRE LES SHIGELLA

Des essais sur le terrain sont envisagés pour les vaccins candidats anti-Shigella, de façon à déterminer quelle est leur efficacité dans les conditions où le vaccin serait probablement utilisé. Les principes généraux des essais cliniques (par exemple la nécessité de disposer d'un échantillon suffisamment grand, une population témoin appropriée et des mécanismes non biaisés de détection des cas) s'appliquent à ces essais comme à tout autre. En ce qui concerne le vaccin anti-Shigella, les essais doivent présenter quelques caractéristiques supplémentaires importantes, dont certaines, générales et particulières, sont décrites ci-dessous.

7.1 Population des essais sur le terrain

L'essai sur le terrain doit porter sur des populations semblables à celles chez lesquelles le vaccin sera éventuellement utilisé. Les groupes vaccinés et non vaccinés doivent être comparables en ce qui concerne l'âge, le sexe, l'état nutritionnel et l'incidence des infections précédentes à Shigella. La population doit être définie d'après ses caractéristiques démographiques et la présence de facteurs de risques particulièrement liés aux shigelloses (par exemple malnutrition, rougeole et carence possible en vitamine A).

7.2 Randomisation

Généralement, il est préférable de distribuer au hasard les individus dans les groupes vaccin ou placebo; cependant, certains vaccins vivants anti-Shigella peuvent être excrétés dans les fèces et transmis à d'autres membres de la famille, qui de ce fait seront vaccinés de façon non intentionnelle. Pour les souches de vaccins éventuellement transmissibles, la randomisation devrait se faire par ménage et la même préparation devrait être donnée à tous les membres vaccinables du ménage.

7.3 Incidents possibles

Les vaccins anti-Shigella sont destinés à protéger des individus de la shigellose clinique; cependant, il faut également envisager la possibilité d'une diminution de l'incidence des infections asymptomatiques due à la vaccination. Parmi les incidents possibles, le plus important est l'existence de diarrhée ou de dysenterie avec coprocultures positives pour Shigella, quoique l'incidence des infections asymptomatiques doive également être déterminée.

Les cas peuvent être décelés parmi les patients se présentant dans des hôpitaux ou des cliniques, ou par surveillance active, répétée, de la communauté (par exemple deux ou trois fois par semaine); les cas ainsi décelés seront vraisemblablement modérés, alors que ceux décelés dans les hôpitaux et les dispensaires seront plus graves. La possibilité que la vaccination réduise plus l'incidence des infections graves que celle des infections modérées ou asymptomatiques, doit être envisagée. Il faudrait donc que les méthodes utilisées pour déceler les cas portent davantage sur la surveillance des malades se présentant à des dispensaires et à des hôpitaux. Par ailleurs, une surveillance active, à base communautaire, sera particulièrement importante lors des essais d'un vaccin anti-S. sonnei car la maladie provoquée par ce sérotype est plutôt modérée. Les infections asymptomatiques doivent être décelées par coproculture périodique chez un échantillon aléatoire de vaccinés et de témoins sains.

Il faut donner à certains termes une définition précise, applicable partout et facile à utiliser, sans erreur possible, par les agents de terrain. Des définitions sont particulièrement nécessaires pour les termes suivants: "sujet vacciné", "diarrhée", "dysenterie", "shigellose", "maladie légère, modérée et sévère", "diarrhée persistante" et "infections asymptomatiques". Des définitions peuvent associer des examens cliniques et de laboratoire et devraient permettre de faire la distinction entre les cas dans lesquels Shigella est le seul germe pathogène isolé et les infections mixtes dues à Shigella et à d'autres organismes pathogènes intestinaux. Pour calculer la taille des échantillons, il faudrait se baser sur des proportions connues d'incidents possibles, spécifiques de la communauté étudiée (par exemple dysenterie ou diarrhée due au sérotype de Shigella présent dans le vaccin).

7.4 Méthodes de laboratoire

7.4.1 Tests pour la recherche de leucocytes et de sang dans les fèces

Pour faire la distinction entre dysenterie et diarrhée, des techniques normalisées devraient être utilisées pour rechercher la présence de leucocytes et de sang dans les selles. Il peut être nécessaire de disposer, pour tout prélèvement, d'un test chimique pour le sang, associé à un examen microscopique pour les leucocytes.

7.4.2 Méthodes microbiologiques

Dans toute la mesure possible, les échantillons de selles ou les écouvillonnages rectaux devraient être déposés sur un milieu solide, immédiatement après leur prélèvement. Quand ceci n'est pas possible, les échantillons devraient être transportés au laboratoire dans les 24 heures (si possible moins) en utilisant comme milieu de transport du soluté salin tamponné au glycérol (refroidi si possible). Le milieu de Cary-Blair n'est pas idéal pour le transport des Shigella mais devrait être utilisé quand d'autres germes pathogènes intestinaux sont recherchés.

L'isolement primaire devrait comprendre au moins deux milieux de culture. Le choix dépend quelque peu des sérotypes recherchés; cependant, le premier choix devrait être la gélose avec xylose-lysine-désoxycholate (XLD), le second étant soit la gélose de MacConkey soit la gélose SS. Une description détaillée des méthodes d'isolement et d'identification des Shigella se trouve dans le Manuel pour l'étude au laboratoire des infections intestinales aiguës (document OMS non publié CDD/83.3 Rev.1, 1986).

8. RECOMMANDATIONS CONCERNANT LA RECHERCHE

8.1 Modèles animaux

8.1.1 Il faudrait disposer d'un petit modèle animal permettant des études quantitatives détaillées sur la pathogénie des infections à Shigella vivantes (y compris S. sonnei, S. flexneri et S. dysenteriae 1), sur l'efficacité des vaccins candidats et sur le mécanisme de l'immunité envers les infections. Dans la mesure du possible, des souches isogènes de Shigella avec des modifications ou des délétions génétiques particulières devraient être utilisées pour des études du mécanisme de la pathogénie et de l'immunité.

8.2 Mécanismes de virulence et d'immunité

8.2.1 Les antigènes de la surface cellulaire de Shigella devraient être caractérisés de façon plus approfondie et leur rôle dans la pathogénie et l'immunité défini. Des antigènes mineurs et des antigènes jusqu'à présent non identifiés devraient également faire l'objet d'investigations, y compris ceux exprimés dans les conditions qui prévalent au niveau de l'intestin. Des anticorps monoclonaux envers de tels antigènes seront probablement nécessaires.

8.2.2 Le rôle de la toxine Shiga dans la virulence de S. dysenteriae 1 (et d'autres shigella) devrait être déterminé, et il faudrait définir quel est le rôle protecteur de l'antitoxine muqueuse ou circulante, si tant est qu'elle existe. Pour cette analyse, la création de mutants de S. dysenteriae 1 dépourvus de toxine est très importante. De telles souches devraient être examinées par des méthodes normalisées, de préférence dans un laboratoire de référence unique, pour confirmer le phénotype (ou le génotype) dépourvu de toxine. Il faudrait inclure dans ces études des séquelles de shigellose à médiation toxinique possible, comme le syndrome hémolytique et urémique.

8.2.3 Il faudrait savoir quel est le processus et le mécanisme de la colonisation muqueuse de Shigella et quels sont les antigènes impliqués dans ce processus. Il faudrait examiner la captation et le devenir de Shigella dans les cellules épithéliales M et savoir s'il y a corrélation avec l'immunogénicité de certaines souches. Des mutants isogènes virulents et avirulents devraient être utilisés dans ces études.

8.3 Immunité

8.3.1 Il faudrait déterminer à quel point la protection envers les shigelloses induite par une infection préalable est spécifique de sérotype, ou si elle s'étend à des sérotypes hétérologues, et ceci chez des modèles animaux, par des études chez des volontaires, par des études longitudinales de population et par des essais de vaccins sur le terrain. Une attention particulière devrait être donnée à une protection croisée possible entre les sérotypes de S. flexneri, et entre S. flexneri et S. dysenteriae ou S. sonnei.

8.3.2 Il faudrait connaître quels sont les rôles des mécanismes immunitaires humoraux et à médiation cellulaire, particulièrement ceux qui agissent à l'intérieur de la muqueuse intestinale ou à sa surface. Les antigènes (ou les associations d'antigènes) responsables de ces réponses devraient être identifiés.

8.3.3 Il faudrait savoir si les antigènes contenus dans le lait ou le colostrum confèrent une protection envers les shigelloses; si oui, quels sont les antigènes et les anticorps impliqués, et quelle est l'étendue de cette protection.

8.3.4 Il faudrait définir quelles sont les réponses immunitaires générales et muqueuses dans les shigelloses. Ces réponses comprennent celles aux antigènes-O, aux protéines de la membrane externe, à la toxine Shiga, et à d'autres antigènes ayant un rôle pathogène possible.

8.4 Mise au point et évaluation de vaccins

8.4.1 En ce qui concerne la santé publique des pays en développement, la recherche devrait être centrée sur la mise au point de vaccins contre S. dysenteriae 1 et contre les sérotypes les plus fréquents de S. flexneri (1b, 2a, 3a, 4a). Des vaccins polyvalents peuvent être nécessaires.

8.4.2 La mise au point de vaccins devrait particulièrement viser des vaccins buccaux vivants, y compris des mutants avirulents de Shigella et des souches hybrides (vecteurs hétérologues exprimant les antigènes de Shigella).

8.4.3 Il faudrait définir quels sont les meilleurs "vecteurs" de vaccins hybrides. Ceux-ci peuvent comprendre des souches vaccinales vivantes contre S. typhi, E. coli avirulent et des vaccins vivants, avirulents, contre V. cholerae. Il faudrait connaître les caractères qui déterminent l'efficacité d'un "vecteur".

8.4.4 Il faudrait savoir quelles sont les meilleures méthodes de préparation et d'administration de vaccins buccaux vivants contre Shigella. Ceci supposerait que soient effectuées des études pour déterminer les formulations permettant une récupération et une croissance bactérienne maximales, sous une forme qui soit immunogène après reconstitution. Il faudrait également savoir si l'inoculum doit être ou non protégé de l'acide gastrique.

8.4.5 Shigella isolée chez des participants à des essais sur le terrain devrait être soigneusement préservée de façon à pouvoir l'examiner ultérieurement pour rechercher des différences antigéniques possibles entre les isolements provenant de vaccinés et de témoins.

8.4.6 L'efficacité des vaccins devrait être évaluée en termes de durée de la protection, efficacité des vaccinations de rappel, âge des vaccinés (en particulier en dessous de trois ans) et effet sur la gravité de la maladie, et par rapport à l'état nutritionnel des vaccinés.

8.4.7 Des critères normalisés devraient être mis au point pour l'évaluation de l'efficacité des vaccins anti-Shigella. Ces critères devraient comprendre des définitions de la diarrhée à Shigella et des normes d'évaluation de la gravité de la maladie. Des méthodes de diagnostic de laboratoire normalisées devraient être également recommandées.

8.4.8 La mise au point de vaccins devrait avoir comme objectif un produit qui soit efficace et dépourvu de toxicité pour les nouveau-nés de moins d'un an et qui pourrait être incorporé dans le système de prestation des programmes élargis de vaccination nationaux.

9. LISTE DES PARTICIPANTS

Dr C. Ferreccio, Département du soutien au programme, Ministère de la Santé, Santiago, Chili

Dr S. Formal, Chief, Department of Bacterial Diseases, Walter Reed Army Institute of Research, Walter Reed Army Medical Center, Washington, D.C., Etats-Unis d'Amérique

Professeur M. M. Levine, Director, Center for Vaccine Development, University of Maryland,
School of Medicine, Baltimore, MD, Etats-Unis d'Amérique

Professeur A. A. Lindberg, Chef, Département de Bactériologie clinique, Institut Karolinska,
Hôpital universitaire de Huddinge, Huddinge, Suède (Président)

Dr P. A. Manning, Department of Microbiology and Immunology, University of Adelaide, Adélaïde,
SA, Australie

Dr T. Meitert, Institut Cantacuzène, Bucarest, Roumanie

Professeur A. D. O'Brien, Department of Microbiology, Uniformed Services University of the
Health Sciences, Bethesda, MD, Etats-Unis d'Amérique

Dr S. C. Pal, Director, National Institute of Cholera and Enteric Diseases, Calcutta, Inde

Dr David Sack, Associate Director, Disease Transmission, International Centre for Diarrhoeal
Disease Research, Bangladesh, Dacca, Bangladesh (Rapporteur)

Dr P. Sansonetti, Service des Entérobactéries, Institut Pasteur, Unité 199 INSERM, Paris, France

Professeur Y. Takeda, Département des infections bactériennes, Institut des Sciences médicales,
Université de Tokyo, Tokyo, Japon

Dr D. Taylor, United States Armed Forces Research Institute of Medical Sciences, Bangkok,
Thaïlande

Professeur K. Timmis, Département de Biochimie médicale, Centre médical universitaire, Genève,
Suisse

Observateur :

Dr F. Tron, Directeur de la Recherche clinique, Pasteur Vaccins, Marnes-la-Coquette, France

International Centre for Diarrhoeal Disease Research, Bangladesh :

Dr M. Bennish, International Research Associate, Pathogenesis and Therapy

Dr I. Ciznar, Associate Director, Host Defense

Dr A. Salam, Bangladesh Medical Officer

Secrétariat :

Dr B. B. Gaitonde, Bureau régional de l'OMS pour l'Asie du Sud-Est

Dr N. F. Pierce, Coordinateur de la Recherche, Programme OMS de Lutte contre les Maladies
diarrhéiques (Secrétaire)

= = =

