

Diplôme Universitaire

Développement d'un candidat vaccin contre la shigellose

~

Souche vivante atténuée de *Shigella dysenteriae* type 1

$\Delta icsA \Delta ent \Delta fep \Delta stxA:HgR$

Candidat Vaccin SC599

~

Vers la preuve du concept

Mémoire présenté le 21 octobre 2009 par

Christine SADORGE

Née le 2 mars 1960

Jury

Président : Pr D MALVY

Membres : Dr K EZZEDINE
Pr JL KOECK
Pr MIGLIANI
Pr SALIOU
Pr TEYSSOU

TABLE DES MATIERES

RESUME	4
SUMMARY	5
I. INTRODUCTION.....	6
II. CONTEXTE MEDICAL ET EPIDEMIOLOGIQUE	7
A. LA BACTERIE	7
B. LA MALADIE	7
C. LA PATHOGENICITE.....	8
D. L'EPIDEMIOLOGIE.....	9
E. REPONSE IMMUNITAIRE	10
1. <i>Immunité conférée par une infection naturelle</i>	10
2. <i>Identification de la réponse immune protectrice</i>	11
III. LES CANDIDATS VACCINS	12
A. CANDIDATS VACCINS <i>SHIGELLA</i> DE VIRULENCE ATTENUÉE.....	12
1. <i>Candidats vaccins de première génération</i>	12
2. <i>Candidats vaccins de seconde génération</i>	13
B. LES CANDIDATS VACCINS FONDES SUR L'EMPLOI DU LIPOPOLYSACCHARIDE BACTERIEN (LPS).....	14
1. <i>Candidats vaccins type glycoconjugués</i>	14
2. <i>Autres approches</i>	15
IV. LE VACCIN CONTRE <i>SHIGELLA DYSENTERIAE</i> TYPE 1 – SC599	15
A. METHODOLOGIE	15
1. <i>Organisation des essais</i>	15
2. <i>Plans expérimentaux</i>	16
3. <i>Produits administrés</i>	16
4. <i>Recrutement et justification du nombre de sujets</i>	17
5. <i>Evaluation de la tolérance</i>	18
6. <i>Evaluation de la réponse immunitaire</i>	19
7. <i>Excrétion de la souche vaccinale</i>	19
8. <i>Vaccinémie</i>	19
B. RESULTATS.....	20
1. <i>Tolérance</i>	20
2. <i>Excrétion</i>	23
3. <i>Réponse immunitaire</i>	24
C. CONCLUSIONS ET DISCUSSION	29
V. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	32

LISTE DES ACRONYMES

ASC	Antibody Secreting Cell
CFU	Colony Forming Unit
CRP	C Reactive Protein
EI	Événement Indésirable
EIG	Serious Adverse Event
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ELISPOT	Enzyme-Linked ImmunoSPOT
LPS	Lipopolyssacharide
LREC	Local Research Ethic Committee
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
<i>Sd1</i>	<i>S. dysenteriae</i> de sérotype 1
WRAIR	Walter Reed Army Institute of Research

Résumé

Shigella est responsable d'infections entériques à travers le monde entier, mais le fardeau de la shigellose est plus important dans les pays pauvres où la maladie est responsable de 165 millions d'épisodes diarrhéique et de plus d'un million de morts par an, principalement chez les enfants de moins de 5 ans. Le développement d'un vaccin contre la shigellose est un défi majeur pour les scientifiques. Depuis les années soixante, plusieurs candidats vaccins ont été testés chez l'homme mais aucun d'entre eux n'a pu recevoir une autorisation de mise sur le marché. Diverses approches ont été développées. Un vaccin multivalent permettant une protection contre les différents sérotypes de *Shigella* serait le plus approprié. Néanmoins *Shigella dysenteriae* type 1, en raison de sa particularité à provoquer des flambées épidémiques, pourrait être développé comme un vaccin monovalent.

La souche SC599, *Shigella dysenteriae* 1 Δ icsA Δ ent Δ fep Δ stxA:HgR, est un candidat vaccin atténuée qui a été obtenue par la délétion : (1) du gène *icsA*, (2) des gènes « entérocholine » *fep* et *ent*, (3) du gène codant pour la sous-unité A de la toxine de Shiga, et par l'insertion de la résistance au mercure. Deux essais cliniques ont été effectués afin d'apporter la preuve de concept chez des adultes européens en bonne santé. Le premier essai est une phase I, prospective, sans insu avec une escalade de dose (de 10^2 à 10^8 CFU). Vingt huit (28) sujets ont reçu successivement une dose unique de la souche lors d'une hospitalisation. SC599 a été bien tolérée et la dose maximale tolérée semblait être supérieure à 10^8 CFU. Le vaccin a été peu réactogène, une légère élévation de la CRP suggérait une inflammation intestinale infra-clinique. Une réponse immunitaire a été observée à partir de la dose de 10^5 CFU. Cette réponse évaluée par le taux de lymphocytes B sécrétant des anticorps contre le LPS de *Sd1* ne semblait pas dose-dépendante. La phase II a inclus 111 sujets dans une étude prospective, comparative, randomisée en double aveugle contre placebo en groupes parallèles, multicentrique et ambulatoire. L'immunogénicité d'une dose unique de deux dosages de SC599 (10^5 et 10^7 CFU) comparée au placebo a été évaluée et les données de sécurité ont été complétées (tolérance et excrétion de la souche vaccinale). Le pourcentage de sujets répondeurs contre du LPS de *Sd1* mesurés par la méthode de l'ELISPOT (nombre de lymphocytes B sécrétant des IgA $\geq 20/10^6$ PBMC) et par la méthode de l'ELISA quantitative (multiplication par 4 tu titre en anticorps avant vaccination), pour les deux groupes 10^5 et 10^7 CFU a été statistiquement supérieur au groupe placebo, à savoir 34,2% et 44,4% respectivement par la méthode ELISPOT ($p < 0,0001$) et 31,6% et 33,3% respectivement par la méthode ELISA ($p < 0,001$). Aucune différence n'a été observée entre les deux groupes de vaccins. L'excrétion de SC599 a été faible (9 et 11 volontaires dans respectivement les groupes 10^5 et 10^7 CFU). Elle a commencé dans les deux premières semaines après la vaccination, sauf pour un volontaire qui a excrété au 21^{ème} et 28^{ème} jour. La durée moyenne d'excrétion a été inférieure à 5 jours et a commencé en moyenne plus tôt dans le groupe 10^7 CFU (3^{ème} jour) que dans le groupe 10^5 CFU (8^{ème} jour). SC599 a été bien tolérée et les effets indésirables rapportés ont été principalement des troubles digestifs. Ces résultats indiquent que la vaccination orale à dose unique par SC599 suscite une importante circulation de lymphocytes B sécrétant des IgA contre le LPS de *Sd1* et une réponse sérique en anticorps qui pourrait conférer une protection contre les symptômes les plus graves de la shigellose chez les répondeurs au vaccin. Néanmoins des études cliniques complémentaires évaluant un schéma 2 doses permettraient peut-être d'améliorer le nombre de répondeurs. Le taux de lymphocytes B sécrétant des anticorps n'étant pas un corrélât de protection absolu, une étude en zone d'endémie ou de challenge (si éthiquement envisageable) permettraient d'évaluer les taux de protection obtenus dans une population vaccinée.

Summary

Shigella is responsible for enteric infections worldwide, but the burden of shigellosis is greatest in resource-poor countries where the disease may cause as many as 165 million episodes of diarrhoea and over a million deaths annually mainly in children under 5 years of age. The development of a vaccine against *Shigella* is a major challenge for scientists. Since the sixties, various vaccine candidates were tested in humans but none of them were able to receive a marketing authorisation. Various approaches were developed. A multivalent vaccine allowing a protection against the different serotypes of *Shigella* would be the most suitable. Nevertheless *Shigella dysenteriae* type 1, due to its ability to cause major outbreaks, could stand as a monovalent vaccine.

SC599 strain, the *Shigella dysenteriae* 1 Δ *icsA* Δ *ent* Δ *fep* Δ *stxA*:HgR, is a live attenuated vaccine candidate which was obtained by deletion of: (1) *icsA* gene, (2) *fep* and *ent* enterocholin genes, (3) gene encoding the A subunit of Shiga toxin, and by insertion of mercury resistance. Two clinical trials were performed to establish the proof of concept in European healthy adults. The first trial was an unblinded, escalating dosage (from 10^2 to 10^8 CFU) prospective study. Twenty-eight (28) subjects received a unique dose of SC599 during an hospitalisation. SC599 was well tolerated and the maximum tolerated dosage appeared to be greater than 10^8 CFU. The vaccine was only mildly reactogenic. Mild elevation of CRP suggested a sub-clinical gut inflammation. An immune response was observed from the dosage 10^5 CFU. This answer induced a dosage-independent *Sd1* LPS-specific ASC response in all subjects. The phase II enrolled 111 subjects in a multicentre, outpatient, prospective, comparative, parallel-group, randomised, double blind, placebo-controlled trial. The immunogenicity of a single dose of two SC599 dosages (10^5 and 10^7 CFU) versus placebo was evaluated and the safety data was completed (tolerance and vaccine strain shedding). The proportion of responders in LPS-specific IgA measured by ELISPOT method (number of ASC $\geq 20/10^6$ PBMC) and by quantitative ELISA method (4 fold rise-increase), in both 10^5 and 10^7 CFU groups was statistically superior to the placebo group, i.e. 34.2% and 44.4% respectively with ELISPOT ($p < 0.0001$) and 31.6% and 33.3% respectively with ELISA ($p < 0.001$). No difference was observed between the two vaccine groups. The SC599 shedding was low (9 and 11 volunteers in 10^5 and 10^7 CFU groups respectively) and started during the first two weeks following vaccination, except in one volunteer who excreted at day 21 and day 28 post-vaccination. The mean duration of the excretion was less than 5 days starting on the average earlier the 10^7 CFU group (third day) than in the 10^5 CFU group (eighth day). SC599 vaccine was well tolerated, and the reported adverse events were mainly digestive disorders. These results indicate that a single oral immunization of SC599 vaccine elicits a significant circulating IgA ASC and serum antibody response that may confer protection against the most severe symptoms of shigellosis in responders to the vaccine. Nevertheless, further clinical trials with a two-dose schedule would allow maybe improving the number of responders. In addition, as the number of ASC is not an absolute correlate of protection, clinical trials in endemic area or a challenge study (if ethically feasible) would allow evaluating the protection among vaccinated population.

I. Introduction

Les infections à *Shigella* sont un problème majeur de santé publique au sein des populations les plus défavorisées de la planète et particulièrement parmi la population pédiatrique. Selon Kotloff *et Col.*, *Shigella* serait responsable de 165 millions par an d'épisodes diarrhéiques dans le monde dont 99% des cas dans les pays en voie de développement et d'environ 1 million de morts. Soixante neuf pourcent (69) de tous ces épisodes et 61% des décès attribuables à la bactérie surviendraient chez les enfants de moins de 5 ans (Kotloff, 1999). La forme endémique contribue massivement à l'importance de la maladie, elle est causée essentiellement par le sérotype *S. flexneri* dans les pays en développement et *S. Sonnei* dans les pays industrialisés (Kotloff, 1999). En revanche, *S. dysenteriae* (majoritairement *S. dysenteriae* type 1) est un sérotype responsable de la majorité des formes épidémiques et représenterait 6% des épisodes (Kotloff, 1999). Ce sérotype pose un problème majeur notamment pour les populations déplacées en situation de crises humanitaires (Kerneis, 2009).

Malgré l'introduction de nouveaux antibiotiques telles que les quinolones, les résistances se développent rapidement. Récemment, des souches de *Sd1* résistantes à la ciprofloxacine ont été isolées, réduisant encore les possibilités de traitements (Naheed, 2004). Les alternatives pour un traitement oral peu coûteux sont extrêmement limitées dans cette situation, créant un besoin urgent de méthodes efficaces de prévention de l'infection.

Depuis de nombreuses années *Shigella* a fait l'objet de nombreuses tentatives de développement d'un vaccin. Cette croisade a démarré dans les années 60. Différentes approches ont été développées. Certains candidats vaccins ont été menés en essai de phase III. Les 2 principales approches étudiées en essais cliniques sont : (1) les candidats vaccins vivants atténués administrés par la voie orale et (2) les candidats vaccins administrés par voie parentérale basés sur le polysaccharide-O de *Shigella* conjugué à une protéine porteuse.

Le majeur problème du développement vaccinal est la diversité. Une réponse immunitaire spécifique de sérotype ou de séro groupe est très souvent la règle. Ce qui signifie que le vaccin doit permettre de développer une réponse contre un panel d'antigènes très important. Des approches utilisant la cross-protection entre les différents sérotypes restent limitées (Von Seidlein, 2006).

Aujourd'hui, l'idéale serait de développer un vaccin multivalent incluant *S. dysenteriae* type 1 (*Sd1*), *S. sonnei* et les différents sérotypes de *S. flexneri*. Néanmoins la mise au point d'un tel vaccin reste difficilement envisageable pour des questions relatives à la faisabilité d'une telle formulation qui, par ailleurs, s'avérerait extrêmement coûteuse. Une approche, incluant *Sd1*, *S. sonnei*, *S. flexneri* 2a, 3a et 6, semblerait plus réaliste (Levine, 2007). Néanmoins, étant donné la particularité épidémiologique de *Sd1*, responsable de flambée épidémique, un vaccin monovalent aurait un intérêt pour cette souche.

Ce mémoire rapporte les 2 premières études réalisées pour établir la preuve du concept avec un candidat vaccin vivant atténué génétiquement modifié *Shigella dysenteriae* 1 Δ icsA Δ ent Δ fep Δ stxA:HgR, le SC599. Au préalable, une brève revue des différents vaccins déjà développés permettra de situer le candidat vaccin parmi les différentes approches.

II. Contexte médical et épidémiologique

A. La bactérie

Shigella appartient à la famille des entérobactéries gram-négatives. Il en existe 4 espèces (ou sérogroupes) : *S. dysenteriae* (A), *S. flexneri* (B), *S. boydii* (C) et *S. sonnei* (D). En dehors de *S. sonnei*, les trois premières espèces incluent un grand nombre de sérotypes (Levine, 2007).

Espèces	Sérogroupe	Sérotypes
<i>S. dysenteriae</i>	A	1 – 15
<i>S. flexneri</i>	B	14*
<i>S. boydii</i>	C	1 - 20
<i>S. sonnei</i>	D	1

*14 sérotypes et sous-types

B. La maladie

L'espèce humaine et quelques primates sont le réservoir de *Shigella*. La maladie se transmet par contact direct entre personnes infectées, l'ingestion d'eau ou d'aliments contaminés. Toutes les espèces peuvent être responsables de diarrhées aiguës sanglantes. *S. sonnei* et *S. boydii* sont responsables de formes habituellement modérées à type de diarrhées aqueuses. La shigellose ou dysenterie bacillaire, dans sa forme la plus grave, associe une rectocolite aiguë fébrile accompagnée d'une diarrhée muco-purulente et sanglante, de vomissements, de crampes et de ténésme, pouvant conduire à une déshydratation. Les premiers symptômes peuvent apparaître dans les 12 à 48 heures après l'ingestion des bactéries. Chez les sujets en bonne santé la pathologie, habituellement limitée, dure une semaine. Les symptômes les plus sévères surviennent les 2 premiers jours.

Shigella peut être associée à des arthrites notamment si les patients présentent un type tissulaire HLA-B27. Il y a en effet une association fréquente entre arthrite et pathologie inflammatoire du tractus digestif. Les 4 pathogènes les plus fréquemment associés avec une arthrite réactionnelle sont les *Yersinia*, *Salmonella*, *Campylobacter* et *Shigella* (Hill Gaston, 2003). Chez les enfants, *S. dysenteriae* de sérotype 1 (*Sd1*) peut être associée à un syndrome hémolytique et urémique ajoutant à son caractère de gravité (Taneja, 2005).

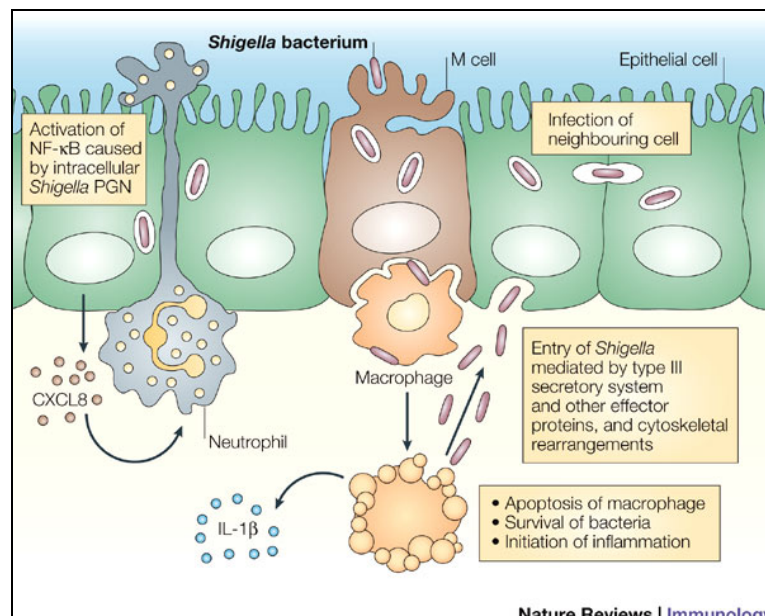
C. La pathogénicité

Environ 10 à 100 bactéries ingérées suffisent pour provoquer l'infection. Après une inoculation orale, les shigelles passent dans l'iléon terminal et le côlon où elles envahissent la muqueuse intestinale en proliférant à l'intérieur des entérocytes, entraînant la mort cellulaire et la destruction de l'épithélium intestinal. Ceci conduit à la formation de micro-ulcères et provoque une réaction inflammatoire, une hypersécrétion de fluides intestinaux et entraîne l'apparition de sang dans les selles. Les selles diarrhéiques contiennent entre 10^6 et 10^8 de shigelles par gramme.

L'invasion des cellules de la muqueuse intestinale est capitale dans la pathogénie de la shigellose.

Un nombre important de facteurs régulés par des gènes ont été identifiés. La plupart d'entre eux sont localisés sur le plasmide de virulence. Ce plasmide de taille importante, 220kb, contient l'essentiel des gènes nécessaires à l'interaction de *Shigella* avec les cellules de l'épithélium intestinal. Parmi ces gènes, certains permettent de réguler l'entrée de *Shigella* dans les cellules épithéliales, l'apoptose des macrophages et l'activation des polynucléaires neutrophiles (Jennison, 2004 ; Sansonetti, 2004). La figure 1 montre les étapes de translocation de *Shigella* dans l'épithélium intestinal dans l'épithélium intestinal et le développement du processus infectieux conduisant à la dysenterie bacillaire (Sansonetti, 2004).

Figure 1 : Etapes de translocation de *Shigella* spp. dans l'épithélium intestinal et développement du processus infectieux conduisant à la dysenterie bacillaire (Sansonetti, 2004)



D. L'épidémiologie

Le nombre annuel d'épisodes diarrhéiques liés à cette bactérie a été estimé à environ 165 millions dans le monde dont 99% des cas dans les pays en voie de développement. *Shigella* serait responsable d'environ 1 million de morts. Soixante neuf pourcent (69%) de tous les épisodes et 61% des décès attribuables à la bactérie surviendraient chez les enfants de moins de 5 ans (Kotloff, 1999).

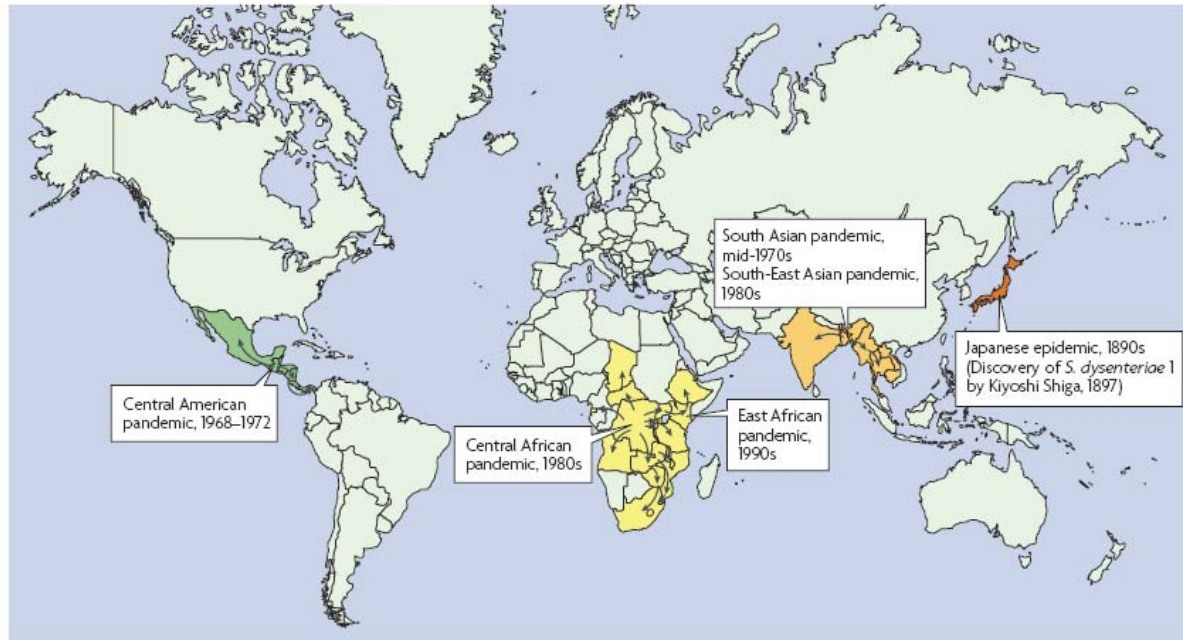
Une étude récente (Von Seidlein, 2006) réalisée entre 2000 et 2004 sur une population de 600 000 personnes résidant en Asie (Bangladesh, Chine, Pakistan, Indonésie, Vietnam, et Thaïlande) a estimé l'incidence annuelle des épisodes de shigellose traitée à 2,1 pour 1 000 habitants toutes tranches d'âge confondues montrant une incidence 100 fois plus élevée que dans les pays industrialisés comme le suggèrent les données de 1999 aux Etats-Unis et de 1996-2000 aux Pays-Bas, où l'incidence annuelle était estimée respectivement de 3,7 et 3,2 pour 100 000 (Gupta, 2004). Dans l'étude de Von Seidlein *et Col.*, l'incidence était plus élevée chez les enfants de moins de 5 ans avec (13.2/1 000) et proche de celle trouvée dans l'étude de Prado *et Col.* réalisée au Chili chez des enfants de 12-47 mois (9,0-12,6/1 000) (Prado, 1999). Selon Kotloff *et Col.*, dans les pays en développement, la distribution des différents sérotypes responsables des épisodes était : *S. flexneri* (60%), *S. sonnei* (15%), *S. boydii* (6%) et *S. dysenteriae* (6% : dont 1 tiers de *Sd1*) ; et dans les pays industrialisés, elle était respectivement de 16%, 77%, 2% et 1%. Ces données montrent que *S. flexneri* prédomine dans les pays en développement, et *S. sonnei* dans les pays industrialisés. Lorsque *S. flexneri* est en cause, c'est le sérotype 2a qui est le plus fréquemment retrouvée, comme l'indique l'étude de Kotloff *et Col.* ; les autres sérotypes retrouvés dans l'ordre d'incidence sont : 1b, 3a, 4a et 6 (Kotloff, 1999). Dans l'étude asiatique de Von Seidlein *et Col.*, *S. flexneri* a été l'espèce la plus fréquemment isolée (68% des cas) sauf pour la Thaïlande où *S. sonnei* était prédominante. Dans les 5 pays où *S. flexneri* était prédominant, les huit sérotypes les plus fréquents ont été dans l'ordre d'incidence 2a, 3a, 1a, 1b, 2b, 1c, 6, x (Von Seidlein, 2006).

Parmi les infections à *Shigella*, *Sd1* présente une particularité épidémiologique, responsable d'épidémie de dysenterie de grande ampleur avec des taux d'attaque et de létalité élevés, particulièrement parmi les enfants et les populations déplacées dans des pays tropicaux. Kerneis *et Col.* ont décrit des épidémies de *Sd1* qui se sont produites entre 1993 et 1995 dans 11 camps de réfugiés au Rwanda, en Tanzanie et en République Démocratique du Congo (DRC). Entre novembre 1993 et février 1995, 181 921 cas de diarrhées sanglantes ont été reportés. Les taux d'attaque et de létalité variaient respectivement de 6.3 % à 39.1 % et de 1.5 % à 9.0 % (Kerneis, 2009).

Depuis quelques années la fréquence de souches de *Shigella* résistantes à l'ampicilline, au chloramphénicol, aux tétracyclines, au triméthoprim-sulfaméthoxazole et à l'acide nalidixique, et modérément sensibles à la ciprofloxacine, est en augmentation en Afrique et en Asie (Bennish, 1992 ; Pazhani, 2004). Récemment, des souches de *Sd1* résistantes à la ciprofloxacine ont été isolées,

réduisant encore les possibilités de traitements (Naheed, 2004). La figure 2 présente les différentes épidémies de *Sd1* depuis sa découverte par Kiyoski Shiga en 1897.

Figure 2 : Epidémies de dysenteries à *Shigella dysenteriae* 1 (Levine, 2007)



E. Réponse immunitaire

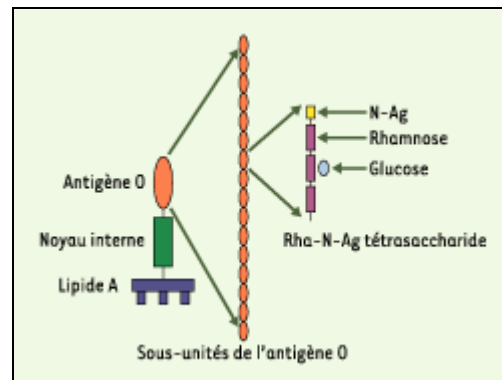
1. Immunité conférée par une infection naturelle

De nombreuses sources indiquent que l'infection naturelle par *Shigella* confère une immunité spécifique de sérotype. Dans les zones d'endémie, l'incidence de la shigellose s'élève durant les cinq premières années de vie et décline ensuite, suggérant que l'immunité se développe après des expositions répétées durant l'enfance. Des études chez de sujets séjournant dans des zones à haut risque comme les camps militaires montrent que l'incidence de la pathologie diminue avec la durée de séjour. Une étude longitudinale sur une cohorte de patients chiliens chez qui une infection primaire par *Shigella* conférait 72 % de protection efficace contre une réinfection avec le même sérotype, a permis de mettre en évidence l'existence d'une immunité naturelle. En fait, des volontaires adultes qui auraient été infectés de façon expérimentale avec *S. sonnei* ou *S. flexneri* ont été significativement protégés contre la maladie après une réinfection avec une souche homologue (Levine, 2007).

2. Identification de la réponse immune protectrice

Le lipopolysaccharide (LPS) est considéré comme l'antigène protecteur contre *Shigella* et un facteur de virulence. Le LPS comprend trois régions : une base lipidique, un noyau interne et une série de sous-unités saccharidiques, formant l'antigène O (Figure 3). Ce domaine majeur du LPS, le polysaccharide O, confère l'immunité contre les infections à *Shigella*.

Figure 3 : Structure du lipopolysaccharide (LPS) (Gilgenkrantz, 2005)



Cohen et collaborateurs ont trouvé que les soldats israéliens qui n'avaient pas d'anticorps anti-LPS étaient significativement plus susceptibles de développer la maladie durant une exposition aux souches homologues de *S. sonnei* ou *S. flexneri* durant les opérations militaires (Cohen, 1991). De façon similaire, Black et collaborateurs ont démontré que les volontaires qui avaient été vaccinés avec des vaccins bivalents comportant *Salmonella Typhi* Ty 21a *S. sonnei* mais manquant d'anticorps anti-LPS étaient 3 à 7 fois plus susceptibles de développer une shigellose après un challenge avec une souche sauvage de type *S. sonnei* comparée à des patients vaccinés (Black, 1987). Les données épidémiologiques chez l'homme (Cohen, 1988 ; Cohen, 1991 ; Rasolofo-Razanamparany, 2001), suggèrent que les anticorps anti-LPS sériques et muqueux spécifiques du sérotype infectieux sont associés à la protection contre la shigellose.

L'immunité acquise contre l'infection par *Shigella* se caractérise par la production d'anticorps sécrétoires d'isotype A (sIgA) et d'anticorps sériques d'isotype G (IgG) spécifiques de certaines protéines bactériennes et de l'antigène majeur de surface, le LPS. Par ailleurs, des études chez les volontaires ont suggéré que le nombre de lymphocytes B recirculants sécrétant une IgA spécifique du LPS de *Shigella*, sept jours après une vaccination était représentatif du niveau de protection intestinale et corrélée à l'efficacité vaccinale (Coster, 1999 ; Katz, 2004). Néanmoins, chez l'homme, les mécanismes de protection exacts des anticorps sériques restent encore mal compris.

III. Les candidats vaccins

Plusieurs candidats vaccins ont déjà été testés chez l'Homme. Certains d'entre eux ont été menés jusqu'en phase III. Les 2 principales approches étudiées en essais cliniques sont : (1) les candidats vaccins vivants atténués administrés par la voie orale et (2) les candidats vaccins administrés par voie parentérale basés sur le polysaccharide-O de *Shigella* conjugué à une protéine porteuse. Ces candidats vaccins sont tous séro-spécifiques. Des approches utilisant la cross-protection entre les différents sérotypes restent limitées (Von Seidlein, 2006).

Aujourd'hui il y a un consensus au développement d'un vaccin multivalent. L'idéale serait un vaccin incluant *Sd1*, *S. sonnei* et les différents sérotypes de *S. flexneri*. Néanmoins la mise au point d'un tel vaccin reste difficilement envisageable pour des questions relatives à la faisabilité d'une telle formulation et extrêmement coûteuse. Une approche, incluant *Sd1*, *S. sonnei*, *S. flexneri 2a, 3a et 6*, semblerait envisageable (Levine, 2007).

A. Candidats vaccins *Shigella* de virulence atténuée

1. Candidats vaccins de première génération

Dans les années 60, Mel *et Col.* à Belgrade (Serbie) ont mis au point des vaccins oraux vivants de *S. Streptomycine-dépendant* (SmD). Dans des études de terrain chez 36 000 adultes et enfants, ces candidats vaccins combinés ont montré une protection séro-spécifique. Ces vaccins présentaient cependant plusieurs problèmes majeurs : la nécessité de l'administration orale de doses multiples avec un rappel une année après pour maintenir la protection, le besoin d'un nombre important d'organismes pour établir chaque dose vaccinale (qui affectait le coût), la survenue de vomissements après la première dose vaccinale chez 1 à 5 % des patients et la réversion de la mutation SmD dans de nombreuses souches vaccinales de *S. sonnei* (Levine, 2007 ; Kweon, 2008).

Le candidat vaccin *S. flexneri 2a* Istrati T₃₂ permettait d'obtenir une protection efficace de 46 à 89 % contre la maladie clinique avec la souche *S. flexneri 2a* quand elle était administrée en 4 doses orales de 40 10¹⁰ CFU (colony forming units) à environ 65 000 adultes et enfants de 4 à 60 ans. Une protection (de 55 à 100 %) contre l'infection avec des sérotypes homologues et hétérologues de *S. flexneri* a été mise en évidence (Levine, 2007 ; Kweon, 2008).

Au-delà des souches de *S. SmD* et de la souche de *S. flexneri 2a* Istrati T₃₂ non invasive mais mal caractérisée, de nombreuses tentatives ont été faites, consistant à construire des candidats vaccins sur des bases rationnelles. Ces candidats vaccins ont montré une faible immunogénicité, une insuffisante capacité protectrice.

2. Candidats vaccins de seconde génération

a) L'approche

La construction des vaccins de seconde génération s'est appuyée sur des données précédentes et l'amélioration croissante des connaissances en génétique et en biologie moléculaire et cellulaire de la pathogénicité de *Shigella* qui ont permis une approche rationnelle de l'atténuation des souches.

Les conséquences phénotypiques des différentes mutations appliquées à des souches de *Shigella* bien caractérisées, ont été étudiées grâce à la construction par plusieurs équipes de candidats vaccins qui ont été étudiés en essais cliniques. Ces mutations concernent entre-autres les gènes : *IcsA* ou *viG* (dont la délétion diminue la motilité intracellulaire et intercellulaire de la bactérie), *ent* et *fep* (qui codent pour des protéines intervenant dans la chélation du fer), *aroD* et *aroA* (qui codent pour les enzymes des voies de synthèse des aminoacides aromatiques), *iuc* (qui code pour l'aérobactine), *guaBA* (qui code pour les enzymes impliqués dans la biosynthèse de la guanine), *set* (qui code pour l'entérotoxine 1, ShET1) et *sen* (qui code pour l'entérotoxine 2, ShET2).

Différentes équipes ont développé des souches atténuées basées sur la délétion de certains de ces gènes. L'équipe de M. Levine au CVD (Baltimore) a développé plusieurs souches dérivées de la souche sauvage de *S. flexneri* 2a 2457T (CVD1203, CVD1204, CVD1207, CVD1208, CVD1208S), l'équipe T.L. Hale au WRAIR, une souche de *S. sonnei* (WRSS1) et une souche *Sd1* (WRSd1) et l'équipe de P. Sansonetti à l'Institut Pasteur, une souche de *S. flexneri* 2a (SC602) et une souche de *Sd1* (SC599). Toutes ces souches atténuées ont fait l'objet d'essais cliniques où l'objectif était de trouver la balance entre une faible réactogénicité et une solide réponse immunologique (Levine, 2007).

b) Mutants de *S. flexneri*, *S. dysenteriae* de sérotype 1

Le groupe de P. Sansonetti a construit deux souches candidates basées sur la délétion du gène *icsA* :

(1) Une souche *S. flexneri* 2a qui a subi une délétion supplémentaire du gène *iuc*. Ce double mutant résultant $\Delta icsA \Delta iuc$, appelé SC602, ne présente pas de résistance aux antibiotiques. Le génotype final de SC602 est $\Delta icsA, \Delta iuc$. SC602 est atténuée. Des études de phase I et II menés aux Etats-Unis puis au Bangladesh ont permis de définir le seuil de tolérance, le degré d'immunogénicité et la capacité protectrice de SC602 (Coster, 1999) chez des volontaires américains en revanche les essais dans la population Bangladeshis a montré une bonne tolérance mais aucune immunogénicité (Kweon, 2008).

(2) Une souche de *Sd1* qui présente deux délétions supplémentaires à l'*icsA* : une dans les opérons *ent*, *fep* (captation du Fe^{+++}) et sur le gène *stxA*. En effet, *Sd1* tire son extrême pathogénicité de la production de la toxine dysentérique (Shiga toxine), une puissante cytotoxine vasculotrope responsable de lésions intestinales, rénales et cérébrales. Cette toxine est codée par le cistron *stxAB*, *stxA* codant pour la sous-unité catalytique A de la toxine. Le gène *stxA* a été délété et remplacé par une

cassette codant pour la résistance au mercure (Hg^R). Le génotype final de la souche, baptisée SC599, est *S. dysenteriae* type 1 Δ icsA, Δ ent, *fep*, Δ stxA : Hg^R . C'est cette souche qui fera l'objet d'une présentation des essais de phase I et II dans le chapitre IV.

B. Les Candidats vaccins fondés sur l'emploi du lipopolysaccharide bactérien (LPS)

1. Candidats vaccins type glycoconjugués

a) Les conjugués polysaccharide-protéine

Des équipes du National Institute of Child Health and Human Development (NICHD) aux Etats-Unis, ont suggéré qu'une petite quantité d'IgG sérique passe la barrière intestinale et permet ainsi de neutraliser ou inactiver un inoculum de souche sauvage de *Shigella* ingérée depuis peu. Préalablement à la mise en évidence du rôle protecteur des anticorps spécifiques de l'Ag O de *S. flexneri* sérotypes 2a et 5a, l'hypothèse que les IgG sériques anti-Ag O confèrent une protection contre les infections à *Shigella* avait été émise. Sur cette base, plusieurs candidats vaccins de type conjugué polysaccharide-protéine ont été développés. Le LPS de la souche de *Shigella* concernée est couplé à une protéine porteuse. Dans cette approche, le LPS n'est donc pas utilisé dans sa forme native. En effet, le lipide A (Figure 3) qui permet l'ancrage du LPS dans la membrane bactérienne, rend ce dernier extrêmement toxique chez l'homme. Il subit une étape de détoxification préalable conduisant à sa dégradation partielle ou totale. Ces conjugués, reposant sur l'emploi de LPS détoxifié diffèrent entre autre selon le choix de la protéine porteuse, tetanus toxoïde (TT), l'exotoxine A recombinante de *Pseudomonas aeruginosa* (rEPA), un mutant inactivé par voie génétique de l'anatoxine diphtérique (CRM9) ou un peptide recombinant de la toxine A de *Clostridium difficile* (rARU). Des conjugués *S. flexneri* 2a-rEPA et *S. sonnei*-rEPA de première génération, évalués dans un essai de phase II chez des volontaires israéliens et des enfants chez des enfants âgés de 4 à 7 ans se sont révélés sans danger et fortement immunogènes. Une flambée d'infection touchant les volontaires 71 à 155 jours après qu'ils aient été vaccinés avec le conjugué *S. sonnei*-rEPA a montré une efficacité protectrice de 74%. Des conjugués de deuxième génération évalués contre les infections à *S. flexneri* 2a et *S. sonnei* chez l'adulte et comparés aux conjugués de première génération, ont conduit à sélectionner les conjugués *S. sonnei*-CRM9 et *S. flexneri*-rEPA_{succ} pour être évalués chez les jeunes enfants de 1 à 4 ans. Ils ont montré qu'ils étaient bien tolérés et immunogéniques dans cette population (Levine 2007 ; Kweon, 2008).

b) Les conjugués oligosaccharide synthétique (OS)-protéine

Une approche plus récente a mis au point des conjugués de *Shigella*, basés sur la synthèse d'oligosaccharide purement synthétique (en remplacement du LPS détoxifié) couplé également à une protéine porteuse. Il a été montré qu'ils étaient immunogènes chez la souris et induisaient des taux

d'IgG sériques anti-LPS supérieurs à ceux induits par un conjugué polysaccharide-protéine conventionnel utilisé en référence. L'évaluation clinique des glycoconjugués correspondants impliquant une protéine porteuse compatible avec une utilisation chez l'homme a été envisagée (Phalipon, 2006).

2. Autres approches

Les candidats vaccins de type protéosome-LPS développés contre l'infection à *S. flexneri* 2a sont des vésicules multimoléculaires constituées de protéines purifiées de la membrane externe de *Neisseria meningitidis* complexées à du LPS purifié de *S. flexneri* 2a. Ces candidats vaccins sont administrés par voie intranasale. Une étude de phase I chez l'adulte a montré qu'un tel candidat vaccin était bien toléré, qu'il induisait après deux administrations une réponse humorale anti-LPS dose-dépendante (Fries, 2001).

L'administration par voie parentérale de complexes entre des particules ribosomales de *S. flexneri* ou *S. sonnei* et les Ag O des souches homologues a été étudiés dans différents modèles animaux (Levenson, 1991) induit une forte réponse immune tant systémique que muqueuse, spécifique de l'Ag O de la souche. Cependant, la quantité d'Ag O présente d'une préparation ribosomale à une autre varie, d'où une reproductibilité difficile des lots (Levenson, 1990).

IV. Le vaccin contre *Shigella dysenteriae* type 1 – SC599

Afin de faire la preuve du concept, deux études ont été réalisées : une étude de phase I d'escalade de dose (Sadorge, 2008) et une étude de phase IIa d'immunogénicité (Launay, 2009).

L'étude de phase I avait pour but de déterminer la sécurité et la tolérance de la souche vaccinale SC599, et obtenir des données préliminaires sur la capacité du vaccin à induire une réponse immunitaire. Cet essai a permis de déterminer les deux doses les mieux tolérées et les plus immunogènes qui ont été testées dans l'étude de phase II. Cet essai avait pour objectif d'évaluer l'immunogénicité de ces 2 doses et de compléter les données de tolérance. Dans les deux essais, l'élimination de la souche vaccinale dans les selles a été étudiée et la détection d'une éventuelle vaccinémie silencieuse a été recherchée.

A. Méthodologie

1. Organisation des essais

Le recrutement et le suivi des volontaires ont été réalisées au St George's Vaccine Institute (SGVI), département des maladies infectieuses de l'hôpital St. George's à Londres pour les deux essais et au

Centre d'Investigation Clinique Cochin-Pasteur de l'hôpital Cochin à Paris pour l'essai de phase II. Le suivi biologique et les analyses bactériologiques des volontaires ont été effectués par les laboratoires hospitaliers des sites investigateurs. Les analyses immunologiques (ELISPOT sur sang frais et ELISA) ont été effectuées par le SGVI (phase I et II) et par l'Unité de recherche et d'expertise Immunité Anti-Virale, Biothérapie et Vaccins de l'Institut Pasteur (phase II), cette dernière ayant assuré la coordination et la mise au point des techniques et la lecture des ELISPOT. Chaque essai avait un comité de coordination et un comité de surveillance de la sécurité des sujets.

2. Plans expérimentaux

L'étude de phase I était une étude prospective d'escalade de doses chez des sujets hospitalisés. Sept cohortes de 4 volontaires sains ont reçu séquentiellement à dose unique 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 Colony Forming Unit (CFU) de la souche vaccinale. Les sujets étaient hospitalisés 5 jours après l'administration du vaccin. Afin d'éradiquer le portage de la souche vaccinale, ils recevaient un traitement par la ciprofloxacine au quatrième jour. L'administration de la dose supérieure à 4 nouveaux volontaires ne se faisait qu'après une évaluation satisfaisante de la tolérance (par un comité de surveillance de la sécurité des sujets) au 14^{ième} de suivi de la cohorte en cours d'observation.

L'étude de phase II était une étude ambulatoire, prospective, randomisée, en double aveugle et en groupes parallèles. A l'inclusion, les volontaires recevaient une dose de placebo ou 10^5 CFU ou 10^7 CFU de la souche vaccinale, puis ils étaient suivis pendant 28 jours. Si les sujets excrétaient la souche vaccinale lors de leur dernière visite, ils recevaient de la ciprofloxacine et faisaient l'objet d'un suivi jusqu'à son élimination. La durée du suivi des sujets était de 28 jours pour les deux essais.

3. Produits administrés

L'étude de phase I constituant la première utilisation du vaccin vivant atténué de *Shigella dysenteriae* type 1 chez l'homme, les doses sélectionnées se sont basées sur la dose infectieuse d'une souche sauvage de la bactérie (soit 10 à 100 bactéries) et sur les données bibliographiques concernant des souches apparentées de *Shigella* ayant subies des modifications génétiques similaires. Dans 2 études publiées (Coster, 1999 ; Katz, 2004), les doses allant au-delà de 10^5 CFU s'avéraient fortement associés à des effets indésirables (diarrhée, dysenterie, fièvre).

Dans l'essai de phase I, des doses de 10^2 à 10^8 CFU ont été administrées aux volontaires sains en prise unique, par voie orale (3.0×10^2 CFU/ml, 2.7×10^3 CFU /ml, 2.1×10^4 CFU /ml, 5.2×10^5 CFU /ml, 6.2×10^6 CFU /ml, 3.5×10^7 CFU /ml, 3.5×10^8 CFU /ml).

Pour l'essai de phase II, les doses les plus immunogènes identifiées en phase I (10^5 et 10^7 CFU) ont été administrées aux sujets: soit $1,2 \times 10^5$ CFU/ml ou $1,9 \times 10^7$ CFU/ml ou du placebo (solution de bicarbonate PBS et Glycérol 20%).

Pour les 2 études, les sujets recevaient une solution tampon de bicarbonate de sodium afin de neutraliser l'acidité gastrique et permettre ainsi à la bactérie de passer la barrière gastrique sans être détruite.

4. Recrutement et justification du nombre de sujets

Les deux études ont été réalisées, chez des volontaires sains ayant signé un consentement éclairé, âgés de 18 à 45 ans pour la première étude et de 18 à 50 ans pour la seconde.

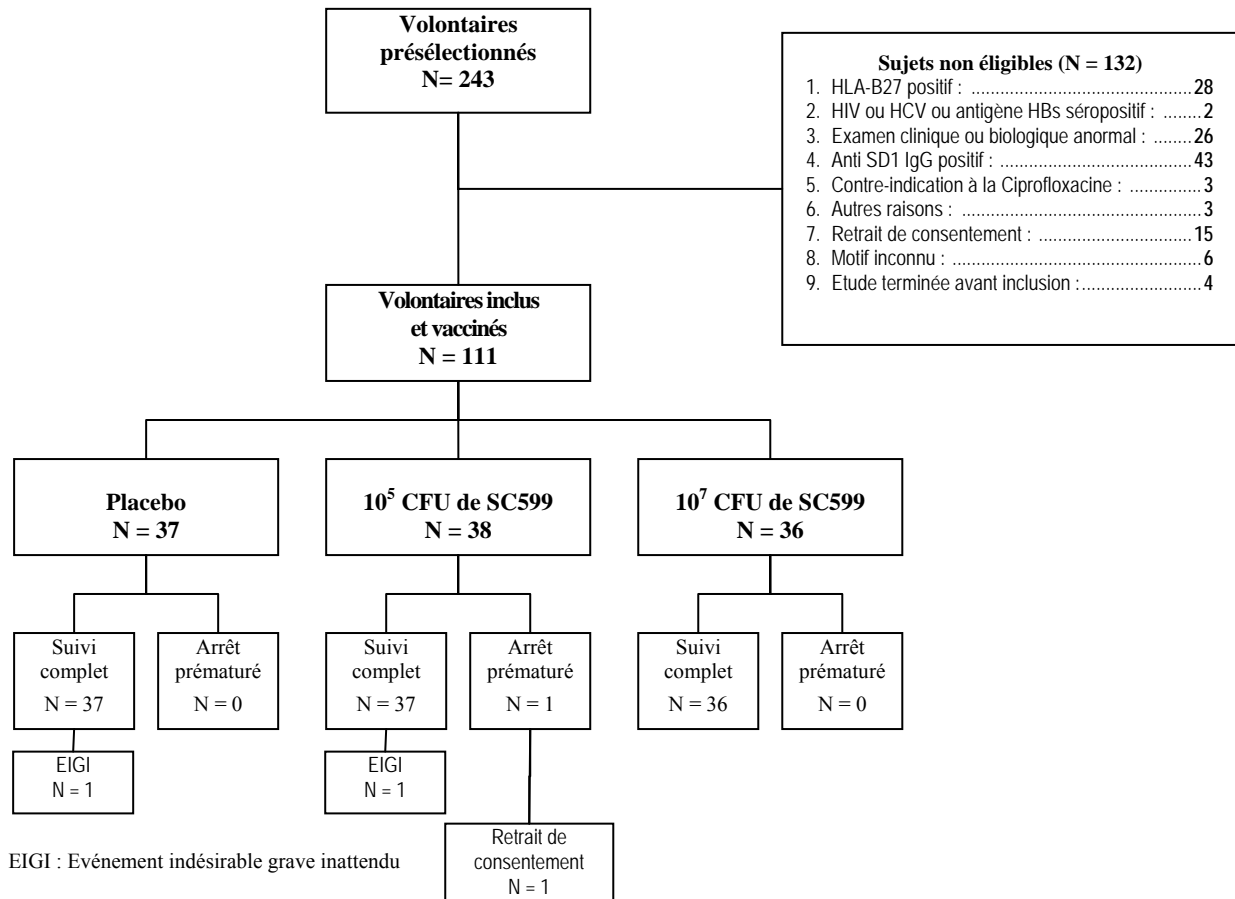
Les sujets présentant les critères suivants ne pouvaient pas être inclus (1) hypersensibilité à une ou plusieurs des substances entrant dans la composition du vaccin étudié, (2) un haplotype HLA B27 en raison de leur prédisposition potentielle à développer une arthrite réactionnelle post-infectieuse, (3) une hypersensibilité à la ciprofloxacine (antibiotique utilisée pour stopper la colonisation intestinale par la souche vaccinale [phase I] ou traiter un éventuelle bactériémie ou shigellose lié à la souche), au sulfaméthoxazole et au triméthoprime ou tout autre antibiotique des classes précédentes, (4) un antécédent ou une suspicion de maladies ou d'anomalies gastro-intestinales, (5) des traitements par des antibiotiques, du fer, du zinc (le fer et le zinc pouvant théoriquement interférer avec le mécanisme d'atténuation de la bactérie) ou des antagonistes des récepteurs H2 ou inhibiteurs de la pompe à proton (le suc gastrique jouant un rôle majeur dans la défense contre les infections à *Shigella*) ou ayant reçu un vaccin contre *Shigella*, (6) une protéinurie ou une hémoglobinurie significative ou des anomalies aux tests hématologiques ou biochimiques ou un résultat positif sur les cultures d'échantillons collectés lors de la sélection des volontaires, (7) une immunodépression ou un traitement immunosuppresseur (y compris les corticoïdes systémiques), (8) un certain degré d'immunité contre *Shigella* lors de la présélection.

De même ne pouvaient être inclus les sujets ayant eu (1) une shigellose suspectée ou confirmée au cours des 6 mois précédant la participation à l'étude, (2) une infection aiguë (y compris les fièvres >38°C) ou ayant une maladie chronique. Afin de ne pas transmettre la souche à des personnes à risque de développer la maladie, étaient également exclus (1) les sujets ayant une profession impliquant des contacts avec des personnes susceptibles aux maladies, (2) des professionnels manipulant des denrées alimentaires et (3) ceux en contact étroit à domicile avec un enfant âgé de moins de 5 ans ou avec une personne immunodéprimée.

Quarante trois (phase I) et 243 volontaires (phase II) ont été présélectionnés pour permettre l'inclusion des 28 (phase I) et 111 sujets (phase II, voir détail Figure 4).

L'essai de phase I n'a fait l'objet d'aucun calcul d'effectif.

Figure 4 : Répartition des volontaires de l'essai de phase II



Dans l'essai de phase II, 111 sujets devaient être inclus, 37 sujets par groupe, en supposant une différence minimum de 30% entre le groupe placebo et les groupes ayant reçu le vaccin (10^5 CFU et 10^7 CFU), une taux de réponse dans le groupe placebo de 5%, une puissance de 90%, un risque α de première espèce de 5%, une puissance de 90%, un test exacte de Fisher unilatéral, une estimation de 5% de sorties prématurés. Par ailleurs, compte tenu de la taille de cet échantillon, la différence minimum de la proportion d'événements indésirables qui pourraient être détectés était de 25% ($\alpha = 0,05$, test unilatéral) entre le placebo et les groupes vaccinés et 35% ($\alpha = 0,05$, test bilatéraux) entre les deux dosages (10^5 CFU et 10^7 CFU) avec une puissance de 80%.

5. Evaluation de la tolérance

S'agissant d'un vaccin vivant atténué absorbé par voie orale, la fièvre, les céphalées, les nausées les vomissements, les douleurs abdominales, l'aspect (couleur, consistance, présence de sang et de mucus)

et la fréquence des selles ont été collectés. Les effets indésirables ont été évalués par l'investigateur, puis gradés selon leur intensité (léger, modéré ou sévère), leur sévérité et le lien de causalité potentiel avec la vaccination. Un lien de causalité défini comme probable ou définitif était une cause d'arrêt prématuré de l'étude.

6. Evaluation de la réponse immunitaire

Les taux de lymphocytes B sécrétant des anticorps (ASC: *Antibody Secreting Cells*) anti-LPS (IgA, IgG, IgM) ont été mesurés par *Enzyme-Linked ImmunoSPOT* (ELISPOT) aux jours 0, 9 et 14 dans l'essai de phase I et aux jours 0, 7, 9 et 11 dans l'essai de phase II. Dans l'essai de phase II, les volontaires présentant un taux d'ASC en IgA anti-LPS supérieur ou égal à $20 / 10^6$ *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (PBMC) à au moins une des mesures après vaccination étaient qualifiés de « Répondeurs ».

Dans les 2 essais, les taux d'anticorps anti-LPS (IgA, IgG, IgM) ont été mesurés aux visites de présélection, à J0, J7, J14, J21 et J28 : par *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA) qualitatif à toutes les visites de l'essai de phase I et à la visite de présélection de l'essai de phase II et par ELISA quantitatifs pour toutes les autres visites de l'essai de phase II. Les volontaires présentant une augmentation du taux d'IgA anti-LPS supérieure à 4 fois le taux avant vaccination étaient qualifiés de « Répondeurs ».

Dans l'essai de phase II, comme pour la réponse sérologique anti-LPS, les concentrations en anticorps anti-*stxB* ont été mesurées par ELISA quantitatifs pour les sérums collectés en présélection et aux jours 0, 7, 14, 21 et 28 ; et toute augmentation de la concentration en anticorps anti-*stxB* supérieure ou égale à 4 fois la concentration avant vaccination était définie comme significative.

7. Excrétion de la souche vaccinale

La souche vaccinale a été recherchée systématiquement dans les selles avant vaccination, aux jours 1, 2, 3, 4, 9, 14, 21 et 28 dans les 2 essais ainsi qu'aux jours 7 et 11 pour l'essai de phase II.

8. Vaccinémie

La souche vaccinale a été recherchée systématiquement dans le sang, le jour de la vaccination et aux jours 1, 2, 3 et 4 dans l'essai de phase I.

B. Résultats

1. Tolérance

a) Phase I

Dans l'ensemble SC599 a été bien toléré. La sévérité des événements indésirables (EI) rapportés considérés comme reliés était légère (81%) à modérée (19%). Il n'y avait aucune relation dose-réponse en fréquence ou intensité et aucune sortie prématurée suggérant que la dose maximale tolérée n'avait pas été atteinte dans cette étude (Tableau 1). Seuls 2 événements indésirables graves ont été rapportés mais aucun n'a été attribué à SC599. L'inconfort abdominal a été observé chez 17 sujets et considéré comme relié chez 12 d'entre eux (Tableau 1). Trois (3) sujets ont présenté des EI classés comme des épisodes de diarrhée et considérés comme reliés à SC599 ; 3 autres sujets ont présenté des épisodes, après l'administration post-vaccinale de ciprofloxacine, considérés comme non reliés (Tableau 2). Trois sujets ont présenté une fièvre considérée comme liée à SC599 dans les groupes 10^2 , 10^3 et 10^8 (Tableau 1).

Aucune anomalie hématologique (numération formule sanguine) ou biochimique (bilan hépatique et rénale) significative pendant l'étude n'a été observée durant l'étude pouvant être liée à SC599 (données non présentées).

Un volontaire (sujet 907) a présenté une CRP élevée (39,4) au 9^{ème} jour après la vaccination et l'administration de ciprofloxacine, associé à une infection des voies respiratoires supérieures, une fièvre modérée et une diarrhée (tableau 2). Cet EI a été considéré comme modérément relié à SC599. Chez 3 volontaires (sujets 934, 937 et 939), la CRP s'est modestement élevée à J2 post-vaccination avant l'administration de ciprofloxacine mais pour l'un d'entre eux (sujet 937) cette élévation est restée au dessous de la normale. Un volontaire (sujet 904) a présenté une élévation de la CRP (40,9) le lendemain de la vaccination associée la veille à une élévation de la température à 39,4°C, 30 minutes après avoir reçu le vaccin. Cet épisode a été considéré comme possiblement lié au vaccin mais une infection intercurrente n'a pas été écartée. Quant au volontaire 929, l'élévation de la CRP à 128 à J9 a été considérée comme non relié au vaccin à l'étude (tableau 3). Aucune bactériémie n'a été observée.

Trois (3) volontaires ont rapporté du sang dans les selles mais la relation avec le vaccin à l'étude a été considéré comme éloigné.

Tableau 1 : Phase I – Fréquence des événements indésirables reliés ^a

Dose administrée (CFU)	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
Diarrhée ^b	0	2	0	0	0	0	1
Inconfort abdominal ^c	2	4	0	2	2	1	1
Nausée	0	1	0	1	0	0	1
Vomissement	0	2	0	1	0	0	0
Fièvre	1	1	0	0	0	0	1
Céphalée	0	0	0	2	0	0	1

^a Nombre de sujets reportant événement au moins une fois

^b Inclut les selles non moulées et l'augmentation de fréquence des selles

^c Inclut les crampes, les douleurs abdominales, flatulence

Tableau 2 : Phase I – Fréquence de tous les événements indésirables et relation temporelle avec l'administration de ciprofloxacine ^a

Dose administrée (CFU)	Début avant le début de l'administration de ciprofloxacine							Début après le début de l'administration de ciprofloxacine						
	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
Diarrhée ^b	0	1	0	0	0	0	0	0	2	1	1	0	1	1
Inconfort abdominal ^c	2	4	0	2	1	1	1	0	1	1	2	2	0	0
Nausée	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	2	2	0	2
Vomissement	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	1	0	0	0
Fièvre	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1
Céphalées	0	0	0	1	0	0	1	2	1	1	3	0	1	1

^a Nombre de sujets reportant événement au moins une fois

^b Inclut les selles non moulées et l'augmentation de fréquence des selles

^c Inclut les crampes, les douleurs abdominales, flatulence

Tableau 3 : Phase I – Volontaires présentant des CRP en dehors de la norme

Dose administrée (CFU)	N° de sujet	Jour après immunisation										
		-28 to -7	0	1	2	3	4	9	14	21	28	
10 ²	903	6	5.2	4.8	4.2	3.7	ND	5.4	5.5	13.5	3.3	
	904	0.2	2.5	40.9	29	12.4	6.8	0.9	2.8	0.4	0.2	
10 ³	907	7.4	0.2	0	0.2	0.2	0.2	39.4	2.1	0.4	0.9	
10 ⁶	929	0.9	2.7	2.3	1.5	1	0.8	128	13.3	2.1	1.4	
10 ⁷	934	2.5	2.4	6.3	9.2	5.1	4.3	2.4	1.9	1	5.9	
	937	0.4	0.5	0.3	7.1	5.7	2.6	1.2	<0.2	0.3	1.2	
10 ⁸	939	0.2	0.2	0.2	14.4	9	4.9	0.4	0.2	0.3	0.2	

Laboratory normal range < 8mg/l

ND : non disponible

b) Phase II

La proportion de sujets présentant au moins un EI était similaire entre les groupes placebo, 10⁵ et 10⁷ CFU (respectivement 95%, 97% et 86%). Les EIs rapportés étaient essentiellement légers (69%) à modérés (30%) et très rarement sévères (< 1%) (Tableau 4).

La proportion de sujets présentant un inconfort abdominal relié était de 49%, 74% et 53% dans respectivement les groupes placebo, 10⁵ et 10⁷ CFU. Soixante dix (70) pourcent, 81% et 58% des sujets ont eu des événements systémiques dans respectivement les groupes placebo, 10⁵ et 10⁷ CFU. Les diarrhées et l'inconfort abdominal étaient significativement plus fréquent (p = 0,02) dans le groupe 10⁵ CFU que dans le groupe placebo, ce qui n'a pas été observé dans le groupe 10⁷ CFU.

Tableau 4 : Phase II – Fréquence des événements indésirables reliés au vaccin ^a

	Placebo (n=37)		10 ⁵ CFU (n=38)		10 ⁷ CFU (n=36)		
	n	%	n	%	n	%	
Sujet avec au moins un événement indésirable	35	94,6	37	97,4	31	86,1	
Symptômes Gastro-intestinaux							
Tous	18	48,6	28	73,7	19	52,8	
Inconfort abdominal ^b	Légère	7	18,9	18	47,4	7	19,4
	Modérée	3	8,1	6	15,8	6	16,7
	Sévère			1	2,6		
Diarrhée ^c	Légère	3	8,1	9	23,7	5	13,9
	Modérée			2	5,3		
	Sévère			1	2,6		
Nausée	Légère	1	2,7	10	26,3	5	13,9
	Modérée	3	8,1	5	13,2	2	5,6
Vomissement	Légère	2	5,4	2	5,3		
	Modérée					1	2,8
Autres symptômes gastro-intestinaux	Légère	5	13,5	8	21,1	8	22,2
	Modérée	1	2,7	1	2,6	1	2,8
	Sévère			1	2,6		
Réactions systémiques							
Toutes	26	70,3	31	81,6	21	58,3	
Asthénie	Légère	2	5,4	3	7,9	8	22,2
	Modérée	3	8,1	1	2,6	2	5,6
	Sévère			1	2,6		
Céphalées	Légère	14	37,8	18	47,4	11	30,6
	Modérée	16	43,2	16	42,1	8	22,2
Fièvre	Légère	1	2,7	2	5,3		
	Modérée			2	5,3	1	2,8
Autres réactions systémiques	Légère	10	27,0	14	36,8	9	25,0
	Modérée	5	13,5	5	13,2	3	8,3

^a Nombres et pourcentage de sujets présentant au moins un symptôme

^b inclus crampes, douleur abdominal et flatulence.

^c Diarrhée = augmentation de la fréquence des selles (3 ou plus en 24 heures) ou selles liquides.

Deux événements indésirables graves inattendus ont été rapportés, une polyarthralgie dans le groupe placebo et une diarrhée fébrile dans le groupe 10⁵ CFU. Le dernier concernait une jeune volontaire de 22 ans avec un index de masse corporelle bas (17), qui a présenté des douleurs abdominales sévères avec un ténésme au 14^{ième} jour après avoir reçue SC599, s'y sont associés au 15^{ième} jour, fièvre (température orale à 38,3°C), anorexie, fatigue, céphalées et myalgies, suivis d'une diarrhée au 16^{ième}

jour. SC599 a été isolé dans les selles. Un traitement par ciprofloxacine a permis de guérir la volontaire. Aucune anomalie biologique significative, hématologique et biochimique (incluant la CRP), n'a été observée dans les 3 groupes. Aucune bactériémie n'a été observée.

2. Excrétion

Dans l'essai de phase I, SC599 a été détecté dans les selles de 3 sujets pendant une seule journée aux jours 1, 2 et 4 (Tableau 5).

Tableau 5 : Phase I – Volontaires présentant une excrétion de la souche SC599 dans les selles dans l'essai de phase I

Dose administrée (CFU)	N° de sujet	Nombre de jours après immunisation									
		1	2	3	4	C	9	14	21	28	
10 ⁴	920	-	-	-	+	C I P R O	-	-	-	-	
	932	-	+	-	-		-	-	-	-	
10 ⁷	934	+	-	-	-		-	-	-	-	

+ Coproculture positive à SC599, - Coproculture négative à SC599, CIPRO : ciprofloxacine

Dans l'essai de phase II, 9 volontaires (23,7%) du groupe 10⁵ et 11 (30,6%) du groupe 10⁷ CFU ont excrété au moins une fois la souche vaccinale. Quelle que soit la dose, l'excrétion a principalement eu lieu au cours des deux premières semaines suivant l'ingestion de la souche vaccinale. Un seul volontaire a excrété la souche vaccinale au-delà de la deuxième semaine. Il a par conséquent reçu, comme prévu par le protocole, un traitement par ciprofloxacine afin d'éradiquer, avec succès, la souche vaccinale (Tableau 6).

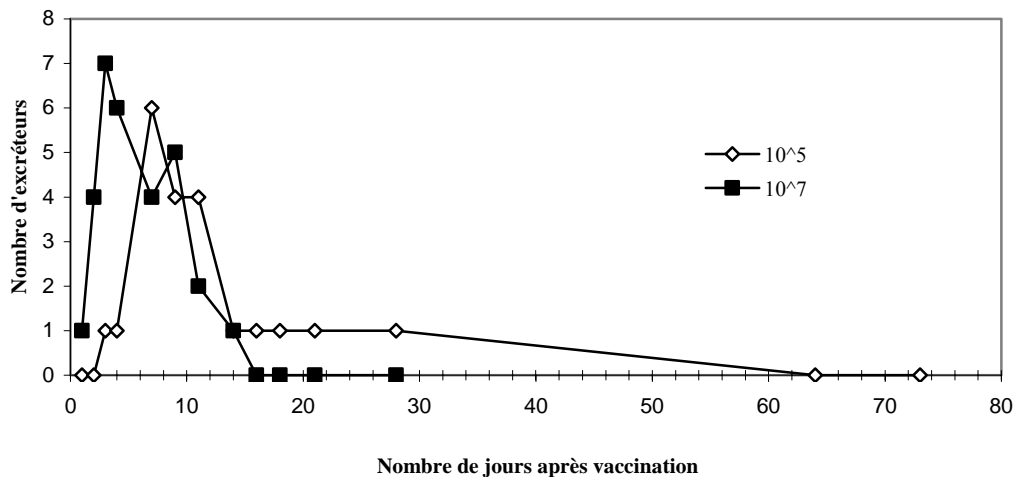
Tableau 6 : Phase II – Excrétion de la souche vaccinale SC599, coproculture positive par volontaire dans l'essai de

Groupe (CFU)	N° de sujet	Nombre de jours après immunisation													
		1	2	3	4	7	9	11	14	16	18	21	28	>28	
10 ⁵ N= 9/38	1023	-	-	-	-	+	+	-	-	.	.	-	-	.	.
	1027	-	-	-	-	-	+	-	-	.	.	-	-	.	.
	1079	-	-	-	-	+	-	-	-	.	.	-	-	.	.
	1105	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	.	.
	2004	-	-	-	-	+	+	+	-	.	.	-	-	.	.
	2049	-	-	-	-	+	-	-	-	.	.	-	-	.	.
	2081	-	-	+	+	-	-	+	-	.	.	-	-	.	.
	2099	-	-	-	-	+	-	+	-	.	.	-	-	.	.
	2101	-	-	-	-	-	-	-	-	.	.	+	+	-*	-**
10 ⁷ N= 11/36	1010	-	-	+	-	-	-	-	-	.	.	-	-	.	.
	1038	-	-	-	-	-	-	+	-	.	.	-	-	.	.
	1068	-	+	+	-	-	-	-	-	.	.	-	-	.	.
	1088	-	+	+	+	-	-	-	-	.	.	-	-	.	.
	2006	-	+	-	-	-	+	-	-	.	.	-	-	.	.
	2046	-	-	+	+	+	+	-	-	.	.	-	-	.	.
	2064	-	-	-	-	-	+	-	-	.	.	-	-	.	.
	2075	-	-	+	+	+	-	-	-	.	.	-	-	.	.
	2079	-	+	+	+	+	+	-	-	.	.	-	-	.	.
	2085	-	-	-	+	-	+	+	+	.	.	-	-	.	.
	2098	+	-	+	+	+	-	-	-	.	.	-	-	.	.

‘+’ Coproculture positive à SC599, ‘-’ Coproculture négative à SC599, ‘.’ Pas de coproculture prévue ce jour, *Jour 64 post-vaccination, ** Jour 73 post-vaccination

La durée moyenne d'excrétion des deux groupes est équivalente (4,8 jours) alors que le délai moyen d'apparition est plus précoce dans le groupe 10^7 CFU ($3,7 \text{ jours} \pm 3,3$) que dans le groupe 10^5 CFU ($8,6 \text{ jours} \pm 5,3$) (Figure 5).

Figure 5 : Phase II – Profil d'excrétion de la souche vaccinale selon le groupe



3. Réponse immunitaire

a) Phase I

Dans l'essai de phase I, la réponse post-vaccinale en lymphocytes B sécrétant des IgA anti-LPS (mesurée par ELISPOT) a été la plus forte observée, moindre pour la réponse en IgG et IgM (Figure 6). Aucune réponse n'a été observée jusqu'aux doses 10^4 CFU. Les réponses les plus fortes ont été obtenues dans les groupes ayant reçu 10^5 et 10^7 CFU. La moyenne géométrique des réponses en IgA anti-LPS pour les groupes ayant reçu 10^5 , 10^6 , 10^7 et 10^8 ont été respectivement : 41,2, 8,8, 26 et 8,5 ASC par 10^6 PBMC. Deux sujets ont présenté une réponse au-delà de 100 ASC, 5 entre 20 et 100, et 5 entre 10 et 20. L'importance de la réponse ne semblait pas liée à la dose reçue.

Les titres en anticorps anti-LPS contre *Sd1* ont été mesurés par ELISA pour les visites de présélection, à J0, J7, J14, J21 et J28 afin d'en mesurer l'augmentation. Une augmentation supérieure ou égale à 4 fois le seuil à l'inclusion était définie comme significative.

Pour tous les sujets répondeurs, l'isotype prédominant était l'IgA. Seuls 3 sujets (924, 934 & 939) ont présenté une réponse en ELISA significative. Ces 3 mêmes volontaires ont présenté également une réponse en ELISPOT. Deux d'entre eux (924 & 934) ont obtenu un taux d'ASCs supérieur à 100 par 10^6 PBMC. L'un d'entre eux (934) a présenté une réponse significative en IgG anti-LPS (multiplication du titre d'anticorps de 35,6) qui s'est maintenu à la dernière visite de suivi (J28). Ce

volontaire a présenté la meilleure réponse en taux de lymphocytes B sécrétant des IgA ($160 \text{ ASC}/10^6 \text{ PBMC}$) et élévation significative du titre d'IgA (multiplication du titre d'anticorps de 9,2) (Tableau 7).

Quatre volontaires (sujets 927, 931, 937 & 944) ont présenté une augmentation comprise entre 2 et 4 fois le seuil de base en IgA. Pour tous les volontaires, le titre d'anticorps est revenu au titre avant vaccination sauf pour un (sujet 934) qui a maintenu une réponse au-delà du seuil fixé (augmentation du titre d'anticorps de 18,5 par rapport à l'inclusion) à la dernière visite (données non présentées).

Figure 6 : Phase I – Nombre de lymphocytes B sécrétant des anticorps anti-LPS, réponse au 9^{ème} jour post-vaccination (en ELISPOT)

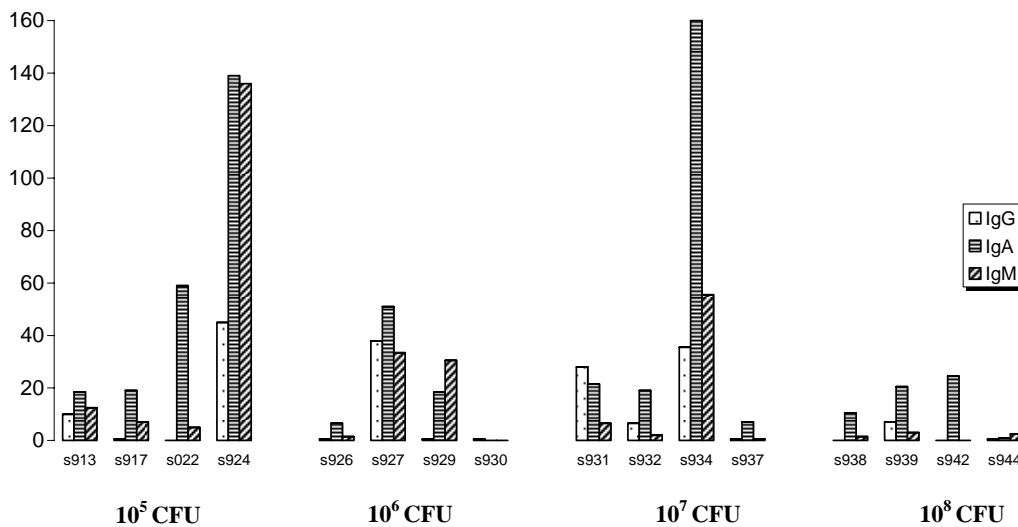


Tableau 7 : Phase I – Résumé des réponses immunitaires

Groupe (CFU)	N° de sujet	Nombre d'ASC /10 ⁶ PBMC (ELISPOT)			Augmentation du titre d'anticorps (ELISA)	
		IgA	IgG	IgM	IgA	IgG
10 ⁵	913	18,5	10	12,5	1,9	1,0
	917	19	0,5	7	1,7	1,2
	922	59	0	5	2,0	1,0
	924	139	45	136	4,7	1,0
10 ⁶	926	6,5	0,5	1,5	1,1	1,2
	927	51	38	33,5	2,3	2,5
	929	18,5	0,5	30,5	1,3	0,9
	930	0	0,5	0	0,6	1,0
10 ⁷	931	21,5	28	6,5	3,2	1,9
	932	19	6,5	2	1,1	1,1
	934	160	35,5	55,5	9,2	35,6
	937	7	0,5	0,5	2,2	1,1
10 ⁸	938	10,5	0	1,5	1,2	1,0
	939	20,5	7	3	7,7	1,6
	942	24,5	0	0	1,2	1,0
	944	1	0,5	2,5	2,9	3,4

b) Phase II**i) Réponse anti-LPS**

Le critère principal d'évaluation était la proportion de sujets répondeurs définis comme les sujets présentant un taux de lymphocytes B sécrétant (ASC) des IgA anti-LPS supérieures à $20/10^6$ PBMC. Sur la population en intention de traiter, la proportion de répondeurs étaient de 34,2% (13/38) et 44,4% (16/36) respectivement dans les groupes 10^5 et 10^7 CFU. Aucune réponse n'a été observée dans le groupe placebo. Les groupes 10^5 et 10^7 CFU présentaient une réponse statistiquement supérieure au groupe placebo ($p < 0,0001$). Une relation dose-réponse a été observée mais aucune différence statistiquement significative entre les 2 groupes. L'analyse per-protocole ainsi que l'analyse de sensibilité (seuil répondeur abaissé à $10 \text{ ASC}/10^6 \text{ PBMC}$) a conduit aux mêmes conclusions. Le taux de lymphocytes B sécrétant des IgA, IgG et IgM anti-LPS des groupes ayant reçu la souche vaccinale étaient significativement supérieurs à ceux du groupe placebo (Figure 7).

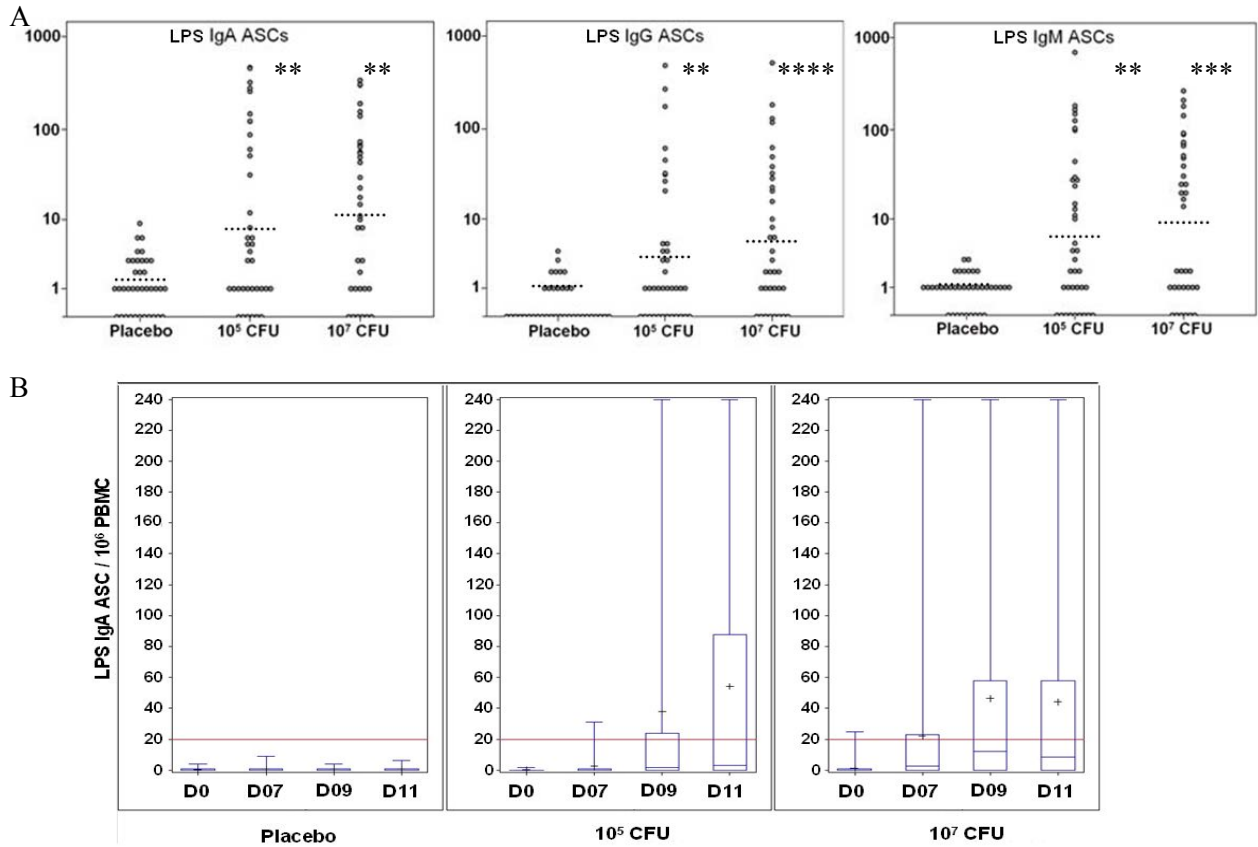
Les proportions de répondeurs en IgA anti-LPS mesuré par l'ELISA quantitatif (multiplication par 4 de la concentration en anticorps avant vaccination), étaient statistiquement supérieures au placebo dans les groupes 10^5 et 10^7 , soit respectivement 31,6% et 33,3% par l'ELISA ($p < 0,001$). En revanche, aucune différence n'a été observée entre les deux groupes 10^5 et 10^7 CFU. Le facteur d'augmentation de la concentration en IgA anti-LPS (ELISA) par rapport à celle de base était respectivement dans les groupes 10^5 et 10^7 CFU: au jour 14 (6,1 et 5,4), au jour 21 (2,9 et 2,8), et au jour 28 (1,9 et 1,9).

Onze (11) des 13 répondeurs en IgA anti-LPS mesurée ELISPOT l'étaient également en ELISA. La réponse (ELISPOT) dans le groupe 10^7 CFU était plus précoce que dans le groupe 10^5 CFU, débutant respectivement au jours 7 et J9 pour ensuite atteindre un plateau à $45 \text{ ASC}/10^6 \text{ PBMC}$ dans le groupe 10^7 CFU. Dans le groupe 10^5 CFU, la réponse continuait d'augmenter au jour 11 jusqu'à $54,4 \text{ ASC}/10^6 \text{ PBMC}$. Dans chacun des groupes, la réponse en anticorps anti-LPS (ELISA) atteignait un pic au 14^{ième} aussi bien pour les IgA que pour les IgG, mais redescendait au 21^{ième} jour pour les IgA alors qu'elle atteignait un plateau pour les IgG. Pour chacun des isotypes, la concentration moyenne était supérieure dans le groupe 10^5 CFU par rapport au groupe 10^7 CFU, et dans l'ensemble, la concentration en IgG était 10 fois supérieure à la concentration en IgA.

ii) Réponse anti-stxB

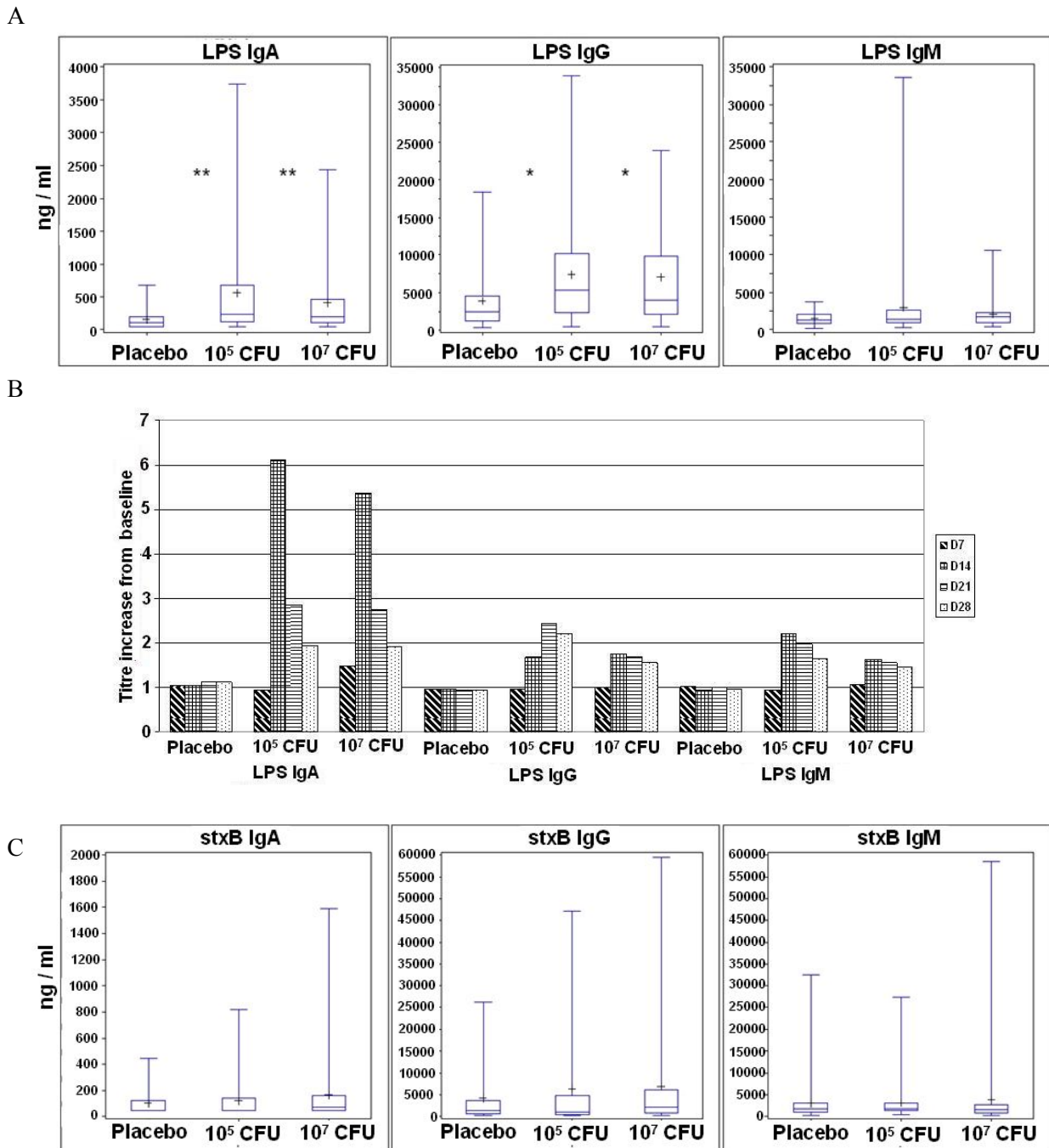
Les réponses en anticorps dirigés contre la sous-unité B de *Sd1* étaient très faibles comparativement à celles dirigées contre le LPS. L'analyse des proportions de répondeurs ne démontrait aucune différence entre les groupes ayant reçu la souche vaccinale et le groupe placebo, quel que soit le seuil d'augmentation considéré. Par conséquent, les quelques augmentations supérieures aux seuils définies ont été considérées comme potentiellement liées au bruit de fond de l'ELISA lui-même ou à une non spécificité de la réponse vis-à-vis de la sous-unité B.

Figure 7 : Phase II – Réponse immunitaire en lymphocytes B sécrétant des anticorps (ASC) IgA, IgG et IgM anti-LPS de *Sd1* mesurée en ELISPOT aux jours 0, 7, 9 et 11 sur les PBMC



A – Pic de la réponse post-vaccinale des lymphocytes B sécrétant des IgA, IgG et IgM (ASC). Lignes pointillées représentent les moyennes géométriques du nombre d'ASC/ 10^6 PBMC : 1,51 (1,21 ; 1,87 95% IC), 7,89 (3,82 ; 16,3 95% CI) et 11,27 (5,53 ; 23 95% CI) pour les lymphocytes B sécrétant des IgA dans respectivement les groupes placebo, 10^5 CFU et 10^7 CFU ; 1,13 (1,01 ; 1,26 95% CI), 3,38 (1,88 ; 6,08 95% IC) et 5,46 (2,94 ; 10,14 95%IC) for les lymphocytes B sécrétant des IgG dans respectivement les groupes placebo ; 1,14 (1,03 ; 1,25 95% IC), 6 (3,08 ; 11,7 95% IC) et 9,2 (4,54 ; 18,66 95% IC) pour les lymphocytes B sécrétant des IgA dans respectivement les groupes placebo. Différence statistique significative entre les groupes 10^5 et 10^6 CFU vs placebo: * < 0.025 , ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

B – Cinétique de la réponse des lymphocytes B sécrétant des IgA. Boxplots : médiane (barre), moyenne arithmétique (+) premier quartile Q1 et dernier quartile Q3, valeurs minimum et maximum. Seuil = $20/10^6$ PBMC.

Figure 8 : Phase II – Pic de la réponse en anticorps anti-LPS et anti-stxB spécifique de *Sd1*

A – Pic de concentration en IgA, IgG et IgM dans les 3 groupes. La concentration a été déterminée par ELISA aux jours 0, 7, 14, 21 et 28. Différence statistique significative entre les groupes 10^5 et 10^6 CFU vs placebo: * < 0.025, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001.

B – Cinétiques d'accroissement de la concentration en anticorps avant/après vaccination (J7, 14, 21 et 28).

C – Réponses en IgA, IgG et IgM spécifique du *StxB*. Calculs réalisés avec la valeur la plus haute parmi les jours 7, 14, 21 and 28. Boxplots : médiane (barre), moyenne arithmétique mean (+) premier quartile Q1 et dernier quartile Q3, valeurs minimum et maximum.

C. Conclusions et discussion

Seul un autre candidat vaccin vivant atténué contre *Sd1* (WRSd1), mis au point par le WRAIR, a été mené en phase I (McKenzie, 2008). Il s'agit d'une souche délétée du gène *icsA* comme pour SC599 et du gène *stxAB* qui code pour la production de la toxine de Shiga.

L'essai de phase I avec SC599, a permis d'évaluer la sécurité et la tolérance du vaccin à l'étude et d'obtenir des données préliminaires sur l'immunogénicité de la souche vaccinale et son élimination dans les selles. A l'issue de cette étude, les 2 doses les plus immunogènes et les mieux tolérées (10^5 , 10^7 CFU) ont été sélectionnées pour être comparées à un placebo dans un essai de phase II. Le pourcentage de sujets répondeurs contre du LPS de *Sd1* mesurés par la méthode ELISPOT (nombre de lymphocytes B sécrétant des IgA $\geq 20/10^6$ PBMC) et par la méthode ELISA quantitative (multiplication par 4 du titre en anticorps avant vaccination), pour les deux groupes de 10^5 et 10^7 CFU a été statistiquement supérieur au groupe placebo, à savoir 34,2% et 44,4% respectivement avec la méthode ELISPOT ($p < 0,0001$) et 31,6% et 33,3% respectivement avec la méthode ELISA ($p < 0,001$). La réponse immunitaire anti-LPS est apparue au cours des deux premières semaines après la vaccination. Celle du groupe ayant reçu la plus forte dose (10^7 CFU) semble plus précoce et moins persistante après avoir atteint son maximum à J14, que dans le groupe 10^5 CFU. Les résultats de l'immunogénicité dirigée contre la sous-unité B de *Sd1* n'ont pas été exploitables en l'absence d'analyses complémentaires. Les résultats ont permis de démontrer qu'une dose orale de SC599 induisait une réponse immunitaire en IgA (mesurée par ELISPOT) et une réponse en IgA et IgG (mesurée par ELISA) contre de LPS de *Sd1*.

D'une façon générale, le vaccin à l'étude a été bien toléré. Les événements indésirables étaient principalement digestifs et d'intensité légère à modérée. Très peu d'épisodes de fièvre ont été rapportés. Dans l'essai de phase II, une volontaire du groupe 10^5 CFU a présenté une diarrhée fébrile reliée au candidat vaccin au cours de la deuxième semaine après vaccination. Cet événement a été déclaré comme grave et inattendu par l'investigateur et reporté comme tel aux autorités de santé. Cependant, les caractéristiques physiques de la volontaire (Index de Masse Corporelle à 17), l'absence de selles muco-purulentes et sanglantes et l'éradication rapide de la souche vaccinale par un traitement à la ciprofloxacine sont des arguments pris en compte par le Comité Scientifique pour relativiser la sévérité de l'épisode.

L'excrétion de SC599 a été faible (pour l'essai de phase II : 9 et 11 volontaires dans respectivement les groupes 10^5 et 10^7 CFU). Elle a commencé dans les deux premières semaines après la vaccination, sauf pour un volontaire qui a excrété au 21^{ème} et 28^{ème} jour. La durée moyenne d'excrétion a été inférieure à 5 jours et a commencé en moyenne plus tôt dans le groupe 10^7 CFU (3^{ème} jour) que dans le groupe 10^5 CFU (8^{ème} jour). Dans l'essai de phase I avec le WRSd1, 9 volontaires ont excrété la souche (1 pour le dosage 10^3 , 10^4 et 10^5 CFU, 4 pour le dosage 10^6 CFU et 2 pour le dosage 10^7 CFU).

Un des sujets a excrété la souche le jour de la vaccination uniquement dans le groupe 10^7 CFU mais n'a présenté aucun symptôme ni diarrhée. Les sujets ont excrété la souche entre le 1^{ier} et le 7^{ième} jour après la vaccination. Une excrétion plus tardive n'a pas été étudiée car tous les volontaires recevaient de la ciprofloxacine au 8^{ième} jour. L'excrétion de la souche vaccinale est une des difficultés majeures rencontrées avec les vaccins vivants atténués requérant l'évaluation par les autorités compétentes du risque lié à la dissémination de la souche dans l'environnement et de sa transmissibilité à d'autres individus, notamment chez des sujets fragiles, comme les personnes immunodéprimées. Il a été possible de réaliser l'essai de phase II avec le SC599 en ambulatoire car l'essai préalable de phase I chez des sujets hospitalisés avait permis de rassurer les autorités sur la risque potentiel de dissémination de la souche. Néanmoins, une évaluation intermédiaire de l'excrétion de la souche après l'inclusion et le suivi du premier tiers des sujets a été requise par les autorités françaises.

Le rationnel pour développer un vaccin vivant administré par voie orale, est d'induire une réponse mucoale qui mime la réponse lors d'une infection naturelle par la souche et cette réponse semble être mieux corrélée par la mesure du taux de lymphocytes B circulants sécrétant des IgA (Cohen, 1992). Ces dernières années, outre l'équipe de P. Sansonetti, les équipes du CVD à Baltimore (Levine, 2007) et du WRAIR (Kotloff, 2002 ; McKenzie, 2008), ont développé des candidats vaccins utilisant une approche rationnelle par délétion génétique. La réponse immunitaire a été évaluée en essai clinique, en utilisant le taux de lymphocytes B circulants sécrétant des anticorps mesuré par la méthode ELISPOT. Un essai de phase IIb (challenge) évaluant SC602, une souche de *S. flexneri* 2a construite avec les mêmes bases d'atténuation génétique que la souche SC599, a montré que des volontaires ayant reçu un inoculum de 10^4 CFU trois mois auparavant comparés à des volontaires non vaccinés, challengés avec une souche sauvage par voie orale, ont été protégés à 100% contre la dysenterie contrairement aux non immunisés. Néanmoins, certains des volontaires immunisés ont présenté des diarrhées qui n'ont cependant pas requis de prise en charge médicale. Les volontaires n'ayant présenté aucun symptôme étaient ceux dont le taux de lymphocytes B sécrétant des IgA contre le LPS, étaient le plus élevé (Coster, 1999).

Dans l'étude de phase II avec SC599, le pourcentage de sujets considérés comme répondeurs pour les groupes 10^5 et 10^7 CFU a été 34,2% et 44,4% respectivement. Dans l'étude d'escalade de doses (10^3 à 10^7 CFU) avec le WRSd1, environ deux tiers des sujets ont présenté une réponse considérée comme significative par les auteurs. Parmi les 8 volontaires du groupe 10^7 CFU, 3 volontaires ont présenté une réponse supérieure à 20 ASC/ 10^6 PBMC, un seul volontaire dans le groupe 10^5 CFU (McKenzie, 2008). Avec SC599, une réponse en IgA supérieure ou égale à 20 ASC/ 10^6 PBMC était considérée comme significative alors qu'un seuil à 5 ASC/ 10^6 PBMC a été pris en compte par McKenzie *et Col.*. Le seuil utilisé pour évaluer la significativité d'une réponse varie d'une étude à l'autre rendant difficile un ciblage comparable des candidats vaccins.

Les résultats de l'étude de phase II avec SC599 pourrait suggérer une protection potentielle contre les symptômes les plus graves de la shigellose chez les répondeurs au vaccin. Des études cliniques complémentaires évaluant un schéma 2 doses permettraient peut-être d'améliorer le nombre de répondeurs. Cependant le taux de lymphocytes B sécrétant des anticorps n'étant pas un corrélat de protection absolu, une étude en zone d'endémie ou bien une étude de challenge (si éthiquement envisageable) serait peut-être plus adaptée pour évaluer les taux de protection dans une population vaccinée par le SC599.

V. Références bibliographiques

- Bennish, M. L., M. A. Salam, et al. (1992). "Antimicrobial resistance of *Shigella* isolates in Bangladesh, 1983-1990: increasing frequency of strains multiply resistant to ampicillin, trimethoprim-sulfamethoxazole, and nalidixic acid." Clin Infect Dis 14(5): 1055-60.
- Cohen, D., M. S. Green, et al. (1988). "Serum antibodies to lipopolysaccharide and natural immunity to shigellosis in an Israeli military population." J Infect Dis 157(5): 1068-71.
- Cohen, D., M. S. Green, et al. (1991). "Prospective study of the association between serum antibodies to lipopolysaccharide O antigen and the attack rate of shigellosis." J Clin Microbiol 29(2): 386-9.
- Cohen, D., M. S. Green, et al. (1992). "Natural immunity to shigellosis in two groups with different previous risks of exposure to *Shigella* is only partly expressed by serum antibodies to lipopolysaccharide." J Infect Dis 165(4): 785-7.
- Coster, T. S., C. W. Hoge, et al. (1999). "Vaccination against shigellosis with attenuated *Shigella flexneri* 2a strain SC602." Infect Immun 67(7): 3437-43.
- Fries, L. F., A. D. Montemarano, et al. (2001). "Safety and immunogenicity of a proteosome-*Shigella flexneri* 2a lipopolysaccharide vaccine administered intranasally to healthy adults." Infect Immun 69(7): 4545-53.
- Gilgenkrantz, S et al. (2005). "Petit traité d'art militaire... de *Shigella*." Médecine/Sciences 21(4): 443-444.
- Gupta, A., C. S. Polyak, et al. (2004). "Laboratory-confirmed shigellosis in the United States, 1989-2002: epidemiologic trends and patterns." Clin Infect Dis 38(10): 1372-7.
- Hill Gaston, J. S. and M. S. Lillicrap (2003). "Arthritis associated with enteric infection." Best Pract Res Clin Rheumatol 17(2): 219-39.
- Jennison, A. V. and N. K. Verma (2004). "*Shigella flexneri* infection: pathogenesis and vaccine development." FEMS Microbiol Rev 28(1): 43-58.
- Katz, D. E., T. S. Coster, et al. (2004). "Two studies evaluating the safety and immunogenicity of a live, attenuated *Shigella flexneri* 2a vaccine (SC602) and excretion of vaccine organisms in North American volunteers." Infect Immun 72(2): 923-30.
- Kerneis, S., P. J. Guerin, et al. (2009). "A look back at an ongoing problem: *Shigella dysenteriae* type 1 epidemics in refugee settings in Central Africa (1993-1995)." PLoS One 4(2): e4494.
- Kotloff, K. L., J. P. Winickoff, et al. (1999). "Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies." Bull World Health Organ 77(8): 651-66.
- Kotloff, K. L., D. N. Taylor, et al. (2002). "Phase I evaluation of delta virG *Shigella sonnei* live, attenuated, oral vaccine strain WRSS1 in healthy adults." Infect Immun 70(4): 2016-21.

- Launay, O., C. Sadorge, et al. (2009). "Safety and immunogenicity of SC599, an oral live attenuated *Shigella dysenteriae* type-1 vaccine in healthy volunteers: results of a Phase 2, randomized, double-blind placebo-controlled trial." Vaccine 27(8): 1184-91.
- Levine, M. M., K. L. Kotloff, et al. (2007). "Clinical trials of *Shigella* vaccines: two steps forward and one step back on a long, hard road." Nat Rev Microbiol 5(7): 540-53.
- Levine, M. M., E. J. Gangarosa, et al. (1975). "Shigellosis in custodial institutions. IV. In vivo stability and transmissibility of oral attenuated streptomycin-dependent *Shigella* vaccines." J Infect Dis(131): 704-707.
- Naheed, A., P. Kalluri, et al. (2004). "Fluoroquinolone-resistant *Shigella dysenteriae* type 1 in northeastern Bangladesh." Lancet Infect Dis 4(10): 607-8.
- Pazhani, G. P., B. Sarkar, et al. (2004). "Clonal multidrug-resistant *Shigella dysenteriae* type 1 strains associated with epidemic and sporadic dysenteries in eastern India." Antimicrob Agents Chemother 48(2): 681-4.
- Phalipon, A., C. Costachel, et al. (2006). "Characterization of functional oligosaccharide mimics of the *Shigella flexneri* serotype 2a O-antigen: implications for the development of a chemically defined glycoconjugate vaccine." J Immunol 176(3): 1686-94.
- Prado, V., R. Lagos, et al. (1999). "Population-based study of the incidence of *Shigella* diarrhea and causative serotypes in Santiago, Chile." Pediatr Infect Dis J 18(6): 500-5.
- Rasolofon-Razanamparany, V., A. M. Cassel-Beraud, et al. (2001). "Predominance of serotype-specific mucosal antibody response in *Shigella flexneri*-infected humans living in an area of endemicity." Infect Immun 69(9): 5230-4.
- Sadorge, C., A. Ndiaye, et al. (2008). "Phase 1 clinical trial of live attenuated *Shigella dysenteriae* type-1 DeltaicsA Deltaent Deltaefp DeltastxA:HgR oral vaccine SC599 in healthy human adult volunteers." Vaccine 26(7): 978-87.
- Sansonetti, P. J. (2004). "War and peace at mucosal surfaces." Nat Rev Immunol 4(12): 953-64.
- Taneja, N., V. W. Lyngdoh, et al. (2005). "Haemolytic uraemic syndrome due to ciprofloxacin-resistant *Shigella dysenteriae* serotype 1." J Med Microbiol 54(Pt 10): 997-8.
- Taylor, D. N., L. Bodhidatta, et al. (1991). "Epidemiologic aspects of shigellosis and other causes of dysentery in Thailand." Rev Infect Dis 13 Suppl 4: S226-30.
- Von Seidlein, L., D. R. Kim, et al. (2006). "A Multicentre Study of *Shigella* Diarrhoea in Six Asian Countries: Disease Burden, Clinical Manifestations, and Microbiology." PLoS Medecine 3(9): 1556-1569.