

Développement d'un candidat vaccin contre la Shigellose

– Souche vivante atténuée de *Shigella dysenteriae* type 1
 Δ icsA Δ ent Δ fep Δ stxA:HgR – SC599

Vers la preuve du concept

Cours International Francophone de Vaccinologie 2009
 Université Victor Segalen Bordeaux 2 - Ecole du Val-de-Grâce

Mémoire DU de Vaccinologie

Christine Sadorge

21/10/2009

Mémoire CIFV 2009 C. Sadorge

1

- De la bactérie..... à l'épidémiologie
- Réponse immunitaire
- Les candidats vaccins
- Vaccin contre *Shigella dysenteriae* type 1 – SC599 – Vers la preuve du concept (Méthodologie, Résultats, Conclusions)

21/10/2009

Mémoire CIFV 2009 C. Sadorge

2

De la bactérieà l'épidémiologie (1)

■ Bactériologie

- Entérobactérie, 4 espèces : *S boydii*, *S sonnei*, *S flexneri*, *S dysenteriae*,
- Sérotypes principaux : *S flexneri* 2a, 3a & 6, *S dysenteriae* 1 (Sd1), *S sonnei*,
- Homme : seul réservoir (tube digestif)
- Contamination ingestion d'aliments et d'eau souillées ou interhumaine directe
- Dose infectante : 10 – 100 bactéries
- Multiplication dans le colon et iléon
- 10⁸ et 10⁹ de shigelles par gramme

■ Manifestations cliniques

- Incubation : 12 à 48 heures
- Syndrome dysentérique : selles glairo-sanglantes voire purulentes avec fièvre à 39-40°C, douleurs abdominales, ténésme et d'épreintes
- Arthrite réactionnelle (HLA B27)
- Syndrome hémolytique et urémique (Sd1) chez les enfants

■ Traitement

- Ciprofloxacine
- Résistance aux antibiotiques en particuliers les pénicillines A mais également développement de résistance aux quinolones

21/10/2009

Mémoire CIFV 2009 C. Sadorge

3

De la bactérieà l'épidémiologie (1)

■ Revue de la littérature estimation des infections à *Shigella*

- 165 millions/an dans le monde
- 99% dans les pays du sud,
- 1 million de décès, 61 % chez les enfants < 5 ans

Kotloff, 1999

■ Etude prospective 2000-2004

- 600 000 personnes résidant en Asie (Bangladesh, Chine, Pakistan, Indonésie, Vietnam, et Thaïlande)
- Estimation de l'incidence annuelle des épisodes de shigellose traitée à 2,1 pour 1 000 habitants toutes tranches d'âge confondues,
- Incidence 100 fois plus élevée que dans les pays industrialisés

Von Seidlein, 2006

21/10/2009

Mémoire CIFV 2009 C. Sadorge

4

Particularités de *Shigella dysenteriae* 1

■ Bactériologiques

- Bactérie entéro-invasive liée à la présence d'un plasmide de virulence et à la sécrétion d'une shiga-toxine

■ Epidémiologiques

- Cause majeure d'épidémie de rectocolite hémorragique avec des taux d'attaque et de létalité élevés dans tous les groupes d'âge
- Epidémie de dysenterie de grande ampleur 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 reportés: taux d'attaque (6.3 % à 39.1 %) et de létalité (1.5 % à 9.0 %)

Kerneis, 2009

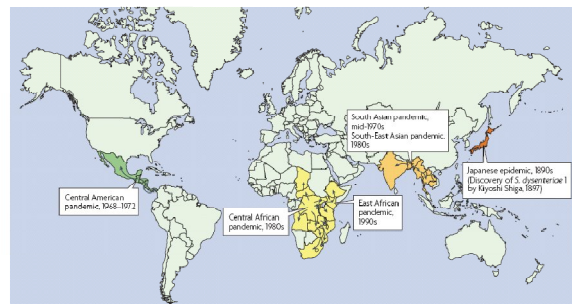
21/10/2009

Mémoire CIFV 2009 C. Sadorge

5

Epidémies de dysenteries à *Shigella dysenteriae* 1

Levine, 2007



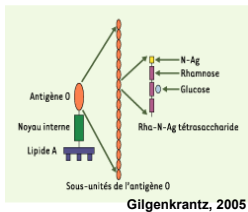
21/10/2009

Mémoire CIFV 2009 C. Sadorge

6

Réponse immunitaire

- Sérotype spécifique
- Le lipopolysaccharide (LPS) antigène protecteur contre *Shigella* et facteur de virulence.
- une base lipidique, un noyau interne et une série de sous-unités saccharidiques, formant l'antigène O
- Production d'anticorps sécrétoires d'isotype A (sIgA) et d'anticorps sériques d'isotype G (IgG) spécifiques de certaines protéines bactériennes et du LPS.
- Etudes 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).
- Mécanisme de protection exacts des anticorps sériques restent encore mal compris.



21/10/2009

Mémoire CIFV 2009 C. Sadorge

7

Candidats Vaccins – Principales différentes approches

- Les 2 principales approches étudiées en essais cliniques sont :
 - Candidats vaccins vivants atténués administrés par la voie orale
 - Candidats vaccins administrés par voie parentérale basés sur le polysaccharide-O de *Shigella* conjugué à une protéine porteuse.
 - Tous séroséparés.
- 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 à son coût
 - Une approche, incluant Sd1, *S. sonnei*, *S. flexneri* 2a, 3a et 6, semblerait envisageable

21/10/2009

Mémoire CIFV 2009 C. Sadorge

8

Candidats vaccins vivants atténués

- S. Streptomycine-dépendant (SmD), *S. flexneri* 2a Istrati T32
 - Souches non invasive mais mal caractérisées,
 - Nécessité de doses multiples, besoin d'un nombre important d'organismes pour établir chaque dose vaccinale (qui affectait le coût), la réversion de la mutation SmD dans de nombreuses souches vaccinales
- Candidats vaccins de seconde génération
 - Amélioration croissante des connaissances en génétique et en biologie moléculaire et cellulaire de la pathogénicité de *Shigella*
 - Délétion génétique
 - telle que 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), ...
 - CVD (M Levine) dérivées de la souche sauvage de *S. flexneri* 2a 245TT
 - Institut Pasteur (P Sansonetti): *S. flexneri* (SC602) et une souche Sd1 (SC599)
 - WRAIR (L Hale): *S. sonnei* (WRSS1) et une souche Sd1 (WRSd1)

21/10/2009

Mémoire CIFV 2009 C. Sadorge

9

Polysaccharide-O de *Shigella* conjugué

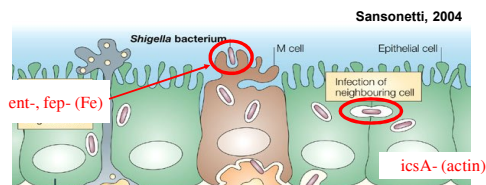
- Conjugués *S. flexneri* 2a-rEPA et *S. sonnei*-rEPA de première génération,
 - Essai de phase II chez des volontaires israéliens et des enfants chez des enfants âgés de 4 à 7 ans se sont révélés sans danger et fortement immunogènes.
 - Une flambée d'infection touchant les volontaires 71 à 155 jours 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*-rEPAsucc pour être évalués chez les jeunes enfants de 1 à 4 ans.
 - Bien tolérés et immunogéniques dans cette population

21/10/2009

Mémoire CIFV 2009 C. Sadorge

10

SC599 – Principe d'atténuation



- ΔicsA : perte de la motilité intra-cellulaire et de la capacité de migrer d'une cellule épithéliale à l'autre
- Δent, Δfep : perte de la capacité de chélation du fer
- ΔstxA : perte de la sous-unité catalytique de la toxine de *S. dysenteriae*
- Insertion d'une cassette de résistance au Hg

Shigella dysenteriae 1 ΔicsA Δent Δfep ΔstxA:HgR

21/10/2009

Nature Reviews | Immunology
Mémoire CIFV 2009 C. Sadorge

11

Vers la preuve du Concept – Méthodologie

- Phase I
 - Etude prospective d'escalade de doses 10² à 10⁸ CFU chez des 28 sujets (7 cohortes de 4 volontaires sains) hospitalisés 5 jours après l'administration du vaccin
- Phase II
 - Etude prospective, randomisée, en double aveugle et en 3 groupes parallèles chez 111 sujets ambulatoires : placebo ou 10⁵ CFU ou 10⁷ CFU de la souche vaccinale
- Traitement par la ciprofloxacine (arrêt du portage de la souche)
 - A J4 avant sortie d'hospitalisation (Phase I)
 - Si excrétion lors de la dernière visite (Phase II)
- Durée du suivi des sujets : 28 jours pour les deux essais.

21/10/2009

Mémoire CIFV 2009 C. Sadorge

12

Vers la preuve du Concept – Critères Immunologiques

- Taux de lymphocytes B sécrétant des anticorps (ASC) anti-LPS (IgA, IgG, IgM) mesurés par ELISPOT
 - J0, J9 et J14 (Phase I) et J0, J7, J9 et J11 (Phase II)
 - Répondeurs (Phase II) : les volontaires présentant un taux d'ASC en IgA anti-LPS $\geq 20/10^6$ PBMC à au moins une des mesures après vaccination
- Taux d'anticorps anti-LPS (IgA, IgG, IgM) mesurés par ELISA
 - J0, J7, J14, J21 et J28
 - Répondeurs : volontaires présentant une augmentation du taux d'IgA anti-LPS ≥ 4 fois le taux avant vaccination
- Taux d'anticorps anti-*stxB* (IgA, IgG, IgM) mesurés par ELISA (phase II)

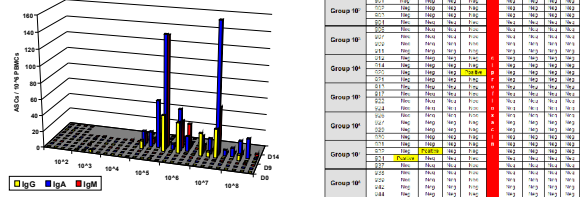
21/10/2009

Mémoire CIFV 2009 C. Sadorge

13

Phase I : Résultats

Anti-LPS ASC / 10^6 PBMC by ELISPOT



- Réponse immunitaire détectable à partir de 10^5 CFU
- Faible excrétion dans les selles (3 volontaires sur 28) avant ciprofloxacine
- Bonne tolérance jusqu'à 10^8 CFU, signes digestifs légers à modérés sans effet-dose ni relation évidente avec le vaccin

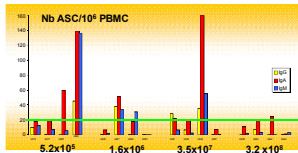
21/10/2009

Mémoire CIFV 2009 C. Sadorge

14

Phase II : Méthodologie

- Démontrer la supériorité de l'immunogénicité de 2 doses (10^5 & 10^7 CFU) de SC599 versus placebo sur le pourcentage de répondeurs
 - Répondeur : volontaire avec un taux de lymphocytes B sécrétant de IgA dirigées contre le LPS supérieur ou égale à $20/10^6$ cellules mononucléées sanguines circulantes à J7 ou J9 ou J11



- Décrire l'intensité et la cinétique de la réponse immunitaire pour tous les isotypes (IgA, IgG et IgM)
- Comparer la tolérance clinique et biologique,
- Comparer les 2 doses entre elles
- Explorer la durée d'excrétion sans confinement

21/10/2009

Mémoire CIFV 2009 C. Sadorge

15

Phase II : Résultats – Immunogénicité (1)

Répondeurs

- ELISPOT : 34,2% (Groupe 10^5 CFU) et 44,4% (Groupe 10^7 CFU)
 - 10^5 vs. placebo $p < 0,001$, 10^7 vs. placebo $p < 0,0001$, NS entre les 2 doses
- ELISA : 31,6% (Groupe 10^5 CFU) et 33,3% (Groupe 10^7 CFU)

Moyennes géométriques

	Groupe Placebo	Groupe 10^5 CFU	Groupe 10^7 CFU
■ IgA	1,51 (1,21 ; 1,87 95% CI)	7,89 (3,82 ; 16,3 95% CI)	11,27 (5,53 ; 23 95% CI)
■ IgG	1,13 (1,01 ; 1,26 95% CI)	3,38 (1,88 ; 6,08 95% CI)	5,46 (2,94 ; 10,14 95% CI)
■ IgM	1,14 (1,03 ; 1,25 95% CI)	6 (3,08 ; 11,7 95% CI)	9,2 (4,54 ; 18,66 95% CI)

21/10/2009

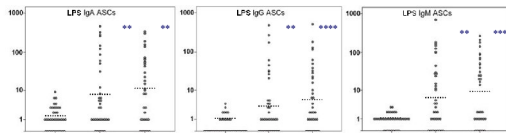
Mémoire CIFV 2009 C. Sadorge

16

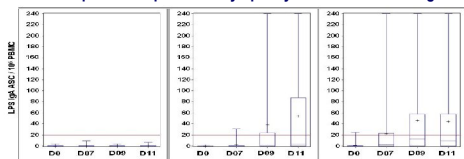
Phase II : Résultats – Immunogénicité (2)

Réponse en ASC (ELISPOT) anti-LPS de Sd1 à J0, J7, J9 et J11

Pic de la réponse post-vaccinale – Moyenne géométrique



Cinétique de la réponse des lymphocytes B sécrétant des IgA



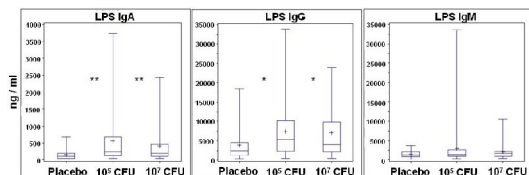
■ * $p < 0,025$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

17

Phase II : Résultats – Immunogénicité (3)

Réponse en anticorps (ELISA) anti-LPS J0, J7, J14, J21 et J28

Pic de la réponse post-vaccinale – Moyenne géométrique



■ * $p < 0,025$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$

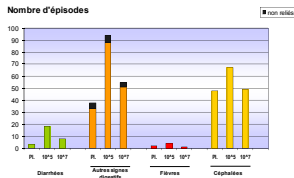
21/10/2009

Mémoire CIFV 2009 C. Sadorge

18

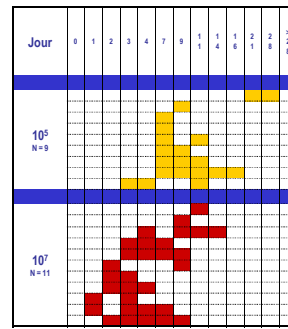
Phase II : Résultats – Tolérance

	Placebo	10 ⁵	10 ⁷	Total
Nb de volontaires avec au moins un EI	35	37	31	103
%	94.6%	97.4%	86.1%	92.8%
Nb d'Eis	182	284	182	648
Reliés	77.5%	82.3%	78.5%	80.0%



- #93% des volontaires ont au moins un EI, 80% sont considérés comme reliés
- Principalement : légers à modérés et digestifs
- Pas d'anomalie biologique notable entre les groupes et durant le suivi des volontaires (en particulier sur les marqueurs d'une infection, d'une atteinte rénale)
- 1 événement indésirable grave inattendu relié au produit : une diarrhée fébrile à SC599 chez une femme du groupe 10⁵

Phase II : Résultats – Profil d'excrétion



- 20 excréteurs : 9 (10⁵) – 11 (10⁷)
- Durée médiane : 5 jours [1 – 11]
- Délai médian d'apparition : 7 jours (10⁵) / 3 (10⁷)
- Confirmation génétique : SC599
- Le profil d'excrétion suit le profil de la réponse immunitaire
- Excrétion intermittente ?

Phase II – Conclusions

- Réponses immunitaires observées dans les groupes 10⁵ & 10⁷ CFU et supérieur au placebo
 - En nombres de répondeurs
 - En nombre de lymphocytes B sécrétant des IgA anti-LPS
 - En titre d'anticorps IgA anti-LPS
- SC599 bien toléré, EI principalement digestifs
- Durée d'excretion identique dans les 2 groupes SC599 mais plus tardive dans le groupe 10⁵ CFU

Conclusions (1)

- Le rationnel pour développer un vaccin vivant administré par voie orale, est d'induire une réponse mucosale 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.

Conclusions (2)

- 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 10⁴ 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 (Coster, 1999).
- 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.

Perspectives

- 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.

Equipes participantes

- **Unité de Pathogénie Microbienne Moléculaire**, Philippe Sansonetti, coordination scientifique
- **Centre d'Investigation Clinique de Vaccinologie Cochin-Pasteur (CICV CP)**, Odile Launay, centre investigateur
- **Saint George Vaccine Institute (SGVI)**, David Lewis, centre investigateur
- **Unité d'Immunité anti-virale, Biothérapie et Vaccins**, Marie-Lise Gougeon, immuno-monitoring
- **Centre de Recherche Vaccinale et Biomédicale (CRVBm)**, Christine Sadorge, coordination technique et représentant du promoteur
- **Henogen**, production du lot clinique
- **Epidémiologie des Maladies émergentes**, Arnaud Fontanet (Muriel Vray & Loïc Chartier)
- **Centre de ressources en biostatistiques, épidémiologie et pharmaco-épidémiologie**, Didier Guillemot (Claire Bernède)
- **Unité de Pathogénie Microbienne Moléculaire**, Yves Germani
- **Service Qualité** (Emmanuelle Boehm & Eloïse Cuitot)

21/10/2009

Mémoire CIFV 2009 C. Sadorge

25