



WORLD HEALTH ORGANIZATION  
ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE

WHO/DDC/78.2

ORIGINAL : ANGLAIS

INDEXED

PROGRAMME DE LUTTE CONTRE LES MALADIES DIARRHEIQUES

## IMMUNITE ET ELABORATION DES VACCINS

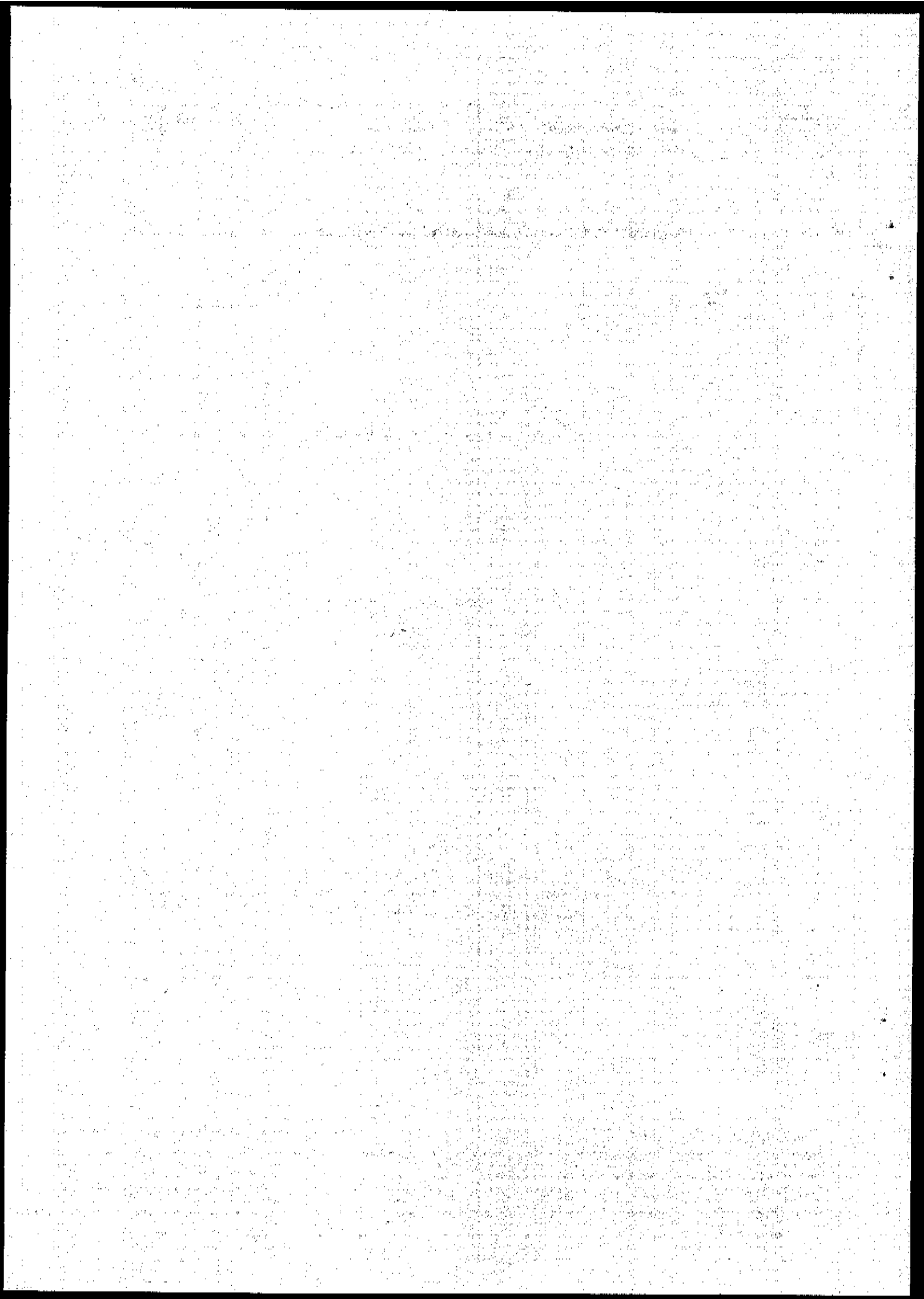
Rapport d'un Groupe scientifique de travail  
(Genève, 14-16 août 1978)



Ce rapport exprime les vues collectives d'un groupe international d'experts et ne représente pas nécessairement les décisions ou la politique officiellement adoptée par l'Organisation mondiale de la Santé.

The issue of this document does not constitute formal publication. It should not be reviewed, abstracted or quoted 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 sans l'autorisation de l'Organisation Mondiale de la Santé. Les opinions exprimées dans les articles signés n'engagent que leurs auteurs.





PROGRAMME DE LUTTE CONTRE LES MALADIES DIARRHEIQUES

IMMUNITÉ ET ELABORATION DES VACCINS

Rapport d'un groupe scientifique de travail  
(Genève, 14-16 août 1978)

Table des matières

|  | <u>Pages</u> |
|--|--------------|
| LISTE DES PARTICIPANTS .....   | 3            |
| 1. INTRODUCTION .....  | 3            |
| 2. IMMUNITÉ INTESTINALE .....  | 4            |
| 2.1 Anticorps intestinaux .....  | 4            |
| 2.2 Cinétique de la réponse en IgA et production d'anticorps de cette classe   | 5            |
| 2.3 Durée de la protection muqueuse .....  | 6            |
| 2.4 Techniques de mesure de la réponse immunitaire muqueuse chez l'homme ...   | 6            |
| 2.5 Immunité à support cellulaire et facteurs non immunologiques .....   | 7            |
| 3. APPLICATION DE LA GENÉTIQUE A LA MISE AU POINT DE VACCINS CONTRE LES<br>ENTEROBACTERIES .....                         | 7            |
| 3.1 Analyse génétique des agents entéropathogènes .....  | 7            |
| 3.2 Déterminants de la virulence à support plasmidique .....   | 8            |
| 3.3 Transposition .....  | 9            |
| 3.4 "Minicellules" .....   | 9            |
| 3.5 ADN recombinant .....  | 9            |
| 3.6 Isolement de mutants spécifiques en vue de leur emploi comme vaccin ....   | 10           |
| 4. POINT DE LA SITUATION ACTUELLE EN MATIÈRE D'AGENTS IMMUNISANTS ET<br>PERSPECTIVES DE DÉVELOPPEMENT .....              | 10           |
| 4.1 Agents immunisants contre le choléra et les souches d' <u>Escherichia coli</u><br>productrices d'entérotoxines ..... | 10           |
| 4.2 Vaccins antityphoïdiques .....   | 14           |
| 4.3 Vaccins anti- <u>Shigella</u> .....  | 15           |
| 4.4 Vaccins contre les diarrhées virales .....   | 16           |
| 5. PROMOTION ET EXECUTION DE LA RECHERCHE .....  | 18           |

The issue of this document does not constitute formal publication. It should not be reviewed, abstracted or quoted 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 sans l'autorisation de l'Organisation Mondiale de la Santé. Les opinions exprimées dans les articles signés n'engagent que leurs auteurs.

|   | <u>Pages</u> |
|---|--------------|
| 6. BESOINS DE LA RECHERCHE .....  | 19           |
| 6.1 Diarrhées provoquées par le vibrion cholérique, les vibrions non cholériques et les souches d' <u>E. coli</u> productrices d'entérotoxines (ETEC) ..... | 19           |
| 6.2 Recommandations pour la poursuite de l'élaboration de vaccins anti-typhoïdiques .....   | 20           |
| 6.3 Recommandations pour la poursuite de l'élaboration de vaccins anti- <u>Shigella</u> .....   | 21           |
| 6.4 Diarrhées à virus .....   | 21           |
| 6.5 Recommandations concernant les études génétiques .....  | 23           |
| 6.6 Mise en place de nouvelles possibilités d'expérimentation sur des volontaires dans des zones d'endémie ou de non-endémie .....                          | 23           |

LISTE DES PARTICIPANTS

Membres :

- Dr J. P. Craig, Department of Microbiology and Immunology, Downstate Medical Center, State University of New York, Brooklyn, NY, Etats-Unis d'Amérique (Président)
- Dr S. Falkow, School of Medicine, University of Washington, Seattle, WA, Etats-Unis d'Amérique
- Dr J. Holmgren, Département de Bactériologie, Institut de Microbiologie médicale, Université de Göteborg, Suède
- Dr I. Joo, Centre collaborateur OMS de Référence et de Recherche pour les Vaccins bactériens, Institut "Human" de Production et de Recherche séro-bactériologiques, Budapest, Hongrie
- Dr A. Z. Kapikian, Laboratory of Infectious Diseases, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Bethesda, MD, Etats-Unis d'Amérique
- Dr M. H. Merson, Cholera Research Laboratory, Dacca, Bangladesh
- Dr N. F. Pierce, Baltimore City Hospitals, Baltimore, MD, Etats-Unis d'Amérique (Rapporteur)

Secrétariat :

- Dr D. Barua, Infections bactériennes et vénériennes, Division des Maladies transmissibles, OMS, Genève, Suisse (Secrétaire)
- Dr P. Brès, Médecin-chef, Maladies à Virus, Division des Maladies transmissibles, OMS, Genève, Suisse
- Dr A. I. Goussev, Médecin, Immunologie, Division des Maladies non transmissibles, OMS, Genève, Suisse
- Dr A. Zahra, Directeur de la Division des Maladies transmissibles, OMS, Genève, Suisse

1. INTRODUCTION

Pour lutter contre les diarrhées infectieuses et les autres infections intestinales, l'arme de choix réside dans l'amélioration de l'approvisionnement en eau et de l'assainissement et le développement de l'éducation. Mais, dans de nombreuses régions du monde, ce but sera impossible à atteindre dans le proche avenir par suite du manque de ressources et des arbitrages à effectuer pour tenir compte des autres priorités.

Une approche complémentaire de la prévention réside dans la mise au point de vaccins capables de conférer une protection durable. Pour illustrer l'efficacité que peut avoir un vaccin contre les entérobactéries, il suffit de rappeler l'important recul qu'a enregistré la poliomyélite dans le monde entier à la suite de la mise au point de vaccins, vivants ou inactivés.

L'élaboration de vaccins efficaces contre les principaux agents pathogènes intestinaux nécessite une meilleure compréhension des mécanismes immunitaires au niveau du tractus gastro-intestinal. Malgré les progrès importants réalisés dans la connaissance de l'immunité associée à l'intestin, les connaissances fondamentales devront encore être développées dans ce domaine.

D'importants progrès ont également été accomplis ces dernières années dans l'élucidation des mécanismes pathogènes de certaines diarrhées infectieuses, mais de nombreux points restent obscurs.

Au titre de l'élément "recherche" du Programme mondial OMS de lutte contre les maladies diarrhéiques, un groupe scientifique de travail s'est réuni du 14 au 16 août 1978 pour examiner

les progrès récents enregistrés dans la connaissance de l'immunité associée à l'intestin, l'application des nouvelles acquisitions de la génétique à l'élaboration de vaccins contre les entérobactéries, la situation actuelle en matière d'agents immunisants et les perfectionnements ou innovations envisageables à ce dernier égard.

## 2. IMMUNITE INTESTINALE

L'intestin constitue un organe important du point de vue de l'immunité, puisqu'il contient dans le chorion de sa muqueuse autant de cellules lymphoïdes que la rate. Parmi ces cellules figurent des cellules T (dérivées du thymus), des cellules B (dérivées de la moelle osseuse), des cellules "null" (petits lymphocytes ne présentant aucune des caractéristiques des cellules T ou B) et des plasmocytes. Ces derniers sont essentiellement des immunoglobulines de la classe A qui constituent la source d'anticorps sécrétés à la surface de la muqueuse. Les nombreux petits lymphocytes participent au contrôle de la production d'anticorps et il est certain qu'ils ont un rôle dans les réponses immunitaires cellulaires importantes qui sont encore mal connues. Les anticorps sécrétés représentent le principal mécanisme de protection contre les bactéries non invasives et les virus intestinaux, ainsi que contre leurs produits toxiques. Il est probable que les anticorps, sécrétés ou circulants, confèrent aussi une protection contre les bactéries invasives, encore que les mécanismes d'immunité à support cellulaire aient eux-mêmes une importance indéniable à cet égard. Si ce tableau d'ensemble fait ressortir l'importance de la réponse immunitaire sous forme de production d'anticorps sécrétoires, c'est essentiellement parce qu'il s'agit de l'aspect le mieux connu de l'immunité intestinale. La plupart des concepts évoqués ici ont leur origine dans l'expérimentation animale; mais, de façon générale, ils s'appliquent probablement à l'homme, encore que des différences interspécifiques puissent exister.

### 2.1 Anticorps intestinaux

Les anticorps qui protègent la muqueuse intestinale contre les micro-organismes non invasifs ou contre leurs produits ont deux sources : le sérum et les plasmocytes du chorion. Le mécanisme de production d'anticorps à partir du sérum semble inefficace car il est rare que le titre d'anticorps puisse être maintenu à la valeur élevée qui est nécessaire pour assurer la protection. Les anticorps sériques qui parviennent jusqu'à la lumière intestinale sont en majeure partie des IgG. Par contre, les anticorps produits localement par les plasmocytes du chorion sont généralement des IgA, sécrétés de façon sélective à la surface de la muqueuse par l'épithélium des cryptes de Lieberkühn. Comme les IgA sécrétoires résistent à la protéolyse des enzymes intestinales, elles semblent mieux conçues que les IgG pour assurer la protection de la muqueuse superficielle.

Dans une large mesure, le système immunitaire de la muqueuse fonctionne de façon indépendante des mécanismes immunitaires généraux. Une réponse immunitaire peut apparaître au niveau de l'un des deux systèmes, sans qu'il en aille nécessairement de même au niveau de l'autre. Pour qu'il y ait réponse immunitaire locale, il semble nécessaire que l'antigène atteigne le tissu lymphoïde de l'intestin, en particulier les plaques de Peyer. Ce contact se produit parfois quand les antigènes sont injectés par voie parentérale, notamment à doses élevées. Mais, en général, la réaction locale n'est intense que si la surface muqueuse est directement exposée à l'antigène.

Les plaques de Peyer consistent en des accumulations disséminées de follicules clos formés de cellules lymphoïdes situées dans la sous-muqueuse de l'intestin; elles contiennent des cellules T, des cellules B et des macrophages. Ces plaques qui s'observent dans l'intestin grêle et dans l'appendice renferment les cellules qui constituent les précurseurs de la réponse en IgA. L'épithélium muqueux qui recouvre les plaques de Peyer est modifié, formant seulement des villosités rudimentaires et manifestant une pinocytose accrue. Bien que de petites quantités de macromolécules, notamment de protéines, soient absorbées sans aucune altération par les villosités, la muqueuse qui recouvre les plaques de Peyer semble conçue pour procéder à une présélection des antigènes provenant de la lumière intestinale et en effectuer la "présentation" aux tissus lymphoïdes des plaques. Les virus dont la répllication s'opère dans la muqueuse sont généralement doués d'un pouvoir immunogène élevé. En revanche, les antigènes non vivants possèdent une aptitude très inégale à susciter une réponse immunitaire locale. C'est ainsi que la quantité nécessaire pour susciter une réponse se chiffre en milligrammes ou même en grammes

dans le cas de protéines comme la séralbumine bovine ou la ferritine de la rate de cheval, alors qu'il suffit de 100 ng de toxine cholérique pour déclencher une réponse primaire au niveau de l'intestin du rat. Encore qu'elles soient imparfaitement comprises, ces différences tiennent peut-être aux propriétés spécifiques de la toxine cholérique qui en font un antigène muqueux particulièrement efficace. Ces propriétés sont au nombre de deux : une capacité de liaison à la membrane, qui peut renforcer la phagocytose de l'antigène adsorbé par les lymphocytes des plaques de Peyer, et l'activation de l'adényl-cyclase, qui peut renforcer la réponse immunitaire par effet direct sur la fonction lymphocytaire. S'il était possible de choisir d'autres antigènes possédant ces mêmes propriétés - ou de les préparer à cette fin - on disposerait d'agents immunisants particulièrement efficaces au niveau de la muqueuse.

## 2.2 Cinétique de la réponse en IgA et production d'anticorps de cette classe

L'origine et la migration des IgA intestinaux ou de leurs précurseurs sont schématisées sur la figure ci-dessous. Elle récapitule les travaux de plusieurs laboratoires et, bien que les antigènes protéiques aient été étudiés le plus en détail, il est probable qu'elle vaut également pour la réponse à tous les types d'antigènes.

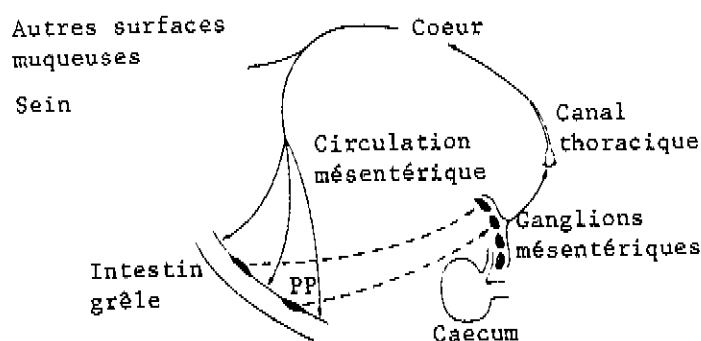


Figure.\* Circulation des immunocytes intestinaux. Les immunoblastes ont leur origine dans les plaques de Peyer (PP) ou dans les ganglions mésentériques; ils migrent à travers le canal thoracique et pénètrent dans la circulation générale. Leur point final d'aboutissement se trouve essentiellement dans l'intestin, mais ils peuvent également se diriger vers d'autres surfaces muqueuses ou vers le sein. Au niveau du chorion de la muqueuse, les immunoblastes apparaissent sous forme de plasmocytes.

Chez les animaux qui se trouvent exposés à l'antigène pour la première fois, la rencontre de celui-ci avec le tissu lymphoïde des plaques de Peyer provoque l'expansion d'un clone de cellules B spécialisées dans la production d'anticorps de la classe IgA. Pour une petite part, ces cellules se transforment en plasmoblastes et quittent la plaque pour pénétrer dans les vaisseaux lymphatiques efférents; mais la plupart restent dans la plaque sous forme de cellules B sensibilisées à l'antigène. Il est probable qu'une sensibilisation des cellules T intervient également, mais elle n'a pas été étudiée en détail. Lors d'une deuxième exposition à l'antigène, ces cellules sensibilisées subissent une transformation lymphoblastique rapide. Elle est suivie d'une division cellulaire puis d'une migration des immunoblastes IgA, tout d'abord vers les ganglions lymphatiques mésentériques puis, à travers le canal thoracique, jusqu'à la circulation générale. Ainsi, les cellules IgA engendrées par une petite zone de l'intestin peuvent se disséminer dans l'ensemble de l'organisme. Il est probable que certaines d'entre elles s'établissent dans des sites lointains de sécrétion d'IgA, par exemple la lamina propria du tractus respiratoire ou l'épithélium des conduits galactophores. Mais, en très grande majorité, elles reviennent jusqu'au chorion de la muqueuse intestinale, où elles prennent rapidement la morphologie de plasmocytes d'une durée de vie moyenne d'environ 5 jours. La présence dans la

\* Reproduit d'après Pierce, N. F., *Intestinal antibodies*, *J. infect. Dis.*, 1978, 137, 661-662, avec l'aimable autorisation de l'auteur et de l'éditeur, l'Université de Chicago. C 1978, Université de Chicago. Tous droits réservés.

muqueuse de l'antigène contre lequel les anticorps sont dirigés constitue l'un des principaux éléments qui déterminent le retour électif de ces cellules jusqu'à l'intestin. Contrairement à la réponse primaire, cette réponse secondaire est massive et rapide, se manifestant dans les 48 à 60 heures pour atteindre un pic au bout de 4 ou 5 jours et décliner ensuite très vite. Quand la réponse immunitaire est provoquée par une agression prolongée, comme c'est le cas dans les infections virales ou bactériennes de l'intestin, ces deux aspects, primaire et secondaire, fusionnent pour ne former qu'une série continue de réactions qui s'enchaînent jusqu'à la fin de l'infection.

Les cellules du chorion productrices d'IgA sécrètent un dimère 9S qui pénètre dans les cellules épithéliales de la couche glandulaire. L'IgA se combine alors avec une "composante sécrétoire produite par ces cellules épithéliales, et l'immunoglobuline apparaît à la surface de la muqueuse sous forme d'une IgA sécrétoire de constante de sédimentation 11S. Les anticorps sécrétoires IgA assurent une protection antibactérienne selon deux grands mécanismes : 1) une action directe sur les bactéries, qui aboutit à leur immobilisation ou leur agglutination ou encore les empêche d'adhérer à la muqueuse; et 2) une combinaison avec des produits bactériens, par exemple des toxines ou des enzymes, qui entraîne une inactivation des bactéries et facilite leur destruction par les enzymes protéolytiques. Il n'est pas démontré que l'IgA sécrétoire ait un rôle bactéricide important. Quant à l'activité antivirale de l'IgA sécrétoire, elle s'exerce par combinaison avec le virus et inhibition de leur captage par les cellules hôtes.

### 2.3 Durée de la protection muqueuse

On peut envisager deux mécanismes qui expliqueraient une protection prolongée à la surface de la muqueuse sous l'influence des anticorps locaux. Tout d'abord, il est possible que des plasmocytes spécifiques à IgA produisent une quantité d'anticorps sécrétoires faible mais suffisante pour assurer une protection, et cela longtemps après la fin de l'exposition à l'antigène. En second lieu, il se peut que la protection prolongée soit subordonnée à une mémoire immunologique du système IgA de la muqueuse, qui se réveillerait rapidement. Les réponses de type primaire et secondaire qu'on a mises en évidence dans ce système sont bien la preuve qu'il existe une sorte de mémoire immunologique locale. Un tel mécanisme pourrait conférer une protection contre les infections ayant une période d'incubation d'au moins 3 à 5 jours et il pourrait également hâter la fin des infections constituées. Il est moins certain que la réponse de type secondaire soit suffisamment rapide pour empêcher la survenue de maladies dont l'incubation est plus rapide, comme c'est le cas de nombreuses infections intestinales, virales ou bactériennes. La durée maximale pendant laquelle la mémoire locale assure des réponses secondaires non affaiblies n'est pas connue avec certitude, mais elle doit au moins atteindre 4 à 8 mois. Cependant, l'ampleur de la réponse secondaire peut se trouver diminuée et la durée d'efficacité de la mémoire nettement raccourcie en cas de dépression de la réponse en IgA. Le mécanisme de cette dépression, spécifique de l'antigène, est mal connu, mais il devient généralement de plus en plus intense à mesure qu'on s'éloigne du moment de l'immunisation, mettant souvent 4 à 8 semaines pour atteindre son maximum. Il peut persister de nombreux mois. Chez le rat et le lapin, ce mécanisme s'observe fréquemment après immunisation par voie parentérale et il peut également survenir après immunisation par voie digestive; par contre, il n'a jamais été observé chez le chien immunisé par voie parentérale. Chez l'homme, aucune étude n'a été consacrée à ces phénomènes de mémoire ou de dépression au niveau du système IgA de la muqueuse.

### 2.4 Techniques de mesure de la réponse immunitaire muqueuse chez l'homme

Les techniques de mesure de la réponse immunitaire au niveau de la muqueuse doivent reposer sur la compréhension des caractéristiques de ce système, notamment la distribution et la classe des anticorps produits. Les méthodes traditionnelles d'étude de la réponse immunitaire générale font essentiellement appel à la détection des anticorps dans le sérum; mais sauf exception (voir ci-après), ces méthodes sont pratiquement dénuées d'intérêt lorsqu'il s'agit de mesurer la réponse immunitaire au niveau de la muqueuse. Plusieurs méthodes susceptibles d'être employées dans ce cas sont décrites ci-dessous. Il convient en outre de noter qu'une réponse immunitaire au niveau de la muqueuse ne s'accompagne pas nécessairement d'une protection et que, à l'inverse, il peut y avoir protection sans réponse immunitaire décelable.

La corrélation entre la protection et la mesure d'une réponse locale spécifique ne peut être mise en évidence qu'au moyen d'études après injection de doses d'épreuve ou d'études prospectives appropriées sur le terrain.

#### 2.4.1 Mesures directes

2.4.1.1 L'anticorps sécrétoire spécifique est décelable dans le liquide intestinal prélevé par tubage. Les principales difficultés tiennent au mode d'obtention de l'échantillon et à la dilution variable de l'IgA sécrétoire par les sucs intestinaux. Les anticorps sécrétés risquent aussi d'être partiellement dégradés par les enzymes intestinales. Dans certaines épreuves, on peut utiliser le liquide intestinal tel quel mais, dans d'autres, il est nécessaire de procéder à une dialyse poussée, à une concentration ou à une séparation des immunoglobulines pour pouvoir obtenir des résultats convenables. De façon générale, la méthode d'épreuve doit être spécifique de la classe IgA pour exclure le risque de détection d'anticorps dérivés du sérum. La technique ELISA (titrage avec immunoabsorbant lié à une enzyme) s'est aussi montrée très utile. Des épreuves qui permettent de reconnaître la fonction des anticorps - par exemple la neutralisation de virus ou de toxines - sont également importantes mais elles ne sont généralement pas spécifiques de cette classe d'anticorps.

2.4.1.2 Chez les animaux, des plasmocytes renfermant des anticorps spécifiques ont été identifiés et dénombrés dans des biopsies du chorion au moyen d'une technique d'immunofluorescence spécifique. Elle serait utilisable chez l'homme, mais son application se trouve très fortement limitée par les difficultés de la biopsie intestinale et la faible taille de l'échantillon.

#### 2.4.2 Mesures indirectes

2.4.2.1 La mesure d'anticorps IgA spécifiques dans d'autres sécrétions externes, notamment la salive, le colostrum et le lait, pourrait être utile. On sait en effet que les IgA provenant de la réponse intestinale passent en partie dans ces sécrétions lors de leur diffusion. Cette approche a l'avantage de permettre un prélèvement plus facile de l'échantillon. Mais il n'est pas encore prouvé que la réponse intestinale en IgA se manifeste dans ces sécrétions de façon fiable ou quantitative. Ce point sera peut-être clarifié par les études futures.

2.4.2.2 La mesure des anticorps IgA spécifiques dans le sérum est également intéressante car une partie des IgA intestinaux ne sont pas excrétés mais pénètrent dans la circulation sanguine. Cette approche exige une technique hautement spécifique de la classe IgA, car le sérum risque de contenir des anticorps spécifiques d'autres classes ainsi que des anticorps provenant de sites autres que la muqueuse. En outre, il n'est pas certain que les anticorps IgA spécifiques du sérum fournissent un reflet quantitatif de la production muqueuse puisque des IgA sous forme de monomère 7S sont également produites au niveau de la rate.

#### 2.5 Immunité à support cellulaire et facteurs non immunologiques

Il faut insister sur le fait que l'anticorps sécrétoire ne constitue que l'un des éléments d'un système complexe de défense au niveau de l'intestin. Les mécanismes de défense immunitaire à support cellulaire sont mal connus mais il est certain qu'ils réagissent en présence d'une invasion de bactéries, et peut-être de virus, et contribuent à la protection. Une étude poussée de cet aspect du système immunitaire de la muqueuse s'impose. Enfin, des facteurs non immunologiques - par exemple l'acide gastrique, les enzymes protéolytiques, les contractions péristaltiques et la sécrétion de mucus - jouent aussi un rôle important en empêchant la colonisation bactérienne ou en inactivant les produits bactériens toxiques.

### 3. APPLICATION DE LA GENETIQUE A LA MISE AU POINT DE VACCINS CONTRE LES ENTEROBACTERIES

#### 3.1 Analyse génétique des agents entéropathogènes

La génétique microbienne s'attache à identifier les traits spécifiques de la virulence en examinant des mutants à qui manquent un ou plusieurs gènes contribuant à la pathogénicité du virus. Ces déterminants sont ensuite caractérisés par croisement génétique. Depuis le début

des années 60, on dispose pour étudier les agents pathogènes intestinaux de procédures génétiques, qui ont d'abord été appliquées à Escherichia coli K-12. On sait produire des recombinants interspécifiques ou intergénétiques entre E. coli, Shigella et Salmonella par transduction (transfert de matériel génétique par l'intermédiaire des bactériophages) et par conjugaison (transfert génétique par l'intermédiaire des pili lors du contact entre deux micro-organismes). Plus récemment, on a appliqué à l'analyse d'E. coli K-12 la technique de transformation (transfert génétique par l'intermédiaire de la fixation de molécules libres d'ADN). Cette technique n'a guère été appliquée aux autres entérobactériacées ni aux vibrions.

Souvent, la transformation ne s'accompagne que d'une transmission limitée des gènes chromosomiques entre les différents micro-organismes par suite de l'hétérologie de l'ADN ou de différences concernant les enzymes spécifiques qui dégradent (enzymes de restriction) ou modifient (enzymes de modification) l'ADN étranger. Pourtant, l'emploi des techniques de transfert s'est révélé utile à plusieurs occasions. Par exemple, des études de conjugaison et de transduction entre E. coli et Shigella flexneri ont abouti à l'identification des déterminants génétiques spécifiques qui régissent la colonisation de l'intestin, l'invasion des cellules épithéliales et la multiplication intracellulaire. Ces techniques génétiques ont permis de mettre au point plusieurs recombinants E. coli-Shigella qui pourraient servir de souches vaccinales.

Dans quelques études, on a essayé d'identifier les déterminants génétiques de la pathogénie des infections à Salmonella chez la souris, et des progrès considérables ont été accomplis dans la compréhension des bases génétiques de la biosynthèse de l'antigène. Depuis le début des années 60, on dispose aussi d'un système de transfert génétique pour Vibrio cholerae. Par contre, on est mal renseigné sur les gènes de V. cholerae qui contrôlent la biosynthèse de la toxine et régissent la capacité des vibrions à coloniser l'intestin. Depuis quelque temps, la recherche sur l'analyse génétique de V. cholerae s'est développée grâce aux meilleures souches, donatrices et réceptrices, dont on dispose et à l'application de certaines des acquisitions les plus récentes de la technologie de la génétique microbienne.

Des systèmes génétiques convenables permettent aujourd'hui d'étudier la pathogénie des diarrhées à E. coli, Salmonella, Shigella et V. cholerae. Mais jusqu'à il y a peu ces systèmes n'ont guère été appliqués par suite du manque d'épreuves relativement simples qui permettraient de repérer les produits des gènes de virulence parmi les multiples recombinants issus des croisements génétiques. Il est vrai aussi que, sauf quelques exceptions notables, les généticiens les plus compétents ne se sont pas intéressés à la génétique des déterminants de la pathogénie.

Il faut également noter à ce sujet que, souvent, les spécialistes qui s'intéressent le plus à la mise au point de souches vaccinales n'ont pas conscience des possibilités de la génétique.

### 3.2 Déterminants de la virulence à support plasmidique

Les plasmides, ces éléments extra-chromosomiques qui peuvent être transférés d'une bactérie à l'autre, font l'objet d'études intensives depuis une vingtaine d'années. Dans la plupart des cas, les travaux ont porté sur les plasmides qui déterminent la résistance aux antibiotiques. Plus récemment, on a découvert que E. coli possède des déterminants de virulence à support plasmidique, qui comprennent des entérotoxines ( $Ent^+$ ) et des facteurs de colonisation. Les deux catégories de déterminants sont nécessaires pour que le caractère pathogène s'exprime pleinement. Les déterminants chromosomiques qui agissent en association avec  $Ent^+$  et avec les antigènes de colonisation sont en grande partie inconnus. Des facteurs contributifs de ce genre peuvent avoir une importance considérable dans l'élaboration de souches vaccinales appropriées.

Les manipulations génétiques des plasmides  $Ent$  et des plasmides de colonisation offrent d'excellentes perspectives. Par exemple, il est possible de transposer sur ces plasmides les gènes de la résistance aux antibiotiques. Outre que l'on peut ainsi marquer le plasmide au moyen d'un élément facile à définir, la méthode permet aussi d'isoler des dérivés non toxinogènes ( $tox^-$ ) qui peuvent présenter une déficience dans la biosynthèse d'un ou plusieurs gènes

de structure ou de régulation. Il ne devrait pas être difficile d'isoler un mutant producteur d'une substance immunogène mais non toxique susceptible de servir pour la mise au point d'un vaccin.

Très peu d'informations ont été publiées sur la contribution possible des plasmides à la pathogénie de la salmonellose, de la shigellose ou du choléra.

### 3.3 Transposition

L'une des observations récentes les plus intrigantes de la génétique microbienne consiste dans l'identification d'une classe de séquences de base qui peuvent être excisées d'une portion de la molécule d'ADN et insérées en un autre point de l'ADN à l'intérieur de la même cellule. De nombreux gènes de la résistance aux antibiotiques supportés par les facteurs R se comportent de la sorte. Ces segments supports de la résistance, désignés sous le nom de séquences de transposition ou transposons, peuvent être excisés d'un génome de facteurs R et insérés dans un autre plasmide au sein de la cellule. Ils peuvent aussi être transposés dans le chromosome bactérien. Ces phénomènes de transposition sont assez fréquents et s'opèrent de façon pratiquement aléatoire.

L'insertion d'un transposon exerce un effet mutagène puisqu'elle perturbe les fonctions du gène où a lieu l'insertion.

De nombreuses possibilités s'offrent pour l'exploitation de la transposition. Par exemple :

- 1) elle peut être utilisée pour isoler des mutants dans pratiquement tout plasmide ou gène chromosomique;
- 2) des facteurs R porteurs de transposons peuvent être largement transférés à toutes les entérobactéries et au vibron cholérique;
- 3) des transposons distincts de résistance aux antibiotiques ou aux métaux lourds peuvent être utilisés pour marquer une même source ou un même plasmide en de multiples endroits;
- 4) dans certaines conditions, les transposons peuvent être introduits dans les chromosomes de sorte que tout clone bactérien résultant possédera une insertion chromosomique. La méthode présente un net avantage sur la mutagenèse chimique puisqu'on a toutes les chances de parvenir à trouver une classe particulière de mutants, quelle qu'elle soit;
- 5) il est possible de construire des souches portant des transposons identiques sur le chromosome bactérien et sur un plasmide du micro-organisme. Dans des conditions convenables, ces souches peuvent servir de donneurs génétiques.

### 3.4 "Minicellules"

Il existe chez *E. coli*, *Salmonella* et *Shigella* une classe de mutants, qualifiés de "minicellules", qui représente peut-être une nouvelle approche, prometteuse, de la mise au point des vaccins. Il s'agit de petites cellules non viables, faciles à obtenir en grande quantité et constituant les produits d'une division cellulaire aberrante. Aucune ségrégation de l'ADN chromosomique ne s'opère dans les minicellules mais elles sont normales sous la plupart des autres aspects, notamment la structure pariétale et les appendices cellulaires.

### 3.5 ADN recombinant

Les progrès récents de la biochimie de l'ADN et le développement de la technologie de l'ADN recombinant ont notablement accru les perspectives de l'isolement et des manipulations génétiques des gènes de virulence. Il est possible de former des molécules d'ADN recombinant in vitro en sondant, par voie enzymatique, des fragments d'ADN provenant de pratiquement n'importe quelle source à un transporteur, par exemple un plasmide ou un bactériophage. Une fois que ces molécules d'ADN recombinant (également qualifiées de chimères) ont été formées in vitro, on dispose des techniques voulues pour les introduire dans un hôte bactérien convenable où il y aura répliation de la chimère.

Les méthodes de l'ADN recombinant ont été appliquées avec succès à l'isolement des gènes de E. coli ST, LT, K88 et K99. Par exemple, on a pu établir la séquence du gène de structure codant la biosynthèse de ST et l'on en a déduit la séquence des acides aminés de ST. De plus, la nature de la séquence a permis d'établir que le gène de structure codant ST se trouve sur un transposon. Ces données laissent penser que les gènes codant ST de nombreuses espèces ont une origine commune. En outre, comme il est noté par ailleurs dans le rapport, il serait extrêmement utile de disposer d'une épreuve in vitro simple applicable à la détection de ST. Comme il est possible de modifier la position du gène codant ST grâce à un emploi judicieux d'enzymes de soudure, on parviendra peut-être à réaliser la fusion du polypeptide ST, normalement dépourvu d'immunogénicité, avec une protéine immunogène. Ce pourrait être un moyen utile pour mettre au point un test sérologique applicable à la détection de ST et, éventuellement, un agent immunisant contre le produit ST.

Ces méthodes sont applicables à n'importe quel gène présentant un intérêt. Les méthodes de l'ADN recombinant ont cependant leurs limites : il est clair, notamment, qu'elles doivent être axées sur quelques gènes seulement et les produits correspondants. Des applications sont possibles en matière d'immunoprophylaxie des maladies intestinales puisque ces méthodes permettent de modifier de façon systématique des séquences génétiques spécifiques. Les techniques de l'ADN recombinant ont déjà été appliquées à la synthèse in vitro de plusieurs gènes d'hormones d'eucaryotes et elles le seront peut-être pour la synthèse de gènes de procaryotes susceptibles de produire des immunogènes appropriés.

### 3.6 Isolement de mutants spécifiques en vue de leur emploi comme vaccin

En principe, un vaccin buccal vivant doit a) être dénué de pathogénicité pour l'homme, b) être stable, c) conférer une protection, et d) porter un ou plusieurs marqueurs appropriés permettant son identification chez l'hôte et dans l'environnement. Quand il s'agit d'un agent pathogène intestinal non invasif, tels V. cholerae et les E. coli productrices d'entérotoxines, il doit demeurer capable de coloniser la surface épithéliale de l'intestin, mais pour des micro-organismes comme Shigella et Salmonella typhi qui se multiplient à l'intérieur de la cellule, cette capacité de pénétrer dans les cellules et de s'y multiplier est peut-être inséparable de leur pathogénicité. Des efforts importants ont été accomplis en vue d'isoler des classes spécifiques de mutants qui pourraient posséder ces qualités. Pour la plupart, les travaux ont porté sur des espèces de Shigella et de Salmonella et les mutants étudiés étaient essentiellement du type létal conditionnel, c'est-à-dire que les mutants isolés peuvent facilement croître au laboratoire dans des conditions sélectives mais perdent rapidement leur capacité de multiplication chez l'hôte animal. Cette caractéristique limite la masse antigénique disponible pour stimuler les systèmes immunitaires. Les classes les mieux connues de mutants de ce type sont des dérivés streptomycino-dépendants de E. coli, Shigella, Salmonella et V. cholerae. On ignore quelles sont exactement les lésions génétiques de ces mutants streptomycino-dépendants, encore qu'elles puissent vraisemblablement être analysées par les méthodes classiques de la génétique.

Il serait désirable que les souches vaccinales potentielles soient examinées non seulement sous l'angle de leur capacité de réversion mais également en vue de préciser la nature du défaut génétique. Dans ces souches, la lésion génétique devrait de préférence résulter d'une délétion ou d'une série de mutations ponctuelles affectant un même gène. En outre, seule une analyse génétique précise permet de localiser exactement un gène spécifique.

## 4. POINT DE LA SITUATION ACTUELLE EN MATIÈRE D'AGENTS IMMUNISANTS ET PERSPECTIVES DE DÉVELOPPEMENT

### 4.1 Agents immunisants contre le choléra et les souches d'Escherichia coli productrices d'entérotoxines

#### 4.1.1 Séro-épidémiologie du choléra

Dans les régions de forte endémie, le choléra est avant tout une maladie de l'enfance. Des études réalisées au Bangladesh ont permis de comparer les données séro-épidémiologiques et la fréquence de la maladie. Faible avant l'âge de deux ans, l'incidence atteignait son maximum de

2 à 5 ans pour diminuer ensuite régulièrement. La proportion de sujets en bonne santé porteurs d'anticorps vibriocides augmentait rapidement au cours de l'enfance, de sorte que, à l'âge de 12 ans, 80 % environ des sujets présentaient les signes d'une infection antérieure, ce niveau élevé se maintenant ensuite tout au long de la vie. Par contre, l'antitoxine sérique atteignait son maximum au début de l'enfance et diminuait ensuite régulièrement. Ce schéma semble paradoxal puisque les observations concernant les vibriocides montrent que le sujet est soumis toute sa vie à des infections répétées. Une explication serait qu'il y a exposition inégale à la toxine et à l'antigène somatique (probablement un lipopolyoside). Ce résultat serait possible si l'immunité antibactérienne locale limite la croissance bactérienne, d'où une production de toxine faible ou nulle. Autre explication envisageable : la possibilité qu'une antitoxine locale neutralise la toxine sécrétée localement et empêche son absorption. Quoi qu'il en soit, on ne perdra pas de vue que les mesures ont uniquement porté sur les vibriocides et les anticorps antitoxiques du sérum. Ainsi, la séro-épidémiologie du choléra est fort loin d'être complètement élucidée. La connaissance de la distribution des anticorps locaux et généraux dirigés contre d'autres facteurs de virulence fournira peut-être une vue plus claire de l'interaction hôte-parasite.

#### 4.1.2 Vaccins anticholériques à base de vibrions entiers

Les vaccins anticholériques actuellement disponibles ne confèrent qu'une protection incomplète et de courte durée. Les seuls vaccins d'emploi général sont des vaccins tués, à base de vibrions entiers, à injecter par voie parentérale. La dose habituelle contient environ 4000 millions de vibrions tués, des deux sérotypes Inaba et Ogawa. Comme dans le cas de tous les vaccins à germes entiers préparés à partir de bacilles gram-négatifs, l'inoculation provoque assez fréquemment un érythème local, une hyperesthésie douloureuse au toucher et, rarement, des réactions générales modérées sous forme de fièvre et de malaise. Les réactions sévères sont d'une fréquence négligeable. Pratiquement toutes les personnes vaccinées développent des anticorps vibriocides circulants (dépendants vis-à-vis du complément) et des agglutinines, mais aucune antitoxine. Pour la fabrication du vaccin, les vibrions sont généralement cultivés à la surface d'un gel de gélose. On obtient ainsi un vaccin pratiquement dépourvu d'entérotoxine intra- ou extracellulaire.

Plusieurs essais sur le terrain soigneusement contrôlés, réalisés dans des régions d'endémie cholérique au Bangladesh et aux Philippines, ont montré que les vaccins sans adjuvant confèrent une protection de trois à six mois dans 50 à 80 % des cas, selon le groupe d'âge, la qualité du vaccin et le schéma de vaccination. La protection est d'une égale efficacité contre les biotypes homologues et hétérologues. Chez les enfants de moins de 5 ans, on peut renforcer la protection en administrant deux doses à un mois d'intervalle. D'après des essais récents en Inde et en Indonésie, il semble que l'emploi d'aluminium comme adjuvant renforce la protection conférée par une dose unique de vaccin chez ce groupe particulièrement important des moins de cinq ans. Cependant, le niveau de protection fourni par tous les types de vaccin anticholérique à vibrions entiers n'a qu'un intérêt limité du point de vue de la santé publique, même dans les régions d'endémie. Aucun des vaccins expérimentés n'a, semble-t-il, eu d'effets sur la fréquence des infections inapparentes et n'a contribué à endiguer les épidémies.

#### 4.1.3 Immunogènes cholériques expérimentaux

4.1.3.1 On a essayé sur le terrain, au Bangladesh, un vaccin lipopolyosidique du sérotype Ogawa. Les injections sous-cutanées confèrent pendant un an une protection importante contre le choléra Inaba, mais uniquement chez l'adulte, encore que le nombre de cas ait été faible. Dans un autre essai, un vaccin Ogawa à vibrions entiers s'est montré inefficace contre la maladie provoquée par le sérotype Inaba. Avec un complexe lipopolyoside-protéine préparé à partir de germes du sérotype Inaba et avec un vaccin Inaba à vibrions entiers, on a obtenu chez l'adulte une protection importante contre la maladie Inaba homologue, pendant une période relativement courte. Les résultats médiocres obtenus une fois de plus chez les enfants laissent supposer que le vaccin agit à la façon d'un rappel chez les adultes de cette zone d'endémie et ne conférerait probablement aucune protection à des populations immunologiquement vierges, aux doses et selon les schémas employés. Aux Philippines, le même vaccin Inaba à vibrions entiers a également conféré une protection contre le choléra Ogawa, pratiquement aussi importante que la protection obtenue avec le vaccin Ogawa à vibrions entiers qui s'était montré inefficace contre le choléra Inaba au Bangladesh.

4.1.3.2 L'immunogénicité et l'efficacité des anatoxines cholériques purifiées ont fait l'objet d'études poussées chez plusieurs modèles animaux et lors d'essais sur le terrain. Pour obtenir la détoxification, on a utilisé à la fois le formol et le glutaraldéhyde.

Un essai a été réalisé au Bangladesh, en 1974, pour expérimenter l'efficacité d'une anatoxine détoxifiée par le glutaraldéhyde et hautement purifiée, administrée par voie parentérale. Cette anatoxine a suscité une élévation de l'antitoxine circulante au moins aussi importante que chez les convalescents du choléra clinique. Pourtant, la protection ainsi conférée a été faible et provisoire. Une protection importante n'a été observée que dans le groupe d'âge de 5 à 14 ans, pendant 90 jours environ. Il est ainsi nettement établi que l'immunité antitoxique suscitée par injection de cette anatoxine par voie parentérale ne confère pas une protection d'un niveau suffisant pour être intéressante en santé publique. L'essai n'exclut pas la possibilité que d'autres formes de toxines, administrées par d'autres voies, puissent conférer une protection. En particulier, il n'exclut pas la possibilité qu'un anticorps sécrétoire local antitoxique joue un rôle dans la résistance.

#### 4.1.4 Etudes du choléra et de la vaccination anticholérique chez des volontaires

Des renseignements extrêmement précieux sur l'immunologie du choléra ont été fournis par des études réalisées sur des volontaires à qui l'on a administré des vibrions vivants. Le fait le plus important est que, après rétablissement, les sujets présentent pendant au moins deux à trois mois une protection pratiquement totale contre une nouvelle dose d'épreuves. La durée de l'immunité au-delà de cette période n'a pas été convenablement déterminée. Cette résistance présente une efficacité égale contre tous les sérotypes, qu'ils soient hétérologues ou homologues. La colonisation semble inhibée puisque, chez les volontaires résistants, on ne retrouve pas les vibrions d'épreuve au niveau du grêle. Il est possible que l'entérotoxine soit le principal antigène commun responsable de la protection, mais cette inhibition apparente de la colonisation donne à penser que la toxine n'est pas le seul antigène en cause.

L'immunisation de volontaires à l'aide de doses orales multiples très élevées (8-24 mg) d'une anatoxine cholérique préparée par le glutaraldéhyde n'a conféré aucune protection contre le vibron vivant administré par voie buccale. Chez environ deux tiers des volontaires, on a vu apparaître une très faible concentration d'antitoxine sérique, mais aucune réponse locale. En revanche, dans la maladie naturelle ou provoquée, on observe presque toujours une réponse beaucoup plus nette en antitoxine sérique : ces différences entre la réaction à l'infection et à l'anatoxine orale s'expliquent sans doute par des différences dans la forme de la toxine antigénique, le mode de présentation à la muqueuse et (ou) la dose et le calendrier d'administration.

On a également expérimenté chez des volontaires des vaccins anticholériques tués administrés par voie buccale. Aux doses très élevées employées, on a obtenu une certaine protection contre une dose d'épreuves composée de micro-organismes vivants, mais cette protection demeure très inférieure à celle dont bénéficient les sujets précédemment malades.

L'administration orale de doses massives d'un mutant vivant hypotoxinogène de la souche 569 B (M-13) ne confère une protection qu'à 60 % des volontaires. Cette proportion relativement médiocre, si on la compare à celle que suscitent des souches pleinement virulentes, s'explique peut-être par une déficience simultanée affectant l'un des facteurs de colonisation; il se peut aussi qu'une production de toxine suffisante pour provoquer la maladie soit nécessaire pour assurer une production optimale d'antigène protecteur, quel qu'il soit.

Au total, ces observations faites sur des volontaires amènent à la conclusion que le but de la recherche sur les vaccins est clair : mettre au point un vaccin et un mode d'administration qui puissent conférer une protection aussi élevée que celle qui résulte de la maladie.

#### 4.1.5 Diarrhée provoquée par des souches d'E. coli productrices d'entérotoxines (ETEC)

La maladie diarrhéique provoquée chez des volontaires par l'infection orale au moyen d'une souche d'E. coli productrice d'entérotoxines thermolabiles (LT) et thermostables (ST), confère une protection élevée contre une dose d'épreuve formée de la même souche. Au contraire, il

n'existe aucune protection contre les autres sérotypes d'E. coli qui produisent uniquement l'entérotoxine LT. Ces observations donnent à penser que, dans une diarrhée provoquée par les ETEC, l'immunité dirigée contre les facteurs autres que les toxines peut jouer un rôle important dans la protection. Comme dans le cas du choléra, la durée de l'immunité n'est pas connue. Il n'existe aucun vaccin contre les diarrhées à ETEC qu'on puisse utiliser chez l'homme.

Des études épidémiologiques récentes ont clairement montré que les ETEC constituent une cause importante de la "diarrhée du voyageur" dans différentes régions du monde. Par conséquent, la mise au point d'agents immunogènes efficaces utilisables à titre prophylactique pourrait avoir des répercussions importantes en permettant de réduire à la fois l'incidence des maladies diarrhéiques endémiques et des cas de maladie associés à un voyage dans une nouvelle région.

Les premiers travaux consacrés à la pathogénie, à la génétique et à l'immunologie des maladies à ETEC ont été l'oeuvre de vétérinaires qui étudiaient des diarrhées analogues chez les animaux domestiques. Une meilleure compréhension des maladies à ETEC exigera que les chercheurs qui travaillent les uns sur les maladies humaines, les autres sur les maladies animales, continuent de collaborer et de confronter l'expérience acquise grâce à leurs travaux.

Par exemple, on sait que l'immunisation de la truie par un facteur de colonisation, l'antigène K-88, confère au porcelet à la mamelle une protection contre une dose d'épreuve d'ETEC vivants. Ce phénomène vient corroborer les observations limitées effectuées chez des volontaires selon lesquelles des anticorps dirigés uniquement contre les antigènes somatiques protègent de la diarrhée à ETEC.

Il existe probablement d'importantes différences entre les mécanismes pathogènes et immunitaires des maladies diarrhéiques provoquées par les souches "entéropathogènes" d'E. coli (EPEC) et par les souches ETEC. Cependant, dans l'étude de l'immunisation contre les infections à ETEC, il sera important de tenir compte des résultats fournis par les études limitées qui ont été consacrées à la vaccination contre les maladies à EPEC. C'est ainsi que, dans une étude réalisée en Hongrie, on a constaté que, chez le nouveau-né, l'administration orale répétée de vaccins entiers tués préparés à partir des sérotypes EPEC classiques (O55, O86 et O111) conférait dans 75 % des cas une protection contre les diarrhées naturelles à EPEC, du deuxième au sixième mois de la vie. Au cours du premier mois, la protection était seulement minime.

#### 4.1.6 Perspectives de la mise au point de vaccins

Les études chez les animaux d'expérience ont montré que, dans le cas du choléra, l'immunité antibactérienne et l'immunité antitoxique agissent en synergie pour conférer une protection contre la maladie à la suite de l'exposition intestinale à des vibrions vivants. Quand l'immunisation s'effectue au moyen d'une association d'un antigène somatique (vaccin à vibrions entiers ou lipopolyoside purifié) et d'un antigène sous forme de toxine (toxine cholérique, sous-unité B ou anatoxine préparée à l'aide de formol ou de glutaraldéhyde), elle confère une protection qui est au moins égale au produit des protections fournies par chacun des deux immunogènes agissant isolément. Il semble donc que l'association d'antigènes qui sont en soi capables de conférer une certaine protection puisse renforcer notablement leur pouvoir protecteur.

Dans les vaccins anticholériques à vibrions entiers tués qui sont actuellement en usage, le principal antigène protecteur est le complexe lipopolyoside-protéine du sérotype Inaba et le lipopolyoside du sérotype Ogawa. Cependant, sur les vibrions cholériques vivants, il existe peut-être d'autres antigènes superficiels capables de susciter l'apparition d'anticorps protecteurs qui inhibent le processus complexe de colonisation. Ces antigènes peuvent comprendre la flagelline, la gaine du flagelle et des structures adhésives ou chimiotactiques encore non identifiées pour une grande part. Il se peut aussi que des anticorps dirigés contre des produits extracellulaires comme la mucinase et la neuraminidase contribuent à la protection. Le rôle protecteur de l'immunité antitoxique semble important, à en juger par des expériences sur les animaux dans lesquelles l'immunisation au moyen de toxines hautement purifiées a conféré une protection substantielle contre des doses d'épreuve de vibrions cholériques vivants ou de

toxines préformées. La toxine cholérique constitue un agent immunogène d'une efficacité inhabituelle du fait qu'elle possède des propriétés inhérentes d'adjuvant grâce à sa capacité de stimuler l'adényl-cyclase. Pour la vaccination par voie buccale, elle présente en outre l'avantage sur la plupart des autres antigènes de pouvoir se lier avec avidité à l'épithélium intestinal. Il est tout à fait improbable qu'une toxine puisse conserver cette propriété d'adjuvant quand elle est transformée en anatoxine. Le meilleur élément a priori utilisable comme agent immunogène non vivant dérivé d'une toxine, spécialement pour un emploi par voie buccale, est sans doute la sous-unité B purifiée. Elle renferme les principaux déterminants antigéniques protecteurs de la toxine, se lie aussi bien que la toxine à la membrane intestinale et ne présente aucun risque de retour à la toxicité puisqu'il lui manque l'effecteur toxique, la sous-unité A. L'immunisation de lapins à l'aide de sous-unité B purifiée a donné des résultats prometteurs.

En vue de mettre au point des agents immunogènes protecteurs contre les maladies à ETEC, il est important d'identifier les antigènes qui sont responsables de la bonne protection contre une nouvelle injection d'épreuve homologue que l'on observe chez les volontaires après la maladie clinique. Il s'agit apparemment d'une immunité antibactérienne et non d'une immunité antitoxique, et l'on peut a priori concevoir comme mécanisme immunitaire n'importe quelle combinaison d'anticorps qui entravent l'attraction chimiotactique des bactéries par la muqueuse, la pénétration du mucus, l'adhésion à la bordure en brosse et la multiplication in situ. Etant donné le grand nombre de sérotypes d'E. coli, il est probablement impératif pour la mise au point d'un vaccin d'identifier un ou plusieurs antigènes somatiques qui soient communs à la plupart des ETEC. Un antigène important qui rentre dans cette catégorie est manifestement l'antigène LT, dont la structure est étroitement apparentée à celle de la toxine cholérique, sans lui être identique. L'homologue de B dans LT constitue donc en principe un agent immunogène intéressant à inclure dans un vaccin ETEC tué. Il est également possible que la réactivité croisée entre l'antigène LT et la toxine cholérique soit suffisante pour que les sous-unités B de cette toxine confèrent également une certaine protection contre les maladies à ETEC, tout particulièrement chez les personnes qui ont subi leur première exposition à LT par voie naturelle.

Aussi bien dans le cas du choléra que des diarrhées à ETEC, un vaccin buccal vivant non pathogène pourrait constituer l'agent immunogène idéal. De telles souches vaccinales doivent conserver leur capacité de colonisation et posséder d'aussi nombreux antigènes protecteurs que possible à l'exception, bien entendu, de la toxine active. Ces vaccins vivants pourraient être formés de souches non pathogènes existant à l'état naturel ou obtenues par diverses manipulations génétiques.

#### 4.2 Vaccins antityphoïdiques

Il n'existe ni modèle animal ni épreuve in vitro qui permettent de prévoir avec certitude le degré de protection conféré à l'homme par les vaccins antityphoïdiques. Lors d'essais contrôlés sur le terrain on a relevé une corrélation entre le niveau des anticorps H et le degré de protection; en fait, lors d'un essai récent où l'on expérimentait un vaccin dénué d'antigène H, aucune protection n'a été observée. Il semble donc que cet antigène ait un rôle protecteur. Toutefois, il se pourrait qu'il ne soit qu'un marqueur d'un "antigène protecteur" thermolabile, non encore identifié.

##### 4.2.1 Vaccins administrés par voie parentérale

###### 4.2.1.1 Vaccins à germes entiers

Des essais contrôlés réalisés chez l'adulte dans des zones d'endémie ont donné les résultats suivants : vaccin inactivé par l'acétone (2 doses) : 70-85 % de protection pendant 3-4 ans; vaccin inactivé par le phénol et la chaleur (2 doses) : 70-75 % de protection pendant environ 3 ans; vaccin inactivé par l'alcool (2 doses) : environ 60 % de protection pendant 1 à 2 ans. Ainsi, ces vaccins antityphoïdiques peuvent être d'un emploi intéressant dans les zones de forte endémicité. En revanche, il convient de mettre fin à l'utilisation des vaccins antitypho-paratyphoïdiques A et B (vaccin triple associé TAB) pour les raisons suivantes : 1) l'incidence de la paratyphoïde A ou B est généralement faible; 2) l'immunogénicité du vaccin antiparatyphoïdique A pour l'homme n'a jamais été prouvée dans une étude contrôlée sur le terrain;

et 3) les résultats des essais contrôlés ont clairement montré qu'il faudrait administrer au moins  $7,5 \times 10^8$  germes de Salmonella paratyphi B pour obtenir une protection notable; mais si l'on ajoutait cette quantité de S. paratyphi B au vaccin antityphoïdique (qui renferme  $1 \times 10^9$  S. typhi), on obtiendrait un vaccin associé de réactivité inacceptable.

#### 4.2.1.2 Vaccins chimiques dépourvus de micro-organismes (types Boivin, Raistrick-Topley et Westphal)

Les essais contrôlés réalisés sur le terrain à l'aide de ces vaccins ont fait apparaître des variations considérables de la protection conférée; en général, les vaccins de ce type sont moins efficaces que les vaccins à base de micro-organismes entiers.

#### 4.2.2 Vaccins administrés par voie buccale

##### 4.2.2.1 Vaccins inactivés

Bien que ces vaccins soient employés de longue date dans plusieurs pays, leur efficacité chez l'homme n'a pas été démontrée. Lors d'essais sur le terrain réalisés au Chili, on a obtenu des résultats contradictoires et, en Inde, trois essais n'ont fait apparaître aucune protection. Chez les volontaires, une certaine protection a pu être mise en évidence quand on emploie des doses élevées et répétées.

##### 4.2.2.2 Vaccins vivants

Vaccin streptomycino-dépendant : un vaccin de ce type a été mis au point et il s'est révélé d'emploi sûr chez des volontaires mais d'efficacité variable.

Vaccin dépourvu de galactose-épimérase : il manque à ce vaccin une enzyme, l'UDP-4 galactose-épimérase, ce qui empêche la synthèse normale du lipopolysaccharide de la paroi cellulaire. Sur des volontaires, ce vaccin s'est révélé sûr et il a conféré une protection dans 87 % des cas. Un essai sur le terrain est en cours en Egypte.

#### 4.2.3 Rôle de l'immunité à support cellulaire

S. typhi est une bactérie intracellulaire; par conséquent, comme pour d'autres bactéries du même type, par exemple Brucella, Listeria et Mycobacterium tuberculosis, l'immunité à support cellulaire joue un rôle important dans la résistance. Récemment, l'épreuve d'inhibition de la migration des leucocytes a montré que l'immunité à support cellulaire se manifeste de façon plus intense chez les patients atteints de typhoïde que chez les sujets immunisés à l'aide du vaccin TAB inactivé par la chaleur et le phénol.

#### 4.3 Vaccins anti-Shigella

##### 4.3.1 S. flexneri, S. sonnei

##### 4.3.1.1 Vaccins administrés par voie parentérale

Les nombreux essais réalisés à l'aide de vaccins à germes entiers ou de vaccins exempts de germes se sont soldés par un échec total.

##### 4.3.1.2 Vaccins administrés par voie buccale

##### a) Vaccins buccaux inactivés

Administré à doses répétées à des singes Macaca mulatta, un vaccin polyvalent du type Boivin (S. flexneri 2a, 3a, 4a, 6 et S. sonnei) a conféré aux animaux d'expérience une protection importante contre une injection d'épreuve d'une souche virulente S. flexneri 2a. Lors d'un vaste essai sur le terrain (non contrôlé), l'administration à des enfants d'un vaccin à base de S. sonnei renfermant des bactéries désintégrées a provoqué un certain recul de la morbidité.

Ces vaccins ont été administrés à doses très importantes et renouvelés.

#### b) Vaccins buccaux vivants

Lors d'essais de grande ampleur sur l'enfant ou l'adulte, un vaccin polyvalent streptomycino-dépendant (S. flexneri 2a, 3 et S. sonnei) a conféré une importante protection spécifique du sérotype, mais le risque de réversion n'a pas pu être exclu.

Les possibilités d'application pratique du vaccin sont réduites par le grand nombre et l'importance des doses qu'il est nécessaire d'administrer (avec du bicarbonate) pour obtenir une protection. Une nouvelle génération de vaccins hybrides atténués (S. flexneri 2a et S. dysenteriae 1 atténué par incorporation d'un chromosome de E. coli; E. coli portant des antigènes superficiels de S. flexneri) a été expérimentée, par voie buccale, sur des volontaires. Ces vaccins ont été bien tolérés, mais aucune protection n'a pu être mise en évidence.

#### 4.3.2 Vaccin à base de S. dysenteriae 1

S. dysenteriae 1 a récemment provoqué en Amérique centrale et dans certaines régions de l'Asie du Sud-Est d'importantes épidémies marquées par un taux de létalité relativement élevé; les complications générales étaient particulièrement sévères.

L'injection par voie parentérale d'une anatoxine de Shiga a récemment été expérimentée sur des singes; aucune protection ne s'est manifestée lors de l'administration par voie orale d'une dose d'épreuve contenant des germes vivants.

Aucun autre vaccin n'a été expérimenté contre S. dysenteriae 1.

#### 4.4 Vaccins contre les diarrhées virales

##### 4.4.1 Point des connaissances actuelles

La connaissance de l'étiologie des gastro-entérites infectieuses aiguës d'origine non bactérienne vient de faire d'importants progrès grâce à la découverte de deux nouveaux groupes d'agents associés à ce syndrome. Le premier groupe, dont le prototype est constitué par les particules Norwalk de 27 nm, a été associé à des poussées épidémiques à l'école, dans la communauté ou dans le milieu familial, frappant essentiellement des enfants d'âge scolaire et des adultes. La maladie provoquée par ce groupe d'agents prend généralement fin spontanément, au bout d'environ 24 à 48 heures. La durée classique de la période d'incubation est également de 24 à 48 heures. Chez des résidents des Etats-Unis d'Amérique, des études sur la fréquence des anticorps, mesurée à l'aide de l'épreuve d'hémagglutination par immuno-adhérence, ont montré que des anticorps sériques dirigés contre l'agent Norwalk apparaissent progressivement et sont présents chez 50 % des sujets de 40 à 50 ans. L'étude des agents Norwalk est entravée par l'impossibilité de faire pousser ces agents en culture cellulaire, ce qui nécessite le recours à la microscopie électronique, classique ou immunitaire, pour les détecter. Il apparaît aujourd'hui que ce groupe d'agents comporte trois sérotypes - Norwalk, Hawaï et Ditchling - et peut-être un quatrième, le "cockle agent". Deux autres agents similaires, l'agent MC (Montgomery County) et l'agent W, sont respectivement apparentés à l'agent Norwalk et à l'agent Ditchling. Toutes ces particules ont une densité de flottation comparable en chlorure de césium (1,37-1,41 g/cm<sup>3</sup>), les agents Norwalk et W sont tous deux stables vis-à-vis de l'éther et l'agent Norwalk est en outre acidorésistant et relativement thermostable. Ces propriétés ainsi que la morphologie des agents du groupe Norwalk ont conduit à l'idée qu'il s'agissait peut-être de micro-organismes analogues aux parvovirus. Mais il s'agit d'une classification toute provisoire, puisqu'on ne sait même pas si leur acide nucléique est l'ADN (comme pour les parvovirus) ou l'ARN.

L'autre forme de gastro-entérite non bactérienne, plus importante, a été associée à une infection par des rotavirus de 70 nm et se caractérise par une diarrhée sévère qui frappe essentiellement les nourrissons et les jeunes enfants de 6 à 24 mois et exige parfois la compensation des pertes hydriques, par voie parentérale ou buccale. Dans cette forme de gastro-entérite, le taux de morbidité chez les contacts familiaux des nourrissons et des jeunes enfants est faible, bien que l'infection infraclinique soit fréquente. Contrairement au cas des

agents Norwalk, les anticorps dirigés contre les rotavirus apparaissent tôt dans la vie, selon un schéma analogue à celui du virus respiratoire syncytial et du virus paragrappal type 3. Les rotavirus constituent le principal agent étiologique de la gastro-entérite infantile puisque, dans de nombreux pays au climat tempéré, jusqu'à 50 % des cas de diarrhée du nourrisson ou du jeune enfant exigeant une hospitalisation lui sont associés. L'infection à rotavirus présente un caractère épidémique inhabituel et sévit généralement pendant les mois les plus froids de l'année dans les climats tempérés. Les maladies à rotavirus sont également fréquentes dans les pays tropicaux où l'on a effectué des recherches. La durée d'incubation est d'environ deux jours. Chez le nouveau-né, on observe normalement, sans qu'on en connaisse les raisons, un rapport infection : cas élevé et une faible morbidité. Peu d'études ont été consacrées aux infections à rotavirus qui provoquent une gastro-entérite chez le jeune enfant et le nourrisson mais sans exiger l'hospitalisation; cependant, il semble que les rotavirus jouent un rôle important dans les épisodes de diarrhée modérée.

Il existe au moins deux sérotypes de rotavirus humain, désignés provisoirement sous le nom de type 1 et type 2. Leur détection, qui se faisait initialement au microscope électronique, est maintenant possible par de nombreuses méthodes, la technique ELISA étant probablement la plus efficace et la plus commode.

On a découvert des rotavirus dans les excréta de nombreux animaux atteints de diarrhée - veau, souriceau, poulain, agneau, lapin, daim et antilope -, dans les excréta d'un singe normal et dans les produits de lavement intestinal de mouton et de bovin. En outre, l'administration de rotavirus humains aux animaux nouveau-nés privés de colostrum provoque une maladie diarrhéique chez le veau et l'agneau gnotobiotiques, le porcelet gnotobiotique ou normal et le singe Rhesus. Les cultures cellulaires se sont révélées très efficaces pour faire pousser divers rotavirus animaux, mais inefficaces dans le cas des rotavirus humains.

#### 4.4.2 Perspectives de l'immunoprophylaxie dans le cas des agents viraux de la gastro-entérite

La mise au point d'un vaccin contre les rotavirus constitue un aspect prioritaire de l'immunoprophylaxie des maladies diarrhéiques du nourrisson et du jeune enfant. Cependant, il convient tout d'abord de comprendre les mécanismes immunitaires de défense contre l'infection à rotavirus. Des études sur l'animal (veau, porcelet et agneau) ont montré que les anticorps intestinaux jouent un rôle important dans la prévention des maladies à rotavirus ou dans l'amélioration des symptômes. Lors d'études particulièrement bien conduites sur l'agneau pris comme modèle, l'administration avec les aliments d'anticorps dirigés contre les rotavirus a réussi à induire une résistance vis-à-vis d'une dose d'épreuve de rotavirus donnés par voie buccale, alors que les anticorps circulants ne suffisaient pas à assurer une protection. En outre, il ressort d'études sur des volontaires que la résistance à une dose d'épreuve de rotavirus présente une corrélation plus étroite avec le titre des anticorps intestinaux IgA qu'avec le titre des anticorps sériques. Il apparaît ainsi que les anticorps présents à la surface épithéliale de l'intestin grêle constituent un élément primordial de la résistance aux maladies à rotavirus. Par conséquent, une méthode possible pour aborder l'immunoprophylaxie des infections à rotavirus serait de mettre au point un vaccin buccal capable de stimuler l'apparition d'une quantité suffisante d'anticorps IgA locaux au niveau de l'intestin.

Mais la réalisation de cet objectif soulève plusieurs difficultés. Un grave problème tient à l'incapacité d'entretenir correctement les rotavirus humains en culture cellulaire, ce qui empêche actuellement de produire suffisamment d'antigènes humains pour les études de mise au point de vaccins. Une autre difficulté tient au problème de la durée de l'immunité. Les adultes sont fréquemment réinfectés par des rotavirus, alors que la maladie clinique est rare. On peut être perplexe quand on considère les résultats d'une expérience conduite avec l'agent Norwalk : des adultes volontaires qui avaient contracté la maladie lors d'un premier contact avec l'agent sont de nouveau tombés malades lors d'une épreuve de contrôle pratiquée 27 à 42 mois plus tard au moyen d'une souche identique, ce qui laisse penser que l'immunité est de courte durée. L'existence de deux sérotypes des rotavirus humains complique encore le problème de l'immunoprophylaxie puisque, du moins à en juger d'après les résultats préliminaires, il n'existe pas de protection croisée entre eux. Par conséquent, un vaccin anti-rotavirus devrait comporter au moins ces deux antigènes, sans d'ailleurs que l'existence d'autres sérotypes soit exclue.

La mise au point d'un vaccin contre les rotavirus peut s'envisager de diverses façons. Une stratégie consisterait à utiliser un rotavirus animal, par exemple le rotavirus isolé chez le veau, s'il est possible de trouver une souche animale qui puisse infecter l'homme sans le rendre malade, mais tout en suscitant l'apparition d'anticorps protecteurs. Les rotavirus humains et animaux ont en commun certains antigènes qu'on peut cependant différencier au moyen de diverses épreuves, par exemple l'analyse des schémas de migration de l'ARN par électrophorèse en gel de polyacrylamide et certaines techniques sérologiques. Cette approche s'est montrée prometteuse chez le veau pris comme modèle, puisqu'une injection in utero d'un rotavirus de veau a permis d'obtenir une protection contre une dose d'épreuves de rotavirus humains le jour du vêlage ou le jour suivant. Des vaccins de ce type devront faire l'objet d'expériences soigneuses sur divers modèles animaux pour en vérifier l'innocuité et la faisabilité avant qu'on puisse, s'ils se révèlent sûrs et efficaces, procéder aux premières expériences sur des volontaires présentant un taux préexistant élevé d'anticorps dirigés contre les rotavirus (de préférence des IgA dans les liquides intestinaux). La mise au point d'une souche de cette nature se poursuit actuellement.

Etant donné que le virus humain ne pousse pas suffisamment bien en culture cellulaire pour qu'on puisse entreprendre des études d'élaboration de vaccins, on pourrait envisager la production d'un hybride par recombinaison génétique avec un rotavirus animal, par exemple celui du veau, pour qui ce mode de culture est au contraire possible. L'idéal serait que l'hybride conserve sa capacité de croissance en culture cellulaire tout en possédant les antigènes capsidiques extérieurs des rotavirus humains. Cette méthode génétique est en cours d'exploration.

Une autre approche qu'il convient d'approfondir consisterait à utiliser le lait maternel pour prévenir ou modifier les infections à rotavirus. On a en effet trouvé dans le colostrum et le lait maternel de plusieurs populations des anticorps IgA spécifiques dirigés contre les rotavirus. Par ailleurs, on a signalé que ces infections sont nettement moins fréquentes en cas d'alimentation maternelle qu'en cas d'alimentation au biberon. Cependant, il n'a pas été possible de vérifier l'effet exercé sur le cours de la maladie puisque, dans les deux cas, elle est le plus souvent inapparente, ce qui prouve qu'un autre mécanisme intervient pour contenir l'infection. L'utilisation du lait maternel pour assurer une immunoprophylaxie passive contre les infections à rotavirus nécessite donc de nouvelles études.

En outre, il convient d'étudier l'importance des rotavirus en tant qu'agents entéropathogènes dans les pays en développement, de façon à déterminer avec précision leur part relative dans l'incidence globale des maladies diarrhéiques, ainsi que leur histoire naturelle sur une durée relativement longue. Cependant, il ne faudra pas attendre ces résultats pour s'attaquer à la solution des problèmes de la production de vaccins puisqu'il est clair que les rotavirus constituent un agent étiologique important, sinon l'agent principal, de la diarrhée chez le nourrisson et le jeune enfant.

## 5. PROMOTION ET EXECUTION DE LA RECHERCHE

Le plan d'exécution de l'élément "recherche" du Programme de lutte contre les maladies diarrhéiques, actuellement en cours de mise au point, a été soumis à l'examen d'un groupe de travail qui en a approuvé la forme présente. L'accent a été mis en particulier sur la diffusion de l'information concernant les modalités de la gestion du programme et ses objectifs, notamment parmi les pays en développement par l'intermédiaire des bureaux régionaux, en vue de faciliter l'identification des chercheurs et des institutions les mieux à même de participer au programme. Le groupe de travail a estimé que les institutions qui se montrent intéressées par tel ou tel domaine de recherche devraient recevoir une assistance en vue de la mise au point de protocoles de recherche. Il a en outre été convenu qu'une méthode uniforme était nécessaire pour évaluer les propositions de recherche. Le groupe a recommandé qu'on mette au point une présentation type qui serait utilisée par les institutions candidates pour décrire les recherches proposées.

## 6. BESOINS DE LA RECHERCHE

Selon le groupe, des recherches complémentaires sont nécessaires dans les domaines suivants :

### 6.1 Diarrhées provoquées par le vibrion cholérique, les vibrions non cholériques et les souches d'*E. coli* productrices d'entérotoxines (ETEC)

#### 6.1.1 Mécanismes de défense immunitaire et antigènes protecteurs

6.1.1.1 Il est nécessaire de définir avec davantage de précision les structures somatiques bactériennes et les produits extracellulaires qui sont importants du point de vue de la pathogénie et (ou) de l'établissement de l'immunité. Ces connaissances sont essentielles pour pouvoir choisir de façon plus rationnelle les éléments a priori utilisables pour l'élaboration de nouveaux vaccins.

6.1.1.2 Des méthodes devront être mises au point pour déceler les anticorps dirigés contre toutes les structures ou produits de micro-organisme qui jouent un rôle dans la pathogénie. Ces méthodes doivent comprendre des techniques de titrage des anticorps dirigés contre les divers facteurs de colonisation qui interviennent dans l'attraction chimiotactique de la bactérie par la muqueuse, la pénétration dans le mucus, l'adhésion à la bordure en brosse et la multiplication in situ. Il convient également d'améliorer les épreuves de titrage des anticorps dirigés contre les entérotoxines et leurs sous-unités, notamment pour la toxine cholérique, *E. coli* LT et les toxines des vibrions non cholériques. Des épreuves simples applicables à ces anticorps, dans le sérum et dans le liquide intestinal, sont nécessaires pour l'exécution d'études séro-épidémiologiques. Enfin, il est manifestement indispensable de disposer d'une épreuve in vitro applicable à *E. coli* ST et de réaliser des études pour vérifier si, dans certaines conditions, cette toxine de faible masse moléculaire peut être immunogène.

6.1.1.3 Le cours naturel de la maladie clinique provoquée par *V. cholerae*, les ETEC et les vibrions non cholériques doit être déterminé par des études épidémiologiques et sur des volontaires. Plusieurs points sont à préciser :

- a) intensité et durée de la protection immunitaire contre les organismes homologues;
- b) protection croisée contre les organismes hétérologues (par exemple, l'immunité au choléra confère-t-elle une résistance contre les maladies à *E. coli* LT ?); et
- c) intensité et durée de la première stimulation du système immunitaire de la muqueuse nécessaires pour assurer une réponse immunitaire secondaire (par exemple, une diarrhée à *E. coli* LT constitue-t-elle une première exposition efficace pour obtenir une réponse secondaire en présence d'anatoxines cholériques ou de sous-unités de toxines ?).

#### 6.1.2 Méthodes de stimulation de l'immunité muqueuse

6.1.2.1 Il est nécessaire d'étudier des méthodes qui permettraient de déclencher au niveau de la muqueuse une réponse de protection immunitaire, en particulier d'évaluer divers antigènes, voies d'administration et adjuvants.

6.1.2.2 Il convient de trouver le moyen de prolonger à la fois la réponse immunitaire proprement dite et la mémoire qui assure la réponse à une stimulation ultérieure; le rôle de chacun de ces deux aspects dans la prolongation de la protection devrait être étudié.

6.1.2.3 Des études sont nécessaires pour définir des moyens pratiques de mesurer l'immunité muqueuse chez l'homme. Ces études doivent comporter l'examen de sécrétions extra-intestinales, telles que la salive et le lait maternel, pour déterminer si elles donnent un reflet exact de l'immunité intestinale.

6.1.2.4 Il convient d'étudier les anticorps présents dans le lait maternel pour voir s'ils fournissent un reflet de l'immunité intestinale de la mère et assurent une protection immunitaire à l'enfant, qui pourrait être renforcée par l'immunisation de la mère selon un schéma déterminé.

6.1.2.5 L'éventail des réponses immunitaires observées dans les différentes populations est à préciser. Il faudrait non seulement effectuer des comparaisons entre les habitants de régions d'endémie et ceux d'autres régions, mais également déterminer l'influence éventuelle de l'âge, de l'état nutritionnel, des facteurs génétiques et des infections microbiennes et parasitaires accessoires.

#### 6.1.3 Développement de modèles animaux

Un modèle plus satisfaisant que ceux dont on dispose actuellement pour étudier la pathogénie et l'immunité protectrice dans le choléra et les diarrhées à ETEC constitue un réel besoin. Ce modèle devrait utiliser l'intestin non ligaturé d'animaux adultes neufs. Dans de nombreux cas, l'établissement d'un tel modèle faciliterait grandement la poursuite des études recommandées ci-dessus.

#### 6.1.4 Agents immunisants

6.1.4.1 Des systèmes d'analyse biologique et génétique devraient être appliqués à V. cholerae et aux ETEC en vue de parvenir à une compréhension précise des facteurs qui sont associés à la virulence et à la protection. L'application de ces connaissances faciliterait un choix rationnel des antigènes à inclure dans les vaccins.

6.1.4.2 De nouveaux agents immunogènes, perfectionnés, doivent être mis au point; ils devraient comprendre les catégories suivantes :

- a) des agents immunogènes non vivants, comprenant des vaccins à base de micro-organismes entiers, des produits extracellulaires bruts et des produits somatiques ou extracellulaires purifiés, tels que des lipopolyosides ou des antigènes dérivés de toxines;
- b) des vaccins vivants, formés soit de souches non pathogènes rencontrées à état naturel, soit de mutants ou de recombinants produits en laboratoire. Les souches susceptibles de servir à la préparation de vaccins vivants devraient posséder des marqueurs génétiques sélectifs permettant de les différencier des souches sauvages.

6.1.4.3 Il convient de poursuivre l'évaluation, sur des animaux d'expérience et sur des volontaires, de la synergie obtenue avec deux ou plusieurs agents immunogènes. Cela facilitera l'élaboration de vaccins non vivants associés (par exemple vaccin contre le choléra ou les diarrhées à ETEC contenant à la fois des antigènes somatiques et des antigènes dérivés des toxines (comme les sous-unités B), ainsi que l'identification des antigènes qui sont nécessaires dans les souches de vaccins vivants.

#### 6.2 Recommandations pour la poursuite de l'élaboration de vaccins antityphoïdiques

##### 6.2.1 Vaccins administrés par voie parentérale

Comme les vaccins actuellement en usage provoquent des réactions assez intenses et ne confèrent pas une protection complète, il est nécessaire de les améliorer. Des méthodes d'inactivation peu brutales seront utilisées pour préparer des vaccins qui soient immunogènes tout en provoquant moins de réactions; des vaccins de ce type ont été récemment mis au point en Union soviétique : il conviendrait d'étudier leur efficacité au moyen d'essais contrôlés sur le terrain. Une autre approche pour mettre au point un vaccin ne déclenchant pas de réactions consisterait à isoler les structures glucidiques de l'antigène O, exemptes du lipide toxique A, ou à préparer ces structures par voie de synthèse puis à les coupler à une protéine de transport pour les rendre immunogènes; des études conformes à ce schéma sont en cours en Suède. Comme les réactions provoquées par l'injection intradermique de vaccin antityphoïdique sont très faibles, il conviendrait de comparer, lors d'une étude contrôlée sur le terrain, la vaccination par voie intradermique et la vaccination par voie sous-cutanée. Dans ce genre d'étude, il est nécessaire de comparer aussi bien les doses que la voie d'administration.

### 6.2.2 Vaccins buccaux inactivés

Jusqu'ici, les vaccins antityphoïdiques buccaux inactivés qui ont été expérimentés se sont montrés d'une efficacité douteuse; il convient d'en poursuivre l'étude. La préférence devra aller à des préparations dotées d'une plus grande antigénicité à l'égard des animaux. D'autres orientations sont possibles pour les recherches : a) essai de différentes méthodes d'inactivation; b) amélioration des méthodes (schémas) d'application, par exemple primo-vaccination par voie parentérale et rappel par voie buccale; et c) utilisation d'adjuvants actifs par voie buccale.

### 6.2.3 Vaccins buccaux vivants

Il n'existe malheureusement aucun modèle de laboratoire pour reconnaître l'atténuation de la virulence chez *S. typhi*. Un modèle de ce type doit être mis au point. On poursuivra les tentatives en vue d'isoler, par les méthodes de la génétique, des souches immunogènes stables.

Il faut également continuer l'évaluation du nouveau vaccin dépourvu de galactose-épimérase.

### 6.2.4 Analyse du rôle de l'immunité à support cellulaire

Il est important de mettre au point des méthodes simples qui permettent d'éprouver l'immunité à support cellulaire dirigée contre le bacille de la typhoïde. Il faudrait notamment étudier la possibilité de préparer à cette fin un antigène pour cuti-réaction analogue à la tuberculine. Les vaccins potentiels devraient être mis à l'épreuve pour voir s'ils possèdent la capacité de stimuler l'immunité de ce type.

## 6.3 Recommandations pour la poursuite de l'élaboration de vaccins anti-Shigella

### 6.3.1 Vaccins buccaux inactivés

Les vaccins buccaux inactivés se sont jusqu'ici montrés inefficaces contre la shigellose; il se peut que le perfectionnement des méthodes de préparation de ce type de vaccin ne mérite pas la priorité.

### 6.3.2 Vaccins buccaux vivants

Il semble que, pour provoquer la maladie et susciter en même temps l'apparition de la résistance, il faut qu'il y ait colonisation, pénétration et multiplication dans les cellules épithéliales. La pénétration est absente avec les souches vaccinales actuelles, atténuées. Le recours aux techniques de la génétique permettrait peut-être d'élaborer des souches qui ne pénétreraient pas à l'intérieur de la muqueuse et, par conséquent, ne provoqueraient pas la maladie, mais seraient capables de coloniser la surface de la muqueuse en constituant un stimulus antigénique suffisant pour assurer la protection. La mise au point d'un vaccin vivant, sûr et efficace, contre *S. dysenteriae* serait particulièrement précieuse.

6.3.3 L'importance des entérotoxines de *Shigella* dans la pathogénie de la shigellose de tous les séro-groupes doit être mieux élucidée.

6.3.4 Des études doivent être réalisées en vue de définir la durée de l'immunité intestinale à l'égard de la maladie naturelle.

## 6.4 Diarrhées à virus

### 6.4.1 Etudes épidémiologiques

6.4.1.1 Il convient de réaliser des études épidémiologiques, tout particulièrement du type longitudinal, pour déterminer l'incidence des diarrhées provoquées par des agents viraux spécifiques. De la sorte, il sera possible de déterminer l'importance relative des divers agents et de fixer les priorités en conséquence.

6.4.1.2 Il est nécessaire de déterminer l'importance des maladies à rotavirus dans diverses populations et de préciser l'éventail de ces maladies. Ces informations de base sur l'histoire naturelle des infections à rotavirus sont essentielles pour déterminer quelles seraient les populations qui tireraient le plus grand profit de la mise au point de vaccins. Les études permettraient de déterminer a) le nombre de sérotypes et la présence de différences antigéniques mineures; b) la fréquence des réinfections; c) les groupes d'âge les plus sévèrement frappés; et d) l'importance à long terme des rotavirus pour la santé infantile.

6.4.1.3 Des réactifs de référence permettant l'application aux rotavirus de la technique ELISA devraient être fournis sous les auspices de l'OMS. Un approvisionnement plus abondant en réactifs de ce type faciliterait les études épidémiologiques et serait particulièrement important pour la caractérisation des souches vaccinales envisageables pour la préparation de vaccins.

#### 6.4.2 Rotavirus

6.4.2.1 Les rotavirus humains ne croissent pas suffisamment bien pour atteindre les titres importants que nécessiterait leur emploi direct dans la recherche d'un vaccin; il convient donc d'accorder une priorité élevée à l'étude de méthodes assurant une reproduction plus efficace de ces organismes.

6.4.2.2 Les anticorps IgA intestinaux dirigés contre les rotavirus revêtent une importance décisive dans la prévention des maladies occasionnées par ces virus; il convient cependant de réaliser des études complémentaires pour établir la durée de la réponse immunitaire et trouver des moyens de renforcer cette réponse. Les titres d'anticorps anti-rotavirus doivent être étudiés dans des sécrétions telles que la salive et le lait maternel pour déterminer s'ils reflètent correctement le titre des anticorps dans le liquide intestinal du grêle.

6.4.2.3 Dans une maladie où les anticorps locaux au niveau de l'intestin jouent un rôle aussi important dans la résistance, il est difficile d'expliquer le faible taux de morbidité chez les nouveau-nés infectés. Le mécanisme de cette résistance doit être étudié.

6.4.2.4 Des études longitudinales doivent être réalisées pour déterminer le rôle de l'alimentation maternelle sur l'histoire naturelle des infections à rotavirus. L'étude doit porter sur les facteurs épidémiologiques, immunologiques et sociaux. Les connaissances ainsi rassemblées aideraient à prendre une décision concernant la pratique éventuelle de la vaccination contre les rotavirus chez les femmes en âge de procréer.

6.4.2.5 L'administration passive d'anticorps anti-rotavirus par la voie digestive a suscité chez divers modèles animaux l'apparition d'une résistance à une dose d'épreuve de rotavirus : on pourrait donc envisager d'étudier chez l'homme l'effet de l'administration per os d'anticorps dirigés contre les rotavirus humains. Une autre approche consisterait dans l'administration buccale d'un "lait immun" de vache (qui contient des anticorps anti-rotavirus).

6.4.2.6 Il faut rechercher un animal chez qui la maladie puisse être provoquée au-delà du début de l'existence. Ce point est important pour l'étude de l'innocuité et de l'efficacité des vaccins envisagés contre les rotavirus.

#### 6.4.3 Agents du groupe Norwalk

6.4.3.1 Les efforts doivent se poursuivre en vue de trouver des modèles animaux permettant l'étude des maladies provoquées par les agents du groupe Norwalk.

6.4.3.2 L'absence d'immunité à long terme contre ces agents qu'on observe chez des volontaires soulève des problèmes intrigants en rapport avec l'immunité intestinale. Il convient d'élucider les raisons du phénomène.

#### 6.4.4 Autres agents viraux

On continuera de rechercher et de caractériser d'autres agents viraux qui seraient associés à la gastro-entérite à virus et l'on en déterminera l'importance.

## 6.5 Recommandations concernant les études génétiques

Il y a tout lieu de croire qu'il est possible de tirer parti des progrès récents de la génétique microbienne et de la biochimie de l'ADN en les appliquant aux problèmes pratiques de la mise au point de vaccins contre les entérobactéries. Cela exige une juste appréciation à la fois de l'utilité potentielle et des limitations de la méthode génétique. Si l'on voit souvent dans la génétique un domaine technique complexe, il est en réalité possible de réaliser des croisements génétiques à l'aide de milieux bactériologiques moins complexes que ceux que l'on utilise au laboratoire pour poser le diagnostic des maladies intestinales. On peut rapidement acquérir une formation qui permette d'effectuer une analyse plasmidique relativement détaillée des souches en employant des réactifs assez peu chers et en utilisant un matériel peu complexe - qui se limite à un appareil permettant de fabriquer sur place des plaques de gélose et à une source de courant continu. Et de fait, ces méthodes ont déjà été enseignées, avec le soutien de l'OMS, à des techniciens et des cliniciens de pays en développement qui ont pu les appliquer avec profit une fois de retour dans leur pays.

Il est par conséquent recommandé de continuer à encourager la formation conjointe et la collaboration des épidémiologistes, immunologistes et microbiologistes avec les experts de la génétique et de la biologie moléculaire.

En plus des études génétiques citées dans les sections qui précèdent, plusieurs éléments sont nécessaires :

- 6.5.1 un meilleur choix et une plus grande variété de souches donatrices et réceptrices bien caractérisées d'agents entéropathogènes qui faciliteraient l'étude des déterminants génétiques de la pathogénie;
- 6.5.2 une meilleure caractérisation des plasmides Ent des ETEC de l'homme, et l'élucidation de leurs relations avec ceux des animaux;
- 6.5.3 des études sur la nature et la base génétique (chromosomique ou extrachromosomique) de la colonisation par les ETEC humains, V. cholerae et les autres agents pathogènes intestinaux; et
- 6.5.4 la détermination du rôle éventuel des plasmides dans la pathogénie de la salmonellose, de la shigellose et du choléra.

## 6.6 Mise en place de nouvelles possibilités d'expérimentation sur des volontaires dans des zones d'endémie ou de non-endémie

S'agissant des diarrhées infectieuses, quelles qu'elles soient, certaines questions concernant la pathogénie et l'immunité ne peuvent recevoir une réponse définitive qu'au moyen d'études sur des volontaires. Il est donc indispensable de mettre en place des moyens permettant de réaliser ce genre d'étude dans des zones d'endémie ou de non-endémie. Il faut pouvoir étudier ainsi :

- 1) la réaction à une dose d'épreuve, administrée par voie buccale, d'agents bactériens ou viraux vivants pour pouvoir définir le cours naturel de la maladie;
- 2) la réponse immunitaire sous forme de l'apparition d'anticorps dans le sérum ou les autres liquides organiques;
- 3) la valeur de la protection assurée par les divers vaccins à l'étude.

Dans tous ces travaux, on devra respecter scrupuleusement les règles de la déontologie pour choisir les volontaires et les informer de leurs droits. Les centres d'étude sur volontaires doivent être administrés sous la direction de chercheurs locaux. L'examen des protocoles doit être confié à des commissions locales de déontologie formées de quelques personnalités qui ne prennent pas directement part au projet.