

## 9

## Système immunitaire muqueux et vaccination

La plupart des agents pathogènes bactériens et viraux infectent leurs hôtes respectifs au travers de la barrière muqueuse. Ceci vaut plus particulièrement pour les pathogènes des systèmes respiratoire, intestinal et génital. Ainsi, une forte immunité exprimée à la porte d'entrée même de l'agent infectieux semble être la plus appropriée pour prévenir une infection. Les réponses immunitaires systémique et muqueuse étant par ailleurs induites et contrôlées par des mécanismes partiellement indépendants, la (ou les) stratégie(s) permettant d'induire une réponse immunitaire protectrice au niveau muqueux est un aspect critique du développement de nouveaux vaccins. Alors que la voie parentérale induit principalement une forte immunité cellulaire et humorale, et ceci au niveau systémique seulement, il apparaît de plus en plus que la voie muqueuse est plus apte à stimuler une immunité muqueuse efficace, et même accompagnée d'une forte immunité systémique dans certains cas. Finalement, en évitant l'injection, la voie muqueuse est une méthode non invasive de choix pour la vaccination, particulièrement chez l'enfant.

Le système immunitaire muqueux (SIM) et la problématique de la vaccination par voie muqueuse ont fait l'objet de nombreuses revues de littérature (McGhee et Kiyono, 1993 ; Walker, 1994 ; James, 1997 ; Mestecky et coll., 1997 ; Mowat et Viney, 1997 ; Wu et Russel, 1997). La complexité apparente du SIM a longtemps défié le développement et l'évaluation rationnels de vaccins par voie muqueuse. Il recouvre une très large surface (environ 400 m<sup>2</sup> chez l'homme adulte), comprend la plus forte population de cellules B, T et plasmiques de l'organisme, de même que des cellules capables de traiter et présenter des antigènes, le tout en étroite interaction avec l'épithélium muqueux. Il est d'autre part organisé en sites fonctionnels distincts. Dans les premiers, ou sites inducteurs, le contact est établi avec l'antigène vaccinal qui est alors traité et présenté au système immunitaire en un processus conduisant à la différenciation partielle et la prolifération de lymphocytes B et T. Ces derniers sont alors transportés par voie lymphatique jusqu'aux ganglions lymphatiques régionaux où ils subissent une deuxième phase de différenciation avant d'entrer dans la circulation systémique. Grâce à l'expression de protéines lymphocytaires membranaires (*homing receptors*) spécifiques de ligands

(*mucosal addressins*) exprimés par les cellules endothéliales présentes dans les tissus muqueux et glandulaires, ils vont alors s'établir dans les sites effecteurs du SIM où se produit leur différenciation finale en cellules plasmiques, principalement productrices d'immunoglobulines d'isotype IgA sécrétoires (sIgA). La sécrétion des IgA dimériques au travers des muqueuses et dans les sécrétions glandulaires est la caractéristique majeure de l'immunité muqueuse. Ces anticorps interfèrent avec l'adhérence des agents pathogènes et de leur toxines à la muqueuse et forment des complexes immuns facilitant leur élimination. Le rôle et les mécanismes de l'immunité cellulaire dans la défense immunitaire muqueuse sont aussi partiellement caractérisés (James, 1997).

L'observation du trajet circulaire de différenciation et dissémination des lymphocytes B et T depuis les sites inducteurs jusqu'aux sites effecteurs du SIM a conduit au modèle du système immunitaire muqueux commun (SIMC). Initialement établie chez la souris (McDermott et Bienenstock, 1979), l'existence d'un SIMC a été ultérieurement confirmée chez l'homme (Czerkinsky et coll., 1987). En théorie, le SIMC pourrait permettre de stimuler une immunité protectrice dans des sites effecteurs distants des sites inducteurs impliqués dans l'initiation de la réponse immunitaire. Il apparaît toutefois que le SIMC est compartimentalisé de sorte que la stimulation de sites inducteurs induit une réponse distribuée de façon inégale entre les différents sites effecteurs. En général, la réponse est plus marquée aux sites effecteurs voisins du site inducteur stimulé ou à ceux qui lui sont directement associés en termes de drainage lymphatique (McGhee et Kiyono, 1993 ; Wu et Russell, 1997).

Avant d'aborder la partie analyse de ce chapitre, deux remarques s'imposent. Premièrement, les modèles complexes décrivant les mécanismes d'induction et de régulation de la réponse immunitaire muqueuse aux agents infectieux et après immunisation ont presque exclusivement été développés sur la base d'études effectuées sur des souches de souris consanguines, parfois dans des conditions axéniques. Ces conditions expérimentales, indispensables pour une approche scientifique rigoureuse, n'ont qu'une valeur prédictive pour l'homme. Certains résultats ont en partie été confirmés en essais cliniques indiquant que, dans les grandes lignes, les modèles développés sont applicables. Des différences notables sont cependant constatées. Deuxièmement, la très vaste majorité des essais de vaccins expérimentaux, notamment les tests d'efficacité, font intervenir des systèmes animaux qui, au mieux, ne sont qu'une approximation des conditions rencontrées chez l'homme. Ainsi, même les vaccins candidats les plus prometteurs en phase de développement préclinique peuvent s'avérer inefficaces en essais cliniques. Cette constatation vaut pour les vaccins en général ; sur la base d'une étude récente portant sur 266 projets de vaccinologie menés entre 1983 et 1994, il est remarquable de constater que près de 80 % d'entre eux sont abandonnés dès les premiers essais cliniques en phase I (Struck, 1996).

Au vu de l'ampleur du thème abordé dans ce chapitre et des remarques exprimées ci-dessus, l'analyse qui suit est principalement centrée sur une sélection de publications, le plus souvent récentes, concernant des vaccins testés cliniquement ou déjà commercialisés. Dans un premier sous-chapitre, nous abordons le domaine des vaccins contre les maladies entériques. Le deuxième sous-chapitre tente de faire le point sur l'approche de l'immunisation par voie muqueuse dans un contexte plus large.

## Vaccins pour la prévention des maladies entériques

Les infections diarrhéiques bactériennes et virales sont un problème majeur de santé publique dans le monde entier. Dans les pays en développement, la diarrhée chronique est une cause importante de malnutrition chez les enfants alors que les épisodes diarrhéiques aigus sont associés à des taux de mortalité élevés (Black, 1993). L'approvisionnement insuffisant en eau potable et les conditions sanitaires déplorablement sont les facteurs de risque principaux dans le tiers monde, une situation qui ne va vraisemblablement pas s'améliorer de façon significative dans un proche avenir. Ainsi, la vaccination demeure le moyen le plus réaliste et le plus efficace, aussi bien en termes de santé que de coûts, pour combattre les agents pathogènes entériques dans les régions endémiques du tiers monde. Cependant, même dans les pays industrialisés, les coûts médicaux et sociaux liés aux infections diarrhéiques sont considérables (Black, 1993).

Des vaccins efficaces sont disponibles contre la fièvre typhoïde et, plus récemment, le choléra. Toutefois, aucun vaccin efficace et sûr n'est encore sur le marché contre les agents pathogènes intestinaux les plus fréquents, à savoir les rotavirus, les *Escherichia coli* entérotoxigéniques (ETEC) et les *Shigella* spp. C'est pourquoi l'OMS a donné une haute priorité au développement de tels vaccins (OMS, 1991). L'agent infectieux à l'origine de la majorité des ulcères duodénaux et de nombreux cas de cancer gastrique *Helicobacter pylori* semble aussi être une cible privilégiée pour la vaccination. Nous essayerons ici de faire le point sur l'état du développement de vaccins contre ces infections.

Comme déjà mentionné plus haut, une immunité locale (muqueuse) est la mieux à même de prévenir l'infection dès les premiers contacts d'un agent pathogène avec les voies digestives. Bien que, dans certains cas, un vaccin administré par voie parentérale puisse s'avérer efficace, seule la voie orale est susceptible d'induire une bonne immunité muqueuse au niveau de l'intestin. Deux approches peuvent être envisagées : l'application orale d'un vaccin non vivant (cellules ou virus entiers inactivés, antigène purifié) et un vaccin vivant basé sur une souche atténuée de l'agent infectieux lui-même, ou sur une souche bactérienne ou virale atténuée ou naturellement non pathogène (souche commensale), exprimant un ou plusieurs antigènes protecteurs du même agent. La première approche requiert de grandes quantités d'antigènes

et le problème central réside dans la nécessité de développer des systèmes de présentation d'antigènes appropriés pour assurer la stabilité et la présentation optimale des antigènes vaccinaux, de même que des adjuvants visant à renforcer et/ou à moduler la réponse immunitaire induite (adjuvant muqueux). En ce qui concerne la deuxième approche, la souche vaccinale, obtenue par exemple par atténuation génétique d'une souche virulente, est susceptible de se propager dans l'intestin de la personne vaccinée et conduire ainsi à une infection avortée bénigne mais suffisante pour induire une immunité locale du même type que celle stimulée par l'infection naturelle. Dans ces conditions, la dose à administrer est beaucoup plus faible et le vaccin ne requiert en principe pas d'adjuvant. La difficulté ici consiste à trouver un équilibre entre le degré d'atténuation (innocuité) de la souche vaccinale et sa capacité de coloniser la muqueuse de l'hôte (immunogénicité).

### Fièvre typhoïde

La fièvre typhoïde, infection systémique par *Salmonella typhi*, est devenue extrêmement rare dans les pays industrialisés grâce à l'amélioration constante des conditions d'hygiène et d'approvisionnement en eau potable. La situation est toute autre dans les pays en développement où cette affection est endémique et près de 600 000 personnes en décèdent chaque année (OMS-UNICEF, 1996). De plus, l'incidence des souches de *S. typhi* plurirésistantes aux antibiotiques augmente rapidement depuis 1990 en particulier dans le sous-continent indien et en Asie du Sud-Est.

Le vaccin typhoïdique parentéral à cellules entières tuées a montré un bon niveau de protection en essais de champ. Il présente cependant un fort taux de réactions locales et systémiques qui limite fortement son acceptation. Par ailleurs, deux vaccins bien tolérés et efficaces sont actuellement sur le marché. Un vaccin vivant oral basé sur la souche atténuée de *S. typhi* Ty21a (3 doses) et un vaccin parentéral basé sur l'antigène capsulaire polysaccharidique Vi (1 dose). Les deux vaccins ont démontré un bon niveau de protection, de l'ordre de 60 % à 80 %, pendant 7 ans pour Ty21a (Levine et coll., 1997) et au moins 17-21 mois (plus long intervalle testé) pour Vi (Acharya et coll., 1987 ; Klugman et coll., 1987), dans des essais de champ en régions endémiques. Avec plus de 200 millions de doses administrées dans le monde et un taux extrêmement faible d'effets secondaires, Ty21a est désormais un standard de référence pour le développement de vaccins vivants oraux. Récemment, des essais cliniques ont montré que la souche Ty21a pouvait être associée avec succès avec une souche recombinante vivante atténuée de *Vibrio cholerae* pour l'immunisation combinée par voie orale contre la fièvre typhoïde et le choléra (Cryz et coll., 1995 ; Kollaritsch et coll., 1996, 1997).

Le développement de nouveaux vaccins typhoïdiques vise à produire de nouvelles souches atténuées qui portent des mutations définies affectant certaines voies métaboliques, la synthèse de protéines de stress, des systèmes

globaux de régulation métabolique ou impliqués dans le contrôle de la virulence, et/ou des caractères spécifiques de virulence (pour une revue voir Levine et coll., 1997). De telles recherches pourraient dans le cas idéal aboutir à un vaccin vivant oral à dose unique conférant un haut taux de protection à long terme, par exemple pendant l'enfance et l'adolescence (pic d'incidence 5 à 19 ans) pour des enfants immunisés à l'entrée à l'école. Cependant, la difficulté majeure réside dans la marge étroite observée en essais cliniques entre l'innocuité de la souche vaccinale et son immunogénicité. La souche sauvage virulente utilisée pour dériver une souche vaccinale candidate apparaît comme un facteur critique et le modèle animal classique (*Salmonella typhimurium*/souris) s'est malheureusement révélé peu prédictif. Dans l'état actuel des essais cliniques, deux souches semblent ressortir du lot : CVD908-*htrA* (*aroC*, *aroD*, *htrA*) (Tacket et coll., 1997a) et Ty800 (*phoP/phoQ*) (Hohmann et coll., 1996). Des essais sur un plus grand nombre de volontaires seront nécessaires pour confirmer l'innocuité et l'immunogénicité observées dans les essais en phase I. L'évaluation de l'efficacité de nouvelles souches vaccinales typhoïdiques est par ailleurs rendue difficile par l'absence, en partie pour des raisons éthiques, d'un modèle d'infection expérimentale (challenge) chez l'homme.

## Choléra

L'infection intestinale par le *Vibrio cholerae* est responsable d'environ 120 000 décès par an, essentiellement parmi les enfants de moins de 5 ans dans les pays en développement. Contrairement à la fièvre typhoïde caractérisée par une infection systémique de l'organisme par l'agent pathogène, l'infection par *V. cholerae* se déroule sans invasion active de la muqueuse intestinale. Les vibrions prolifèrent dans l'intestin grêle, accèdent à la surface de la muqueuse et sécrètent une toxine puissante, la toxine cholérique (CT) dont l'action sur les cellules épithéliales a pour conséquence la perte massive en liquide et électrolytes caractéristique des formes graves du choléra. Ainsi, *V. cholerae* est le type même de l'agent pathogène contre lequel une forte immunité locale, notamment sécrétrice, devrait s'avérer optimale. Depuis les années vingt et pendant près de soixante-dix ans, seuls des vaccins inactivés parentéraux réactogènes et peu immunogènes étaient disponibles. Récemment, deux vaccins oraux efficaces ont été développés et sont sur le marché dans certains pays.

Le premier vaccin, désigné par les appellations B-WC ou WC/rBS suivant les publications, est administré en 2 ou 3 doses. Il comprend  $10^{11}$  vibrions tués et 1 mg de rCTB (sous-unité B non toxique de la toxine cholérique recombinante) par dose (Holmgren et coll., 1997). Dans un essai de champ à grande échelle au Bangladesh, ce vaccin administré en 3 doses a pu induire un taux de protection de l'ordre de 85 % pendant 6 mois et de 50 % pendant 3 ans. Chez les jeunes enfants (2 à 5 ans), un taux de protection significatif a été observé pendant 2 ans contre les vibrions de biotype classique, la protection

contre le biotype El Tor se révélant de très courte durée. Dans le groupe d'âge supérieur à 5 ans, une protection significative a été observée jusqu'à 3 ans contre les deux biotypes, avec un taux supérieur pour le biotype classique (Van Loon et coll., 1996). Un essai au Pérou avec une série de 2 doses du vaccin B-WC a révélé un taux de protection de 85 % durant 6 mois (Sanchez et coll., 1994). Un vaccin du même type produit au Viêt-nam a montré une efficacité de 66 % dans un essai de terrain effectué dans ce pays (Trach et coll., 1997). Un vaccin combiné O1/O139 basé sur le même principe a récemment été testé en phase I (Jertborn et coll., 1996).

Le second vaccin est basé sur une souche recombinante de *V. cholerae*, CVD 103-HgR (biotype classique, O-sérotype Inaba) (Levine et coll., 1988), et administré en une seule dose orale d'environ  $5 \times 10^8$  organismes vivants. La souche a été atténuée par une délétion spécifique des deux copies chromosomiques du gène codant pour la sous-unité A (CtxA) de la toxine cholérique, tout en maintenant l'expression de la sous-unité B (CtxB) immunogène. L'introduction d'un gène marqueur de résistance au mercure permet l'identification de la souche vaccinale (Favre et coll., 1996a). Ce vaccin a été largement testé en essais cliniques, y compris dans des essais d'infection expérimentale (challenge) avec des souches sauvages de biotypes et/ou sérotypes homologues et hétérologues. Ce vaccin est très bien toléré et très immunogène ; un taux de protection de 80-100 % a été observé contre toute diarrhée induite par le biotype classique homologue (protection acquise en moins de 8 jours et conférée pour au moins 6 mois, le plus long intervalle testé avant l'épreuve de « challenge ») et de l'ordre de 60 % contre le biotype El Tor. Dans tous les cas, un taux de protection de 100 % a été observé contre les formes sévères du choléra (*cholera gravis*) (Levine et Kaper, 1993 ; Kaper et coll., 1997). Le vaccin basé sur la souche CVD 103-HgR est déjà en vente dans un certain nombre de pays et en cours d'enregistrement centralisé en Europe ; il est principalement destiné aux voyageurs vers les régions endémiques. La souche vaccinale CVD103-HgR peut être administrée en combinaison avec le vaccin vivant oral antityphoïdique. D'autres souches candidates, construites selon le même principe, sont en cours d'évaluation et visent à augmenter le taux de protection contre le biotype El Tor et à immuniser contre le *V. cholerae* à sérotype O139 (Favre et coll., 1996b ; Sack et coll., 1997a et b ; Tacket et coll., 1997 ; Taylor et coll., 1997b).

### ***Escherichia coli* entéro-toxigéniques (ETEC)**

Les différentes souches d'*Escherichia coli* entéro-toxigéniques (ETEC) sont la première cause de diarrhée dans les pays en développement, principalement chez les enfants de moins de 5 ans (Black, 1993). En termes de mortalité due aux maladies diarrhéiques, les ETEC occupent la 4<sup>e</sup> place (380 000 décès par an) après les rotavirus (870 000), la fièvre typhoïde (600 000) et la shigellose (600 000) alors que le choléra vient en 5<sup>e</sup> position (120 000) (OMS-UNICEF, 1996). Les ETEC sont également à l'origine de 30 % à 50 % des

infections diarrhéiques contractées par près de la moitié des voyageurs des pays industrialisés lors de leur déplacement en Afrique, en Asie et en Amérique latine (Black, 1993). Un vaccin ETEC efficace à large spectre aurait ainsi un impact important, tant dans les régions endémiques que pour la médecine du voyage.

Comme pour le choléra, la pathogénèse des diarrhées à ETEC résulte de la colonisation de l'intestin grêle et de la sécrétion d'une ou deux toxines principales, la toxine thermo-labile (LT) qui est immunogénique et/ou la toxine thermo-stable (ST) qui, en raison de sa petite taille (18-19 acides aminés) n'est pas immunogénique (Levine et coll., 1983 ; Nataro et Kaper, 1998). La toxine LT est produite par environ deux tiers des ETEC et présente 80 % d'identité avec la toxine cholérique (CT), raison probable pour laquelle le vaccin oral contre le choléra B-WC a induit une immunité croisée à court terme contre les ETEC sécrétrices de LT dans des essais en phase III (Clemens et coll., 1988 ; Peltola et coll., 1991). Cependant, le développement d'un vaccin ETEC efficace doit également prendre en compte le fait qu'une immunité à long terme devrait être induite contre les principaux facteurs de colonisation (CF) bactériens, notamment les pili – ou *fimbriae* – et autres appendices protéiniques exprimés à la surface des ETEC, leur permettant d'adhérer à l'épithélium intestinal (Svennerholm et coll., 1997). Des études chez l'animal ont en effet montré qu'une immunité CF-spécifique protège contre une infection subséquente par une souche virulente exprimant le CF homologue. Une immunité contre l'antigène somatique O, soit la partie du lipopolysaccharide (LPS) qui détermine la spécificité O du pathogène, et, dans une moindre mesure, contre l'antigène flagellaire (antigène H) pourrait également jouer un rôle.

Malheureusement, au contraire de *S. typhi* et *V. cholerae*, les ETEC présentent une grande variabilité antigénique de surface de sorte qu'un vaccin basé sur un antigène ou une souche unique ne peut être envisagé. Sur la base de données épidémiologiques, un vaccin efficace basé sur un nombre limité de souches exprimant les types des CF les plus fréquents pourrait cependant permettre de protéger contre 70-80 % des infections à ETEC (Wolf, 1997).

Au vu du mode d'infection, très proche de celui du choléra, un vaccin oral devrait être le plus approprié pour l'immunisation contre les infections à ETEC. Différents candidats vaccins oraux ont été développés, basés sur :

- des toxoïdes LT/ST purifiés (Tacket et Levine, 1997) ;
- des CF purifiés administrés seuls ou enveloppés dans des microsphères (Evans et coll., 1984 ; Tacket et coll., 1994 ; Tacket et Levine, 1997) ;
- des cellules d'ETEC entières tuées (Evans et coll., 1988 ; Werneras et coll., 1992 ; Svennerholm et coll., 1997) ;
- des souche ETEC atténuées vivantes (Tacket et Levine, 1997) ;
- des souches recombinantes vivantes atténuées de *Salmonella* et *Shigella* exprimant des CF de ETEC (Giron et coll., 1995 ; Noriega et coll., 1996a).

Certains de ces vaccins ont été testés en essais cliniques de phase I. Récemment même, des pommes de terre transgéniques exprimant la sous-unité B de la toxine LT (LTB) se sont révélées immunogènes après application par voie orale à des volontaires (Tacket et coll., 1998).

Le vaccin le plus avancé, quant à la couverture potentielle des infections par les ETEC et quant aux essais déjà effectués chez l'homme, utilise la même stratégie que le vaccin oral B-WC contre le choléra (Wenneras et coll., 1992 ; Ahren et coll., 1993). Dans sa formulation actuelle, le vaccin est une combinaison de 5 souches ETEC ( $10^{11}$  cellules inactivées totales et 1 mg de rCTB par dose) exprimant les 7 CF les plus fréquents. Le schéma complet de vaccination comprend 2 ou 3 doses administrées à 2 semaines d'intervalle. Le vaccin a fait preuve d'une bonne immunogénicité en essais cliniques de phase I et II en Suède, en Egypte et au Bangladesh (Svennerholm et coll., 1997 ; Jertborn et coll., 1998 ; Savarino et coll., 1998). Différents essais en phase III sont prévus.

Compte tenu du temps nécessaire à la conduite et à l'analyse des essais à grande échelle, puis à l'enregistrement du vaccin auprès des autorités compétentes, il est improbable qu'un vaccin ETEC soit sur le marché avant 4 à 5 ans.

## Shigellose

La shigellose est une infection causée par les bactéries du genre *Shigella* qui est endémique dans le monde entier et à l'origine d'environ 600 000 décès par année, principalement parmi les enfants entre 1 et 4 ans dans les pays en développement (OMS, 1997). Les *Shigella* spp. sont des agents pathogènes intracellulaires facultatifs et la pathogenèse de l'infection est caractérisée par l'invasion et la dissémination de l'agent pathogène de cellule à cellule au niveau de la muqueuse du côlon. En général, l'infection est limitée à cet endroit. Cependant, des complications extra-intestinales telles que la septicémie ne sont pas rares chez les jeunes enfants souffrant de malnutrition (Lindberg et Pål, 1993).

Des études épidémiologiques et expérimentales (épreuves de « challenge ») ont montré que l'infection induit chez l'homme une immunité protectrice contre une infection subséquente par une souche de *Shigella* du sérotype O homologue (Dupont et coll., 1972 ; Cohen et coll., 1988 ; Herrington et coll., 1990). Compte tenu de la situation épidémiologique dans les pays en développement, un bon niveau de couverture vaccinale pourrait être assuré par un vaccin combinant les principaux sérotypes de *Shigella* spp., à savoir *S. flexneri* 2a et 2b, *S. dysenteriae* type 1 et *S. sonnei*. Un vaccin contre *S. sonnei*, le sérotype prédominant dans les pays industrialisés serait également souhaitable. Aux Etats-Unis, les populations cibles pour la vaccination sont les pensionnaires et personnels des garderies d'enfants et des institutions de soin, les populations carcérales, les travailleurs immigrants, les Indiens des réserves

fédérales, les militaires et les voyageurs. La mise au point de vaccins est cependant compliquée par le fait qu'aucun modèle animal adéquat n'est disponible.

En dépit de nombreuses recherches menées depuis plus de trente ans, aucun vaccin contre la shigellose n'est actuellement disponible sur le marché. Quatre approches principales ont été tentées pour développer des vaccins contre la shigellose (OMS, 1997) :

- des souches-vecteurs vivantes exprimant des antigènes protecteurs de *Shigella* spp. ;
- des souches de *Shigella* spp. atténuées par diverses mutations ;
- des lipopolysaccharides (LPS) purifiés de *Shigella* spp. associés à des protéosomes ;
- des vaccins basés sur l'antigène polysaccharidique O (antigène O) de *Shigella* spp. conjugué à des protéines « carriers ».

Les trois premiers types de vaccins sont administrés par voie orale, le dernier par voie parentérale.

Dans l'approche « vecteurs vivants », les souches candidates évaluées en essais cliniques exprimaient l'antigène O de différents sérotypes de *Shigella*, parfois avec co-expression de déterminants de virulence (pour une revue voir Hale et Venkatesan, 1997). Il s'agissait par exemple de la souche de vaccin typhoïdique *S. typhi* Ty21a contenant le plasmide de virulence de *S. sonnei*, d'une souche commensale non invasive d'*E. coli* portant les gènes responsables de la synthèse de l'antigène O de *S. flexneri* 2a intégrés dans le chromosome, ou de souches hybrides *E. coli* K-12/*S. flexneri* 2a atténuées par différentes mutations et contenant le plasmide de virulence de *S. flexneri* 5 et les gènes de synthèse de l'antigène O de *S. flexneri* 2a. D'autres souches candidates sont basées sur une souche atténuée de *S. flexneri* Y exprimant l'antigène O de *S. dysenteriae* type 1 avec ou sans expression conjointe de la sous-unité B de la toxine Shiga (Fält et coll., 1995 ; Tzschaschel et coll., 1996 ; Klee et coll., 1997). Finalement, des souches recombinantes basées sur la souche vaccinale *V. cholerae* CVD 103-HgR exprimant le sérotype O de *S. sonnei* ont également été construites (Favre et coll., 1996c ; Viret et coll., 1996). Parmi les souches testées en essais cliniques, aucune n'a pour l'instant fourni des résultats permettant d'envisager le développement d'un vaccin sûr et efficace.

La construction rationnelle de souches atténuées de *Shigella* spp. a largement bénéficié des connaissances récentes sur la génétique moléculaire des mécanismes de virulence chez ces organismes. Comme pour *S. typhi*, l'atténuation par des mutations dans les gènes responsables de la biosynthèse des composés aromatiques (gènes *aro*) s'est révélée insuffisante pour assurer un niveau d'innocuité de la souche vaccinale comparable aux standards de référence en la matière (*S. typhi* Ty21a et *V. cholerae* CVD 103-HgR) (Li et coll., 1992 ; Kärnell et coll., 1995 ; pour une revue voir Noriega et coll., 1997). La combinaison du même type de mutations, ou de mutations affectant la synthèse des bases puriques, avec d'autres mutations situées dans les gènes de

virulence a abouti à quelques souches candidates (Kotloff et coll., 1996 ; Noriega et coll., 1996a). La totale innocuité et l'immunogénicité de ces souches chez l'homme restent encore à démontrer. Finalement, des souches basées uniquement sur des mutations atténuantes dans les gènes de virulence ont été développées (Sansonnetti et Arondel, 1989 ; Sansonnetti et coll., 1991 ; Bâzru et coll., 1996, 1998).

En tant que déterminant majeur du sérotype O des bactéries pathogènes Gram négatives, l'antigène O est un bon candidat pour un vaccin sous-unité contre la shigellose. De par sa nature polysaccharidique et son faible poids moléculaire, l'antigène purifié n'est cependant pas immunogène. Sous forme conjuguée à des protéines immunogènes telles que l'anatoxine tétanique ou l'exotoxine A recombinante de *Pseudomonas aeruginosa*, cet antigène est toutefois très immunogène après application par voie intramusculaire. Des vaccins conjugués basés sur les antigènes O purifiés à partir des sérotypes majeurs de *Shigella* ont été développés (Taylor et coll., 1993). Un vaccin conjugué contre *S. sonnei* a récemment conféré un taux de protection significatif dans un essai de terrain (Cohen et coll., 1996, 1997). Des vaccins similaires contre d'autres sérotypes sont en cours de préparation. Le taux de protection conféré par de tels vaccins à des volontaires immunologiquement naïfs reste à évaluer.

Des particules appelées protéosomes basées sur un complexe de protéines de la membrane externe (OMP) de *Neisseria meningitidis* peuvent être utilisées comme vecteur pour la présentation d'antigènes. Ce type de présentation a été largement testé dans des vaccins candidats contre les infections à méningocoques. Un des vaccins commercialisés contre *Haemophilus influenzae* de type b est également basé sur des préparations protéiniques similaires. Des molécules amphotères telles que les LPS conviennent particulièrement bien à la présentation par les protéosomes ; leur partie hydrophobe (lipide A) assure l'ancrage dans le protéosome et leur région antigénique (antigène O) est présentée de façon optimale à la surface. Des essais précliniques d'un vaccin candidat LPS-protéosomique contre *S. sonnei* a montré que ce vaccin administré par la voie intranasale est plus immunogène que par la voie orale. Ces résultats ont été confirmés dans un essai clinique en phase I. D'autres essais d'innocuité et d'immunogénicité sur un plus grand nombre de volontaires sont prévus (Lowell, 1997).

En conclusion, de nombreuses approches sont en cours d'évaluation pour le développement de vaccins anti-*Shigella* spp. Compte tenu toutefois de toutes les questions qui subsistent, notamment quant à l'innocuité et l'efficacité réelle des vaccins candidats chez l'homme, la mise sur le marché d'un vaccin contre la shigellose est improbable avant 5 ans.

## Rotavirus

Responsables annuellement d'environ 125 millions de cas de diarrhée et de près de 900 000 décès, les rotavirus sont la principale cause des diarrhées infantiles aiguës dans le monde, particulièrement dans les pays en développement. Indépendamment de leur pays de naissance, pratiquement tous les enfants subissent au moins une infection à rotavirus au cours des 5 premières années de leur vie, de sorte que 1 enfant sur 40 aux Etats-Unis et en moyenne 1 sur 30 dans les pays en développement doit être hospitalisé. Aux Etats-Unis, où plus de 3 millions de cas de diarrhée à rotavirus surviennent chaque année, les coûts médicaux directs sont de l'ordre de 500 millions de dollars par an (Glass et coll., 1994, 1996 ; Nakagomi et Nakagomi, 1996). En France, environ 700 000 nourrissons auraient été touchés lors du pic épidémique hivernal 1995-1996 (Desenclos, 1997).

Le rotavirus est un virus non enveloppé appartenant à la famille des réoviridés et dont le génome segmenté comprend 11 molécules d'ARN bicaténaires (Estes, 1996). De par la configuration segmentée du génome, comme pour le virus de la grippe, des échanges de segments d'ARN peuvent intervenir entre souches de rotavirus au cours d'une infection virale mixte et aboutir à des souches dites réassortantes. Quatre sérotypes viraux G1-G4, déterminés antigéniquement au niveau de la glycoprotéine VP7 (ou protéine G) de la capsid virale, sont globalement responsables de la majorité des infections, mais d'autres sérotypes peuvent prévaloir dans certains pays (Gentsch et coll., 1996). Les protéines VP7 et VP4 (ou P protéine), une autre protéine de la capsid externe, et dans une certaine mesure VP6, une protéine de la capsid interne, sont les déterminants principaux d'une immunité protectrice. L'infection naturelle confère une immunité sérotype-spécifique et dans une moindre mesure une immunité croisée protectrice. Une réaction immunologique croisée a parfois été observée entre souches animales et humaines et certaines isolats humains se sont révélés être des souches réassortantes hybrides animales : humaines (Midthun et Kapikian, 1996 ; Offit, 1996).

Le développement de vaccins contre les infections à rotavirus est en partie basé sur cette dernière observation. En effet, différentes souches virales réassortantes (bovine : humaine, simienne : humaine) sont à l'origine de vaccins largement testés en essai clinique et sur le terrain. D'autres vaccins candidats sont basés sur des souches humaines atténuées (Kapikian et coll., 1996a ; Midthun et Kapikian, 1996 ; Offit et coll., 1997 ; Berstein et coll., 1998).

Deux vaccins réassortants tétravalents sont à l'heure actuelle les plus avancés (Clark et coll., 1996 ; Kapikian et coll., 1996a et b ; Glass et coll., 1997). L'un de ceux-ci, RRV-TV, vient d'obtenir une autorisation de mise sur le marché aux Etats-Unis et est en cours d'enregistrement en Europe. Il comprend une souche virale simienne (rhésus) de sérotype G3, et trois souches réassortantes rhésus : humaines de sérotypes G1, G2 et G4. Le vaccin est administré en 3 doses orales à intervalle de 2 mois, chaque dose contenant  $10^5$  virus vivants

de chacune des souches. L'interférence due aux anticorps maternels et l'augmentation de l'incidence des effets secondaires (fièvre de 38-39 °C, surtout après la première dose de vaccin) après une vaccination tardive font que l'application du vaccin doit commencer dans une fenêtre temporelle réduite, par exemple entre 2 et 6 mois. Dans sa formulation définitive, le vaccin a été testé à grande échelle sur des nourrissons aux Etats-Unis (Dennehy et coll., 1996 ; Kapikian et coll., 1996b ; Santosham et coll., 1997) et en Finlande (Vesikari et Joensuu, 1996 ; Joensuu et coll., 1997) et s'est révélé très efficace avec des taux de protection de 100 % contre les symptômes diarrhéiques les plus graves (déshydratation), de 80 % à 90 % contre les diarrhées cliniques et d'environ 50 % contre toute diarrhée. Dans un essai récent au Vénézuéla, les taux de protection étaient de 88 % contre les diarrhées sévères et 48 % contre toute diarrhée alors qu'une réduction de 70 % des cas d'hospitalisation a également été observée ; ces données indiquent qu'un tel vaccin pourrait également s'avérer efficace dans certains pays en voie de développement (Perez-Schael et coll., 1997). Un bon niveau de protection a également été obtenu au Brésil (Linhares et coll., 1996). Le taux de protection était cependant très inférieur, voire nul contre toute diarrhée, dans un essai au Pérou (Lanata et coll., 1996). Le vaccin n'a encore été testé ni en Afrique ni en Asie, régions où l'incidence de l'infection est telle que la vaccination devra le cas échéant s'effectuer dès la naissance. Selon des études menées aux Etats-Unis, la vaccination systématique des nourrissons (3 doses entre 2 et 6 mois administrées à des dates compatibles avec le calendrier vaccinal) présenterait un rapport coût-bénéfice favorable (Smith et coll., 1995). De telles données font actuellement défaut en France.

Des approches alternatives aux souches réassortantes sont également en cours d'évaluation (Conner et coll., 1996a et b ; Offit et coll., 1997).

### ***Helicobacter pylori***

En 1983, la publication de la découverte d'*Helicobacter pylori*, bactérie hélicoïdale productrice d'uréase, par deux chercheurs australiens et sa culture à partir de la muqueuse gastrique de patients atteints de gastrite et d'ulcères fut une véritable révolution pour le monde de la gastroentérologie (Marshall, 1983 ; Warren, 1983). L'idée même qu'un agent bactérien puisse proliférer dans cet environnement hostile et causer ces deux types d'affections suscita passablement de scepticisme pendant près de dix ans jusqu'à la démonstration du fait que l'éradication de l'agent pathogène par un traitement médicamenteux conduisait à la guérison (Valle et coll., 1991 ; Hentschel et coll., 1993). En 1994, l'Institut américain de la santé (NIH) recommandait la thérapie antimicrobienne pour tous les patients atteints d'ulcères avec diagnostic confirmé pour *H. pylori* (Yamada et coll. in Anonymous, 1994).

La prévalence de cet organisme dans la population mondiale est en moyenne de 50 % et varie, entre pays et à l'intérieur d'un pays, en fonction du statut socio-économique. Elle est ainsi de 20 % à 30 % dans les pays industrialisés

(France : environ 30 %, mais 45 % dans un échantillon de consultants pour symptomatologie digestive) et de 70 % à 90 % dans les pays en développement. L'infection intervient surtout durant l'enfance avec une probabilité d'autant plus forte que la taille de la famille et la promiscuité sont plus grandes (Anonymous, 1996).

L'habitat naturel d'*H. pylori* est la muqueuse gastrique humaine ; des bactéries apparentées ont été identifiées dans d'autres espèces animales. Après ingestion de la bactérie, celle-ci résiste à l'acidité gastrique grâce à son aptitude à produire une uréase, traverse le mucus qui recouvre l'épithélium, puis prolifère et colonise la surface épithéliale. L'infection induit une réponse immunitaire humorale (anticorps sériques) qui est cependant inefficace pour éradiquer l'agent pathogène ; elle provoque aussi une forte réponse inflammatoire locale conduisant à une gastrite chronique avec un risque potentiel d'induction d'une réponse de type auto-immun (Ferrero, 1997). La présence d'*H. pylori* est fortement liée (90 %) au diagnostic de gastrite chronique et à la symptomatologie ulcéreuse gastroduodénale. L'infection serait responsable d'environ 95 % des ulcères duodénaux et de 70 % à 80 % des ulcères gastriques. En France, le risque cumulé de développer une maladie ulcéreuse duodénale au cours de la vie est d'environ 10 %, l'incidence annuelle étant de 0,2 % chez l'adulte, soit 60 à 80 000 nouveaux cas ; la mortalité annuelle associée est estimée à 800 cas (Anonymous, 1996). De plus, le rôle de l'agent pathogène en tant qu'agent causal, avec d'autres facteurs d'ordre nutritionnel ou liés à l'hôte, des adénocarcinomes et lymphomes non hodgkinien gastriques est débattu de sorte qu'en 1994 l'Agence internationale pour la recherche sur le cancer de l'OMS a classifié *H. pylori* comme un agent carcinogène de classe 1 (IARC, 1994). Depuis la révolution industrielle, les changements drastiques du niveau de vie, les progrès de l'hygiène et l'augmentation de l'espérance de vie ont totalement changé l'épidémiologie de ce micro-organisme et indirectement l'incidence relative des différentes manifestations symptomatologiques associées (Parsonnet, 1996).

En dépit de la réaction inflammatoire induite par l'infection, des cas d'éradication spontanée ont rarement été documentés. Le traitement par des antimicrobiens est généralement prescrit pour les cas diagnostiqués d'ulcère gastrique ou duodéal. Actuellement, le traitement de choix consiste en une trithérapie combinant un antisécrétoire et deux antibiotiques à raison de 2 doses journalières pendant une à deux semaines. Des taux d'éradication de l'ordre de 90 % peuvent ainsi être obtenus. Le taux de récurrence infectieuse est de l'ordre de 5 % la première année et de 0,3 % à 0,5 % les autres années (probablement suite à une réinfection, ce taux étant équivalent à l'incidence annuelle de l'infection chez l'adulte). En dépit de bons taux de réussite, les traitements médicamenteux sont difficilement applicables à grande échelle en raison notamment de leur coût élevé. De plus, l'apparition de souches résistantes aux antibiotiques pourrait à l'avenir limiter l'efficacité des thérapies de

sorte que le développement de stratégies immunothérapeutiques passives ou actives est très souhaitable (Yamada et coll. *in* Anonymous 1994 ; De Korwin et Lozniewski, 1996).

De nombreux projets de recherche visant au développement de vaccins sont en cours (Ferrero et Labigne, 1996 ; Lee, 1996 ; Telford et Ghiara, 1996 ; Haas et Meyer, 1997 ; Lee et Doidge, 1997). Les plus avancés (uréase recombinante purifiée administrée par voie orale avec ou sans adjuvant muqueux LT) ont atteint le stade des premiers essais cliniques sur un petit nombre de volontaires. Pour l'instant les résultats sont mitigés. L'application orale de doses massives (60 mg, 1 fois par semaine pendant 4 semaines) d'antigène seul chez des volontaires infectés n'a pas produit d'effet secondaire notable ; aucun volontaire n'a cependant montré des signes d'éradication du pathogène (Kreiss et coll., 1996). Par ailleurs, l'application conjointe d'uréase et de 10 µg d'holotoxine LT a engendré un taux de toxicité trop élevé au niveau intestinal dans un autre groupe de volontaires de sorte que la dose de LT a dû être réduite à 5 µg pour la fin de l'essai. Au cours de cet essai, le taux de séroconversion contre l'uréase fut faible et bien qu'une réduction transitoire de la charge bactérienne ait été observée chez certains volontaires, l'agent pathogène n'a été éradiqué chez aucun d'entre eux (Michetti et coll., 1997 ; Corthésy-Theulaz et coll., 1998).

L'approche vecteur vivant fait aussi l'objet de nombreuses études chez l'animal. Récemment, l'immunisation intranasale de souris par une souche atténuée de *S. typhimurium*, exprimant les deux sous-unités de l'uréase, UreA et UreB, a conféré une immunité protectrice contre une souche de *H. pylori* adaptée à cet animal (Corthésy-Theulaz et coll., 1998). Cette approche pourrait également être envisagée chez l'homme lorsqu'une souche-vecteur équivalente prouvée sûre et efficace sera disponible.

Au vu des données épidémiologiques et des questions encore ouvertes concernant les risques potentiels d'induction d'une réponse immunitaire non appropriée (Lee, 1996), une vaccination prophylactique à grande échelle de la population à risque est à l'heure actuelle difficilement envisageable. Cependant, un vaccin à usage thérapeutique visant à l'éradication du pathogène serait une alternative attractive au traitement médicamenteux. Le développement d'un tel vaccin est d'une grande complexité car, en plus de l'identification du ou des antigène(s) protecteur(s), il exige la mise au point et l'évaluation concomitante de nouveaux véhicules et adjuvants. Ainsi, au vu du caractère encore très expérimental de la recherche dans ce domaine et des résultats des premiers essais cliniques, la mise sur le marché d'un vaccin contre *H. pylori* est improbable avant 7 à 10 ans.

## Vaccins actifs par voie muqueuse

Les tissus muqueux de l'organisme, de par leur surface considérable et leur structure histologique, constituent la porte d'entrée privilégiée pour la plupart des agents pathogènes. Pour pallier ce danger, la muqueuse, particulièrement au niveau des systèmes respiratoire et digestif, dispose d'un système immunitaire propre capable d'une réponse plus ou moins ciblée dans la région muqueuse proche du site de contact avec l'agent pathogène.

En plus de cette réponse locale, on a pu montrer chez l'animal, principalement la souris mais aussi le singe (Russel et coll., 1996), et dans une certaine mesure chez l'homme également (Quiding-Järbrink et coll., 1995 ; Nardelli-Haeffliger et coll., 1996 ; Bergquist et coll., 1997a ; Kozlowski et coll., 1997), que la mobilisation des sites inducteurs du système immunitaire muqueux dans une région donnée, par exemple le rhinopharynx ou l'intestin, peut le cas échéant également induire une réponse au niveau de sites effecteurs distants ; cette réponse est généralement plus faible que la réponse locale correspondante. De telles observations ont conduit à la notion de système immunitaire muqueux commun (SIMC) (McGhee et Kiyono, 1993 ; Wu et Russel, 1997).

Une telle stratégie de défense a cependant pour corollaire le fait que le système immunitaire muqueux n'est que peu ou pas du tout mobilisé par une vaccination parentérale. Ainsi, en dépit de travaux de recherche visant, par le biais d'adjuvants, à induire une immunité muqueuse au moyen d'une vaccination parentérale (Chin et coll., 1996 ; Daynes et coll., 1996), l'opinion prévaut qu'une vaccination par voie muqueuse est la plus appropriée. De plus, certaines approches d'immunisation par voie muqueuse présentent l'avantage d'induire une immunité muqueuse aussi bien que systémique (Mestecky et coll., 1997). Pour ces différentes raisons, la vaccination par voie muqueuse fait l'objet d'une intense recherche multidisciplinaire faisant intervenir des domaines tels que la génétique moléculaire des agents pathogènes considérés (dissection des mécanismes de pathogénicité, construction de souches atténuées), la biologie cellulaire (interaction pathogène-hôte) et l'immunologie (réponses inflammatoire et spécifique, cellulaire et humorale). Les techniques biochimiques de purification d'antigènes, de même que le développement de nouveaux systèmes pour l'application optimale et contrôlée des antigènes vaccinaux au niveau des muqueuses, sont également indispensables (Shalaby, 1995 ; Mestecky et coll., 1997 ; Sabbaj et coll., 1997).

Deux catégories d'approches peuvent être distinguées :

- les vaccins non vivants (bactéries et virus inactivés, vaccins sous-unités) ;
- les vaccins vivants, soit des souches bactériennes ou virales vivantes atténuées dérivées de l'agent pathogène concerné. De telles souches peuvent également être modifiées génétiquement de sorte qu'elles expriment un ou plusieurs antigènes protecteurs provenant d'un autre agent pathogène (vecteurs vivants).

## Vaccins non vivants et adjuvants muqueux

Bactéries ou virus entiers inactivés peuvent être administrés par voie muqueuse. L'application simultanée d'un adjuvant visant à renforcer et/ou à moduler la réponse immunitaire induite peut cependant s'avérer nécessaire. En ce qui concerne l'immunisation par des antigènes purifiés, outre la forte dose antigénique requise, le problème central réside dans la nécessité de développer des systèmes appropriés de présentation d'antigènes permettant d'assurer la stabilité et l'application optimale de l'antigène vaccinal à l'endroit désiré. Cet aspect est surtout important en cas d'application orale en raison de l'environnement particulièrement agressif rencontré au niveau du système digestif. Il s'agit donc d'éviter la dégradation de l'antigène avant qu'il soit délivré au niveau des sites inducteurs du SIM.

Certains vecteurs non vivants en cours d'évaluation, tels que (i) liposomes et virosomes, (ii) microsphères à base de polymères, notamment les poly (lactide-co-glycolides) (PLG) et (iii) structures membranaires de type hélicoïdal (cochléates), sont brièvement décrits et commentés dans Mestecky et coll. (1997). Ces diverses approches font également l'objet de revues plus spécifiques (Alving, 1997 ; Glück et Wegmann, 1997 ; Mannino et Gould-Fogerite, 1997 ; O'Hagan, 1997). Une approche alternative basée sur des structures appelées protéosomes (Lowell, 1997 ; Lowell et coll., 1997) a déjà été mentionnée dans le paragraphe consacré aux vaccins anti-*Shigella* spp. Les développements dans le domaine des nouveaux adjuvants vaccinaux en général sont analysés dans une revue récente par Edelman (1997). Il faut cependant remarquer que peu d'essais de ces adjuvants de la nouvelle génération sont pour l'instant documentés chez l'homme.

En ce qui concerne les adjuvants muqueux, le risque potentiel de stimuler une immunité non souhaitée de type allergique contre des antigènes naturels présents au site d'immunisation (« *by-pass antigens* »), notamment des protéines alimentaires (intestin) ou des substances allergènes (voies respiratoires), doit être soigneusement examiné pour chaque adjuvant (Stewart-Tull et Jones, 1992).

### ***CT et LT en tant que protéines immunogènes et adjuvants muqueux***

Les travaux de recherche sur l'immunisation par voie muqueuse au moyen de vaccins non-vivants sont difficilement dissociables des nombreuses études sur les adjuvants muqueux les plus étudiés, à savoir les holotoxines homologues CT (*V. cholerae*) et LT (ETEC), leur sous-unités immunogéniques non toxiques CTB et LTB, ou des variants d'holotoxines détoxifiées génétiquement par mutagenèse dirigée.

Des études chez la souris suggèrent que des traces (de l'ordre de 2 ng pour la voie intranasale) d'holotoxine sont nécessaires pour observer un effet adjuvant de la part de CTB ou LTB (Tamura et coll., 1994a), ou en tout cas pour augmenter cet effet (Wu et Russell, 1998). Le fait que de faibles quantités

d'holotoxine résiduelle soient présentes dans la plupart des préparations commerciales de CTB ou LTB a conduit à une controverse dans la littérature, quant au caractère indispensable de l'holotoxine pour l'effet immunogène ou adjuvant.

Une préparation de LTB recombinante (rLTB 2 µg), donc sans traces de LT, administrée par voie intranasale chez la souris induit une réponse anti-CT humorale systémique modérée et une faible réponse muqueuse au niveau local seulement ; l'adjonction de 50 ng d'holotoxine LT a permis d'obtenir une forte réponse systémique, comparable à celle obtenue avec 2,9 µg de LT seule, de même qu'une forte réponse muqueuse en IgA sécrétoires dans des tissus muqueux distants tels que les poumons, l'intestin et le système urogénital (de Haan et coll., 1996a). Des résultats plus nuancés ont été obtenus chez le macaque rhésus par Russel et coll. (1996). Selon ces auteurs, les grandes différences observées entre différents organismes (souris, singe, homme) en ce qui concerne la sensibilité à l'holotoxine CT et les doses minimales immunogènes rendent l'extrapolation des résultats extrêmement aléatoire.

Les expériences d'immunisation par voie orale effectuées par Takahashi et coll. (1996) indiquent par ailleurs que des souches de souris d'haplotypes différents ne réagissent pas de façon identique à l'application par voie orale de la toxine LT. Ce dernier travail révèle de plus que les réponses immunitaires induites chez la souris par LT ou CT peuvent différer qualitativement, en ce sens que CT, contrairement à LT, a tendance à favoriser une réponse de type Th2 conduisant à la production d'anticorps IgE antitoxine. En raison de cette dernière observation et de résultats similaires obtenus par d'autres (Snider et coll., 1994 ; Tamura et coll., 1994b), la recherche dans ce domaine s'oriente désormais plutôt vers la toxine LT ou ses dérivés.

En ce qui concerne les essais chez l'homme, le vaccin oral contre le choléra WC/rBS, développé en Suède, contient  $10^{11}$  *V. cholerae* tués et 1 mg de sous-unité CTB recombinante (rCTB) par dose (paragraphe ci-dessus). Deux ou trois doses de ce vaccin ont déjà été administrées à de nombreux volontaires, y compris dans des essais de champ en régions endémiques. La forte concentration de rCTB incorporée dans le vaccin vise à induire une immunité antitoxique. Un vaccin similaire est en développement contre les ETEC.

Une étude de Hashigucci et coll. (1996) fait état d'un certain effet adjuvant d'une préparation de rLTB contenant 0,5 % de LT coadministrée par voie intranasale avec un vaccin antigrippal trivalent inactivé. Une réactogénicité non négligeable, attribuée à la présence de LT, a été observée chez certains volontaires.

La possibilité d'induire une immunité muqueuse au niveau du tractus génital a été évaluée dans deux études utilisant le vaccin cholérique WC/rBS. Dans la première (Wassen et coll., 1996), des femmes ont été immunisées à 3 reprises, à intervalle de 2 semaines, soit par la voie orale soit par la voie vaginale. Cette dernière s'est révélée très supérieure à la voie orale pour induire une réponse

muqueuse locale au niveau du tractus génital. Dans une autre étude (Kozlowski et coll., 1997), l'application à trois reprises, par différentes voies, du vaccin WC/rBS a montré que les voies orales, rectales ou vaginales permettaient d'induire des réponses spécifiques en IgG sériques et en IgA sécrétoires salivaires. La voie rectale s'est révélée la plus favorable pour induire des taux élevés en IgA et IgG dans les sécrétions rectales ; elle était cependant inefficace pour induire une réponse dans le tractus génital féminin. Seule la voie vaginale a permis d'induire une réponse spécifique significative au niveau des voies génitales. Ces résultats démontrent les limitations du modèle du SIMC chez l'homme ; seule l'application par voie muqueuse d'un vaccin à proximité de l'endroit même où la réponse immunitaire est souhaitée pourrait s'avérer efficace.

En revanche (Berguist et coll., 1997a), l'application intranasale de doses croissantes (de 10, 100 et 1 000 µg) de la sous-unité CTB à 45 volontaires a permis d'induire des réponses anti-CTB significatives aux niveaux systémique (IgA et IgG sériques) et muqueux (IgA et IgG dans les sécrétions nasales et vaginales) pour les deux plus fortes doses administrées, aucune réponse significative n'étant observée pour la dose de 10 µg. Un niveau inacceptable de réactogénicité au niveau local a cependant été observé pour la dose la plus forte. Ces résultats montrent que la vaccination intranasale avec CTB est susceptible d'induire de fortes réponses systémique et muqueuse chez l'homme et suggèrent que la sous-unité CTB, conjuguée à un antigène vaccinal, pourrait éventuellement être utilisée en tant que vecteur protéinique pour induire une immunité protectrice contre des infections systémiques, respiratoires ou génitales.

Une publication récente de Haneberg et coll. (1998) présente des résultats prometteurs d'immunisation par voie intranasale au moyen de vésicules préparées à partir de la membrane externe de *Neisseria meningitidis*. L'immunisation primaire de 12 volontaires par 4 doses appliquées à intervalles d'une semaine suivie d'un rappel à 5 mois a induit une réponse spécifique sécrétoire dans les sécrétions nasales de tous les volontaires, 8 d'entre eux présentant de plus une réponse salivaire persistant pendant au moins 5 mois.

L'immunisation intravaginale pourrait également être une approche prophylactique contre les infections urinaires. Dans un essai en double aveugle de phase II, Uehling et coll. (1997) ont tenté de vacciner un groupe de femmes contre une dizaine de souches bactériennes uropathogènes d'un vaccin multivalent incorporé dans un suppositoire vaginal. Le vaccin a montré une faible efficacité sous la forme d'une réinfection urinaire retardée dans le groupe traité par rapport au groupe témoin ; l'emploi d'un adjuvant vaccinal aurait éventuellement pu améliorer la performance du vaccin.

Finalement, parmi les développements récents dans ce domaine, il convient de signaler l'approche visant à obtenir, par mutagenèse dirigée, des variants détoxifiés génétiquement des holotoxines CT et LT présentant si possible les mêmes propriétés d'immunogénicité et d'adjuvance que les toxines natives.

Certaines de ces protéines mutantes se sont révélées prometteuses dans des essais chez l'animal (Di Tommaso et coll., 1996 ; de Haan et coll., 1996b, 1998 ; Douce et coll., 1997 ; Tsuji et coll., 1997 ; Chong et coll., 1998 ; Komase et coll., 1998). La toxine LTK63 (Di Tommaso et coll., 1996) est actuellement l'un des adjuvants de choix dans le développement de vaccins sous-unités oraux contre *H. pylori* (Telford et Ghiara, 1996). Elle a aussi été testée chez l'animal pour l'immunisation intranasale en combinaison avec des peptides synthétiques homologues à certains épitopes du virus de la rougeole (Partidos et coll., 1996).

Une autre approche intéressante consiste à exprimer un antigène sous forme de fusion génétique avec la partie carboxy-terminale de CtxA (CtxA2) ; la protéine ainsi exprimée est naturellement présentée en association avec la sous-unité CtxB pentamérique et l'application orale chez la souris peut conduire à une immunité à long terme (Hajishengallis et coll., 1995, 1996). Inversement, l'application intranasale de fusions de différents immunogènes à la partie amino-terminale de CtxA (CtxA1) s'est révélée immunogène chez la souris ; de telles fusions étaient non toxiques dans des tests *in vitro* et *in vivo* (Agren et coll., 1997).

L'innocuité, c'est-à-dire l'absence d'effet toxique direct et d'induction d'une réaction immunitaire inappropriée, de même que l'efficacité de telles toxines mutantes ou fusions restent cependant à démontrer chez l'homme.

### Vaccins vivants et vecteurs vivants dérivés

L'approche « vaccins vivants » pour l'immunisation par voie muqueuse est basée sur le développement de souches atténuées bactériennes (*Salmonella*, *Shigella*, *Listeria*, *Mycobacteria*...) et virales (poliovirus, adénovirus, virus de la vaccine et virus apparentés, virus de l'influenza...).

En ce qui concerne les maladies virales, les vaccins vivants ont largement contribué au succès de la vaccination, notamment au cours des grandes campagnes de vaccination contre la variole, la poliomyélite, la rougeole, la rubéole et les oreillons.

Pour les infections bactériennes, trois vaccins vivants sont actuellement sur le marché :

- le vaccin parentéral contre la tuberculose basé sur la souche BCG de *Mycobacterium bovis*, développée au début du siècle déjà, et qui a largement contribué à la diminution de l'incidence de cette affection dans le monde ;
- la souche de vaccin typhoïdique oral *S. typhi* Ty21a développée dans les années soixante-dix ;
- la souche de *V. cholerae* CVD 103-HgR développée dans les années quatre-vingt grâce au génie génétique.

En dépit d'efforts de recherche intenses dans de nombreux laboratoires, le vaccin polio selon Sabin, les souches Ty21a et CVD 103-HgR, et très récemment un vaccin réassortant vivant contre les diarrhées à rotavirus sont à

l'heure actuelle les seuls vaccins vivants pour l'immunisation par voie orale ayant reçu une autorisation de mise sur le marché.

En plus de leur potentiel vaccinal contre les agents pathogènes respectifs, de telles souches peuvent être modifiées génétiquement de sorte qu'elles expriment un ou plusieurs antigènes protecteurs d'un agent pathogène hétérologue qu'elles vont alors délivrer directement au niveau muqueux. L'approche « vecteurs vivants » est analysée de façon plus approfondie dans un autre chapitre.

De nombreuses souches-vecteurs exprimant une grande variété de déterminants antigéniques ont déjà été testées avec des succès variables chez l'animal. Les rares essais réalisés chez l'homme n'ont montré que peu ou pas du tout d'immunogénicité de la part de l'antigène hétérologue exprimé, en dépit parfois d'une bonne immunogénicité de la souche-vecteur. Cette observation vaut pour des souches atténuées de *S. typhi* exprimant une protéine antigénique de la forme circumsporozoïte de *Plasmodium falciparum* (Sztein et coll., 1994) ou l'antigène HBc du virus de l'hépatite B (Nardelli-Haefliger et coll., 1996 ; Tacket et coll. 1997a). Les résultats négatifs obtenus par Nardelli-Haefliger et coll. (1996) sont particulièrement décevants compte tenu du fait que le même antigène viral exprimé dans une souche atténuée de *S. typhimurium* a induit de bons taux de séroconversion chez la souris (Hopkins et coll., 1995). Ces observations sont en soi une bonne illustration des surprises rencontrées lors du passage des essais précliniques aux essais en phase I.

Finalement, une difficulté potentielle à relever concernant l'emploi de vaccins par voie muqueuse basés sur des systèmes de vecteurs vivants ou non vivants concerne les effets éventuels de l'immunité induite par le vecteur lui-même. En effet, une forte immunité induite contre le vecteur d'immunisation pourrait interférer avec l'utilisation ultérieure du même vecteur pour administrer un nouvel antigène. Un tel effet a été observé chez la souris aussi bien après immunisation par voie orale au moyen de souches vecteurs vivantes de *Salmonella* spp. exprimant des immunogènes (pili) d'*E. coli* (Attridge et coll., 1997), qu'après l'application intranasale d'un vaccin expérimental consistant en une fusion de dextrane (immunogène) à la sous-unité CTB de la toxine cholérique (Berquist et coll., 1997b). Dans les deux cas, une forte immunité préexistante contre le vecteur a fortement inhibé l'induction d'une réponse immunitaire contre l'immunogène. Ces résultats indiquent qu'une approche globale d'immunisation par voie muqueuse pourrait exiger le développement d'une palette de vecteurs alternatifs ne présentant pas d'antigénicité croisée. Considérant le travail considérable que représente la construction et la caractérisation exhaustive d'un nouveau vecteur d'immunisation, la généralisation de ce type de vaccins n'est pas à prévoir pour les 10 prochaines années.

## Immunsation « génétique » par la voie muqueuse

L'immunsation « génétique » par application d'ADN plasmidique exprimant un antigène sous le contrôle d'un promoteur eucaryotique est une approche révolutionnaire testée par de nombreux laboratoires (Donnelly et coll., 1997 ; Manickan et coll., 1997 ; Robinson, 1997 et la série d'article sur les vaccins ADN dans le même cahier du journal *Vaccine*).

L'application directe par voie muqueuse d'ADN plasmidique a aussi été tentée chez la souris par différentes voies et en utilisant différents modèles ; comme pour l'application d'antigènes purifiés, l'emploi d'adjuvants muqueux et/ou de systèmes vecteurs tels que des microparticules pourrait parfois s'avérer indispensable (Fynan et coll., 1993 ; Etchart et coll., 1997 ; Jones et coll., 1997 ; Klavinskis et coll., 1997). Une publication récente rapporte des résultats intéressants d'immunsation de rats femelles par de l'ADN plasmidique administré par voie mucosale vaginale au moyen d'un canon à gènes (*gene-gun*) (Livingston et coll., 1998).

La capacité de certains agents pathogènes tels que *Shigella* spp., *Salmonella* et *Listeria* de pénétrer dans les cellules épithéliales et immunitaires, telles que les cellules dendritiques et les macrophages, a incité différents groupes de recherche à étudier la possibilité d'utiliser des souches vecteurs atténuées basées sur de tels agents pathogènes pour délivrer de l'ADN plasmidique et exprimer un antigène protecteur de façon ciblée au niveau muqueux (Courvalin et coll., 1995 ; Sizemore et coll., 1995 ; Darji et coll., 1997 ; Dietrich et coll., 1998). Parmi ces travaux, celui de Darji et coll. (1997) est le seul montrant que l'immunsation de souris par voie orale au moyen d'une souche de *S. typhimurium* exprimant un antigène protecteur de *Listeria* pouvait permettre d'induire une immunité protectrice cellulaire et humorale contre cet agent. Ces auteurs démontrent que l'expression de l'antigène se fait au niveau du noyau de la cellule-hôte après relargage intracellulaire de l'ADN plasmidique. Ainsi l'immunsation génétique ciblée au niveau muqueux semble possible. Cependant, l'observation par Dietrich et coll. (1998) que l'ADN plasmidique introduit dans les macrophages par un vecteur *Listeria* s'intègre dans le génome de la cellule hôte à une fréquence de l'ordre de  $10^{-7}$  pose la question de l'innocuité d'une telle approche. Cette note de prudence vaut également pour les autres approches d'immunsation génétique (Doerfler et coll., 1997 ; Schubert et coll., 1997).

## Immunsation par la voie muqueuse respiratoire

Quelques publications récentes font état d'essais d'immunsation par la voie muqueuse respiratoire chez l'homme.

### **Diphthérie et tétanos**

Aggerbeck et coll. (1997) ont examiné la réponse immunitaire à une vaccination de rappel contre la diphthérie et le tétanos chez des volontaires auxquels

les toxoïdes diphtérique et tétanique ont été administrés par voie intranasale (spray) en combinaison avec deux surfactants (adjuvants). Des taux de séroconversion significatifs, mais inférieurs à ceux obtenus après vaccination parentérale, ont été observés. En dépit d'une certaine réactogénicité, la majorité des personnes vaccinées ont dit préférer la vaccination intranasale. Les auteurs de l'article attribuent le faible taux de séroconversion au fait que probablement seule une faible proportion de l'antigène passe la barrière muqueuse. La dose antigénique effective administrée au cours d'une immunisation par voie muqueuse est en effet souvent un paramètre difficilement maîtrisable. En plus de nouvelles données expérimentales, l'article d'Aggerbeck et coll. (1997) fournit une liste intéressante de publications, remontant à 1927, sur le thème de la vaccination antidiphtérique et antitétanique par voie muqueuse.

### **Grippe**

Contrairement au vaccin parentéral inactivé traditionnel, l'infection grippale semble conférer un certain niveau de protection croisée contre des souches virales de sérotype hétérologue en induisant la production d'anticorps sécrétoires au niveau du tractus respiratoire. Ainsi, compte tenu de la pathogenèse infectieuse du virus de l'influenza, la voie intranasale paraît optimale pour l'immunisation contre la grippe.

Des essais chez la souris ont montré que l'immunogénicité d'un vaccin antigrippal à virus inactivés administré par voie intranasale est augmentée par l'application simultanée d'une préparation de CTB ou LTB pour autant que celle-ci contienne des traces de toxine cholérique CT active (Tamura et coll., 1994a). Hashigucci et coll. (1996) ont cherché à confirmer cette observation chez l'homme en immunisant de façon similaire des volontaires avec un vaccin antigrippal trivalent en présence ou en absence de 100 µg de LTB recombinante et 0,5 µg de LT. Une réponse significative (anticorps salivaires IgA et anticorps sériques inhibiteurs dans le test d'hémagglutination), bien que relativement faible, a été observée avec un certain effet positif de la part de l'adjuvant muqueux. Très peu de volontaires ont cependant montré une réponse contre chacun des trois sérotypes viraux inclus dans le vaccin. Les effets secondaires locaux et systémiques ont été plus fréquents dans le groupe traité avec l'adjuvant muqueux. Les auteurs prévoient un essai avec une dose antigénique plus forte.

L'application dans les voies respiratoires d'un vaccin vivant basé sur une souche virale d'influenza atténuée est également possible (Clements et Stephens, 1997). En ce qui concerne l'atténuation de la souche vaccinale, deux approches ont récemment été testées.

La construction de souches contenant plusieurs mutations de thermosensibilité (*ts*) dans le gène de la transcriptase virale PB2D a été réalisée. De telles souches se sont révélées instables en essais précliniques, de sorte que leur utilisation chez l'homme ne peut être envisagée. Afin de limiter les risques de

réversion à un virus pathogène, une possibilité consisterait à introduire d'autres mutations d'atténuation dans au moins un autre gène viral comme c'est le cas pour d'autres vaccins et vaccins candidats (Murphy et coll., 1997 et références citées).

Un deuxième type de souche atténuée a déjà été extensivement testé en essais cliniques ; il s'agit de souches « *cold adapted* » (*ca*) incapables de se propager à la température des voies respiratoires profondes mais pouvant coloniser la muqueuse nasale. Dans une étude récente à grande échelle sur 1 126 enfants de 2 à 36 mois (Gruber et coll., 1997), une dose unique d'un vaccin vivant bivalent de ce type s'est montrée sûre et immunogène chez les enfants de 6 à 36 mois ; la dose optimale devrait encore être optimisée pour les enfants plus âgés (influence possible d'une immunité préexistante limitant la colonisation par la souche vaccinale). Une éventuelle interférence des anticorps maternels avec la multiplication de la souche vaccinale pourrait expliquer le taux inférieur de séroconversion chez les enfants de moins de 6 mois.

Dans un autre essai (Clements et coll., 1996), 2 doses intranasales d'un vaccin de type *ca* monovalent administrées à 2 mois d'intervalle chez des enfants de 2 à 6 mois ont permis d'induire des taux d'anticorps protecteurs chez presque tous les vaccinés, aucune interférence n'étant observée avec les vaccinations de routine effectuées en parallèle. Ainsi, l'application par voie muqueuse de 2 doses d'une souche atténuée vivante d'influenza pourrait permettre de pallier la faible immunogénicité des vaccins parentéraux observée pour cette classe d'âge.

Au vu de la très grande variabilité antigénique du virus de la grippe, il faut relever le fait que, quelle que soit l'approche envisagée pour l'atténuation, un vaccin vivant devra être annuellement ajusté en fonction des données épidémiologiques fournies par l'OMS. Ceci implique la constitution d'un lot de semence (*master seed lot*) de la souche atténuée et la construction sur mesure de souches réassortantes exprimant le sérotype approprié. Le développement chaque année d'une ou plusieurs souches vaccinales atténuées conformes aux recommandations de l'OMS et satisfaisant aux critères d'enregistrement (sécurité, reproductibilité de lot à lot) dans un laps de temps extrêmement court pourrait s'avérer difficile.

## **Rougeole**

Le virus de la rougeole étant principalement transmis de personne à personne par la voie aérienne, la vaccination directe au niveau des voies respiratoires supérieures pourrait présenter des avantages importants par rapport à la vaccination conventionnelle, notamment dans les pays en développement (facilité d'application, personnel médical non requis, pas de risque de contamination lié à l'injection par une seringue non stérile). Une meilleure immunité muqueuse pourrait également limiter la circulation du virus de la rougeole dans la

communauté cible pour la vaccination (effet de troupeau ou immunité gré-gaire). Dans une revue récente, Cutts et coll. (1997) font une analyse exhaustive et critique des différentes voies possibles d'immunisation contre la rougeole. Parmi les méthodes alternatives à la voie classique percutanée, la plus étudiée est l'application de la souche vaccinale par aérosol, testée dès les années soixante. Cette méthode semble la plus efficace en terme d'immunogénicité, plus efficace notamment que la voie intranasale. Pour différentes raisons, elle est cependant difficile à standardiser de sorte que son utilisation à grande échelle n'est pour l'instant pas envisageable.

Dans un récent article, Simasathien et coll. (1997) ont comparé les réponses induites par la souche vaccinale vivante Edmonston-Zagreb du virus de la rougeole administrée par voies intranasale ou sous-cutanée chez des enfants thaïlandais âgés de 6 mois. L'application intranasale s'est révélée significativement moins immunogène ; par ailleurs, la réponse induite par cette voie est en général davantage affectée par la forte incidence des infections du système respiratoire pendant la période de suivi. Le faible taux de séroconversion observé par rapport à certains travaux antécédents est attribué au fait qu'une dose vaccinale réduite a été administrée, conformément aux nouvelles recommandations de l'OMS.

**En conclusion**, malgré d'intenses efforts de recherche, l'immunisation par voie muqueuse doit encore être considérée comme une technologie d'avenir. Seuls cinq vaccins, contre la poliomyélite (vaccin vivant), la fièvre typhoïde (vaccin vivant), le choléra (2 vaccins, l'un vivant et l'autre inactivé) et les diarrhées à rotavirus ont en effet obtenu une autorisation de mise sur le marché dans certains pays. La lenteur apparente des développements dans ce domaine tient en grande partie à la difficulté d'acheminer l'antigène vaccinal de façon contrôlée et sûre jusqu'au niveau des tissus immunitaires muqueux, d'où la nécessité de développer de nouveaux systèmes vecteurs (vivants et non vivants).

En ce qui concerne les vaccins non vivants, il semble également que l'application, avec l'antigène vaccinal, d'un adjuvant approprié (adjuvant muqueux) soit dans la plupart des cas indispensable pour assurer une bonne immunogénicité. Actuellement, ce domaine de recherche connaît des développements prometteurs. Les données disponibles sur la vaccination par voie intranasale indiquent que cette stratégie est la plus efficace pour stimuler une forte immunité locale dans le rhinopharynx et les voies respiratoires. Sur la base des rares résultats d'essais cliniques, cette approche pourrait également permettre d'induire une certaine réponse dans des compartiments muqueux éloignés tels que l'intestin et le système génital. L'application orale est toutefois la plus efficace pour induire une immunité protectrice au niveau de l'intestin.

De nombreux essais cliniques seront encore nécessaires pour s'assurer du caractère sûr et efficace de l'application par voie muqueuse de vaccins adjuvantés au moyen de la toxine LT et de ses dérivés, et pour assurer un haut niveau de standardisation de l'application, notamment la reproductibilité de la dose vaccinale. Pour les nouveaux vaccins vivants, un certain nombre de souches candidates sont en cours d'évaluation, la plupart étant encore au stade des essais précliniques. Un nombre limité d'entre elles se sont montrées prometteuses en essais cliniques de phase I ; des essais en phase II et III permettront de confirmer leur innocuité et leur immunogénicité sur un plus grand nombre de volontaires.

Finalement, la problématique de l'immunité induite contre le vecteur pourrait bien être un facteur limitant pour l'immunisation répétée au moyen d'un même vecteur vivant ou non vivant portant différents antigènes hétérologues. Une série de vecteurs vaccinaux devra donc être disponible avant que l'immunisation par voie muqueuse se généralise.

## BIBLIOGRAPHIE

ACHARYA IL, LOWE CU, THAPA R, GURUBACHARYA VL et coll. Prevention of typhoid fever in Nepal with the Vi capsular polysaccharide of *Salmonella typhi*. *N Engl J Med* 1987, **317** : 1101-1104

AGGERBECK H, GIZURARSON S, WANTZIN J, HERON I. Intranasal booster vaccination against diphtheria and tetanus in man. *Vaccine* 1997, **15** : 307-316

AGREN LC, EKMAN L, LOWENADLER B, LYCKE NY. Genetically engineered nontoxic vaccine adjuvant that combines B cell targeting with immunomodulation by cholera toxin A1 subunit. *J Immunol* 1997, **158** : 3936-3946

AHREN C, WENNERAS C, HOLMGREN J, SVENNERHOLM AM. Intestinal antibody response after oral immunization with a prototype cholera B subunit-colonization factor antigen enterotoxigenic *Escherichia coli* vaccine. *Vaccine* 1993, **11** : 929-934

ALVING CR. Liposomes as adjuvants for vaccines. In : New generation vaccines, LEVINE MM, WOODROW GC, KAPER JB and COBON GS Eds. M. Dekker Inc. New York, 1997 : 207-213

ANONYMOUS. NIH Consensus Conference. *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. NIH consensus development panel on *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. *JAMA* 1994, **272** : 65-69

ANONYMOUS. Maladie ulcéreuse et gastrites à l'heure d'*Helicobacter pylori*. *Gastroenterol Clin Biol* 1996, **20** : S155-S162

ATTRIDGE SR, DAVIES R, LABROOY JT. Oral delivery of foreign antigens by attenuated *Salmonella* : consequences of prior exposure to the vector strain. *Vaccine* 1997, **15** : 155-162

BARZU S, FONTAINE A, SANSONETTI P, PHALIPON A. Induction of a local anti-IpaC antibody response in mice by use of a *Shigella flexneri* 2a vaccine candidate : implications for use of IpaC as a protein carrier. *Infect Immun* 1996, **64** : 1190-1196

BARZU S, ARONDEL J, GUILLOT S, SANSONETTI PJ, PHALIPON A. Immunogenicity of IpaC-hybrid proteins expressed in the *Shigella flexneri* 2a vaccine candidate SC602. *Infect Immun* 1998, **66** : 77-82

BERGQUIST C, JOHANSSON E-L, LAGERGARD T, HOLMGREN J, RUDIN A. Intranasal vaccination of humans with recombinant cholera toxin B subunit induces systemic and local antibody responses in the upper respiratory tract and the vagina. *Infect Immun* 1997a, **65** : 2676-2684

BERGQUIST C, LAGERGARD T, HOLMGREN J. AnticARRIER immunity suppresses the antibody response to polysaccharide antigens after intranasal immunization with the polysaccharide-protein conjugate. *Infect Immun* 1997b, **65** : 1579-1583

BERNSTEIN DI, SMITH VE, SHERWOOD JR, SCHIFF GM, SANDER DS et coll. Safety and immunogenicity of live, attenuated human rotavirus vaccine 89-12. *Vaccine* 1998, **16** : 381-387

BLACK RE. Epidemiology of diarrhoeal disease : implications for control by vaccines. *Vaccine* 1993, **11** : 100-106

CHIN J, SAN GIL F, EAMENS G, DJORDJEVIC S, SIMECKA J, DUNCAN J, MULLBACHER A. Manipulating systemic and mucosal immune responses with skin-deliverable adjuvants. *J Biotech* 1996, **44** : 13-19

CHONG C, FRIBERG M, CLEMENTS JD. LT(R192G), a non-toxic mutant of the heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*, elicits enhanced humoral and cellular immune responses associated with protection against lethal oral challenge with *Salmonella* spp. *Vaccine* 1998, **16** : 732-740

CLARK HF, OFFIT PA, ELLIS RW, EIDEN JJ, KRAH D et coll. The development of multivalent bovine rotavirus (strain wc3) reassortant vaccine for infants. *J Infect Dis* 1996, **174** : S73-S80

CLEMENS JD, SACK DA, HARRIS JR, CHAKRABORTY J, NEOGY PK et coll. Cross-protection by B subunit-whole cell cholera vaccine against diarrhoea associated with heat-labile toxin-producing enterotoxigenic *Escherichia coli* : results of a large-scale field trial. *J Infect Dis* 1988, **158** : 372-377

CLEMENTS ML, STEPHENS I. New and improved vaccines against influenza. In : New generation vaccines, LEVINE MM, WOODROW GC, KAPER JB and COBON GS Eds. M. Dekker Inc. New York, 1997 : 545-570

CLEMENTS ML, MAKHENE MK, KARRON RA, MURPHY BR, STEINHOFF MC et coll. Protective immunization with live attenuated influenza A virus can be achieved in early infancy. *J Infect Dis* 1996, **173** : 44-51

COHEN D, GREEN MS, BLOCK C, ROUACH T, OFEK I. Serum antibodies to lipopolysaccharide and natural immunity to shigellosis in an Israeli military population. *J Infect Dis* 1988, **157** : 1068-1071

COHEN D, ASHKENAZI S, GREEN M, LERMAN Y, SLEPON R et coll. Safety and immunogenicity of investigational *Shigella* conjugate vaccines in Israeli volunteers. *Infect Immun* 1996, **64** : 4074-4077

COHEN D, ASHKENAZI S, GREEN MS, GDALEVICH M, ROBIN G et coll. Double-blind vaccine-controlled randomised efficacy trial of an investigational *Shigella sonnei* conjugate vaccine in young adults. *Lancet* 1997, **349** : 155-159

CONNER ME, CRAWFORD SE, BARONE C, ONEAL C, ZHOU YJ et coll. Rotavirus subunit vaccines. *Arch Virol* 1996a, **12** : 199-206

CONNER ME, ZARLEY CD, HU B, PARSONS S, DRABINSKI D et coll. Virus-like particles as a rotavirus subunit vaccine. *J Infect Dis* 1996b, **174** : S88-S92

CORTHESEY-THEULAZ IE, HOPKINS S, BACHMANN D, SALDINGER PE, PORTA N et coll. Mice are protected from *Helicobacter pylori* infection by nasal immunization with attenuated *Salmonella typhimurium phoP<sup>c</sup>* expressing urease A and B subunits. *Infect Immun* 1998, **66** : 581-586

COURVALIN P, GOUSSARD S, GRILLOT-COURVALIN C. Gene transfer from bacteria to mammalian cells. *Life Sci* 1995, **318** : 1207-1212

CRYZ SJ JR, QUE JU, LEVINE MM, WIEDERMANN G, KOLLARITSCH H. Safety and immunogenicity of a live oral bivalent typhoid fever (*Salmonella typhi* Ty21a)-cholera (*Vibrio cholerae* CVD 103-HgR) vaccine in healthy adults. *Infect Immun* 1995, **63** : 1336-1339

CUTTS FT, CLEMENTS CJ, BENNETT JV. Alternative routes of measles immunization : a review. *Biologicals* 1997, **25** : 323-338

CZERKINSKY C, PRINCE SJ, MICHALEK SM, JACKSON S, RUSSELL MW et coll. IgA antibody-producing cells in peripheral blood after antigen ingestion : evidence for a common mucosal immune system in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987, **84** : 2449-2453

DARJI A, GUZMAN CA, GERSTEL B, WACHHOLZ P, TIMMIS KN et coll. Oral somatic transgene vaccination using attenuated *S. typhimurium*. *Cell* 1997, **91** : 765-775

DAYNES RA, ENIOUTINA EY, BUTLER S, MU H-H, MCGHEE ZA, ARANEO BA. Induction of common mucosal immunity by hormonally immunomodulated peripheral immunization. *Infect Immun* 1996, **64** : 1100-1109

DE HAAN L, HOLTROP M, VERWIJ WR, AGSTERIBBE E, WILSCHUT J. Mucosal immunogenicity of the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin : role of the A subunit. *Vaccine* 1996a, **14** : 260-266

DE HAAN L, VERWEIJ WR, FEIL IK, LIJNEMA TH, HOL WGJ et coll. Mutants of the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin with reduced ADP-ribosylation activity or no activity retain the immunogenic properties of the native holotoxin. *Infect Immun* 1996b, **64** : 5413-5416

DE HAAN L, FEIL IK, VERWEIJ WR, HOLTROP M, HOL WG et coll. Mutational analysis of the role of ADP-ribosylation activity and GM1-binding activity in the adjuvant properties of the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin towards intranasally administered keyhole limpet hemocyanin. *Eur J Immunol* 1998, **28** : 1243-1250

DE KORWIN JD, LOZNIEWSKI A. Le traitement de l'infection par *Helicobacter pylori*. *Presse Méd* 1996, **25** : 1917-1922

DENNEHY PH, RODGERS GC, WARD RL, MARKWICK AJ, MACK M, ZITO ET. Comparative evaluation of reactogenicity and immunogenicity of two dosages of oral tetravalent rhesus rotavirus vaccine. *Pediatr Infect Dis J* 1996, **15** : 1012-1018

DESENCLOS JC. Epidemiology of enteric infections. *Méd Mal Infect* 1997, **27** : 521-522 187

DIETRICH G, BUBERT A, GENTSCHEV I, SOKOLOVIC Z, SIMM A et coll. Delivery of antigen-encoding plasmid DNA into the cytosol of macrophages by attenuated suicide *Listeria monocytogenes*. *Nature Biotech* 1998, **16** : 181-185

DI TOMMASO A, SALETTI G, PIZZA M, RAPPUOLI R, DOUGAN G et coll. Induction of antigen-specific antibodies in vaginal secretions by using a nontoxic mutant of heat-labile enterotoxin as a mucosal adjuvant. *Infect Immun* 1996, **64** : 974-979

DOERFLER W, SCHUBBERT R, HELLER H, KAMMER C, HILGER-EVERSHEIM K et coll. Integration of foreign DNA and its consequences in mammalian systems. *Trends Biotechnol* 1997, **15** : 297-301

DONNELLY JJ, ULMER JB, LIU MA. Vaccination against influenza with plasmid DNA : cross-strain and homologous protection. In : *New generation vaccines*, LEVINE MM, WOODROW GC, KAPER JB and COBON GS Eds. M. Dekker Inc. New York, 1997 : 287-295

DOUCE G, FONTANA M, PIZZA M, RAPPUOLI R, DOUGAN G. Intranasal immunogenicity and adjuvanticity of site-directed mutant derivatives of cholera toxin. *Infect Immun* 1997, **65** : 2821-2828

DUPONT HL, HORNICK RB, SNYDER MJ, LIBONATI JP, FORMAL SB, GANGAROSA EJ. Immunity in shigellosis. I. Response of man to attenuated strains of *Shigella*. *J Infect Dis* 1972, **125** : 5-11

EDELMAN R. Adjuvants for the future. In : *New generation vaccines*, LEVINE MM, WOODROW GC, KAPER JB and COBON GS Eds. M. Dekker Inc. New York, 1997 : 173-192

ESTES MK. Advances in molecular biology : impact on rotavirus vaccine development. *J Infect Dis* 1996, **174** : S37-S46

ETCHART N, BUCKLAND R, LIU MA, WILD TF, KAISERLIAN D. Class I-restricted CTL induction by mucosal immunization with naked DNA encoding measles virus haemagglutinin. *J Gen Virol* 1997, **78** : 1577-1580

EVANS DG, GRAHAM DY, EVANS DJ JR, OPEKUN A. Administration of purified colonization factor antigens (CFA/I, CFA/II) of enterotoxigenic *Escherichia coli* to volunteers. *Gastroenterology* 1984, **87** : 934-940

EVANS DG, EVANS DJ JR, OPEKUN AR, GRAHAM DY. Non-replicating oral whole cell vaccine protective against *Escherichia coli* (ETEC) diarrhea : stimulation of anti-CFA (CFA/I) and anti-enterotoxin (anti-LT) intestinal IgA and protection against challenge with ETEC belonging to heterologous serotypes. *FEMS Microbiol Immunol* 1988, **47** : 117-126

FALT IC, SCHWEDA EKH, KLEE S, SINGH M, FLODERUS E et coll. Expression of *Shigella dysenteriae* serotype 1 O-antigenic polysaccharide by *Shigella flexneri aroD* vaccine candidates and different *S. flexneri* serotypes. *J Bacteriol* 1995, **177** : 5310-5315

FAVRE D, STRUCK MM, CRYZ SJ JR, VIRET JF. Further molecular characterization and stability of the live oral attenuated cholera vaccine strain CVD103-HgR. *Vaccine* 1996a, **14** : 526-531

FAVRE D, CRYZ SJ JR, VIRET JF. Construction and characterization of a potential live oral carrier-based vaccine against *Vibrio cholerae* O139. *Infect Immun* 1996b, **64** : 3565-3570

FAVRE D, CRYZ SJ JR, VIRET JF. Development of *Shigella sonnei* live oral vaccines based on defined *rfb*<sub>Inaba</sub> deletion mutants of *Vibrio cholerae* expressing the *Shigella* serotype D O polysaccharide. *Infect Immun* 1996c, **64** : 576-584

FERRERO RL, LABIGNE A. Strategies for an oral vaccine against *Helicobacter pylori*. *Curr Opin Gastroenterol* 1996, **12** : 564-568

FERRERO RL. Immune responses to mucosal infection : the *Helicobacter pylori* paradigm. *Res Immunol* 1997, **148** : 91-107

FYNAN EF, WEBSTER RG, FULLER DH, HAYNES JR, SANTORO JC, ROBINSON HL. DNA vaccines : protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, **90** : 11478-11482

GENTSCH JR, WOODS PA, RAMACHANDRAN M, DAS BK, LEITE JP et coll. Review of G and P typing results from a global collection of rotavirus strains : implications for vaccine development. *J Infect Dis* 1996, **174** : S30-S36

GIRON JA, XU JG, GONZALEZ CR, HONE D, KAPER JB, LEVINE MM. Simultaneous expression of CFA/I and CS3 colonization factor antigens of enterotoxigenic *Escherichia coli* by *ΔaroC*, *ΔaroD* *Salmonella typhi* vaccine strain CVD908. *Vaccine* 1995, **13** : 939-946

GLASS RI, GENTSCH J, SMITH JC. Rotavirus vaccines : success by reassortment ? *Science* 1994, **265** : 1389-1391

GLASS RI, KILGORE PE, HOLMAN RC, JIN SX, SMITH JC et coll. The epidemiology of rotavirus diarrhea in the United States : surveillance and estimates of disease burden. *J Infect Dis* 1996, **174** : S5-S11

GLASS RI, BRESEE JS, PARASHAR U, MILLER M, GENTSCH JR. Rotavirus vaccines at the threshold. *Nature Med* 1997, **3** : 1324-1325

GLUCK R, WEGMANN A. Virosomes, a new liposome-like vaccine delivery system. In : Antigen delivery systems : immunological and technological issues, GANDER B, MERCKLE HP and CORRADIN G Eds. Harwood Academic Publishers, Australia, 1997 : 101-122

GRUBER WC, DARDEN PM, STILL JG, LOHR J, REED G, WRIGHT PF. Evaluation of bivalent live attenuated influenza A vaccines in children 2 months to 3 years of age : safety, immunogenicity and dose-response. *Vaccine* 1997, **15** : 1379-1384

HAAS R, MEYER TF. Vaccine development against *Helicobacter pylori* infections. *Biologicals* 1997, **25** : 175-177

HAJISHENGALLIS G, HOLLINGSHEAD SK, KOGA T, RUSSELL MW. Mucosal immunization with a bacterial protein antigen genetically coupled to cholera toxin A2/B subunits. *J Immunol* 1995, **154** : 4322-4332

HAJISHENGALLIS G, MICHALEK SM, RUSSELL MW. Persistence of serum and salivary antibody responses after oral immunization with a bacterial protein antigen genetically linked to the A2/B subunits of cholera toxin. *Infect Immun* 1996, **64** : 665-667

HALE TL, VENKATESAN MM. Vaccines against *Shigella* infections : Part I : *Escherichia coli*-or *Salmonella typhi* expressing *Shigella* antigens. In : New generation vaccines, LEVINE MM, WOODROW GC, KAPER JB and COBON GS Eds. M. Dekker Inc. New York, 1997 : 843-852

HANEBERG B, DALSEG R, WEDEGE E, HOIBY EA, HAUGEN IL et coll. Intranasal administration of a meningococcal outer membrane vesicle vaccine induces persistent local mucosal antibodies and serum antibodies with strong bactericidal activity in humans. *Infect Immun* 1998, **66** : 1334-1341

HASHIGUCCI K, OGAWA H, ISHIDATE T, YAMASHITA R, KAMIYA H et coll. Antibody responses in volunteers induced by nasal influenza vaccine combined with *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit containing a trace amount of the holotoxin. *Vaccine* 1996, **14** : 113-119

HENTSCHEL E, BRANDSTATTER G, DRAGOSICS B, HIRSCHL AM, NEMEC H et coll. Effect of ranitidine and amoxicillin plus metronidazole on the eradication of *Helicobacter pylori* and the recurrence of duodenal ulcer. *N Engl J Med* 1993, **328** : 308-312

HERRINGTON DA, VAN DE VERG L, FORMAL SB, HALE TL, TALL BD et coll. Studies in volunteers to evaluate candidate *Shigella* vaccines : further experience with a bivalent *Salmonella typhi*-*Shigella sonnei* vaccine and protection conferred by previous *Shigella sonnei* disease. *Vaccine* 1990, **8** : 353-357

HOHMANN EL, OLETTA CA, KILLEEN KP, MILLER SI. *PhoP/phoQ*-deleted *Salmonella typhi* (Ty800) is a safe and immunogenic single-dose typhoid fever vaccine in volunteers. *J Infect Dis* 1996, **173** : 1408-1414

HOLMGREN J, JERTBORN M, SVENNERHOLM AM. New and improved vaccines against cholera. Part II : oral B subunit killed whole-cell cholera vaccine. In : New generation vaccines, LEVINE MM, WOODROW GC, KAPER JB and COBON GS Eds. M. Dekker Inc. New York, 1997 : 459-468

HOPKINS S, KRAEHNBUHL JP, SCHODEL F, POTTS A, PETERSON D et coll. A recombinant *Salmonella typhimurium* vaccine induces local immunity by four different routes of immunization. *Infect Immun* 1995, **63** : 3279-3286

IARC (International Agency for Research on Cancer). Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Working Group on the Evaluation of carcinogenic risks to Humans. Lyon, 7-14 june 1994. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Humans* 1994, **61** : 1-241

JAMES SP. The gastrointestinal mucosal immune system. In : New generation vaccines, LEVINE MM, WOODROW GC, KAPER JB and COBON GS Eds. M. Dekker Inc. New York, 1997 : 151-171

JERTBORN M, SVENNERHOLM AM, HOLMGREN J. Intestinal and systemic immune responses in humans after oral immunization with a bivalent B subunit-o1/o139 whole cell cholera vaccine. *Vaccine* 1996, **14** : 1459-1465

JERTBORN M, AHREN C, HOLMGREN J, SVENNERHOLM AM. Safety and immunogenicity of an oral inactivated enterotoxigenic *Escherichia coli* vaccine. *Vaccine* 1998, **16** : 255-260

JOENSUU J, KOSKENNIEMI E, PANG XL, VESIKARI T. Randomized placebo-controlled trial of rhesus-human reassortant rotavirus vaccine for prevention of severe rotavirus gastroenteritis. *Lancet* 1997, **350** : 1205-1209

JONES DH, CORRIS S, MCDONALD S, CLEGG JC, FARRAR GH. Poly(DL-lactide-co-glycolide)-encapsulated plasmid DNA elicits systemic and mucosal antibody responses to encoded protein after oral administration. *Vaccine* 1997, **15** : 814-817

KAPER JB, TACKET CO, LEVINE MM. New and improved vaccines against cholera. Part I : attenuated *Vibrio cholerae* O1 and O139 strains as live oral cholera vaccines. In : New generation vaccines, LEVINE MM, WOODROW GC, KAPER JB and COBON GS Eds. M. Dekker Inc. New York, 1997 : 447-457

KAPIKIAN AZ, HOSHINO Y, CHANOCK RM, PEREZSCHAEL I. Jennerian and modified jennerian approach to vaccination against rotavirus diarrhea using a quadrivalent rhesus rotavirus (rrv) and human-rrv reassortant vaccine. *Arch Virol* 1996a, 12 : 163-175

KAPIKIAN AZ, HOSHINO Y, CHANOCK RM, PEREZSCHAEL I. Efficacy of a quadrivalent rhesus rotavirus-based human rotavirus vaccine aimed at preventing severe rotavirus diarrhoea in infants and young children. *J Infect Dis* 1996b, 174 : S65-S72

KARNELL A, LI A, ZHAO CR, KARLSSON K, MINH NB, LINDBERG AA. Safety and immunogenicity study of the auxotrophic *Shigella flexneri* 2a vaccine SFL1070 with a deleted *aroD* gene in adult Swedish volunteers. *Vaccine* 1995, 13 : 88-99

KLAVINSKIS LS, GAO L, BARNFIELD C, LEHNER T, PARKER S. Mucosal immunization with DNA-liposome complexes. *Vaccine* 1997, 15 : 818-820

KLEE SR, TZSCHASCHEL BD, SINGH M, FALT I, LINDBERG AA et coll. Construction and characterization of genetically-marked bivalent anti-*Shigella dysenteriae* 1 and anti-*Shigella flexneri* Y live vaccine candidates. *Microb Pathog* 1997, 22 : 363-376

KLUGMAN KP, GILBERTSON IT, KOORNHOF HJ, ROBBINS JB, SCHNEERSON R et coll. Protective activity of Vi capsular polysaccharide vaccine against typhoid fever. *Lancet* 1987, 2 : 1165-1169

KOLLARITSCH H, FURER E, HERZOG C, WIEDERMANN G, QUE JU, CRYZ SJ. Randomized, double-blind placebo-controlled trial to evaluate the safety and immunogenicity of combined *Salmonella typhi* Ty21a and *Vibrio cholerae* CVD 103-HgR live oral vaccines. *Infect Immun* 1996, 64 : 1454-1457

KOLLARITSCH H, QUE JU, KUNZ C, WIEDERMANN G, HERZOG C, CRYZ SJ. Safety and immunogenicity of live oral cholera and typhoid vaccines administered alone or in combination with antimalarial drugs, oral polio vaccine, or yellow fever vaccine. *J Infect Dis* 1997, 175 : 871-875

KOMASE K, TAMURA SI, MATSUO K, WATANABE K, HATTORI N et coll. Mutants of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin as an adjuvant for nasal influenza vaccine. *Vaccine* 1998, 16 : 248-254

KOTLOFF KL, NORIEGA F, LOSONSKY GA, SZTEIN MB, WASSERMAN SS et coll. Safety, immunogenicity, and transmissibility in humans of CVD 1203, a live oral *Shigella flexneri* 2a vaccine candidate attenuated by deletions in *aroA* and *virG*. *Infect Immun* 1996, 64 : 4542-4548

KOZLOWSKI PA, CU-UVIN S, NEUTRA M, FLANIGAN TP. Comparison of the oral, rectal and vaginal immunization routes for induction of antibodies in rectal and genital tract secretions of women. *Infect Immun* 1997, 65 : 1387-1394

KREISS C, BUCLIN T, COSMA M, CORTHESEY-THEULAZ I, MICHETTI P. Safety of oral immunisation with recombinant urease in patients with *Helicobacter pylori* infection. *Lancet* 1996, 347 : 1630-1631

- LANATA CE, MIDTHUN K, BLACK RE, BUTRON B, HUAPAYA A et coll. Safety, immunogenicity, and protective efficacy of one and three doses of the tetravalent rhesus rotavirus vaccine in infants in Lima, Peru. *J Infect Dis* 1996, **174** : 268-275
- LEE A. Vaccination against *Helicobacter pylori*. *J Gastroenterol* 1996, **31** : 69-74
- LEE A, DOIDGE C. Vaccines against *Helicobacter pylori*. In : *New Generation Vaccines*, LEVINE MM, WOODROW GC, KAPER JB and COBON GS Eds. M. Dekker Inc. New York, 1997 : 963-977
- LEVINE MM, KAPER JB, BLACK RE, CLEMENTS ML. New knowledge on pathogenesis of bacterial enteric infections as applied to vaccine development. *Microbiol Rev* 1983, **47** : 510-550
- LEVINE MM, KAPER JB, HERRINGTON D, KETLEY J, LOSONSKY G et coll. Safety, immunogenicity, and efficacy of recombinant live oral cholera vaccines, CVD 103 and CVD 103-HgR. *Lancet* 1988, **2** : 467-470
- LEVINE MM, KAPER JB. Live oral vaccines against cholera : an update. *Vaccine* 1993, **11** : 207-212
- LEVINE MM, TACKET CO, GALEN JE, BARRY EM, NORIEGA F et coll. Progress in development of new attenuated strains of *Salmonella typhi* as live oral vaccines against typhoid fever. In : *New generation vaccines*, LEVINE MM, WOODROW GC, KAPER JB and COBON GS Eds. M. Dekker Inc. New York, 1997 : 437-446
- LI A, PAL T, FORSUM U, LINDBERG AA. Safety and immunogenicity of the live oral auxotrophic *Shigella flexneri* SFL124 in volunteers. *Vaccine* 1992, **10** : 395-404
- LINDBERG AA, PAL T. Strategies for development of potential candidate *Shigella* vaccines. *Vaccine* 1993, **11** : 168-179
- LINHARES AC, GABBAY YB, MASCARENHAS JDP, DEFREITAS RB, OLIVEIRA CS et coll. Immunogenicity, safety and efficacy of tetravalent rhesus-human, reassortant rotavirus vaccine in Belem, Brazil. *Bull World Health Organ* 1996, **74** : 491-500
- LIVINGSTON JB, LU S, ROBINSON H, ANDERSON DJ. Immunization of the female genital tract with a DNA-based vaccine. *Infect Immun* 1998, **66** : 322-329
- LOWELL GH. Proteosomes for improved nasal, oral, or injectable vaccines. In : *New generation vaccines*, LEVINE MM, WOODROW GC, KAPER JB and COBON GS Eds. M. Dekker Inc. New York, 1997 : 193-206
- LOWELL GH, KAMINSKI RW, VANCOTT TC, SLIKE B, KERSEY K et coll. Proteosomes, emulsomes, and cholera toxin B improve nasal immunogenicity of human immunodeficiency virus gp160 in mice : induction of serum, intestinal, vaginal, and lung IgA and IgG. *J Infect Dis* 1997, **175** : 292-301
- MANICKAN E, KAREM KL, ROUSE BT. DNA vaccines. A modern gimmick or a boon to vaccinology ? *Critic Rev Immunol* 1997, **17** : 139-154
- MANNINO RJ, GOULD-FOGERITE S. Antigen cochleate preparations for oral and systemic vaccination. In : *New generation vaccines*, LEVINE MM, WOODROW GC, KAPER JB and COBON GS Eds. M. Dekker Inc. New York, 1997 : 229-237
- MARSHALL BJ. Unidentified curved bacillus on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1983, **1** : 1273-1275

MCDERMOTT MR, BIENENSTOCK J. Evidence for a common mucosal immunologic system. I. Migration of B immunoblasts into intestinal, respiratory, and genital tissues. *J Immunol* 1979, **122** : 1892-1898

MCGHEE JR, KIYONO H. New perspectives in vaccine development : mucosal immunity to infections. *Infect Agents Dis* 1993, **2** : 55-73

MESTECKY J, MOLDOVEANU Z, MICHALEK SM, MORROW CD, COMPANS RW et coll. Current options for vaccine delivery systems by mucosal routes. *J Controlled Release* 1997, **48** : 243-257

MICHETTI P, KREISS C, KOTLOFF K, PORTA N, BLANCO JL et coll. Oral immunization of *H. pylori* infected adults with recombinant urease and LT adjuvant. *Gastroenterology* 1997, **112** : A1042

MIDTHUN K, KAPIKIAN AZ. Rotavirus vaccines : an overview. *Clin Microbiol Rev* 1996, **9** : 423-434

MOWAT AM, VINEY JL. The anatomical basis of intestinal immunity. *Immunol Rev* 1997, **156** : 145-166

MURPHY BR, PARK EJ, GOTTLIEB P, SUBBARAO K. An influenza A live attenuated reassortant virus possessing three temperature-sensitive mutations in the PB2 polymerase gene rapidly loses temperature sensitivity following replication in hamsters. *Vaccine* 1997, **15** : 1372-1378

NAKAGOMI O, NAKAGOMI T. Rotavirus vaccines : a perspective. *Microbiol Immunol* 1996, **40** : 701-709

NARDELLI-HAEFLIGER D, KRAEHENBUHL JP, CURTISS III R, SCHODEL F, POTTS A et coll. Oral and rectal immunization of adult female volunteers with a recombinant attenuated *Salmonella typhi* vaccine strain. *Infect Immun* 1996, **64** : 5219-5224

NATARO JP, KAPER JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 1998, **11** : 142-201

NORIEGA FR, LOSONSKY G, WANG JY, FORMAL SB, LEVINE MM. Further characterization of *AraoA AvirG Shigella flexneri* 2a strain CVD 1203 as a mucosal *Shigella* vaccine and as a live-vector vaccine for delivering antigens of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1996a, **64** : 23-27

NORIEGA FR, LOSONSKY G, LAUDERBAUGH C, LIAO FM, WANG JY, LEVINE MM. Engineered *AguaB-A AvirG Shigella flexneri* 2a strain CVD 1205 : construction, safety, immunogenicity, and potential efficacy as a mucosal vaccine. *Infect Immun* 1996b, **64** : 3055-3061

NORIEGA F, FORMAL SB, KOTLOFF KL, LINDBERG AA. Vaccines against *Shigella* infections. Part II : engineered attenuated mutants of *Shigella* as live oral vaccines. In : New generation vaccines, LEVINE MM, WOODROW GC, KAPER JB and COBON GS Eds. M. Dekker Inc. New York, 1997 : 853-863

OFFIT PA. Host factors associated with protection against rotavirus disease : the skies are clearing. *J Infect Dis* 1996, **174** : S59-S64

OFFIT PA, CLARK HF, KAPIKIAN AZ. Vaccines against rotavirus. In : New generation vaccines, LEVINE MM, WOODROW GC, KAPER JB and COBON GS Eds. M. Dekker Inc. New York, 1997 : 659-671

- O'HAGAN DT. Prospects for the development of new and improved vaccines through the use of microencapsulation technology. In : New generation vaccines, LEVINE MM, WOODROW GC, KAPER JB and COBON GS Eds. M. Dekker Inc. New York, 1997 : 215-228
- OMS (Organisation Mondiale de la Santé). Research priorities for diarrhoeal disease vaccines : memorandum from a WHO meeting. *Bull World Health Organ* 1991, **69** : 667-676
- OMS (Organisation Mondiale de la Santé). Shigella vaccine research and development. *WHO Weekly Epidemiol Rec* 1997, **72** : 73-79
- OMS-UNICEF. In : State of the world's vaccines and immunization. World Health Organization, United Nations Children's Fund, Geneva, Switzerland, 1996
- PARSONNET J. *Helicobacter pylori* in the stomach. A paradox unmasked. *N Engl J Med* 1996, **335** : 278-280
- PARTIDOS CD, PIZZA M, RAPPUOLI R, STEWARD MW. The adjuvant effect of a non-toxic mutant of heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* for the induction of measles virus-specific CTL responses after intranasal co-immunization with a synthetic peptide. *Immunology* 1996, **89** : 483-487
- PELTOLA H, SIITONEN A, KYRONSEPPA H, SIMULA I, MATTILA L et coll. Prevention of travellers' diarrhoea by oral B-subunit/whole-cell cholera vaccine. *Lancet* 1991, **338** : 1285-1289
- PEREZ-SCHAEFEL I, GUNTINAS MJ, PAGONE V, ROJAS AM, GONZALEZ R et coll. Efficacy of the rhesus rotavirus-based quadrivalent vaccine in infants and young children in Venezuela. *N Engl J Med* 1997, **337** : 1181-1187
- QUIDING-JARBRINK M, GRANSTROM G, NORDSTROM I, HOLMGREN J, CZERKINSKY C. Induction of compartmentalized B-cell responses in human tonsils. *Infect Immun* 1995, **63** : 853-857
- ROBINSON HL. Nucleic acid vaccines : an overview. *Vaccine* 1997, **15** : 785-787
- RUSSELL MW, MOLDOVEANU Z, WHITE PL, SIBERT GJ, MESTECKY J, MICHALEK SM. Salivary, nasal, genital, and systemic antibody responses in monkeys immunized intranasally with a bacterial protein antigen and the cholera toxin B subunit. *Infect Immun* 1996, **64** : 1272-1283
- SABBAJ S, KIYONO H, MCGHEE JR. Mucosal immunisation for enteric diseases : current practice and future prospects. *Biodrugs* 1997, **7** : 134-157
- SACK DA, SACK RB, SHIMKO J, GOMES G, OSULLIVAN D, METCALFE K, SPRIGGS D. Evaluation of Peru-15, a new live oral vaccine for cholera, in volunteers. *J Infect Dis* 1997a, **176** : 201-205
- SACK DA, SHIMKO J, SACK RB, GOMES JG, MACLEOD K, OSULLIVAN D, SPRIGGS D. Comparison of alternative buffers for use with a new live oral cholera vaccine, Peru-15, in outpatient volunteers. *Infect Immun* 1997b, **65** : 2107-2111
- SANCHEZ JL, VASQUEZ B, BEGUE RE, MEZA R, CASTELLARES G et coll. Protective efficacy of oral whole cells/recombinant-B-subunit cholera vaccine in Peruvian military recruits. *Lancet* 1994, **344** : 1273-1276

SANSONETTI PJ, ARONDEL J. Construction and evaluation of a double mutant of *Shigella flexneri* as a candidate for oral vaccination against shigellosis. *Vaccine* 1989, **7** : 443-450

SANSONETTI PJ, ARONDEL J, FONTAINE A, D'HAUTEVILLE H, BERNARDINI ML. *OmpB* (osmo-regulation) and *icsA* (cell-to-cell spread) mutants of *Shigella flexneri* : vaccine candidates and probes to study the pathogenesis of shigellosis. *Vaccine* 1991, **9** : 416-422

SANTOSHAM M, MOULTON LH, REID R, CROLL J, WEATHERHOLT R et coll. Efficacy and safety of high-dose rhesus-human reassortant rotavirus vaccine in native American populations. *J Pediatr* 1997, **131** : 632-638

SAVARINO SJ, BROWN FM, HALL E, BASSILY S, YOUSSEF F et coll. Safety and immunogenicity of an oral, killed enterotoxigenic *Escherichia coli*-cholera toxin B subunit vaccine in Egyptian adults. *J Infect Dis* 1998, **177** : 796-799

SCHUBBERT R, RENZ D, SCHMITZ B, DOERFLER W. Foreign (M13) DNA ingested by mice reaches peripheral leukocytes, spleen, and liver via the intestinal wall mucosa and can be covalently linked to mouse DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, **94** : 961-966

SHALABY WSW. Development of oral vaccines to stimulate mucosal and systemic immunity : barriers and novel strategies. *Clin Immunol Immunopath* 1995, **74** : 127-134

SIMASATHIEN S, MIGASENA S, BELLINI W, SAMAKOSES R, PITISUTTITHAM P et coll. Measles vaccination of Thai infants by intranasal and subcutaneous routes : possible interference from respiratory infections. *Vaccine* 1997, **15** : 329-334

SIZEMORE DR, BRANSTROM AA, SADOFF JC. Attenuated *Shigella* as a DNA delivery vehicle for DNA-mediated immunization. *Science* 1995, **270** : 299-302

SMITH J, HADDIX A, TEUTSCH S, GLASS RI. Cost effectiveness analysis of a rotavirus immunization program for the United States. *Pediatrics* 1995, **96** : 609-615

SNIDER DP, MARSHALL JS, PERDUE MH, LIANG H. Production of IgE antibody and allergic sensitization of intestinal and peripheral tissues after oral immunization with protein Ag and cholera toxin. *J Immunol* 1994, **153** : 647-657

STEWART-TULL DES, JONES AC. Adjuvanted oral vaccines should not induce allergic responses to dietary antigens. *FEMS Microbiol Letters* 1992, **100** : 489-496

STRUCK MM. Vaccine R&D success rates and development times. *Nature Biotech* 1996, **14** : 591-593

SVENNERHOLM AM, AHREN C, JERTBORN M. Vaccines against enterotoxigenic *Escherichia coli* infections. Part I : oral inactivated vaccines against enterotoxigenic *Escherichia coli*. In : New generation vaccines, LEVINE MM, WOODROW GC, KAPER JB and COBON GS Eds. M. Dekker Inc. New York, 1997 : 865-873

SZTEIN MB, WASSERMAN SS, TACKET CO, EDELMAN R, HONE D et coll. Cytokine production patterns and lymphoproliferative responses in volunteers orally immunized with attenuated vaccine strains of *Salmonella typhi*. *J Infect Dis* 1994, **170** : 1508-1517

TACKET CO, REID RH, BOEDEKER EC, LOSONSKY G, NATARO JP et coll. Enteral immunization and challenge of volunteers given enterotoxigenic *E. coli* CFA/II encapsulated in biodegradable microspheres. *Vaccine* 1994, **12** : 1270-1274

TACKET CO, LEVINE MM. Vaccines against enterotoxigenic *Escherichia coli* infections. Part II : live oral vaccines and subunit (purified fimbriae and toxin subunit) vaccines. In : New generation vaccines, LEVINE MM, WOODROW GC, KAPER JB and COBON GS Eds. M. Dekker Inc. New York, 1997 : 875-883

TACKET CO, KELLY SM, SCHODEL F, LOSONSKY G, NATARO JP et coll. Safety and immunogenicity in humans of an attenuated *Salmonella typhi* vaccine vector strain expressing plasmid-encoded hepatitis B antigens stabilized by the Asd-balanced lethal vector system. *Infect Immun* 1997a, **65** : 3381-3385

TACKET CO, KOTLOFF KL, LOSONSKY G, NATARO JP, MICHALSKI J et coll. Volunteer studies investigating the safety and efficacy of live oral El Tor *Vibrio cholerae* O1 vaccine strain CVD 111. *Am J Trop Med Hyg* 1997b, **56** : 533-537

TACKET CO, SZTEIN MB, LOSONSKY GA, WASSERMAN SS, NATARO JP et coll. Safety of live oral *Salmonella typhi* vaccine strains with deletions in *htrA* and *aroC aroD* and immune response in humans. *Infect Immun* 1997c, **65** : 452-456

TACKET CO, MASON HS, LOSONSKY G, CLEMENS JD, LEVINE MM, ARNTZEN CJ. Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial antigen delivered in a transgenic potato. *Nature Med* 1998, **4** : 607-609

TAKAHASHI I, MARINARO M, KIYONO H, JACKSON RJ, NAKAGAWA I et coll. Mechanisms for mucosal immunogenicity and adjuvancy of *Escherichia coli* labile enterotoxin. *J Infect Dis* 1996, **173** : 627-635

TAMURA SI, YAMANAKA A, SHIMOHARA M, TOMITA T, KOMASE K et coll. Synergistic action of cholera toxin B subunit (and *Escherichia coli* heat-labile toxin B subunit) and a trace amount of cholera toxin as an adjuvant for nasal influenza vaccine. *Vaccine* 1994a, **12** : 419-426

TAMURA SI, SHOJI Y, HASIGUCHI K, AIZAWA C, KURATA T. Effects of cholera toxin adjuvant on IgE antibody response to orally or nasally administered ovalbumin. *Vaccine* 1994b, **12** : 1238-1240

TAYLOR DN, TROFA AC, SADOFF J, CHU C, BRYLA D et coll. Synthesis, characterization, and clinical evaluation of conjugate vaccines composed of the O-specific polysaccharides of *Shigella dysenteriae* type 1, *Shigella flexneri* type 2a, and *Shigella sonnei* (*Plesiomonas shigelloides*) bound to bacterial toxoids. *Infect Immun* 1993, **61** : 3678-3687

TAYLOR DN, TACKET CO, LOSONSKY G, CASTRO O, GUTIERREZ J et coll. Evaluation of a bivalent (CVD 103-HgR/CVD 111) live oral cholera vaccine in adult volunteers from the United States and Peru. *Infect Immun* 1997, **65** : 3852-3856

TELFORD JL, GHIARA P. Prospects for the development of a vaccine against *Helicobacter pylori*. *Drugs* 1996, **52** : 799-804

TRACH DD, CLEMENS JD, KE NT, THUY HT, SON ND et coll. Field trial of a locally produced, killed, oral cholera vaccine in Vietnam. *Lancet* 1997, **349** : 231-235

TSUJI T, YOKOCHI T, KAMIYA H, KAWAMOTO Y, MIYAMA A, ASANO Y. Relationship between a low toxicity of the mutant A subunit of enterotoxigenic *Escherichia coli* enterotoxin and its strong adjuvant action. *Immunology* 1997, **90** : 176-182

TZSCHASCHEL BD, KLEE SR, DELORENZO V, TIMMIS KN, GUZMAN CA. Towards a vaccine candidate against *Shigella dysenteriae* 1 : expression of the Shiga toxin B-subunit in an attenuated *Shigella flexneri aroD* carrier strain. *Microb Pathog* 1996, **21** : 277-288

- UEHLING DT, HOPKINS WJ, BALISH E, XING YN, HEISEY DM. Vaginal mucosal immunization for recurrent urinary tract infection : phase II clinical trial. *J Urol* 1997, **157** : 2049-2052
- VALLE J, SEPPALA K, SIPPONEN P, KOSUNEN T. Disappearance of gastritis after eradication of *Helicobacter pylori*. *Scand J Gastroenterol* 1991, **26** : 1057-1065
- VAN LOON FP, CLEMENS JD, CHAKRABORTY J, RAO MR, KAY BA et coll. Field trial of inactivated oral cholera vaccines in Bangladesh : results from 5 years of follow-up. *Vaccine* 1996, **14** : 162-166
- VESIKARI T, JOENSUU J. Review of rotavirus vaccine trials in Finland. *J Infect Dis* 1996, **174** : S81-S87
- VIRET JE, CRYZ SJ JR, FAVRE D. Expression of *Shigella sonnei* lipopolysaccharide in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol* 1996, **19** : 949-963
- WALKER RI. New strategies for using mucosal vaccination to achieve more effective immunization. *Vaccine* 1994, **12** : 387-400
- WARREN JR. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1983, **1** : 1273
- WASSEN L, SCHON K, HOLMGREN J, JERTBORN M, LYCKE N. Local intravaginal vaccination of the female genital tract. *Scand J Immunol* 1996, **44** : 408-414
- WENNERAS C, SVENNERHOLM AM, AHREN C, CZERKINSKY C. Antibody-secreting cells in human peripheral blood after oral immunization with an inactivated enterotoxigenic *Escherichia coli* vaccine. *Infect Immun* 1992, **60** : 2605-2611
- WOLF MK. Occurrence, distribution, and associations of O and H serogroups, colonization factor antigens, and toxins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 1997, **10** : 569-584
- WU HY, RUSSEL MW. Nasal lymphoid tissue, intranasal immunization, and compartmentalization of the common mucosal immune system. *Immunol Res* 1997, **16** : 187-201
- WU HY, RUSSELL MW. Induction of mucosal and systemic immune responses by intranasal immunization using recombinant cholera toxin B subunit as an adjuvant. *Vaccine* 1998, **16** : 286-292