

## CHOLERA : LES VACCINS ACTUELS ET FUTURS

B. IVANOFF

• OMS, Développement et Recherche en matière de Vaccins, Genève, Suisse.

*Med. Trop.* 2001 ; **61** : 245-248

Le concept de prévention du choléra par la vaccination dans les pays en développement n'est pas encore admis par tous et reste encore aujourd'hui un sujet de controverse. L'existence même de la maladie est bien souvent cachée par les responsables politiques pour des raisons économiques évidentes. Un pays déclarant officiellement des cas de choléra voit immédiatement chuter son activité touristique et son commerce extérieur lorsqu'il exporte des fruits de mer ou des produits maraîchers.

Les recommandations habituelles basées sur l'hygiène personnelle et l'amélioration des canalisations d'eau et d'égouts sont efficaces si elles sont appliquées convenablement. Malheureusement, essentiellement pour des raisons économiques, la réalité est bien différente. L'OMS estime en effet à environ 2,8 millions le nombre de morts qui sont à déplorer chaque année dans les pays en développement. Ces décès sont causés par les infections dues à *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* ETEC, *Shigella* et rotavirus. Sur ce chiffre, le choléra est responsable d'environ 120000 morts.

Le traitement des cas de choléra par les sels de réhydratation a montré son efficacité sur les personnes malades capables d'atteindre les centres de traitement assez rapidement. Mais cela n'est pas possible pour l'ensemble d'une population et ceux qui ne peuvent atteindre ces centres, pour différentes raisons, viendront malheureusement grossir les statistiques de mortalité. C'est pour ces populations et celles à risque (camp de réfugiés, bidonvilles) que le développement de vaccins anticholériques efficaces est important. Nous décrirons dans cet article les vaccins actuellement disponibles et ceux qui sont en cours de développement. Les recommandations de l'OMS sur l'utilisation de ces vaccins seront présentées par un autre conférencier.

### LES VACCINS ACTUELLEMENT DISPONIBLES

L'ancien vaccin constitué de bactéries inactivées administrées par voie parentérale n'est plus recommandé de nos jours par l'OMS. Il n'entraînait qu'une protection d'environ 50 % pendant 3-4 mois. Depuis, des progrès importants ont été réalisés et de nouveaux vaccins sont actuellement considérés comme potentiellement utilisables en santé publique.

Jusqu'en 1992, le sérotype O1 de *Vibrio cholerae* était le seul à pouvoir provoquer des épidémies. A la fin de 1992, un autre sérotype, le O139, a fait son apparition en Inde et au Bangladesh (1-3). Les vaccins actuellement disponibles ne concernent que le sérotype O1. Il n'existe pas encore, sur le marché, de vaccins destinés à prévenir les infections dues au sérotype O139. Les vaccins anticholériques disponibles actuellement, sont tous donnés par voie buccale. Deux sont actuellement disponibles sur le marché (en Suède et en Suisse) et ont reçu leur licence d'utilisation dans plusieurs pays. Il s'agit d'un vaccin inactivé et d'un vaccin vivant atténué.

### Vaccin oral inactivé.

Ce vaccin est constitué de sous-unités B purifiées et de souches de *Vibrio cholerae* classique et El Tor, Inaba et Ogawa, inactivées par la chaleur ou le formol. Le but de ce vaccin est d'entraîner une réponse en anticorps dirigée à la fois, contre la toxine et contre les antigènes somatiques (essentiellement antigène O du LPS). Les anticorps antitoxine sont dirigés contre la sous-unité B et empêchent la fixation de la toxine sur le ganglioside GM1. Le vaccin est administré sous un volume de 120 ml, avec du bicarbonate à cause de la sensibilité de la sous-unité B à l'acidité gastrique.

Ce vaccin conçu dans les laboratoires du Dr J. Holmgren à Göteborg, est produit par la société « SBL Vaccins » (Swedish Bacteriological Laboratory, Active Biotech) de Stockholm sous l'appellation Dukoral® ; il est administré par voie buccale en deux doses à huit jours d'intervalle. Ce vaccin, évalué en zone d'endémicité cholérique au Bangladesh, a entraîné une protection de 86 % pendant 6 mois chez tous les vaccinés. Deux ans après la vaccination, les personnes âgées de plus de 5 ans étaient encore protégées à 62 %. La protection était encore de 50 % trois ans après la vaccination. Cependant, les enfants de moins de 5 ans voyaient leur protection décroître régulièrement 6 mois après la vaccination. Ce vaccin est efficace contre le biotype classique et le biotype El tor (4,5). Son efficacité apparaît 7 jours après la deuxième dose. Ce vaccin a obtenu sa licence d'utilisation en Suède, Norvège, Pérou, Argentine, Guatemala, Salvador, Honduras, et au Nicaragua. A cause d'une parenté antigénique entre la sous-unité B et l'entérotoxine thermolabile (LT) d'*Escherichia coli* ETEC, ce vaccin a

entraîné une protection, de 67 %, contre les diarrhées à *Escherichia coli* ETEC, pendant les trois premiers mois qui ont suivi l'administration de 2 ou de 3 doses. Il est intéressant de noter que la protection obtenue était semblable pour les diarrhées dues à des souches d'*Escherichia coli* produisant uniquement de l'entérotoxine LT et pour celles produisant *in vitro* à la fois LT et ST (toxine thermostable). Cela laisse donc supposer qu'*in vivo*, chez des patients infectés avec des souches d'ETEC LT-ST, c'est LT qui joue le rôle le plus important dans le pouvoir pathogène.

### Vaccin oral atténué.

Le deuxième vaccin est un vaccin vivant conçu dans les laboratoires du Dr M. Levine à Baltimore (Etats-Unis) et produit par la société SSVI (Swiss Serum and Vaccine Institute) de Berne (Suisse) sous l'appellation Orochol®. Il est donné par voie buccale en une seule dose. Son efficacité apparaît 7 jours après l'administration de la dose unique vaccinale. Préparé à partir d'une souche dérivée de la souche pathogène classique Inaba 569B, ne produisant pas de toxine Shiga-like, il a été donné à des volontaires à la dose de 10<sup>8</sup> bactéries, et a entraîné de bonnes réponses en anticorps vibriocides et antitoxine (6-8). Afin de pouvoir suivre son éventuelle dissémination dans l'environnement, il a été inséré dans son chromosome, des gènes codant pour la résistance de la souche au mercure, propriété qui n'est habituellement pas rencontrée chez les souches de *Vibrio*. Ainsi, une culture sur un milieu contenant du mercure (sous forme de sel HgCl<sub>2</sub>) permettra d'identifier la souche vaccinale puisqu'elle sera capable de pousser alors que la souche sauvage ne le sera pas. Une dose unique a entraîné une protection significative chez des volontaires qui avaient reçu une dose d'épreuve de bactéries pathogènes de biotype classique (95 % de protection) ou El Tor (65 % de protection) de sérotypes Inaba ou Ogawa.

Avant de l'étudier à grande échelle dans les pays en développement, il a été procédé à une étude du pouvoir vibriocide chez des volontaires asiatiques (9). Une différence significative avait été trouvée dans le taux de séroconversion de ces volontaires et ceux obtenus chez des volontaires américains. Aussi a-t-il été décidé de reprendre cette étude en augmentant d'un log la concentration du vaccin en bactéries. Une autre étude a donc été conduite chez des enfants indonésiens âgés de 5 à 9 ans (9, 10). Aucune réaction secondaire importante n'a été observée. Des doses de 10<sup>8</sup> n'entraînaient que 5 à 16 % de séroconversion, tandis que des doses de 10<sup>9</sup> et 10<sup>11</sup> produisaient respectivement 75 % et 81 % de séroconversion. C'est la raison pour laquelle une formulation à 10<sup>9</sup> a été produite pour les ressortissants des pays en développement. Il est recommandé de ne pas prendre le vaccin Orochol au cours d'infections intestinales ou au cours de traitement antibiotique (laisser 7 jours d'intervalle après le traitement). De même qu'une éventuelle prophylaxie antipaludique ne devra commencer qu'une semaine après la prise d'Orochol (10). Ce vaccin a obtenu sa licence d'utilisation en Suisse, en Finlande, en Argentine, au Pérou, aux Philippines, au Canada (MutacolR), et il est en attente de réponse des Etats Unis et d'autres pays d'Europe.

Une étude clinique de phase III a été conduite en Indonésie, avec un suivi de quatre ans, pour déterminer l'efficacité d'une dose unique de ce vaccin oral. Dans un contexte de faible incidence de choléra pendant plus d'un an, le taux de protection obtenu a été très faible. D'autres études de protection sont nécessaires avant de se prononcer sur l'efficacité réelle de ce vaccin. En résumé, à cause de son efficacité démontrée chez des volontaires nord-américains, ce vaccin est considéré comme utile chez les voyageurs, mais ne peut être recommandé aujourd'hui pour une utilisation en santé publique.

---

## LES FUTURS VACCINS

---

### Vaccin oral inactivé produit au Viêt-Nam.

Un transfert de technologie du vaccin inactivé Suédois contre le sérotype O1, a été effectué entre la Suède et le Viêt-Nam il y a quelques années. Sur les recommandations de l'OMS, la composition de ce vaccin a été légèrement modifiée. Il contient en effet 50 % de biotype El Tor, au lieu de 25 %, ainsi qu'une concentration accrue en MSHA (*Mannose Sensitive HaemAgglutinin*). Il est administré en deux doses à une semaine d'intervalle sous un volume de 1,5 ml car il ne renferme pas de sous-unité B qui nécessite l'absorption de tampon entraînant ainsi un volume beaucoup plus important pour le vaccin suédois (120 ml *versus* 1,5 ml). Ce tampon est destiné à diminuer les effets de l'acidité gastrique sur la structure de la sous-unité B. Ce faible volume rend ce vaccin très attractif pour les vaccinations de masse. Deux personnes peuvent ainsi vacciner 800 à 900 personnes par jour. Un essai conduit entre 1992-1993 au Viêt-Nam a permis de montrer une efficacité protectrice de 66 % après 8 mois de suivi, dans toutes les tranches d'âge (11). Un nouveau vaccin bivalent O1 + O139, produit à l'Institut Pasteur de Nha Trang est actuellement en évaluation de phase III chez 300 000 personnes. Les premiers résultats d'immunogénicité sont encourageants (12). Ces deux vaccins (monovalent O1 et bivalent O1 + O139) ne sont utilisés qu'au Viêt-Nam et n'ont pas de licence d'utilisation à l'extérieur du pays. Un accord vient d'être signé avec la firme Bioforma en Indonésie pour la production de ces vaccins sous GMP (*Good Manufacturer Practices*), ce qui devrait permettre de les utiliser à l'extérieur du Viêt-Nam.

### Vaccin oral atténué.

- Vaccins contre le sérotype O1

- \* Peru 15

Le biotype El Tor sévissant actuellement en Amérique du sud, il était logique de vouloir développer un vaccin contre le sérotype O1, à partir de souches El Tor ayant fait la preuve de leur pouvoir pathogène en Amérique latine ou dans d'autres régions. C'est ce qui a été fait par Mekalanos (13,14) qui a choisi 3 souches provenant du Pérou (Inaba), du Bangladesh (Ogawa), et de Bahrain (Ogawa).

Les gènes codant pour des toxines (ctx A, ace, zot) ont subi une délétion, donnant naissance aux 3 souches dénommées Peru 2, Bang 2, et Bah 2. Puis la série n°3 (Peru 3, etc.) fit son apparition avec la délétion du gène recA. La délétion du gène recA et l'insertion de la sous-unité B de la toxine cholérique, donna naissance à la série 4 (Pérou 4, etc.). Les souches «3» ont un promoteur de choc thermique pour le gène ctxB et les «4» ont un promoteur ctx pour ctxB. La série Pérou 5, etc. est dérivée des mutants «2» par insertion du gène ctxB à l'intérieur du gène de structure LacZ.

Peru 5, Bang 5, et Bah 5 ont été données à 3 volontaires pour évaluer leur pouvoir de colonisation et leur pouvoir immunogène à une dose de  $2 \times 10^6$  bactéries. Sur 3 volontaires, 2 ont montré une bonne colonisation et le troisième a eu des diarrhées. Si l'on augmente la dose à  $10^8$ , 6 volontaires sur 6 montrent une bonne colonisation et l'un d'entre eux a des diarrhées. Une étude d'efficacité avec dose d'épreuve (El Tor), menée un mois plus tard, montra que les 6 vaccinés n'ont présenté aucune diarrhée alors que 6 volontaires non vaccinés en ont développé. Ceci démontre qu'une souche El Tor privée de ses facteurs de toxicité est capable d'entraîner une protection contre une dose d'épreuve à l'aide du biotype El Tor.

A cause des effets secondaires produits par ces candidats vaccins, J. Mekalanos a préparé des souches ayant un potentiel de colonisation plus faible (souches filamenteuses, et de mobilité déficiente), baptisées Peru 14, qui ont entraîné une bonne réponse immunitaire et ont été bien tolérées administrées à des volontaires en une dose. Dans une étude d'efficacité réalisée sur un petit nombre de volontaires, une dose d'épreuve de El Tor Inaba a été administrée 4 mois après la vaccination : une protection de 80 % a été observée. Une autre souche avec une mobilité encore plus faible, Peru 15, a été également évaluée chez des volontaires et a entraîné une protection de 84 % chez des volontaires ayant reçu une dose d'épreuve de la souche El Tor pathogène. Il est intéressant de noter que la déficience en mobilité de la souche Peru 15 ne semble pas entraîner de diminution de sa capacité de colonisation de l'intestin, suggérant ainsi que la perte de mobilité atténue le pouvoir réactogène par un mécanisme autre que celui qui réduit la colonisation. Ce vaccin sera évalué prochainement au Bangladesh dans le cadre d'une collaboration entre l'OMS et l'Institut International des Vaccins (IVI) à Séoul.

• Vaccins contre le séro-groupe O139

\* CVD112

Avant de développer le CVD112, le groupe de M. Levine au Maryland a fait plusieurs observations importantes sur le *Vibrio cholerae* O139 (souche AI1837) chez des adultes volontaires nord-américains. Le groupe a montré que la souche d'épreuve AI1837 était capable d'entraîner des diarrhées à une concentration de  $10^6$ , que les réponses en IgA des ASC étaient principalement dirigées contre la capsule de AI1837 plutôt que vers son LPS, que les réponses en anticorps vibriocides étaient faibles et qu'une dose d'épreuve initiale conférait une protection de 83 % contre une nouvelle

dose d'épreuve homologe. L'importance de la capsule est soulignée par le fait que le sérum normal tue *Vibrio cholerae* O1, tandis que *Vibrio cholerae* n'est pas détruit dans ces conditions.

CVD112 a été construit par délétion mutation de AI1837 en suivant une approche identique à celle prise pour le développement des vaccins anti-cholériques O1. Des délétions ont été pratiquées dans la cassette de virulence et les gènes ctxB et celui codant pour la résistance au Hg, ont été insérés au niveau du locus de l'hémolyse. CVD112 a été évalué chez des volontaires nord-américains, chez lesquels il a fait preuve d'une bonne innocuité et a entraîné une protection de 83 % contre une dose d'épreuve de la souche pathogène.

\* Bangale 15

Le groupe de Mekalanos a construit plusieurs vaccins atténués de *Vibrio cholerae* O139 par délétion multiple des copies des gènes codant pour la toxine cholérique à partir de deux souches de *Vibrio cholerae*, O139: MO10 et AI4456, isolées respectivement à Madras et à Dacca.

\* Vaccin produit au Viêt-Nam

Un vaccin bivalent produit au Vietnam est actuellement en cours d'évaluation (voir chapitre précédent)

**Souches atténuées de *Salmonella typhi* exprimant des antigènes de *Vibrio cholerae*.**

Les chercheurs australiens ont été parmi les premiers à introduire dans des souches de Ty21a (*Salmonella typhi* atténuée) des gènes codant pour la production d'antigènes O d'Inaba de souche de *Vibrio cholerae* biotype classique. L'intérêt était en effet grand de pouvoir utiliser une souche porteuse qui avait déjà fait la preuve de son innocuité. La souche Ty21a renfermant un plasmide stable codant pour des antigènes O d'Inaba, a été donnée à des volontaires à la dose de  $10^{11}$  bactéries vivantes avec un tampon, en deux doses espacées d'un mois. Aucune réaction secondaire importante n'a été observée. Le vaccin entraîne une réponse significative en anticorps dirigés contre le LPS d'Inaba. En revanche, la réponse en anticorps vibriocides est restée modeste. Ce concept est également utilisé pour d'autres antigènes comme ceux des *Shigella*, de l'hépatite ou de *Plasmodium*.

• Vaccin injectable

Une nouvelle approche a été prise par J. Robbins du NIH (Bethesda) et J.M. Fournier de l'Institut Pasteur de Paris. Les nouveaux candidats vaccins injectables sont préparés à partir d'antigène O du LPS de *Vibrio cholerae* O1 ou O139, couplé à une protéine porteuse qui est soit l'exoprotéine A de *Pseudomonas aeruginosa* (Robbins) soit l'anat oxine tétanique (15). Ces candidats vaccins injectés à des souris ont fait preuve d'un bon pouvoir immunogène. Leur efficacité chez l'homme reste à démontrer. Le principe est basé sur l'apparition d'IgG d'origine sérique au niveau de la lamina propria puis de la muqueuse intestinale par un phénomène de transudation.

---

### CONCLUSION

---

Le choléra reste un problème de santé publique important pour certains pays en développement où il sévit à l'état endémique. D'importants progrès ont été réalisés dans le développement de nouveaux vaccins ayant fait preuve d'innocuité et d'une efficacité satisfaisante. L'utilisation des vaccins actuellement disponibles ne fait pas encore l'unanimité et reste à définir. D'autres candidats vaccins sont à l'étude et pourront être utilisés dans le cadre d'un polyvaccin contre les maladies diarrhéiques. Il existe en effet la même approche injectable basée sur l'utilisation de conjugués sucrés pour les shigelloses, le choléra et la fièvre typhoïde.

---

### REFERENCES

---

- 1 - RAMAMURTHY T., GARG S., SHARMA R. et Coll. - Emergence of novel strain of *Vibrio cholerae* with epidemic potential in southern and eastern India. *Lancet* 1993; **341** : 703-704.
- 2 - BERCHE P., IVANOFF B. - Vers la huitième pandémie de choléra. *Presse Med.* 1994; **23** : 872-873.
- 3 - IVANOFF B., CLEMENS J. - Caractéristiques épidémiologiques, cliniques et microbiologiques de la nouvelle souche de *Vibrio cholerae* O139. *Med. Trop.* 1994; **54** : 75-77.
- 4 - BLACK R.E., LEVINE B., CLEMENS M.L. et Coll. - Protective efficacy in human of killed whole vibrio-oral cholera vaccine with and without the B subunit of cholera toxin. *Infect. Immun.* 1987; **55** : 1116-1120.
- 5 - SANCHEZ J.L., VA SQUEZ B., BEGUE R.E. et Coll. - Protective efficacy of oral whole-cell/recombinant-B-subunit cholera vaccine in Peruvian military recruits. *Lancet* 1994; **344** : 1273-1275.
- 6 - LEVINE MM., KAPER JB. HERRINGTON D. et Coll. - Safety immunogenicity and efficacy of recombinant live oral cholera vaccine CVD103 and CVD103-HgR. *Lancet* 1988; **2** : 467-470.
- 7 - KOTLOFF K.I., WASSERMAN S.S., O'DONNELL S. et Coll. - Safety and immunogenicity in North Americans of a single dose of live Oral cholera vaccine CVD103HgR: Results of a randomized, placebo-controlled, double-blind crossover trial. *Infect. Immun.* 1992; **60** : 4430-4432.
- 8 - TACKET C.O. LOSONSKY G. et Coll. - Onset and duration of protective immunity in challenged volunteers after vaccination with live oral cholera vaccine CVD103HgR. *J. Infect. Dis.* 1992; **166** : 837-841.
- 9 - AREHAWARATANA P.S., SINGHARAJ P., TAYLOR N. et Coll. - Safety and Immunogenicity of Different Immunization Regimens of CVD 103-HgR Live Oral Vaccine in Soldiers and Civilians in Thailand. *J. Infect. Dis.* 1992; **164** : 1042-1048.
- 10 - SIMANJUTAK S.C. et Coll. - Safety and Immunogenicity of single dose live oral cholera vaccine CVD103HgR in 5-9 years old Indonesian children. *Lancet* 1992; **340** : 689-694.
- 11 - TRACH, D.D., CLEMENS J. D., KE N.T., et Coll. - Field trial of a locally produced, killed, oral cholera vaccine in Viet Nam. *Lancet* 1997; **349** : 231-235.
- 12 - TRACH D.D., CAM P.D., KE NT et Coll. - Investigations of the safety and immunogenicity of a new killed oral cholera vaccine developed in Vietnam. *Bull. World Health Organ.* 2001 (sous presse).
- 13 - WALDOR M. K., WOODS A., PEARSON DN. et Coll. - Molecular analysis of novel *Vibrio cholerae* strains and development of live vaccines prototypes. *J. Infect. Dis.* 1994; **170** : 278-283.
- 14 - WALDOR MW, MEKALANOS J.J. - ToxR regulates virulence gene expression in non-O1 strains of *Vibrio cholerae* that cause epidemic cholera. *Infect. Immun.* 1994; **62** : 72-78.
- 15 - BOUTONNIER A., VILLENEUVE S., NATO F. et Coll. - Preparation, immunogenicity and protective efficacy in a murine model, of conjugate vaccine composed of the polysaccharide moiety of the lipopolysaccharide of *Vibrio cholerae* O139 bound to tetanus toxoid. *Infect. Immun.* 2001; **69** : 3488-3493.