



WORLD HEALTH ORGANIZATION
ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE

DISTR. : GENERAL(E)

WHO/CDD/IMV/89.2 Rev.1

ORIGINAL : ANGLAIS

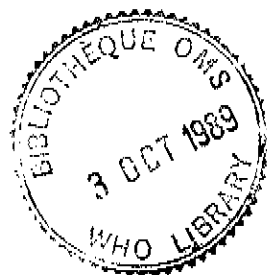
PROGRAMME DE LUTTE CONTRE LES MALADIES DIARRHEIQUES

25503

MISE AU POINT DE VACCINS CONTRE LE CHOLERA ET LA DIARRHEE
A ESCHERICHIA COLI ENTEROTOXIGENE

Rapport d'une réunion
University of Maryland, Baltimore, Maryland (Etats-Unis d'Amérique)

6-9 décembre 1988



This document is not a formal publication of the World Health Organization (WHO), and all rights are reserved by the Organization. The document may, however, be freely reviewed, abstracted, reproduced and translated, in part or in whole, but not for sale nor for use in conjunction with commercial purposes.

The views expressed in documents by named authors are solely the responsibility of those authors.

Ce document n'est pas une publication officielle de l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) et tous les droits y afférents sont réservés par l'Organisation. S'il peut être commenté, résumé, reproduit ou traduit, partiellement ou en totalité, il ne saurait cependant l'être pour la vente ou à des fins commerciales.

Les opinions exprimées dans les documents par des auteurs cités nommément n'engagent que lesdits auteurs.

LISTE DES PARTICIPANTS

1. Participants

- Dr J. Clemens, Center for Vaccine Development, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, MD, Etats-Unis d'Amérique
- Dr J. D. Clements, Associate Professor, Department of Microbiology and Immunology, Tulane University Medical Center, New Orleans, LA, Etats-Unis d'Amérique
- Dr D. G. Evans, Research Associate Professor, Division of Gastroenterology, Baylor College of Medicine, Houston, TX, Etats-Unis d'Amérique
- Dr R. Glass, Chief, Rotavirus Laboratory, Division of Viral Diseases, Centers for Disease Control, Atlanta, GA, Etats-Unis d'Amérique
- Dr T. R. Hirst, Senior Research Fellow, Department of Genetics, University of Leicester, Leicester, Royaume-Uni
- Dr F. Huq, Head, Microbiological Laboratory, Institute of Public Health, Mahakhali, Dhaka, Bangladesh
- Professeur M. M. Levine, Director, Center for Vaccine Development, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, MD, Etats-Unis d'Amérique
- Professeur J. Mekalanos, Department of Microbiology and Molecular Genetics, Harvard Medical School, Boston, MA, Etats-Unis d'Amérique
- Dr M. McConnell, Principal Microbiologist, Division of Enteric Pathogens, Central Public Health Laboratory, Londres, Royaume-Uni
- Professeur F. S. Mhalu, Department of Microbiology/Immunology, Muhimbili Medical Centre, Dar es-Salaam, République-Unie de Tanzanie
- Dr Sricharoen Migasena, Director, Vaccine Trial Centre, Mahidol University, Bangkok, Thaïlande
- Professeur D. Rowley, Department of Microbiology and Immunology, The University of Adelaide, Adélaïde, Australie
- Dr J. Sanchez, Centre de Recherche sur les Maladies infectieuses, Institut national de Santé publique, Mexico, Mexique
- Dr Suharyono, Head, Subdivision of Paediatric Gastroenterology, Medical School, University of Indonesia, Djakarta, Indonésie
- Dr A. M. Svennerholm, Département de Microbiologie médicale, Université de Göteborg, Göteborg, Suède
- Professeur Y. Takeda, Chairman, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japon
- Dr R. K. Taylor, Assistant Professor, Department of Microbiology and Immunology, University of Tennessee College of Medicine, Memphis, TN, Etats-Unis d'Amérique
- Dr F. van Loon, International Centre for Diarrhoeal Disease Research, Dhaka, Bangladesh

2. Consultants

Professeur R. E. Black, Chairman, Department of International Health, Johns Hopkins School of Hygiene and Public Health, Baltimore, MD, Etats-Unis d'Amérique (Président)

Dr D. Sack, Department of International Health, Johns Hopkins University School of Hygiene and Public Health, Baltimore, MD, Etats-Unis d'Amérique (Rapporteur)

3. Observateurs

Dr Kimi F. Lin, Diarrhoeal Disease Research Coordinator, Office of Health, Bureau for Science and Technology, Agency for International Development, Washington, D.C., Etats-Unis d'Amérique

Dr M. Cadoz, Directeur, Département Vaccins, Institut Mérieux, Lyon, France

Dr S. Cryz, Directeur, Recherche et Production, Institut sérothérapique et vaccinal, Berne, Suisse

Professeur R. Edelman, Associate Director for Clinical Research, Center for Vaccine Development, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, MD, Etats-Unis d'Amérique

Dr P. Devilliers, Recherche et Développement cliniques, Direction médicale, Pasteur Vaccins, Marnes la Coquette, France

Dr W. Habig, Chief, Laboratory of Bacterial Toxins, Center for Biologics Evaluation and Research, Food and Drug Administration, Bethesda, MD, Etats-Unis d'Amérique

Dr C. Hardegree, Directeur, Division of Bacterial Products, Center for Biologics Evaluation and Research, Food and Drug Administration, Bethesda, MD, Etats-Unis d'Amérique

Dr L. D. Johnson, Acting Chief, Development and Applications Branch, Microbiology and Infectious Disease Program, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Bethesda, MD, Etats-Unis d'Amérique

Dr J. B. Kaper, Chief, Bacterial Genetics Section, Center for Vaccine Development, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, MD, Etats-Unis d'Amérique

Dr R. Rappaport, Associate Director, Biological Product Development, Wyeth-Ayerst Research, Marietta, PA, Etats-Unis d'Amérique

Dr C. Tannenbaum, Health and Personal Care Technology Division, The Procter and Gamble Company, Cincinnati, OH, Etats-Unis d'Amérique

4. Secrétariat

Dr M. H. Merson, Directeur, Programme de lutte contre les maladies diarrhéiques, Genève

Dr T. Vesikari, Spécialiste scientifique, Programme de lutte contre les maladies diarrhéiques, Genève, Suisse

INTRODUCTION

Bien que les vaccins anticholériques injectables existent depuis un siècle, ils n'ont pas joué de rôle important dans la lutte contre le choléra, car l'immunité suscitée est faible et de courte durée. Depuis le début des années 1970, l'Organisation mondiale de la Santé déconseille ces vaccins, d'une part parce que leur efficacité est faible, d'autre part par crainte que des vaccinations inefficaces détournent attention et ressources aux dépens de meilleures formes de traitement et de lutte. Entre-temps, les travaux de mise au point de vaccins buccaux efficaces à partir de germes tués et d'antigènes ou de souches vivantes atténuées de *Vibrio cholerae* 01 se sont poursuivis. La réunion a permis d'examiner les derniers résultats de ces études, parmi lesquelles on notera un essai de terrain au Bangladesh avec deux formules de vaccin anticholérique buccal inactivé, des investigations sur les antigènes protecteurs de *V. cholerae* 01 utilisables dans des vaccins inactivés améliorés et l'étude chez des volontaires de l'innocuité, de l'immunogénicité et de l'efficacité des vaccins anticholériques vivants. Les participants ont ensuite formulé des recommandations applicables aux recherches futures dans ces domaines.

La diarrhée provoquée par *Escherichia coli* entérotoxigène (ECET) est un problème grave dans la plupart des pays en développement et la mise au point des vaccins contre cette maladie progresse lentement. Toutefois, des découvertes récentes et importantes sur les antigènes de virulence d'ECET ont permis de mettre au point des vaccins potentiels, et l'évaluation chez l'homme a commencé pour le premier d'entre eux. Les participants ont examiné les travaux menés actuellement sur les antigènes protecteurs d'ECET et formulé un certain nombre de recommandations visant à encourager la mise au point de vaccins protégeant contre la maladie à ECET.

VACCINS ANTICHOLERIQUES

EPIDEMIOLOGIE DE LA MALADIE

Le choléra est actuellement signalé à l'OMS par environ 35 pays. Non traité, c'est encore l'une des maladies infectieuses les plus dangereuses, avec un taux de létalité qui atteint 40 %. Les cas de choléra, estimés à un million par an dans le monde, sont responsables d'environ 20 000 décès en Afrique et 100 000 en Asie. Un tiers approximativement des décès concernent l'enfant de moins de 5 ans, un quart l'enfant de 5 à 14 ans, les autres décès concernent l'adulte.

La maladie sévit à la fois sur le mode épidémique et endémique. Quand une épidémie frappe une zone antérieurement indemne où les populations sont séronégatives, elle atteint également toutes les classes d'âge avec un mode de propagation souvent unique. Ces épidémies sont caractérisées par un taux relativement bas d'infections asymptomatiques et il n'y a ordinairement pas de réservoir d'infection lié à l'environnement. En revanche, lorsque le choléra est endémique, l'incidence est maximale dans la classe d'âge des 2-15 ans, puis diminue avec l'âge, sauf chez la femme en âge de procréer chez qui on observe des taux élevés. La saisonnalité des flambées est marquée et la transmission est liée i) au milieu, par un réservoir hydrique; ii) à des modes de dissémination multiples (eau ou aliments contaminés, parfois transmission interhumaine); iii) à une fréquence élevée d'infections asymptomatiques se traduisant par une prévalence élevée des anticorps avant 20 ans.

En secteur d'endémie, les facteurs de risque de choléra sévère sont : i) l'absence ou un titre peu élevé d'anticorps vibriocides; ii) le contact étroit avec la famille d'un cholérique; iii) une acidité gastrique faible (naturelle ou acquise après chirurgie ou médication par les anti-acides); iv) l'alimentation artificielle (chez l'enfant de moins de 3 ans), et v) l'appartenance au groupe sanguin O. Plusieurs observations évoquent l'existence d'une immunité naturelle contre *V. cholerae* 01 en milieu d'endémicité : la diminution du taux d'atteinte avec l'âge, la baisse du taux d'atteinte lorsque le taux d'anticorps vibriocides est élevé et pour ce qui est de l'épidémiologie, la protection considérable conférée par un épisode de choléra contre un deuxième épisode. Au Bangladesh,

la prévalence de ces anticorps est de 40 % à l'âge de 5 ans et de 80 % à 20 ans. On estime qu'une personne est exposée à V. cholerae 01 au moins une fois en dix ans et que certaines personnes peuvent être exposées une fois par an; il semble que l'immunité soit renforcée par les infections successives y compris par les infections asymptomatiques.

Les groupes qui bénéficieraient le plus d'une vaccination anticholérique efficace sont les enfants et les adultes des régions d'endémicité, les réfugiés des camps où les conditions d'hygiène sont mauvaises et les populations hors des secteurs d'endémicité mais menacées par la proximité d'un foyer d'épidémie. Le risque encouru par les voyageurs internationaux est très faible. Leur vaccination ne permettrait probablement pas d'induire un changement mesurable.

HISTORIQUE DE LA VACCINATION ANTICHOLOERIQUE

On a commencé à vacciner contre le choléra par voie parentérale peu après la mise en évidence par Koch de la responsabilité de Vibrio cholerae 01 dans la maladie. A la fin du XIX^e siècle, on a massivement vacciné en Espagne, puis en Inde, avec un V. cholerae tué. Si les premières études menées en Inde donnaient à penser que le vaccin était protecteur, c'est seulement dans les années 1960 que des essais cliniques contrôlés avec le vaccin injectable à germes entiers tués ont été réalisés. Une série d'essais au Bangladesh, en Inde et aux Philippines ont alors confirmé que le vaccin était efficace mais ont aussi montré que la protection était courte (3 à 6 mois), que le vaccin était beaucoup moins protecteur chez le jeune enfant que chez l'adulte et que la vaccination ne diminuait pas l'excrétion fécale de V. cholerae. La conclusion qui a alors été formulée était que ce vaccin injectable n'était pas rentable comme outil de lutte contre le choléra.

Pendant les années 1970, deux essais ont été réalisés en Inde et en Indonésie avec des vaccins injectables adjuvés par des sels d'aluminium. La protection conférée était plus grande et plus durable que celle conférée par les vaccins non adjuvés. On a également testé au Bangladesh et aux Philippines des vaccins injectables constitués par des antigènes anatoxiques; malgré l'apparition d'une réponse sérique en antitoxine, ces vaccins n'étaient pas protecteurs.

Pendant cette même période, l'OMS a commencé à vivement déconseiller l'utilisation du vaccin anticholérique injectable dans quelque indication que ce soit, en raison de son manque de rentabilité dans les régions d'endémicité, de son inefficacité contre les épidémies et de son inaptitude à juguler la dissémination internationale du choléra. Ce manque d'intérêt pour le vaccin découlait aussi de l'amélioration et de la simplification du traitement : la réhydratation par voie intraveineuse et par voie orale ramenait le taux de létalité à moins de 1 %, et le traitement paraissait avoir un meilleur rapport coût-efficacité que la vaccination en termes de vies épargnées.

Aujourd'hui encore, nombreux sont ceux qui en Asie et en Afrique vivent dans des régions où la fréquence du choléra est importante et où l'on ne dispose pas d'un traitement efficace. Là, la mortalité par choléra reste élevée et les épidémies engendrent des crises de panique dans la population et de graves difficultés sociales et économiques. Un vaccin anticholérique efficace est donc toujours autant nécessaire. Partant du principe que la protection naturelle contre le choléra est due à des anticorps intestinaux antitoxiques et antibactériens, les recherches des années 1980 ont été axées sur la mise au point de vaccins buccaux capables d'induire une immunité protectrice en suscitant une réaction immunitaire intestinale vis-à-vis d'un ou de plusieurs antigènes appropriés de V. cholerae 01.

LES ANTIGENES IMPORTANTS DE VIBRIO CHOLERA 01

Des études chez l'animal et chez l'homme ont montré que le lipopolysaccharide de la paroi du vibron (LPS) et la toxine cholérique (CT) suscitent tous deux des réactions immunitaires protectrices. Les anticorps présents dans l'intestin dirigés contre ces deux antigènes agissent en synergie. L'immunité antibactérienne est essentiellement conférée par les anticorps dirigés contre le LPS mais des anticorps dirigés contre d'autres antigènes protéiques du germe pourraient aussi avoir leur importance. L'immunité antitoxique vise essentiellement la sous-unité B de la toxine cholérique.

La colonisation de l'intestin de l'homme par V. cholerae 01, préalable obligé à l'apparition de la maladie diarrhéique, est sans aucun doute un phénomène complexe, nécessitant l'expression coordonnée du chimiotactisme et de la motilité, des enzymes protéolytiques, des hémagglutinines, des pili de colonisation, et enfin la production de CT. En empêchant l'adhésion bactérienne, on pourrait bloquer la pathogénie cholérique à son début. Des travaux récents chez le souris et sur des volontaires donnent à penser que la colonisation requiert probablement l'élaboration d'un pilus, chez la souche classique comme chez le biotype El Tor. Ce facteur a été appelé TCP (toxin coregulated pilus, pilus corégulé avec la toxine) vu que les conditions de développement qui modulent son niveau d'expression modulent également la production de toxine. En outre, le gène de structure du pilus le plus important, TcpA, et les gènes de la toxine, font partie d'un régulon déterminant la virulence (toxR) qui régule l'expression génique. Etant donné leur rôle important dans la pathogénie du choléra, les protéines dont l'expression est régulée par toxR, protéines sécrétées ou de surface (en particulier le TCP et la sous-unité B de la toxine cholérique (CT-B)), pourraient être employées comme immunogènes associés au LPS dans des vaccins.

Le souris est protégé par immunisation passive avec un immunosérum polyclonal de lapin anti-TCP contre une inoculation d'épreuve avec les souches Ogawa ou Inaba de V. cholerae 01. L'activité protectrice du sérum anti-TCP disparaît après adsorption sur le vibron type sauvage, mais est conservée après adsorption sur un mutant pilus-négatif; la protection serait donc liée aux anticorps anti-TCP. Les séquences du gène TcpA sont identiques chez les deux souches classiques de V. cholerae 01, Ogawa 395 et Inaba 569B. L'homologie est moins grande pour une souche El Tor appartenant au sérotype Ogawa, E7946 : environ 80 % pour la séquence d'acides aminés prévus. Cependant, la structure secondaire prévue, la répartition des restes chargés et les épitopes antigéniques potentiels sont bien conservés d'un biotype à l'autre, donnant à penser que les domaines fonctionnels, comme les épitopes qui suscitent la formation d'anticorps protecteurs peuvent être communs aux pili des deux biotypes.

L'analyse génétique a permis d'identifier, outre TcpA, plusieurs autres produits géniques indispensables à la biogénèse et à la fonction du TCP. L'un d'eux, le TcpG, peut aussi jouer le rôle d'une adhésine et peut donc être envisagé dans les études vaccinales. Le gène toxR régule non seulement les gènes impliqués dans la synthèse du TCP mais aussi les gènes codant pour les protéines de membrane externe et pour la production d'un facteur de colonisation accessoire (ACF). Par suite, TcpA pourrait peut-être servir pendant la préparation des vaccins à germes entiers d'indicateur de la présence d'autres antigènes potentiellement importants régulés par le gène toxR.

Les vaccins oraux tués essayés dernièrement au Bangladesh (voir plus loin) ne contiennent pas de TCP décelable par immunotransfert; la raison est peut-être que les conditions de culture au moment de la préparation du vaccin n'ont pas permis l'expression de ces antigènes. Ni le formol, ni la chaleur (utilisés pour inactiver la bactérie du vaccin à germes entiers), ne semblent diminuer l'immunoréactivité du TCP dans les immunotransferts. Il serait donc possible d'améliorer le vaccin oral à germes entiers en utilisant une souche qui fabrique le TCP et des méthodes de production qui permettent son expression, sa conservation et celles des autres antigènes régulés par toxR.

VACCINS BUCCAUX POTENTIELS

Vaccins non vivants

Des vaccins à germes entiers tués, associés ou non à la sous-unité B de la toxine cholérique, ont été récemment mis au point et testés. Le vaccin buccal germes entiers/sous-unité B contient la sous-unité B purifiée de la toxine cholérique et des vibrons cholériques inactivés par le formol ou par la chaleur appartenant aux souches classiques et El Tor des sérotypes Inaba et Ogawa. La sous-unité B purifiée est totalement dépourvue de toxicité et suscite des titres d'anticorps neutralisants comparables à ceux que suscite l'holotoxine; l'immunogénicité de la sous-unité B pourrait être due en partie à sa capacité à se lier aux membranes cellulaires. Les germes tués par la chaleur présents dans le vaccin apportent les LPS des souches Inaba et Ogawa tandis que les germes tués par le

formol apportent les antigènes thermolabiles. Le pentamère de la sous-unité B étant détruit en milieu acide, le vaccin est administré dans un tampon hydrogénocarbonate de sodium/acide citrique.

L'innocuité du vaccin germes entiers/sous-unité B a tout d'abord été mise en évidence dans des essais cliniques de petite envergure réalisés au Bangladesh, en Suède et aux Etats-Unis d'Amérique. On a évalué au Bangladesh la capacité du vaccin à susciter une réaction immunitaire antibactérienne et antitoxique associée aux muqueuses; on a montré qu'à partir de deux doses orales, on provoque dans le liquide de lavage intestinal des réponses en IgA dirigées contre le LPS et la toxine comparables aux réponses induites par la maladie naturelle. La réponse est nettement plus forte et plus durable qu'avec deux doses intramusculaires du même vaccin. Le vaccin buccal germes entiers/sous-unité B a aussi provoqué chez les volontaires suédois d'importantes réponses antibactériennes et antitoxiques en anticorps, quoique plus faibles que chez les Bangladeschis d'âge comparable. De plus, la sous-unité B de ce vaccin administrée oralement aux volontaires bangladeshis et suédois a induit une mémoire immunologique associée aux muqueuses (IgA) d'une durée d'au moins 15 mois au Bangladesh et 5 ans en Suède.

Chez les volontaires des Etats-Unis d'Amérique, trois doses de ce vaccin ont conféré une protection de 63 %, et le constituant germes entiers une protection de 56 % à lui seul, lors d'une inoculation d'épreuve à DE₁₀₀ avec une souche virulente de *V. cholerae* O1 biotype El Tor. La protection contre une maladie diarrhéique avec émission de selles supérieure à 2 litres a été de 100 % avec le vaccin germes entiers/sous-unité B et de 56 % avec le vaccin germes entiers.

Devant ces résultats encourageants, l'International Centre for Diarrhoeal Disease Research du Bangladesh, avec la collaboration des autorités et de l'Organisation mondiale de la Santé, a entrepris en 1985, dans la région de Matlab, un essai de terrain randomisé, en double aveugle et contre placebo, avec des vaccins anticholériques buccaux tués. Dans cet essai, 63 000 personnes de 2 à 15 ans et des femmes de plus de 15 ans ont reçu différents vaccins à la posologie de trois doses espacées de six semaines : a) vaccin germes entiers/sous-unité B, b) vaccin germes entiers ou c) placebo constitué par un colibacille tué souche K12. Chaque dose de vaccin germes entiers/sous-unité B contenait 1 mg de sous-unité B + 1×10^{11} *V. cholerae* O1 entiers tués, avec en proportions égales la souche classique Inaba tuée par la chaleur (Cairo 48), la souche classique Ogawa tuée par la chaleur (Cairo 50), la souche Inaba El Tor tuée par le formol (Phil 6973) et la souche classique Ogawa tuée par le formol (Cairo 50). Le vaccin germes entiers avait la même composition cellulaire sans contenir de sous-unité B.

Les titres sériques postvaccinaux d'anticorps vibriocides ont presque doublé en général et le vaccin germes entiers/sous-unité B a entraîné une multiplication par quatre à six du titre sérique des IgG dirigées contre la toxine cholérique. Le suivi des vaccinés n'a mis en évidence aucun effet secondaire quel que soit le vaccin utilisé.

L'efficacité du vaccin contre le choléra a été évaluée d'après les données de surveillance recueillies dans les trois centres de traitement de la diarrhée qui desservent la population de Matlab. Les principaux résultats de l'essai sont résumés au tableau 1. Les trois ans de suivi des vaccinés ont montré que le vaccin germes entiers a conféré une protection de 52 % et le vaccin germes entiers/sous-unité B une protection de 50 % contre le vibron cholérique mis en évidence par culture ($P < 0,0001$ pour chacun des vaccins), chez l'adulte comme chez l'enfant.

Avec l'un et l'autre de ces vaccins, l'efficacité protectrice est minimale chez l'enfant vacciné à 2-5 ans : 31 % et 24 % pour le vaccin à germes entiers, 38 % et 47 % pour le vaccin germes entiers/sous-unité B à la première et à la deuxième année de suivi, respectivement, aucune protection pendant la troisième année. On a par contre observé une bonne efficacité pendant les trois années de suivi lorsque la vaccination a eu lieu après six ans. Dans cette classe d'âge, le vaccin à germes entiers a conféré une protection de 68 % et le vaccin germes entiers/sous-unité B une protection de 63 % pour les trois ans de suivi. Dans le groupe placebo, 65 % de l'ensemble des cas se sont déclarés chez les 6 ans ou plus.

Pendant les trois années de surveillance, on a observé des cas à biotype classique et à biotype El Tor de *V. cholerae* O1, les isollements étant pour la plupart de sérotype Ogawa. Tout au long du suivi, les sujets ont été mieux protégés contre la maladie due au biotope classique (tableau 1). Le même degré de protection semble avoir été obtenu avec chacun des vaccins contre les épisodes cholériques associés à une déshydratation sévère et contre des formes plus bénignes. Il semble, toutefois, que la protection ait été plus faible chez les sujets de groupe O que chez les sujets de groupes A, B ou AB.

TABLEAU 1. EFFICACITE AU BANGLADESH DES VACCINS ANTICHOLERIQUES TUES A GERMES ENTIERS ET A GERMES ENTIERS + SOUS-UNITE B

Groupe et période de suivi	Efficacité du vaccin (%)	
	Germes entiers	Germes entiers/ sous-unité B
<u>Par année</u>		
Première année	53	62
Deuxième année	57	57
Troisième année	43	17
<u>Sur 3 ans</u>		
2-5 ans	23	26
>6 ans	68	63
Tous âges confondus	52	50
<u>Etiologie</u>		
Biotype classique	60	58
Biotype El Tor	40	39

Le vaccin germes entiers/sous-unité B a mieux protégé contre le choléra que le vaccin germes entiers pendant les huit premiers mois qui ont suivi la vaccination; pendant cette période, *V. cholerae* biotype El Tor a sévi sur le mode non épidémique. De plus, le vaccin germes entiers/sous-unité B a pu être rapporté à une protection croisée de courte durée (3 mois environ) contre la diarrhée provoquée par des souches d'*E. coli* productrices de toxine thermolabile (LT); ce phénomène pourrait être dû à une similitude antigénique des sous-unités B de la CT et de la LT des ECET.

Bien que cette étude n'ait pas été conçue pour juger de l'efficacité de différentes posologies, il semble que la protection soit la même après administration de deux ou de trois doses. La protection conférée par une seule dose est nulle.

Vaccins anti-*V. cholerae* O1 vivants atténués

Ces dix dernières années, beaucoup de travaux ont été consacrés à la mise au point de mutants atténués de *V. cholerae* O1 pouvant être utilisés dans des vaccins buccaux vivants. L'attention s'est portée particulièrement sur la création de souches mutantes non toxigènes (phénotype A⁻B⁻) ou qui produisent seulement la sous-unité B de la toxine cholérique (A⁻B⁺). Plusieurs souches ont été mises au point et se sont révélées immunogènes et protectrices chez des volontaires. Elles ne peuvent cependant pas être utilisées comme souches vaccinales vu qu'elles provoquent une diarrhée légère chez 25 à 40 % des volontaires. Des travaux récents visent à déterminer le mécanisme de déclenchement de la diarrhée et à mettre au point de nouveaux mutants dépourvus de cet effet secondaire, mais qui conserveraient leur immunogénicité.

Le vaccin potentiel vivant qui présente actuellement le plus d'intérêt est préparé avec la souche CVD 103 de *V. cholerae* 01. Il s'agit d'un mutant A⁻B⁺ préparé par génie génétique, par délétion des gènes codant pour la sous-unité A (toxique) de la CT de la souche Inaba pathogène classique 569B, mais avec conservation de la production de la sous-unité B immunogène et non toxique. Ni la souche parentale, ni la souche CVD 103 ne produisent la toxine "Shiga-like", élaborée par un grand nombre de souches de *V. cholerae* 01 et considérée comme au moins partiellement responsable de la diarrhée due aux souches A⁻B⁺ et A⁻B⁻.

Administré par voie buccale à des volontaires américains adultes en bonne santé, à la dose de 10⁸ organismes viables, aucune réaction indésirable grave n'a été observée; sur 46 volontaires, 5 (soit 11 %) ont cependant fait une diarrhée sans symptômes associés tels qu'altération de l'état de santé, nausées, crampes ou anorexie. Les anticorps sériques vibriocides ont considérablement augmenté chez 45 volontaires sur 46 (soit 98 %), avec un titre inverse moyen géométrique de 1339; l'antitoxine sérique était nettement augmentée chez 93 % des volontaires.

Trois épreuves infectantes distinctes ont été menées sur un total de 26 vaccinés ayant ingéré une dose unique de 2 x 10⁸ germes de souche CVD 103. L'inoculation d'épreuve a eu lieu un mois plus tard, avec une souche pathogène de *V. cholerae*, à une dose qui a provoqué une diarrhée chez 24 des 25 témoins non vaccinés. Dans chacune de ces études, la vaccination a apporté une protection statistiquement significative : globalement, dans les trois études, qui utilisaient des souches d'épreuve différentes de CVD 103 soit par le biotype, soit par le sérotype, une dose unique de CVD 103 a conféré une protection de 80 % contre n'importe quel type de diarrhée et une protection de 94 % contre la diarrhée sévère (volume des selles >2 litres).

La souche CVD 103 a ensuite été modifiée en greffant un gène qui code pour la résistance au mercure dans le locus *hlyA* du chromosome; cette souche a été désignée par CVD 103-HgR. Le marqueur permet de distinguer la souche vaccinale des souches sauvages. La souche CVD 103-HgR, présentée sous forme lyophilisée et maniable, a été administrée à 90 volontaires aux Etats-Unis d'Amérique, à la dose de 5 x 10⁸ germes viables et à 15 autres volontaires à la dose de 5 x 10⁷ germes. A ces doses-là, le vaccin a en général été bien toléré, malgré la présence de selles molles chez 3 des volontaires. Une augmentation notable des anticorps vibriocides a été observée chez 91 % des volontaires, le titre moyen étant 3 à 4 fois plus élevé que chez des volontaires comparables ayant reçu trois doses de vaccin germes entiers/sous-unité B. Le CVD 103-HgR a été isolé des coprocultures chez environ 30 % des vaccinés, contre un taux d'isolement de 90 % après vaccination par la souche parentale CVD 103. Une dose unique de CVD 103-HgR a également conféré une protection de 65 %, contre une inoculation d'épreuve avec un *V. cholerae* 01 pathogène appartenant au biotype hétérologue El Tor, souche Inaba.

Dans une étude menée ultérieurement en Thaïlande (dans une structure de confinement), aucun effet indésirable n'a été observé chez 12 adultes volontaires en bonne santé après ingestion de 5 x 10⁸ germes de souche CVD 103-HgR; sur les 12 personnes vaccinées, 11 ont eu une augmentation importante des anticorps sériques vibriocides et 9 une élévation considérable des titres sériques d'antitoxine. D'autres études, conçues pour évaluer l'innocuité et l'immunogénicité du vaccin, menées en ambulatoire sur des recrues en Thaïlande, ont cependant mis en évidence des réponses sérologiques beaucoup plus faibles. La préparation vaccinale lyophilisée pourrait poser des problèmes techniques (due peut-être à une diminution de la viabilité au moment de la reconstitution) et cette question est en cours d'étude.

Vaccins utilisant un vecteur bactérien vivant

Partant de l'idée qu'un antigène bactérien peut être plus immunogène lorsqu'il est élaboré par un organisme vecteur à l'intérieur de l'intestin que quand il est administré oralement sous une forme non vivante, on a fabriqué une bactérie hybride qui porte les gènes de *V. cholerae* 01 codant pour la synthèse et l'assemblage du LPS cholérique à la surface

de la souche vaccinale antityphoïdique buccale vivante atténuée de Salmonella typhi, Ty21a. L'immunogénicité et l'innocuité de cette souche hybride ont été évaluées chez près de 500 volontaires. Seuls des effets secondaires tout à fait mineurs ont été observés. Après administration de trois doses de chacune 2×10^{10} bactéries vivantes, on a observé une réponse sérique en anticorps dirigée contre le LPS cholérique chez environ 50 % des sujets et une réponse en anticorps vibriocides chez environ 35 %. En revanche, une réponse dirigée contre le LPS de S. typhi a été observée chez 90 à 100 % des volontaires. Une étude avec inoculation d'épreuve chez des volontaires a montré que trois doses de 10^{10} germes vivants présentés sous forme lyophilisée n'ont conféré qu'une protection générale mineure contre le choléra clinique (25 %), mais que la gravité de la diarrhée était notablement diminuée par rapport aux témoins.

Ces études plaident en faveur d'un vaccin anticholérique hybride, sans toutefois avoir débouché sur un vaccin maniable possédant une efficacité protectrice satisfaisante. La mise au point d'un germe vecteur comme par exemple une salmonelle avirulente pour porter les antigènes vaccinaux peut avoir plusieurs avantages : 1) un même vecteur bactérien pourrait servir à créer des vaccins hybrides distincts contre diverses infections atteignant les muqueuses, 2) l'innocuité du vaccin dépend essentiellement du vecteur bactérien et n'a besoin d'être établie qu'une seule fois.

Cependant, les vaccins bactériens hybrides soulèvent toujours un certain nombre d'interrogations : 1) Un autre vecteur aurait-il plus d'efficacité que la souche Ty21a, tout en restant dépourvu de réactogénicité ? 2) Comment optimiser l'expression d'antigènes étrangers ? 3) Un même gène vecteur peut-il être employé à plusieurs reprises chez le même sujet pour porter des antigènes différents ? Certaines de ces questions sont abordées ci-dessous à propos de la mise au point des vaccins potentiels contre E. coli entérotoxigène.

VACCINS CONTRE LA DIARRHÉE A ESCHERICHIA COLI ENTEROTOXIGÈNE

EPIDEMIOLOGIE ET ACQUISITION DE L'IMMUNITÉ NATURELLE

La maladie provoquée par E. coli entérotoxigène (ECET) a une répartition mondiale mais s'observe plus spécialement dans les pays en développement. Dans ces pays, les études sur la diarrhée aiguë réalisées dans les hôpitaux et les dispensaires révèlent la présence d'ECET chez 10 à 50 % des cas, avec une moyenne de près de 20 % chez l'enfant de moins de 5 ans. Des études prospectives de collectivités au Bangladesh, au Brésil, au Pérou et dans divers autres pays montrent que l'incidence maximale de la diarrhée à ECET se situe au début de l'enfance et plus particulièrement avant deux ans. Enfin, pendant les cinq premières années de sa vie, l'enfant des régions où la fréquence de la diarrhée est élevée fait un à deux épisodes à ECET par an.

Deux conditions sont nécessaires pour qu'ECET provoque une diarrhée : i) il faut qu'il colonise l'intestin grêle et ii) qu'il élabore des entérotoxines. ECET peut élaborer une toxine thermostable (ST), une toxine thermolabile (LT), ou les deux. Les isollements d'ECET producteurs seulement de ST ou de LT ou encore des deux entérotoxines sont en proportions légèrement variables d'un pays à l'autre, mais chacun des phénotypes représente en général au moins un quart de l'ensemble des ECET. Il semble d'après plusieurs études que les souches productrices à la fois de ST et LT se limitent à un assez petit nombre de groupes O et dans ces groupes à quelques sérotypes O:H. Les souches productrices de ST ou de LT appartiennent à des sérotypes plus variés. Si tous les sérotypes d'ECET sont ubiquitaires, on observe cependant que l'importance relative de certains sérotypes varie en fonction du lieu, et pour un même lieu, en fonction du temps. La prévalence d'autres déterminants importants de virulence, des facteurs de colonisation par exemple, peut aussi présenter des variations géographiques, mais l'on ne dispose que d'informations limitées sur cette question.

La maladie provoquée par ECET va de la diarrhée bénigne sans déshydratation, tableau clinique le plus caractéristique au syndrome cholérique. En outre, dans les régions d'endémicité, deux tiers au moins des infections semblent asymptomatiques. Au Bangladesh, la

fréquence est maximale chez le jeune enfant et diminue avec l'âge. Le pourcentage d'infections symptomatiques à ECET diminue également avec l'âge. Ces deux observations évoquent une immunité acquise naturellement. Les variations liées à l'âge ont été observées avec ECET producteur de ST/LT ou de ST mais n'ont pas été suffisamment étudiées chez ECET producteur de LT. Malgré des titres élevés en anticorps sériques anti-LT, le jeune enfant des régions d'endémie reste sensible à la diarrhée provoquée par ECET producteur de LT ou de ST/LT. D'où l'hypothèse que la moindre fréquence des infections à ECET et de la maladie observée avec l'âge est due à des mécanismes immunitaires qui ne reposent pas que sur les anticorps anti-LT.

Dans les pays en développement, la diarrhée à ECET a souvent une saisonnalité marquée, avec en général un pic en saison chaude; dans certaines régions, le pic coïncide avec la saison des pluies. D'après les observations dont on dispose, la transmission d'ECET se fait par des aliments et de l'eau souillés par des excréments. Les aliments peuvent être plus facilement contaminés en saison chaude, ce qui s'explique en partie par l'augmentation de la vitesse de croissance due à l'élévation de la température ambiante.

L'étude de la diarrhée des voyageurs apporte quelques éléments supplémentaires sur l'épidémiologie d'ECET et sur la constitution de l'immunité naturelle. Le taux d'atteinte de la diarrhée est élevé pendant les premières semaines qui suivent l'arrivée en pays en développement des voyageurs en provenance de pays industrialisés (généralement plus de 30 %); il semble diminuer après des voyages répétés ou un séjour prolongé dans le pays, évoquant l'acquisition d'une protection. ECET est habituellement le germe entéropathogène prédominant de la diarrhée du voyageur. D'après 19 études réalisées en Amérique latine, 46 % des épisodes diarrhéiques (médiane) étaient associés à ECET (extrêmes 28 % et 72 %). Dans huit études en Asie, ECET a été observé dans 14 % des épisodes (extrêmes 0 % et 37 %) et dans trois études en Afrique, dans 36 % des épisodes (extrêmes 31 % et 75 %). Le nombre d'isollements producteurs de ST, de LT, de ST/LT et des divers facteurs de colonisation varie d'une étude à l'autre.

LES ANTIGENES IMPORTANTS DE E. COLI ENTEROTOXIGENE

Pour qu'il provoque une diarrhée, il faut qu'ECET, grâce à ses facteurs de colonisation, adhère aux surfaces épithéliales de l'intestin et fabrique des entérotoxines. Dans la mesure où ces mécanismes sont communs aux ECET, on a envisagé d'introduire les antigènes correspondants dans un vaccin, qui serait alors efficace contre une grande variété de sérogroupes d'ECET.

Facteurs de colonisation

Parmi les facteurs de colonisation humains, les mieux caractérisés sont le CFA/I, le CFA/II et le CFA/IV (désigné auparavant par PCF8775). Le CFA/I est un antigène fimbrial simple tandis que le CFA/II et le CFA/IV sont tous deux des complexes antigéniques. Les souches productrices de CFA/II possèdent soit l'antigène fimbrial CS1, soit l'antigène fimbrial CS2 (CS: coli-surface-associated) et l'antigène fibrillaire CS3, ou bien encore ne possèdent que le CS3. Les ECET producteurs de CFA/IV possèdent soit l'antigène fimbrial CS4, soit l'antigène fimbrial CS5 et l'antigène CS6 qui n'est probablement pas d'origine fimbriale. Des ECET qui ne produisent que le CS6 ont aussi été identifiés. Tous ces facteurs sont codés par des plasmides qui en général codent aussi pour les entérotoxines (tableau 2).

Les CFA/I, CS1, CS2 et CS4 ont une forme droite en bâtonnet et un diamètre de 6 à 7 nm. La séquence des acides aminés terminaux a été élucidée pour les restes 1 à 20 et elle est très semblable pour tous ces antigènes.

Un certain nombre d'enquêtes ont cherché à déterminer la géoprévalence de ces facteurs de colonisation chez les ECET. On rapporte une prévalence de l'ensemble des CFA/1, CFA/2 et CFA/IV de 29 à 79 % parmi les ECET isolés dans un endroit donné. Les CFA ont été principalement identifiés chez des souches ST/LT et ST, comme prévu dans la mesure où les

plasmides qui codent pour les facteurs de colonisation codent ordinairement pour ces entérotoxines.

L'impossibilité de déceler des facteurs de colonisation sur de nombreuses souches d'ECET a conduit à rechercher de nouveaux facteurs. Les facteurs de colonisation présumés CFA/III, PCF0159:H4 et PCF0166 sont des antigènes fimbriaux codés par des plasmides que l'on observe respectivement chez les sérotypes O25.H16 et H⁻; O159.H4 et H20; et les sérogroupes O71, O78, O98 et O166. On a aussi décrit d'autres antigènes qui pourraient être des facteurs de colonisation : le 334 a été signalé sur une souche de sérotype O15.H11, le 2230 sur une souche de sérotype O25.H16 et le CFA/VI sur une souche de sérotype O9.H⁻; leur présence sur d'autres sérotypes n'a pas été investiguée. Le PCF0148 et le INT407 sont des facteurs qu'on rencontre sur des souches appartenant aux sérogroupes O148 et O27 respectivement (tableau 2). Le rôle exact de ces divers facteurs dans la pathogénie diarrhéique n'a pas été étudié chez l'animal.

Des travaux chez l'animal et chez des volontaires ont montré que les souches d'ECET productrices de CFA/I, CFA/II et CFA/IV administrées par voie orale ou par voie intra-intestinale (tubage) suscitent une immunité protectrice, suggérant qu'elles seraient utiles dans des vaccins. Chez l'animal, la protection passive par des anticorps anti-CFA protège contre une inoculation d'épreuve avec une souche d'ECET qui exprime le CFA homologue. De plus, les anticorps anti-CFA et anti-LT agissent en synergie pour conférer une protection contre la diarrhée à LT provoquée par ECET. Chez le lapin, un contact préalable avec des germes qui expriment le CFA/I ou les différents CS du CFA/II ou du CFA/IV confère une bonne protection contre la maladie, contre la colonisation de l'intestin ou contre les deux, lors d'une épreuve infectante avec une souche homologue de colibacille porteuse du facteur CFA/CS. Cette protection n'est pas obtenue avec des mutants facteurs de colonisation et toxine négatifs.

TABLEAU 2 : FACTEURS DE COLONISATION D'ECET

CFA	Antigènes de surface associés	Entérotoxines associées
CFA I		ST ou ST/LT
CFA/II	CS1 + CS3 CS2 + CS3 CS3	ST/LT ST/LT ST/LT
CFA/III		ST ou LT
CFA/IV	CS4 + CS6 CS5 + CS6 CS6	ST/LT ST ST ou LT
PCF0159:H4	ST/LT	ST/LT
PCF0166	ST ou ST/LT	ST ou ST/LT

Les facteurs 334, 2230, PCF0148, INT407, CFA/VI pourraient aussi être des facteurs de colonisation. Leur présence a été signalée mais ils ne sont pas bien caractérisés.

CFA - facteurs de colonisation

CS - antigène de surface (coli-surface-associated).

Entérotoxines

Chez l'homme comme chez l'animal, les études ont montré que l'infection à ECET suscite des réactions immunitaires importantes au niveau de l'intestin, à la fois antitoxiques et antibactériennes. La réaction immunitaire antitoxique est exclusivement dirigée contre LT; ST est un petit polypeptide qui sous sa forme naturelle n'est pas immunogène. La réponse anti-LT vise principalement la sous-unité B de la molécule et il y a une réaction croisée avec la sous-unité B de la toxine cholérique.

Si STa (la forme de ST fabriquée par l'ECET qui infecte l'homme) n'est pas naturellement immunogène, elle peut à condition d'être couplée à un porteur de nature protéique provoquer la formation d'anticorps neutralisants; c'est cette voie qui est explorée pour mettre au point des antigènes ST utilisables dans des vaccins. Les méthodes chimiques de couplage et le génie génétique ont été exploités pour lier la STa à divers porteurs. La toxicité des conjugués chimiques associant la STa à la sous-unité B de la CT, à la sérumalbumine bovine ou à la STb (forme de ST élaborée par les souches d'ECET infectant le porcelet) n'a cependant pas pu être abolie. Dans l'espoir d'identifier des épitopes de STa non toxiques et se liant à l'anticorps, on a synthétisé des peptides correspondant soit à la STa entière soit à une partie de l'entérotoxine. Le remplacement d'une ou de deux cystéines de STa par l'alanine a donné une STa dépourvue de toxicité se liant aux anticorps monoclonaux qui neutralisent la STa.

Ces résultats étant encourageants, on essaie de préparer des conjugués ST-protéine par manipulation génétique des bactéries. Un oligonucléotide de synthèse a été fabriqué et fusionné avec le gène de structure codant pour la sous-unité B de la CT du vibron cholérique 01. Cet assemblage génique dirige l'expression à concentration élevée d'une protéine de fusion STa-CT-B dont la toxicité résiduelle est très réduite. Les animaux vaccinés avec cette protéine ont élaboré des anticorps anti-STa décelables mais non neutralisants. Des travaux sont en cours pour mettre au point d'autres protéines de fusion non toxiques comportant la STa, en espérant qu'elles induiront la formation d'anticorps neutralisants anti-STa.

La création d'antigènes recombinés STa-LT-B a elle aussi beaucoup progressé ces dernières années. Ces protéines chimériques ont été conçues de façon empirique car on ne sait pas encore très bien comment la sous-unité B de la LT (LT-B) et la STa se replient pour acquérir leur structure tertiaire et leur structure quaternaire. Des fragments du gène STa naturel ainsi que des oligonucléotides de synthèse codant pour 18 ou 19 acides aminés de la STa ont été greffés à différents endroits du gène codant pour LT-B. Dans certaines études, des copies uniques et des copies répétées en tandem des séquences codantes de la STa ont été greffées sur le gène LT-B.

On a ainsi fabriqué des hybrides recombinés STa-LT-B qui possèdent des propriétés structurales et immunologiques importantes, notamment une grande stabilité, une grande affinité de liaison au ganglioside GM1 (le récepteur pour la LT), une bonne réactivité avec les anticorps monoclonaux qui neutralisent ST et LT et la capacité de provoquer des réponses sériques anti-LT et anti-ST chez le lapin vacciné avec une protéine de fusion partiellement purifiée. L'évaluation de l'aptitude de ces protéines recombinées STa-LT-B à conférer après administration orale une protection contre la diarrhée à ECET devra rechercher s'il existe une toxicité résiduelle et déterminer le meilleur mode d'administration, à savoir des sous-unités d'un vaccin tué ou des produits d'un vecteur bactérien vivant atténué.

Etudes des déterminants de l'immunité dirigée contre ECET chez les volontaires

Les études menées aux Etats-Unis d'Amérique sur des adultes volontaires mettent en évidence une protection importante contre une deuxième épreuve infectante avec la souche homologue après une première infection expérimentale par une souche d'ECET productrice de ST/LT. Dans une série d'études, les volontaires protégés ont excrété le germe d'épreuve sans faire de diarrhée. En revanche, la survenue d'une diarrhée après ingestion de la souche LT/ST sérotype 0148:H28 accompagnée d'une élévation importante de l'antitoxine

anti-LT, n'a pas été suivie de protection lors de l'épreuve infectante ultérieure avec une souche productrice seulement de LT appartenant à un sérotype hétérologue (O25:NM). Dans une autre étude, la vaccination par une dose unique de vaccin anticholérique buccal atténué (CVD 103-HgR), bien que suscitant une forte réponse en antitoxine anticholérique, n'a pas protégé contre l'inoculation un mois plus tard d'une souche ST/LT d'ECET. Si les résultats de l'essai de terrain réalisé au Bangladesh avec le vaccin anticholérique germes entiers/sous-unité B évoquaient une protection de courte durée par l'antitoxine anti-CT contre la diarrhée due à ECET producteur de LT, cette protection n'a pas été retrouvée chez les volontaires.

D'après d'autres études chez des volontaires, l'immunité protectrice peut être suscitée par les facteurs de colonisation fimbriaux. Chez des volontaires vaccinés une seule fois avec une souche atténuée d'ECET (5×10^{10} germes vivants), exprimant CS1 et CS3 mais dépourvue des gènes de la LT et de la ST, on a observé une nette augmentation des IgA anti-CS1/CS3 dans le liquide jéjunal. L'infection d'épreuve par une souche ST/LT de sérotype O:H hétérologue exprimant aussi CS1 et CS3 met en évidence une très bonne protection contre la diarrhée. Si la numération de la souche d'épreuve après coproculture est identique, la colonisation de l'intestin grêle proximal (évaluée par numération dans les prélèvements de liquide duodénal) est nettement moins importante chez les vaccinés que chez les témoins, permettant d'imaginer que le vaccin a mis en route dans l'intestin grêle des mécanismes immunitaires qui ont limité la colonisation des muqueuses.

Dans le même ordre d'idées, l'administration passive d'un concentré d'immunoglobulines de lait de vache ayant un titre élevé en anticorps dirigés contre CFA/I et LT (et aussi contre d'autres antigènes d'ECET) a permis d'obtenir une protection de 100 % contre une infection expérimentale avec la souche H10407 d'ECET (O78:H11, ST/LT, CFA/I); cet essai, randomisé et en double aveugle a été mené contre placebo chez des volontaires. Même si cette approche est dépourvue d'intérêt pratique sur le plan de la santé publique, le fait que des anticorps anti-ECET administrés oralement soient efficaces est une incitation supplémentaire à rechercher le moyen d'induire une immunité active par des vaccins buccaux.

LES VACCINS POTENTIELS

Vaccin inactivé germes entiers/antigène purifié

On étudie actuellement un vaccin buccal dirigé contre ECET constitué par l'association 1) d'*E. coli* tués représentant les principaux groupes O producteurs de ST/LT et exprimant les CFA essentiels sous une forme immunogène et 2) de la sous-unité B de la LT ou de la CT (ou d'un conjugué non toxique STa-sous-unité B). Le traitement des germes par le formol à faible concentration tue complètement les germes mais entraîne une perte de 50 à 100 % de l'antigénicité des divers facteurs de colonisation. Les CFA des germes inactivés sont stables à 4°C pendant au moins 8 mois, à condition d'être incubés dans le liquide gastrique acide. Une évaluation de l'innocuité et de l'immunogénicité de ce vaccin chez des volontaires doit avoir lieu sous peu.

Vaccin à germes entiers traités par la colicine E₂

Une nouvelle méthode a été mise au point pour tuer les ECET sans altérer les antigènes protéiques du germe. Elle consiste à les traiter par la colicine E₂, une endonucléase qui pénètre dans les cellules grâce à un récepteur situé sur les souches sensibles d'*E. coli*. Ni l'antigénicité, ni la concentration de la LT, du CFA/I ou des antigènes flagellaires ne sont modifiés chez les germes ainsi tués. Les capacités vaccinales des préparations d'ECET traités par la colicine E₂ ont été testées chez l'animal et chez des volontaires.

La souche H10407 tuée par la colicine E₂ et fraîchement préparée, administrée en deux doses orales de 3×10^{10} germes à un mois d'intervalle, a induit des réponses sériques en IgG et intestinale en IgA, dirigées contre l'entérotoxine LT et le CFA/I chez 29 adultes volontaires sur 32. Aucun des 22 témoins ayant reçu un placebo n'a eu une augmentation de ces anticorps. Pour évaluer la protection conférée par les germes tués par la colicine E₂, on a constitué des groupes de neuf ou dix sujets composés à peu près en nombre égal de sujets ayant reçu le vaccin et de témoins ayant reçu le placebo. Six à huit semaines après

vaccination a eu lieu une infection d'épreuve avec un ECET virulent. La protection contre la diarrhée a été de 75 % chez les vaccinés, que la souche d'épreuve soit homologue ou hétérologue. La souche d'épreuve hétérologue était différente de la souche vaccinale à la fois par son sérotype et le type de CFA; d'autres antigènes protecteurs pourraient donc être importants. Dans une autre étude avec épreuve, on a pu mettre en évidence une protection six à huit mois après la vaccination. Les méthodes de conservation des colibacilles tués par la colicine E₂ ne sont pas encore au point.

Salmonelles avirulentes utilisées comme vecteurs des antigènes d'ECET

Un vaccin potentiel buccal, vivant, multivalent, qui exprime la sous-unité B de la LT, a été mis au point avec pour vecteur la souche Ty21a. La souche SE12, dérivée de *S. typhi*, injectée par voie parentérale à la souris ou au cobaye induit une réponse sérique importante en anticorps anti-LT. La possibilité que cette souche donne un vaccin oral vivant contre ECET n'a pas été testée chez l'animal en raison du petit nombre d'hôtes de *S. typhi*.

Plus récemment, on a utilisé comme souche vecteur une souche murine mutante avirulente *aroA*⁻ de *S. dublin* (SL1438). Chez la souris vaccinée oralement, cette souche provoque une infection analogue à celle que produit chez l'homme la souche Ty21a. La souche a été transformée au moyen d'un plasmide porteur des gènes codant pour la LT-B; elle produit la LT-B et suscite chez la souris qui reçoit la souche oralement des titres élevés d'antitoxines IgG dans le sérum et IgA dans l'intestin. On a également vu apparaître progressivement chez ces souris des réponses muqueuses et sériques en anticorps dirigés contre le LPS de la souche vaccinale. D'autres études chez la souris montrent que seule une souche porteuse d'une mutation *aroA* unique est suffisamment colonisatrice, invasive et capable de persister dans les tissus.

En accord avec ce dernier résultat, des études conduites récemment chez l'homme ont montré que les mutants *aroA*⁻ *purA*⁻ de *S. typhi* ne suscitent que des titres peu élevés d'anticorps contre le polysaccharide O de la souche vaccinale. D'après ces observations, l'absence du gène *purA* qui rend obligatoire un apport exogène d'adénine diminue l'efficacité des salmonelles atténuées administrées comme vaccin buccal vivant et risque de limiter l'efficacité des salmonelles employées comme vecteurs d'antigènes hétérologues. A la place du mutant porteur d'une délétion unique, on peut envisager d'employer comme vecteurs potentiels des antigènes d'ECET des souches porteuses de deux délétions dans la voie des *aroA*. On estime qu'avec deux mutations il n'y a pas de risque de mutation inverse avec retour à la virulence.

Utilisation itérative du vecteur et perte d'efficacité

L'utilisation des salmonelles ou d'autres bactéries vivantes comme vecteurs d'antigènes hétérologues pose un problème important, à savoir le maintien de leur efficacité en cas d'emploi répété, notamment pour apporter des antigènes distincts. Il n'est pas impossible qu'une immunité antivecteur préexistante, suscitée par une première utilisation ou résultant d'une exposition naturelle, puisse intervenir dans la suite d'événements que constituent la colonisation, la multiplication et la formation des antigènes et, par suite, limiter la réponse immunitaire dirigée contre l'antigène hétérologue élaboré par le vecteur. Ce phénomène a été mis en évidence chez le lapin immunisé successivement avec des souches de *V. cholerae* A⁻B⁻ et A⁻B⁺, la réponse antitoxique en IgA associée aux muqueuses étant chez eux beaucoup plus faible que chez les témoins n'ayant reçu que des souches A⁻B⁺. De même, d'après les premières observations, il semble que la souris vaccinée avec un vecteur donné (*Salmonella* SL1438), puis vaccinée de nouveau avec le même vecteur mais exprimant un antigène hétérologue (LT-B), ait des réponses anti-LT-B en IgG sériques et en IgA associées aux muqueuses plus faibles que la souris n'ayant pas été préalablement vaccinée avec ce vecteur.

RECOMMANDATIONS APPLICABLES A LA RECHERCHE

I. VACCINS ANTICHOLERIQUES

1. Vaccin buccal à germes entiers tués

Les prochains travaux de recherche sur le vaccin à germes entiers chercheront à augmenter son efficacité et la durée de la protection conférée, plus particulièrement contre la maladie à V. cholerae 01 El Tor et chez le jeune enfant; des efforts sont également nécessaires pour simplifier son administration. Pour améliorer l'efficacité vaccinale, on peut : 1) inclure dans le vaccin une souche El Tor caractéristique de la pandémie actuelle, 2) augmenter le nombre de germes par dose, 3) faire en sorte que le TCP soit totalement exprimé dans le vaccin ou 4) inclure des souches productrices ou hyperproductrices de sous-unité B. Pour simplifier l'administration, on peut recourir 1) à une forme galénique en capsule ou en comprimé soluble, stable à température ambiante, 2) à un calendrier de vaccination plus maniable et 3) à l'association avec un tampon.

2. Vaccin anticholérique buccal vivant

Les travaux devront viser à préparer une souche vaccinale vivante qui colonise bien l'intestin, est dépourvue de réactogénicité et porte un marqueur génétique stable qui permet de la distinguer des souches de type sauvage. Avant l'essai de terrain, on déterminera les paramètres suivants : degré et durée d'efficacité chez l'adulte, innocuité et immunogénicité chez l'adulte et chez l'enfant. On comparera chez des volontaires l'efficacité des vaccins à germes entiers tués et celle des souches vivantes. On évaluera le risque de transmission à des personnes non vaccinées et le risque de dispersion dans le milieu, pour tout vaccin anticholérique buccal, vivant, potentiel.

D'autres recherches sont nécessaires pour définir les mécanismes de survenue de la diarrhée due à des mutants non toxigènes de V. cholerae 01; l'objectif est de mettre au point des souches vaccinales potentielles dépourvues de cette propriété mais conservant les qualités qui permettent d'induire une immunité protectrice.

3. Protocoles applicables aux essais du vaccin anticholérique

Il est nécessaire d'étudier de nouveaux protocoles et de rechercher de nouveaux sites pour réaliser les prochains essais des vaccins anticholériques. Il faudrait dans la mesure du possible que les protocoles soient plus opérationnels que ceux des essais prospectifs classiques à grande échelle. Le protocole devra par ailleurs apporter des solutions à certains problèmes, comme l'efficacité du vaccin dans divers contextes épidémiques, chez le jeune enfant et dans différents cadres familiaux.

4. Evaluation du rapport coût/efficacité des vaccins retenus

Le rapport coût/efficacité sera étudié pour les vaccins qui ont été évalués dans un essai de terrain et qui se sont montrés au moins modérément efficaces. L'analyse doit tenir compte des conditions propres au pays où l'essai a été réalisé, tout en essayant de prévoir ce que serait ce rapport dans d'autres contextes.

II. VACCINS ANTI-E. COLI ENTEROTOXIGENE1. Antigènes vaccinaux potentiels

a) Facteurs de colonisation : Il est nécessaire de définir plus précisément la prévalence de certains facteurs de colonisation (CFA) dans les isolements d'ECET recueillis chez les jeunes enfants de pays en développement atteints de diarrhée aiguë; il en va ainsi tout particulièrement pour l'Afrique. Parmi les CFA qui devront être identifiés, il faut inclure au moins le CFA/I, le CFA/II, le CFA/III, le CFA/IV, le PCF0159:H4 et le PCF0166. La prévalence des CFA sera déterminée par des études épidémiologiques prospectives de

population. Les recherches menées en vue d'identifier et de caractériser de nouveaux CFA seront poursuivies.

Pour faciliter les études épidémiologiques, des réactifs normalisés d'identification des CFA devront être mis au point. On pense entre autres aux anticorps polyclonaux ou monoclonaux et aux sondes d'ADN.

b) Anatoxines STa : Il convient de poursuivre les travaux concernant la préparation d'anatoxines sûres et immunogènes de STa par création de conjugués STa-protéine ou par synthèse de protéines chimériques (STa-LT-B, par exemple) par des bactéries génétiquement modifiées. On recherchera une éventuelle toxicité résiduelle et on évaluera l'immunogénicité. On déterminera, chez l'animal et si possible chez des volontaires, le rôle protecteur de l'anticorps anti-ST suscitée par ces antigènes. Les possibilités pratiques d'inclusion d'anatoxines STa sûres et protectrices dans des vaccins anti-ECET buccaux potentiels seront explorées.

c) Possibilité d'utilisation d'antigènes protecteurs communs : La possibilité d'obtenir par des antigènes une protection croisée contre des souches d'ECET différentes par leur sérotype, le type de CFA et la production de LT demande une investigation plus poussée chez des volontaires et sur des modèles animaux. Si l'existence d'une protection croisée se confirme, il faudra définir son étendue et tenter d'identifier et de caractériser le ou les antigènes responsables. La préparation des vaccins à germes entiers tués devra utiliser des méthodes dont on sait qu'elles conservent ces antigènes sous une forme immunogène.

2. Vaccins buccaux à germes entiers tués

Le développement d'un vaccin buccal à germes entiers tués efficace et sans danger, contre la diarrhée à ECET, se poursuivra. On envisagera d'inclure dans ces vaccins des germes qui représentent les sérotypes d'ECET les plus importants et qui produisent les CFA les plus fréquents. L'intérêt d'un conjugué non toxique STa-protéine (à supposer qu'on réussisse à en préparer un), ou de la LT-B ou des deux composés, sera évalué. Lorsque des antigènes sont présumés avoir de l'importance, on veillera particulièrement à ce que les méthodes employées pour tuer et pour conserver les germes préservent leur immunogénicité. On déterminera chez des adultes volontaires l'innocuité, l'immunogénicité et l'efficacité des vaccins potentiels. S'ils se révèlent intéressants, on évaluera aussi ces paramètres chez l'enfant.

En ce qui concerne le vaccin buccal à germes entiers préparé à partir de germes traités par la colicine E₂, on cherchera à mieux documenter son efficacité protectrice vis-à-vis de souches d'épreuve hétérologues et on déterminera le degré de cette protection par des études chez des volontaires. Si cette approche marchait bien, on évaluerait alors l'efficacité d'autres souches vaccinales (sérotypes et types de CFA différents). On pourrait être conduit à rechercher des souches appropriées, sensibles à la colicine E₂.

3. Vaccins anti-ECET vivants atténués

Des travaux devront être réalisés pour mettre au point des souches d'ECET qui expriment certains CFA et peut-être aussi la LT-B ou un conjugué STa-LT-B et pour évaluer leur innocuité et leur immunogénicité. On testera sur des volontaires l'innocuité et l'efficacité de ces souches administrées seules ou en association.

III. RECHERCHES COMMUNES AU VACCIN ANTICHOLÉRIQUE ET AU VACCIN ANTI-ECET

1. Conservation des vaccins bactériens vivants

On mettra au point des méthodes de conservation des vaccins bactériens vivants qui garantissent une viabilité maximale et des caractéristiques bactériennes constantes, plus particulièrement la composition antigénique avec le moins de variations possibles d'un lot

de production à l'autre. Peut-être devra-t-on évaluer d'autres méthodes de conservation que la lyophilisation.

2. Indicateurs in vitro de l'immunité

Il est nécessaire de posséder des techniques maniables pour déterminer par avance le pouvoir protecteur des vaccins potentiels et des protocoles de vaccination. Dans certains cas, la réponse en anticorps sériques peut être un indicateur satisfaisant de la réponse immunitaire protectrice associée aux muqueuses. Dans d'autres, on risque d'avoir besoin d'une méthode de mesure simple et précise de la réaction immunitaire locale.

3. Vecteurs bactériens améliorés

Les travaux menés en vue d'identifier des vecteurs bactériens améliorés pour apporter certains antigènes de V. cholerae O1 et d'ECET seront poursuivis. Il faudrait pour bien faire que le vecteur suscite, après administration d'une dose unique, une forte réaction immunitaire associée aux muqueuses sans entraîner d'effets secondaires importants; pareille réponse requiert sans doute que le vecteur colonise ou pénètre, transitoirement du moins, la muqueuse du grêle. La souche Ty21a de S. typhi sera considérée à cet égard comme un vecteur prototype; l'expression par ce vecteur d'un ou de plusieurs antigènes étrangers demande pour être optimisée des recherches approfondies.

4. Adjuvants de l'immunité associée aux muqueuses

La mise au point de vaccins buccaux efficaces contre le choléra et la diarrhée à ECET, comme celle d'autres vaccins à administration orale ou locale, pourrait exiger le recours à des adjuvants qui renforcent la réaction immunitaire muqueuse (IgAs). Des recherches devront identifier ces adjuvants et maximaliser leur efficacité. Pour être maniables, ces adjuvants devront être sans danger, relativement peu coûteux et posséder probablement une action "focalisée" sur les antigènes du vaccin.

- - -