

Choléra: progrès récents en matière de recherche: Mémoire d'une Réunion de l'OMS*

Vibrio cholerae O1 est une cause importante de maladies diarrhéiques dans la plus grande partie de l'Asie et de l'Afrique. La septième pandémie de choléra poursuit sa progression (92 pays étant atteints à l'heure actuelle) et on signale de plus en plus souvent que d'autres micro-organismes apparentés à V. cholerae O1 sont à l'origine de diarrhées, tant épidémiques qu'endémiques.

Les travaux récents ont considérablement amélioré la compréhension de certaines questions comme le mode de transmission du choléra, les mécanismes par lesquels V. cholerae O1 provoque la maladie, et le fonctionnement de la réponse immunitaire locale au niveau de l'intestin, qui protège les individus de l'infection. Ces progrès ont abouti notamment à la mise au point de vaccins anticholériques expérimentaux (provenant de souches non vivantes ou de souches vivantes atténuées) dont on peut penser qu'ils deviendront de nouveaux outils dans la lutte contre le choléra. Le Groupe de travail scientifique sur les infections intestinales bactériennes a procédé à l'examen de ces questions lors d'une réunion qui s'est tenue à Genève (Suisse) en septembre 1984 et il a formulé des recommandations en vue des recherches futures, dont on trouvera l'exposé ci-dessous.

ÉPIDÉMIOLOGIE ET ÉCOLOGIE DU CHOLÉRA

La septième pandémie

Depuis le début, en 1961, de la pandémie actuelle, le choléra sévit, sous forme endémique et/ou épidémique, dans de nombreux pays d'Afrique, d'Asie, de Méditerranée orientale et d'Europe méridionale. Malgré son intérêt, le nombre de cas de morbidité et de mortalité notifiés à l'OMS rend mal compte de l'ampleur du problème, quantité de cas et de décès n'étant pas diagnostiqués et les nombres notifiés étant généralement inférieurs à la réalité. On ne connaît qu'une région du monde qui ait été épargnée par le choléra pendant cette pandémie, l'Amérique du Sud.

Dans certaines régions d'endémie, la transmission tend à avoir un caractère nettement saisonnier. Au Bangladesh et en Inde, par exemple, la survenue de cas tout au long de l'année n'empêche pas qu'il existe des pics saisonniers typiques. Dans d'autres régions où le choléra n'est devenu endémique que plus récemment ou n'a pas été bien étudié, ce caractère est moins

net. Des études plus nombreuses sont nécessaires pour interpréter les profils épidémiologiques du choléra, notamment dans les zones d'endémie d'Afrique et de Méditerranée orientale.

Au cours de ces dernières années, des épidémies de choléra provoquées par des souches de *V. cholerae* O1, biotype eltor, résistantes à de nombreux antibiotiques, ont frappé le Bangladesh et la République-Unie de Tanzanie. Les souches épidémiques observées étaient porteuses de plasmides de résistance. On avait déjà auparavant isolé des souches antibiorésistantes de *V. cholerae* O1, qui toutefois n'avaient pas provoqué d'épidémies. Il est probable que, tout au moins en Tanzanie, une pression excessive des antibiotiques, résultant en grande partie de la prophylaxie de masse du choléra, a contribué à la dissémination de ces souches.

V. cholerae O1 de biotype classique a fait récemment sa réapparition au Bangladesh où, depuis 1973, il avait été apparemment remplacé par le biotype eltor. De 1979 à 1981, les souches appartenant au biotype classique n'ont été isolées que de temps en temps alors qu'en septembre 1982 ce biotype a été très largement observé. Depuis lors, les souches classiques et eltor coexistent. Dans l'Inde voisine, c'est le biotype eltor qui reste l'agent étiologique.

Persistance de l'endémicité

Dans certaines régions où le choléra est endémique, aucun cas n'est décelé pendant certains mois de l'année. On ne connaît pas le mécanisme qui permet à

* Le présent Mémoire a été adapté à partir de l'annee 2 du Rapport de la troisième reunion du groupe de travail scientifique sur les infections intestinales bactériennes (OMS, document non publié WHO/CDD/BEI/84.5) qui a été rédigé par les signataires dont la liste figure à la page 56. Un article relatif au choléra et à d'autres diarrhées associées à des vibrios a été publié dans le *Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé*, 59: 27-52 (1981). Les demandes de tirés à part du présent Mémoire doivent être adressées au Directeur du Programme de lutte contre les maladies diarrhéiques, Organisation mondiale de la Santé, 1211 Genève 27, Suisse. La version originale en anglais a été publiée dans le *Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé*, 63: 841-849 (1985).

V. cholerae O1 de se maintenir pendant ce temps-là, et qui est probablement différent selon le biotype, classique ou eltor, et également selon le climat; ce mécanisme a sans aucun doute une extrême importance pour la compréhension de l'épidémiologie de la maladie et l'efficacité de la lutte. A cet égard, quatre hypothèses ont été avancées, à savoir la persistance de *V. cholerae* O1 a) dans des populations animales; b) chez des porteurs chroniques excréant le vibron de façon discontinue; c) grâce à une transmission continue de faible importance à partir de porteurs asymptomatiques et de cas cliniques bénins; d) dans un ou plusieurs réservoirs aquatiques.

Le mécanisme a) est étudié depuis des années et paraît improbable, tandis que b) est possible mais jugé toutefois d'une importance mineure. Le mécanisme c) est considéré comme responsable, au moins en partie, de la persistance de l'endémicité dans les régions où celle-ci est forte, comme en Inde et au Bangladesh, où des cas de choléra surviennent durant toute l'année. L'intervention de ce mécanisme dans les régions d'endémie d'Afrique et de Méditerranée orientale n'a pas encore été étudiée en détail. Le mécanisme d), enfin, était considéré comme peu vraisemblable jusque vers 1965, mais il retient davantage l'attention ces derniers temps. Il est examiné plus en détail ci-dessous.

Rôle des réservoirs aquatiques. Les études épidémiologiques effectuées en Australie, en Italie (Sardaigne) et dans le sud-est des Etats-Unis d'Amérique montrent que l'existence d'un réservoir aquatique de *V. cholerae* eltor est possible et peut expliquer le maintien de l'endémicité dans une région. Le rôle du réservoir aquatique a été clairement mis en évidence aux Etats-Unis d'Amérique où il n'y a pas de propagation secondaire et où des cas sporadiques sont survenus pendant les mois d'été à la suite de la consommation de fruits de mer crus ou insuffisamment cuits. L'existence de réservoirs analogues dans d'autres régions d'endémie cholérique semble probable.

Les études de laboratoire corroborent l'hypothèse selon laquelle *V. cholerae* eltor en culture pure peut survivre longtemps en eau tiède sans éléments nutritifs. Divers paramètres influent sur la survie, notamment la salinité et le pH. Il est possible que les conditions régnant dans le milieu aquatique jouent un rôle dans la transmission du choléra, tout comme dans la persistance du choléra endémique, étant donné que des conditions optimales peuvent amplifier le risque de transmission par l'intermédiaire des eaux contaminées.

Les microbiotopes aquatiques jouent peut-être aussi un rôle, tant en ce qui concerne le réservoir aquatique que la transmission. Pour ce qui est des souches eltor, deux phénomènes pourraient être

particulièrement importants: l'association et/ou l'adhérence de *V. cholerae* O1 à des plantes et animaux aquatiques (plancton et copépodes notamment). On ne possède à cet égard aucune donnée sur la souche classique de *V. cholerae* O1.

Transmission

L'eau comme les aliments contaminés peuvent servir de véhicule dans la transmission du choléra. En Inde et au Bangladesh, l'eau semble jouer un rôle capital. Dans d'autres régions comme les îles du Pacifique sud, ce sont des flambées d'origine alimentaire qui ont éclaté. Dans le cas où l'eau est le véhicule de l'agent infectieux, ce n'est pas obligatoirement l'eau de boisson qui est en cause; il se peut aussi que de l'eau contaminée servant par exemple pour la vaisselle ou la toilette soit ingérée et transmette l'infection. De plus, l'eau souillée risque également de contaminer les aliments, ce qui aboutit à un choléra d'origine alimentaire. La transmission du choléra est par conséquent complexe et il n'est pas toujours facile de savoir s'il est d'origine alimentaire ou hydrique.

Des études sur des volontaires, de jeunes adultes américains en bonne santé, ont montré que les aliments peuvent en outre avoir pour effet d'abaisser la dose infectante. Un inoculum de 10^3 germes seulement, associé à des aliments ou à un soluté tampon, a conduit à une infection et à la diarrhée, tandis que des doses allant jusqu'à 10^6 vibrons administrées à des sujets à jeun dans de l'eau (sans tampon), n'ont pas provoqué de maladie.

On ne connaît pas le rôle des contagés matériels, mains et draps souillés, etc., dans la transmission du choléra. Le personnel qui a pu observer en République-Unie de Tanzanie des flambées de choléra dans des établissements hospitaliers et pénitentiaires considère qu'il s'agit d'un mode de transmission important, en particulier lorsque les gens sont entassés et que l'hygiène laisse beaucoup à désirer. L'enfant qui contracte un choléra nosocomial est probablement plus sensible que l'enfant normal du fait même de sa maladie (rougeole, malnutrition, affection respiratoire, etc.).

Interruption de la transmission intrafamiliale

Des études sont en cours en Inde et au Bangladesh en vue de trouver des moyens simples permettant d'interrompre la transmission du choléra au sein de la famille. A Calcutta, la javellisation des réserves d'eau du ménage a fait chuter la transmission d'environ 50%; par ailleurs, le remplacement, pour le stockage de l'eau, des seaux par des cruches à col étroit (dans lesquelles il est impossible d'introduire la main ou un récipient) a entraîné une baisse encore plus grande de

la propagation intrafamiliale. A Dacca, on a entrepris des études pour préciser si l'emploi du sulfate double d'aluminium et de potassium (alun), désinfectant bon marché et classique de l'eau, réduit le taux d'infection secondaire au sein de la famille. L'alun, qui précipite les particules en suspension dans l'eau, peut aussi tuer les vibrions en abaissant le pH.

Ces travaux indiquent de nouvelles méthodes de lutte contre les infections secondaires et décrivent une méthodologie simple et peu coûteuse d'étude des voies de transmission. Des études ultérieures devront déterminer les moyens les plus sûrs et les plus efficaces d'appliquer ces techniques.

LYSOTYPIC DE *V. CHOLERA* O1 GROUPE 1

Les études épidémiologiques exigent un système fiable de lysotypie de *V. cholerae* O1. Le plus utilisé ces dernières années est celui qui a été mis au point par le Public Health Laboratory de Maidstone (Angleterre). Grâce à ce schéma, sur 1135 souches, on a pu en typer 99% et l'on a mis en évidence 25 lysotypes. Cependant, 64% des souches appartenaient à trois types, ce qui limite l'intérêt du système. Malgré cet inconvénient, celui-ci s'est révélé utile dans plusieurs études épidémiologiques.

Ce système vient d'être évalué par le Centre collaborateur OMS de Londres pour la lysotypie et l'étude de la pharmacorésistance des entérobactéries. En utilisant les souches fournies par le Public Health Laboratory de Maidstone, il n'a pas été possible de reconfirmer le type phagique de 29 souches sur 37. Ces études ont en outre montré que les phages utilisés pour le typage étaient contaminés; une complication supplémentaire a tenu à l'absence d'un ensemble de souches types. Il en a été conclu qu'avec les réactifs dont on dispose à présent, le système de typage établi à Maidstone n'est pas satisfaisant.

Un autre schéma de lysotypie, mis au point par l'Institut de Recherches scientifiques antipesteuses de Rostov-sur-le-Don (URSS), utilise sept phages virulents d'activité stable— quatre phages de Mukerjee servant au typage des souches du biotype classique et trois autres qui lysent principalement les souches du biotype eltor. Dans les premières études conduites selon ce schéma, on a pu typer 279 des 280 souches du biotype classique et 93% des 2225 souches eltor. Seize lysotypes ont été identifiés. On a constaté par la suite, dans une étude réalisée en collaboration avec le National Institute of Cholera and Enteric Diseases de Calcutta et portant sur 219 souches eltor, que 15% des souches étudiées n'étaient pas typables, que 45% appartenaient au type 13 et que le reste appartenait à d'autres types.

Le Centre collaborateur OMS pour la lysotypie et

l'étude de la pharmacorésistance des entérobactéries a employé les phages de Rostov pour étudier 73 souches de *V. cholerae* O1 biotype eltor et a constaté que 85% donnaient des lysotypes correspondant à ceux décrits par les chercheurs de Rostov. Parmi ces souches, 34% appartenaient au type 13 et 29% aux types 11 et 14. Trois pour cent seulement ont révélé des lysotypes ne correspondant à aucun des lysotypes connus. Bien qu'on n'ait pas disposé des souches types de référence, les résultats de cet examen permettent d'affirmer que les phages qui ont servi au typage n'étaient pas contaminés et que le système établi à Rostov est fiable. Toutefois, l'intérêt de ce procédé est limité sous sa forme actuelle, car 63% des souches eltor appartiennent à 3 lysotypes seulement.

De ce qui précède, on peut conclure que le système élaboré à Maidstone n'est pas satisfaisant pour l'instant. Celui qui a été mis au point à Rostov peut par contre, malgré les limites mentionnées ci-dessus, fournir une bonne base de départ pour la mise au point d'un schéma de lysotypie intéressant.

Il a été proposé que, le jour où l'on disposera d'un tel schéma, l'OMS désigne un centre international chargé de produire, normaliser et distribuer l'ensemble des réactifs nécessaires. Un tel centre pourrait également former des chercheurs dans le but de créer des centres nationaux, participer à la surveillance du choléra à l'échelle mondiale et servir d'organe centralisateur pour les questions de contrôle de qualité et de notification à l'OMS.

PATHOGÉNIE DU CHOLÉRA ET ANTIGÈNES PROTECTEURS POTENTIELS

La pathogénie du choléra et de la diarrhée due à des bactéries entérotoxigènes autres que *V. cholerae* O1 comporte trois phases principales: 1) la colonisation par les bactéries; 2) la production et la libération d'entérotoxines; 3) l'action des toxines et la sécrétion de liquide dans l'intestin. La structure et la fonction de la toxine cholérique (CT) et son action sur les transports liquidiens ont été particulièrement bien mises en lumière. On a récemment identifié d'autres "toxines" que la CT, lesquelles pourraient également jouer un rôle dans la maladie. On connaît beaucoup moins bien le mécanisme par lequel *V. cholerae* O1 colonise l'intestin grêle et libère la toxine. On pense que la colonisation comporte, dans l'ordre: 1) l'attraction, par chimiotactisme, de la bactérie qui vient en contact avec la surface du gel de mucus; 2) la pénétration à l'intérieur de ce gel; 3) sa fixation à la surface des cellules épithéliales; 4) la multiplication des bactéries associées au mucus et à la muqueuse.

Chimiotactisme

Le chimiotactisme des vibrions est un important facteur de virulence dans le choléra expérimental. On a montré que des homogénats d'épithélium intestinal de lapin contiennent des agents chimiotactiques puissants (taxines) auxquels *V. cholerae* O1 peut répondre. Des mutants de *V. cholerae* O1 dépourvus de récepteurs des taxines ont une virulence réduite. La mobilité semble aussi un facteur de virulence important dans le choléra expérimental, car les variants non mobiles sont moins virulents que leurs souches parentales mobiles. La mobilité paraît agir en synergie avec le chimiotactisme et être une condition préalable pour que la pénétration du mucus ait lieu.

Association du vibron et du gel muqueux

L'association de *V. cholerae* O1 avec le mucus et sa croissance dans celui-ci semblent jouer un rôle important dans la virulence. Il se peut qu'elle mette en jeu d'autres types de comportements que celui qui résulte de l'attraction par chimiotactisme, par exemple une interaction basée sur la charge ou une affinité de la surface bactérienne pour des structures présentes dans le mucus. Les mécanismes qui contribuent à l'entrée du vibron dans la couche de mucus et à sa traversée pourraient constituer un domaine d'étude de premier ordre. Ils pourraient impliquer la production d'exo-enzymes telles que l'hémagglutinine soluble (protéase), la mucinase et la neuraminidase (sialidase), que la plupart des souches de *V. cholerae* O1 produisent.

Adhésines

Comparativement aux connaissances relatives à *Escherichia coli* entérotoxigène (ECET), on ne sait pas grand-chose de l'adhérence du vibron cholérique à la bordure en brosse. On n'a pas réussi à mettre en évidence des pili servant à la fixation chez *V. cholerae* O1. On pense plutôt qu'une ou plusieurs des protéines de la membrane externe du vibron pourraient être responsables de la fixation à la muqueuse. Les hémagglutinines de *V. cholerae* O1 liées aux cellules représentent peut-être ces "adhésines". *V. cholerae* O1 peut exprimer au moins deux hémagglutinines différentes: l'une est élaborée par les souches classiques et spécifiquement inhibée par le L-fucose, l'autre est élaborée par les souches eltor et inhibée par le D-mannose. La plupart des souches de *V. cholerae* O1 semblent posséder des gènes codant pour ces deux hémagglutinines, mais l'expression de l'une semble inhiber fortement l'expression de l'autre, en fonction du biotype. L'hémagglutinine fixant le fucose et celle fixant le mannose diffèrent immunologiquement l'une de l'autre et aussi de

l'hémagglutinine soluble (protéase) que les deux biotypes, classique et eltor, sont capables de produire.

Enfin, la toxine cholérique semble participer à la colonisation puisqu'un vibron mutant, incapable de produire la toxine, colonise l'intestin de l'animal moins bien que son parent toxigène; le mécanisme de cet effet n'est pas connu.

Libération de la toxine cholérique

La production et la "libération" de la toxine cholérique comportent diverses étapes: synthèse, traversée de la membrane interne, maturation, assemblage, traversée de la membrane externe (sécrétion) et activation. Ces étapes sont semblables chez *V. cholerae* O1 et ECET si l'on excepte le fait que *V. cholerae* O1 sécrète la toxine cholérique et l'active par protéolyse tandis que ECET accumule la LT sous une forme non activée dans l'espace périplasmique. Les souches toxigènes de *V. cholerae* O1 assemblent les sous-unités A et B dans le périplasma avant de les sécréter; la sécrétion est assurée par un appareil sécréteur localisé dans la membrane externe, qui reconnaît certains domaines structuraux à l'intérieur de la sous-unité B. Il est clair que les processus de libération des entérotoxines sont plus efficaces chez *V. cholerae* O1 que chez *E. coli*. Ces processus comportent un "mécanisme sécrétoire" efficace et des protéases "activatrices" (l'une d'entre elles pourrait être l'hémagglutinine soluble) qui libèrent des toxines activées dans le milieu où elles interagissent avec les tissus de l'hôte et provoquent la maladie.

Toxines autres que la toxine cholérique élaborées par *V. cholerae* O1^a

On a longtemps cru que la CT était entièrement responsable de la sécrétion intestinale d'eau et d'électrolytes et, par conséquent, de la diarrhée aqueuse caractéristique du choléra. Si la CT joue sans aucun doute un rôle prédominant dans ce phénomène, deux observations permettent de penser que *V. cholerae* O1 produit une ou plusieurs autres toxines capables également de provoquer une diarrhée. Tout d'abord, on sait que des souches eltor CT-négatives, comme il en existe dans la nature (l'emploi de sondes d'ADN a confirmé que ces souches sont dépourvues du gène CT), entraînent une sécrétion intestinale lorsque ces souches, ou leurs surnageants de culture, sont inoculées à certains modèles animaux; parmi ces souches, les unes ont été isolées dans l'environnement, les autres à partir de sujets diarrhéiques. Ensuite, on a constaté qu'une

^a Voir p. 52-53 section "Vaccins vivants atténués buccaux".

diarrhée bénigne ou modérée survient chez 30% ou plus des volontaires en bonne santé ingérant des souches viables, CT-négatives, de *V. cholerae* O1 du biotype classique ou du biotype eltor; les souches employées étaient des souches dont le gène CT avait été lésé au moyen de mutagènes ou éliminé sélectivement par recombinaison de l'ADN. Cette ou ces toxines, différentes de la CT, sont importantes car, du fait qu'elles provoquent la diarrhée, elles retirent aux souches qui les produisent tout intérêt comme vaccins buccaux vivants éventuels.

On ne connaît pas la nature de la ou des toxines non CT. Les travaux effectués dans un laboratoire donnent à penser qu'il s'agit d'une protéine thermolabile. De nombreuses souches de *V. cholerae* O1 fabriquant une toxine analogue à celle du bacille de Shiga (toxine "shiga-like"), on a aussi suggéré que celle-ci pouvait être le facteur responsable. De plus, d'après certains auteurs, l'hémolysine soluble élaborée par de nombreux vibriens eltor serait en cause; il existe également des gènes codant pour cette hémolysine chez les souches classiques.

VACCINATION CONTRE LE CHOLÉRA

Stimulation de l'immunité

Du fait du caractère superficiel de l'infection par *V. cholerae* O1, qui n'implique pas l'invasion de la muqueuse par le vibron, l'immunité ne peut être médiée que par des mécanismes agissant à la surface de la muqueuse ou dans la lumière intestinale. A l'heure actuelle, le seul moyen connu de défense immunitaire qui soit efficace à ces deux niveaux est l'anticorps. L'abondance des IgA sécrétoires (sIgA) dans les sécrétions intestinales et la bile évoque leur importance dans l'immunité anticholérique. Cependant, d'autres immunoglobulines, à savoir les IgG produites localement ou circulantes, et les IgM, pourraient aussi intervenir dans le mécanisme.

L'antigène absorbé localement est le meilleur moyen de stimuler les réponses intestinales en sIgA. Les étapes principales sont alors: 1) le transport de l'antigène de la lumière intestinale jusqu'aux follicules lymphoïdes sous-muqueux (plaques de Peyer) par des cellules épithéliales spécialisées appelées cellules M; 2) l'induction par l'antigène, à l'intérieur des plaques de Peyer, de la prolifération des lymphocytes intervenant dans la production d'IgA; 3) la migration de ces cellules par voie lymphatique et sanguine jusqu'à ce qu'elles se fixent dans la *lamina propria* intestinale ou dans d'autres territoires sécréteurs, les glandes mammaires par exemple, ou elles se transforment en plasmocytes mûrs; 4) la sécrétion d'IgA, transportées vers la lumière intestinale ou excrétées dans la bile sous forme de

sIgA. Cette réponse en sIgA comporte la constitution d'une mémoire immunologique qui pourrait jouer un rôle important dans le maintien d'une immunité locale durable. En cas d'immunisation intestinale répétée, les réponses en sIgA tendent à augmenter et la mémoire se développe, ce qui accroît l'intensité de l'immunité et sa durée. Les mécanismes et les territoires impliqués dans la production d'autres classes d'anticorps intestinaux sont moins clairs.

Contrairement à l'immunisation par voie buccale, l'antigène administré par voie parentérale ne stimule que très faiblement la réponse en sIgA au niveau de la muqueuse; il peut cependant renforcer cette réponse, tout au moins brièvement, après une stimulation initiale par voie buccale. L'immunisation par voie parentérale a l'inconvénient majeur, mis en évidence chez l'animal, d'entraîner en fin de compte une dépression marquée du système sIgA, rendant l'immunisation ultérieure par voie buccale moins efficace.

En outre, la forme sous laquelle l'antigène est administré influe nettement sur l'efficacité de la vaccination. *V. cholerae* O1 vivant est transporté activement par les cellules M jusque dans les plaques de Peyer, et représente l'agent immunisant le plus efficace contre le choléra; en outre, il a l'avantage d'offrir à l'immunostimulation un éventail antigénique complet. *V. cholerae* O1 tué est, lui, très mal absorbé et beaucoup moins immunogène. Les antigènes isolés de *V. cholerae* O1 sont également immunogènes mais ont généralement une efficacité assez faible, des doses importantes et multiples étant nécessaires pour susciter une protection notable. La toxine cholérique fait exception puisqu'elle est fortement immunogène, mais elle est trop toxique pour être utilisable en pratique. Une meilleure connaissance des facteurs qui influent sur la fixation de l'antigène par les cellules M aiderait peut-être à concevoir des immunogènes efficaces. Il se peut que les antigènes particuliers se révèlent plus efficaces que les antigènes solubles, et l'on pourra sans doute mettre au point des adjuvants administrables par voie buccale en vue de renforcer les réponses en sIgA; ces domaines doivent faire l'objet d'études plus poussées.

La vaccination anticholérique doit viser à prévenir la colonisation bactérienne et l'action de la toxine. Les études réalisées chez les animaux de laboratoire, et à plus petite échelle chez l'homme, montrent que les anticorps dirigés contre la toxine cholérique sont protecteurs, notamment ceux qui sont dirigés contre la sous-unité B, tout comme les anticorps dirigés contre les déterminants spécifiques de sérotype situés sur le lipopolysaccharide (LPS) de *V. cholerae* O1. Associés, les antitoxines et les anticorps antibactériens (anti-LPS) ont une action protectrice potentialisée. On a de plus observé que l'anticorps dirigé

contre l'hémagglutinine liée à la cellule produite par *V. cholerae* O1 eltor (préalablement purifiée) protège contre le choléra expérimental.

Les protéines de la membrane externe (OMP) de *V. cholerae* O1 ont été étudiées en tant qu'antigènes protecteurs éventuels. Plusieurs semblent communes aux souches de *V. cholerae* O1 des deux biotypes et sérotypes et 50% des volontaires convalescents manifestent de faibles réponses sériques et intestinales en IgA vis-à-vis des OMP. Néanmoins, des rats inoculés au niveau de l'intestin ou des plaques de Peyer avec une souche rugueuse vivante de *V. cholerae* O1 (c'est-à-dire qui exprime les OMP mais non le LPS) ou avec une préparation d'OMP provenant de cette même souche, n'ont pas été protégés contre une inoculation d'épreuve pratiquée avec une souche lisse vivante de *V. cholerae* O1. Ces études semblent confirmer le rôle protecteur du LPS mais infirmer celui des OMP.

Le rôle protecteur de chacun des antigènes de *V. cholerae* O1 peut se résumer ainsi: le LPS et la toxine cholérique (sous-unité B) ou procholéra-génoïde ont un pouvoir protecteur; les hémagglutinines liées à la cellule et la protéine flagellaire sont probablement protectrices; les autres OMP, diverses enzymes, notamment celles qui hydrolysent le mucus, et les toxines autres que la toxine cholérique, pourraient être protectrices.

Evaluation des vaccins potentiels chez l'homme

Plusieurs nouveaux vaccins anticholériques potentiels viennent d'être mis au point. Ils ont en commun d'être administrés par voie buccale, afin de stimuler préférentiellement et le plus efficacement possible la production d'anticorps IgA sécrétoires dans l'intestin. Les vaccins se composent soit d'antigènes non vivants soit de souches vivantes atténuées.

Antigènes non vivants. On a montré chez des volontaires adultes bangladais qu'un antigène non vivant administrable par voie buccale et associant la sous-unité B (1 mg) à des vibrions tués induit une réponse intestinale en anticorps semblable à celle que produit l'infection naturelle. Par la suite, on a administré le même vaccin à plus forte dose à des jeunes volontaires nord-américains en bonne santé, après neutralisation de l'acidité gastrique par la cimétidine et NaHCO₃. Ce vaccin était constitué de 5 mg de sous-unité B additionnés de 2×10^{11} vibrions tués par dose, et a été administré à trois reprises, aux jours 1, 14 et 28. Il a suscité l'élévation des anticorps antitoxiques et vibriocides dans le sérum et dans le liquide jéjunal chez la plupart des volontaires. Une épreuve virulente pratiquée un mois plus tard a montré que le vaccin conférait une protection modérée contre le choléra (64%). La protection a été

à peu près du même ordre chez un autre groupe de volontaires vaccinés par les seuls vibrions entiers.

Un deuxième vaccin associé buccal comportant trois doses de procholéra-génoïde (50 µg, 50 µg et 200 µg) et une préparation différente de vibrions tués (2×10^{11} par dose) a été administré à des volontaires nord-américains. Par rapport au vaccin sous-unité B/vibrions entiers, le taux de séroconversion s'est montré beaucoup plus faible pour l'anticorps vibriocide et sensiblement identique pour l'antitoxine. Ce vaccin n'a pas beaucoup abaissé le taux d'atteinte par le choléra lors d'une inoculation d'épreuve, mais la gravité de la maladie a été considérablement réduite chez les sujets vaccinés. Les vaccins non vivants buccaux se sont montrés inoffensifs dans toutes ces études; aucune réaction indésirable ne s'est produite chez les volontaires bangladais ou nord-américains.

Un essai pratique du vaccin associé sous-unité B/germes entiers fabriqué par l'Institut Mérieux de Lyon (France) sera effectué au Bangladesh en 1985 par le Centre international de Recherche sur les Maladies diarrhéiques, en collaboration avec le Gouvernement du Bangladesh et l'Organisation mondiale de la Santé. Il s'agira d'un essai contrôlé, randomisé, en double aveugle qui portera sur environ 165 000 participants et aura pour but de comparer l'efficacité de trois doses des préparations suivantes: a) vaccin associé, b) vaccin buccal tué composé de vibrions entiers, c) placebo.

Un autre nouveau vaccin buccal non vivant est constitué d'une fraction brute de la paroi de *V. cholerae* O1; il est fabriqué par l'Institut Pasteur de Paris. Les premières épreuves d'innocuité ont montré qu'administré par voie orale cet antigène est sûr et stimule la production de l'anticorps vibriocide sérique. D'après les résultats d'un essai préliminaire conduit au Zaïre en 1983, ce vaccin buccal, administré en deux doses à huit jours d'intervalle, posséderait des propriétés protectrices.

Vaccins vivants atténués buccaux. Pour mettre au point de nouveaux vaccins anticholériques buccaux, il existe une autre voie qui consiste à employer les techniques de recombinaison de l'ADN pour atténuer *V. cholerae* O1 virulent en le privant de certaines propriétés qui lui confèrent cette virulence. On doit choisir comme souches parentales des souches qui se montrent pathogènes chez des volontaires et capables de susciter une solide protection. Les gènes codant pour l'holotoxine cholérique ou la sous-unité A enzymatiquement active ont été supprimés pour donner naissance aux souches vaccinales suivantes: Inaba JBK70 eltor, Ogawa NT (A⁻B⁻) classique, Ogawa CVD101 et N1 (A⁻B⁺) classiques. La souche JBK70 a provoqué une diarrhée bénigne chez un certain nombre de receveurs aux doses de 10⁶, 10⁸ et

10^{10} vibrions, associées à NaHCO_3 . La souche CVD101 a entraîné une proportion comparable de diarrhées chez les sujets recevant 10^7 à 10^8 germes. Ces souches vaccinales obtenues par manipulation génétique ont colonisé l'intestin et suscité des réactions en anticorps vibriocides circulants identiques à celles que l'on observe après un choléra clinique. De plus, une dose unique de JBK70 a conféré un haut degré de protection (89%) contre une inoculation d'épreuve pratiquée avec une souche virulente de *V. cholerae* O1 appartenant au sérotype Inaba.

Ces derniers vaccins suscitent des titres élevés d'anticorps et tous deux ont un effet protecteur après une dose unique, mais ils sont à l'origine d'un taux de réactions indésirables trop élevé pour être acceptable. Le JBK70 comme le CVD101 (et vraisemblablement aussi le N1 et le NT) élaborent une toxine "shigalike" et une hémolysine douée d'une activité cytotoxique et entérotoxique. Il reste à voir si la suppression de l'un de ces facteurs de virulence possibles, ou des deux, atténuera encore les souches vaccinales sans affaiblir leur effet protecteur.

AGENTS PATHOGÈNES APPARENTÉS À *V. CHOLERA* O1

Un certain nombre de micro-organismes étroitement apparentés à *V. cholerae* O1 sont l'objet d'un surcroît d'attention car ils pourraient être des agents entéropathogènes importants pour l'homme. Ce groupe comprend *V. cholerae* non O1, *V. mimicus* (rangé jusqu'à ces derniers temps parmi les souches de *V. cholerae* non O1 ne fermentant pas le saccharose), *Aeromonas hydrophila* et *Plesiomonas shigelloides*.

V. cholerae non O1 et *V. mimicus* n'ont jamais été associés qu'à un très faible pourcentage des cas de diarrhée sévère, où que ce soit dans le monde; il semble bien en revanche qu'ils soient une cause importante de diarrhée bénigne dans les régions côtières. Certains isollements obtenus à partir de diarrhées ont un potentiel de virulence (toxines, facteurs de colonisation) bien plus élevé que d'autres. Il est intéressant de constater que parmi les infections dues à ces micro-organismes, beaucoup sont de type non intestinal et comprennent des bactériémies, des infections de plaies et des infections de l'oreille.

Il y a peu de temps encore, *V. cholerae* non O1 était encore appelé vibron non cholérique (NCV) ou vibron non agglutinable (NAG). L'inclusion de *V. cholerae* O1 et non O1 dans la même espèce a entraîné une certaine confusion quant à l'importance qu'il convient d'accorder à la découverte de *V. cholerae* dans un prélèvement. Si les souches non

O1 sont capables de provoquer une diarrhée, elles ne risquent pas comme les souches de sérotype O1 de déclencher une épidémie. Il semble en fait que ce dernier risque soit limité aux souches de *V. cholerae* O1 productrices de CT.

A. hydrophila se trouve partout dans les eaux et le sol et c'est une espèce qu'on isole couramment de l'intestin des animaux (poïkilothermes ou homéothermes) et de l'homme. Chez ce dernier, on l'a associée à une grande variété de maladies, en particulier des infections des tissus mous, des septicémies et des diarrhées. On ignore encore son importance relative en tant qu'agent entéropathogène chez l'homme. *A. hydrophila* a souvent été isolé chez des porteurs sains, mais des enquêtes indiquent qu'on le rencontre toutefois plus fréquemment chez les diarrhéiques que chez des témoins en bonne santé. Le taux d'isolement augmente notablement si l'on utilise des milieux sélectifs. Le plus employé est la gélose à l'ampicilline, car la plupart des souches sont résistantes à cet antibiotique. Ce n'est cependant pas toujours le cas, au Bangladesh par exemple; il est donc conseillé de déterminer la sensibilité à l'ampicilline avant de l'employer comme agent de sélection. A cet effet, d'autres substances comme la novobiocine sont parfois utiles. *A. hydrophila* étant oxydase-positif, on peut appliquer l'épreuve de l'oxydase comme moyen d'identification devant toute colonie suspecte (colonie hémolytique, par exemple).

P. shigelloides est rarement isolé chez les diarrhéiques; néanmoins, cette bactérie pourrait être une cause de diarrhée plus fréquente qu'on ne le pense habituellement; elle n'est pas facile à isoler, mais elle a été associée à des flambées sur lesquelles on dispose de données précises. L'absence d'un milieu sélectif gêne l'isolement de *P. shigelloides*.

Considéré dans son ensemble, ce groupe de micro-organismes "apparentés" est probablement d'importance épidémiologique ou clinique modeste. Toutefois, des recherches complémentaires sur ce groupe sont justifiées du fait qu'on a trouvé chez ces micro-organismes plusieurs facteurs de virulence que possède aussi *V. cholerae* O1. L'étude de ces facteurs a permis de mieux cerner les mécanismes qui sont à la base de la virulence de *V. cholerae* O1, et elle présente en outre un intérêt pour la mise au point de vaccins buccaux vivants atténués contre le choléra.

Facteurs de virulence

V. cholerae non O1 et *V. mimicus*. Une minorité d'isollements, d'origine clinique ou environnementale, élaborent une entérotoxine identique à la CT d'après de nombreux critères physicochimiques, immunologiques et biologiques. En ce qui concerne *V. cholerae* non O1, moins de 10% des isollements

cliniques et moins de 1% des isolements environnementaux produisent cette entérotoxine. Chez *V. mimicus*, la fréquence des souches productrices de toxine est mal connue, mais semble cependant élevée parmi les isolements cliniques effectués au Bangladesh.

Une proportion très importante des souches de *V. cholerae* non O1 et de *V. mimicus* produisent une cytotoxine-hémolysine qui serait un facteur de virulence. Les produits élaborés par différentes souches ont été purifiés dans plusieurs laboratoires. Il s'agit dans tous les cas de protéines thermolabiles ayant une masse moléculaire comprise entre 50 000 et 60 000 et un point iso-électrique allant de 5,5 à 5,7. Elles donnent des réactions antigéniques croisées entre elles ainsi qu'avec l'hémolysine de la souche eltor, purifiée antérieurement par Honda et Finkelshtein. Les substances étudiées jusqu'ici provoquent une intense réaction cutanée locale chez le lapin au bout de 3 à 5 heures, sont létales chez la souris, mais n'entraînent pas de sécrétion liquidienne dans les épreuves de l'anse iléale du lapin ou du souriceau à la mamelle.

Une autre toxine, qui est un facteur associé à la cellule, est cytotoxique pour les cellules HeLa et peut être neutralisée complètement par l'anticorps dirigé contre la toxine de *Shigella dysenteriae*. Une quatrième toxine est thermolabile et à action rapide dans l'épreuve du souriceau à la mamelle. Aucune de ces deux dernières toxines n'a été purifiée.

On ignore la nature des facteurs de surface qui interviennent dans l'adhérence de *V. cholerae* non O1 et de *V. mimicus* à la muqueuse. Certains isolements de *V. mimicus* élaborent une hémagglutinine soluble antigéniquement semblable à celle de *V. cholerae* O1. Certains isolements provenant de l'environnement sont incapables de coloniser la muqueuse de l'intestin grêle dans des modèles animaux, tandis que d'autres, d'origine clinique pour la plupart, se fixent à cette muqueuse et prolifèrent rapidement. Ces observations donnent à penser que, malgré la production sans doute fréquente de toxines chez ces germes, la différence cruciale entre les souches pathogènes et non pathogènes réside dans leur capacité de colonisation.

A. hydrophila. Ce micro-organisme produit deux hémolysines, alpha et bêta. L'hémolysine alpha semble n'agir que sur la membrane des cellules sensibles; sa relation avec le pouvoir pathogène n'est pas déterminée. L'hémolysine bêta est une protéine thermolabile, de masse moléculaire 50 000; elle est cytotoxique pour un grand nombre de lignées cellulaires comme pour les leucocytes, et létales pour les petits animaux de laboratoire. Elle ne provoque pas d'accumulation liquidienne dans l'épreuve de l'anse iléale du lapin mais agit sur le souriceau à la

mamelle au bout de 4 heures.

Plusieurs laboratoires ont mis en évidence la production par *A. hydrophila* d'une entérotoxine protéique, thermolabile et extracellulaire. Séparée de l'hémolysine, cette entérotoxine provoque une accumulation liquidienne dans l'intestin du rat et du lapin sans lésion de la muqueuse. La sécrétion s'installe rapidement (aussi rapidement qu'avec la ST de *E. coli*). L'entérotoxine induit une stéroïdogénèse, une augmentation de l'AMP cyclique et des modifications cytotoxiques des cellules surrénaliennes Y₁ ainsi qu'une élongation des cellules CHO (cellules ovariennes de hamster chinois); cependant, l'activité cytotoxique de l'hémolysine masque souvent cette réaction. On peut accroître la sensibilité des cellules surrénaliennes Y₁ à la toxine par traitement préliminaire à la bêta-galactosidase ou à la bêta-glucosidase. L'entérotoxine d'*A. hydrophila* ne donne pas de réaction antigénique croisée avec la CT, ni avec la LT de *E. coli*, et les souches productrices de cette entérotoxine ne possèdent pas non plus de gènes semblables à ceux qui codent pour la LT de *E. coli*. L'entérotoxine ne semble pas se lier au ganglioside GM₁ ni à des mélanges de gangliosides bruts. On la rencontrerait dans moins de 50% des isolements provenant de sujets diarrhéiques. Une deuxième entérotoxine de *A. hydrophila* a récemment été décrite au Japon; elle est apparentée antigéniquement à la CT. Sa fréquence n'a pas été assez étudiée, mais il semble qu'elle soit basse.

A. hydrophila entérotoxino-gène possède très souvent certaines propriétés: activité hémagglutinante, présence de pili ou de structures analogues et surface cellulaire de caractère hydrophobe. Des profils caractéristiques d'hémagglutination ont été associés à la présence de pili et de protéines de la membrane externe, mais le rôle de ces fractions en tant que facteurs de colonisation n'a pas été établi.

P. shigelloides. On dispose d'assez peu de données sur la virulence de *P. shigelloides*; toutefois, dans l'épreuve de l'anse intestinale de lapin, certaines souches sont capables de provoquer une sécrétion de liquide. Des facteurs de virulence, tels qu'exoenzymes et facteurs de colonisation, n'ont pas encore été décrits.

RECHERCHES NÉCESSAIRES

Epidémiologie et écologie de V. cholerae O1

1) Il convient de parfaire la description de l'épidémiologie du choléra endémique en Afrique et en Méditerranée orientale; on étudiera plus spécialement les variations saisonnières, la transmission, les facteurs de risque et le rôle éventuel des réservoirs aquatiques.

2) Il est indispensable de déterminer les facteurs qui assurent la persistance et la multiplication des deux biotypes de *V. cholerae* O1, notamment dans les micro- et les macrobiotopes aquatiques, et plus particulièrement dans les régions où le choléra est endémique.

3) On aura recours à des moyens simples pour empêcher la propagation secondaire du choléra au sein des familles, par exemple la désinfection de l'eau à l'aide de produits sans danger, efficaces et bon marché ou l'emploi de récipients permettant le stockage domestique de l'eau dans de bonnes conditions.

Lysotypie et autres marqueurs de V. cholerae O1

1) Un schéma de lysotypie plus satisfaisant pour *V. cholerae* est nécessaire. A cet effet, il faut poursuivre la mise au point du système de Rostov, afin de parvenir à une meilleure différenciation des souches. Comme certains lysotypes sont très fréquents, il faudra les subdiviser et disposer pour cela de phages supplémentaires. Il serait souhaitable d'organiser une étude collective de souches provenant de régions d'endémie et d'évaluer ainsi le système dans un ou deux autres laboratoires compétents en lysotypie. Les phages employés pour le typage, les souches types, les souches de culture et un tableau des réactions seraient fournis par le laboratoire de Rostov. Cette étude pourrait être coordonnée par le Programme OMS de lutte contre les maladies diarrhéiques.

2) Outre la lysotypie, il est indispensable de disposer d'autres méthodes de sous-typage de *V. cholerae* O1 pour faciliter les études épidémiologiques sur le choléra. Parmi les méthodes qui pourraient être explorées, il convient de citer le typage d'après les antigènes de surface (autres que le LPS), l'électrophorèse de certaines fractions bactériennes et divers autres systèmes d'analyse biochimique bidimensionnelle (*fingerprinting*).

Pathogénie du choléra et antigènes protecteurs potentiels

1) Il conviendrait d'effectuer des études afin de préciser le ou les processus intervenant dans la colonisation de l'intestin par *V. cholerae* O1, et plus particulièrement d'identifier les antigènes qui joueraient un rôle important dans l'immunité protectrice.

2) Il est nécessaire d'étudier à fond les toxines de *V. cholerae* O1, autres que la toxine cholérique, susceptibles d'induire une sécrétion intestinale, notamment la toxine "shiga-like" et l'hémolysine, afin d'en déterminer le rôle dans la pathogénie de la diarrhée provoquée par *V. cholerae* O1.

Vaccination anticholérique

1) Il est indispensable d'étudier les facteurs qui déterminent le rendement de la fixation de l'antigène par les cellules M, en partant de l'hypothèse qu'un bon rendement augmente l'efficacité de l'immunisation locale. On étudiera la régulation fonctionnelle de ces cellules, la nature des interactions antigène-cellule M influant sur la fixation et les formes antigéniques les mieux absorbées.

2) On tentera de mettre au point des adjuvants efficaces de l'immunisation par voie intestinale; ces produits peuvent agir en renforçant la fixation de l'antigène, en modifiant la fonction des lymphocytes dans les plaques de Peyer, ou par ces deux mécanismes. On veillera à ce que ces adjuvants ne suscitent pas de réponse immunitaire indésirable vis-à-vis d'autres antigènes éventuellement présents dans l'intestin.

3) Dans les études visant à optimiser la vaccination par voie buccale au moyen d'antigènes vivants ou non vivants, éventuellement associés, on examinera les effets possibles de divers éléments sur le degré d'immunité induite et sur sa durée: espacement des prises, quantité et forme de l'antigène, nombre de doses, âge du sujet vacciné.

4) Il est nécessaire d'obtenir des souches atténuées par élimination de certains gènes, à savoir, outre le gène codant pour la toxine cholérique, ceux qui codent pour la toxine "shiga-like", pour l'hémolysine ou pour d'autres produits de sécrétion; on étudiera l'efficacité de ces souches sur des modèles animaux et chez des volontaires non immuns.

5) Afin de les comparer avec les résultats qu'on observe chez les volontaires des régions indemnes d'endémie, on évaluera les effets des souches vaccinales possibles (A⁻B⁺ et diverses souches atténuées) chez des volontaires d'une zone où le choléra est endémique, par exemple en Afrique ou en Asie.

6) L'immunogénicité et l'efficacité du vaccin anticholérique buccal fabriqué par l'Institut Pasteur seront étudiées sur des volontaires.

7) On mettra au point de nouvelles formes galéniques de vaccins buccaux, faciles à administrer aux jeunes enfants. La forme idéale devrait en outre avoir les caractéristiques suivantes: a) ne pas exiger le recours à la chaîne du froid; b) avoir une longue durée de conservation; c) résister au transit gastrique; d) être bon marché et se prêter à la vaccination collective.

Agents pathogènes apparentés à V. cholerae O1

1) On s'efforcera de déterminer la place d'*Aeromonas hydrophila* et de *Plesiomonas shigelloides* parmi les agents entéropathogènes humains. Ces travaux nécessiteront des investigations épidémiologiques conçues avec soin, couplées à l'identification

et à la caractérisation des facteurs de virulence potentiels dans les souches isolées à partir de sujets diarrhéiques, de témoins indemnes de diarrhée, et à partir de sources environnementales.

2) Il serait souhaitable d'encourager la poursuite des études sur les mécanismes de la virulence chez *V. cholerae* non O1 et *V. mimicus*, en particulier des études comparatives avec *V. cholerae* O1, compte tenu de leur intérêt pour la mise au point d'un vaccin anticholérique buccal vivant.

3) Il convient de mettre au point un titrage simple et rapide de la toxine cholérique, de sorte que l'activité toxino-gène des souches de *V. cholerae* puisse être mise en évidence rapidement.

4) Il est nécessaire d'élaborer un milieu sélectif permettant de différencier *V. cholerae* O1 de *V. cholerae* non O1; un tel milieu serait d'un grand intérêt pour l'examen des échantillons d'eau où les deux vibrions peuvent coexister.

*
* * *

G. N. Cooper, School of Microbiology, University of New South Wales, Kensington, New South Wales, Australie

A. Dodin, Institut Pasteur, Paris, France

Y. El Batawi, Faculté de Médecine Kasr El Eini, Le Caire, Egypte

R. Feachem, Department of Tropical Medicine, London School of Hygiene and Tropical Medicine, Londres, Angleterre

J. Holmgren, Département de Microbiologie médicale, Université de Göteborg, Göteborg, Suède

M. M. Levine, Center for Vaccine Development, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, MD, Etats-Unis d'Amérique

F. S. Mhalu, Department of Microbiology/Immunology, Muhimbili Medical Centre, Dar-es-Salaam, Tanzanie

S. C. Pal, National Institute of Cholera and Enteric Diseases (Indian Council of Medical Research), Calcutta, Inde (*Vice-Président*)

N. F. Pierce, Department of Medicine, Francis Scott Key Medical Center, Baltimore, MD, Etats-Unis d'Amérique

B. Rowe, Central Public Health Laboratory, Division of Enteric Pathogens, Londres, Angleterre (*Président*)

D. Sack, International Centre for Diarrhoeal Disease Research, Dacca, Bangladesh

S. C. Sanyal, Institute of Medical Sciences, Banaras Hindu University, Varanasi, Inde

W. M. Spira, Instituto de Investigación Nutricional, Lima, Pérou

Y. Takeda, Département des Infections Bactériennes, Institut de Science Médicale, Université de Tokyo, Japon

A. N. Terentiev, Institut de Recherches scientifiques antipesteuses, Ministère de la Santé d'URSS, Rostov-sur-le-Don, URSS

T. Wadström, Département de Bactériologie et d'Epizootiologie, Biomedicum, Uppsala, Suède

Wanpen Chaicumpa, Département de Microbiologie et d'Immunologie, Faculté de Médecine tropicale, Université Mahidol, Bangkok, Thaïlande

Observateurs

B. Boon, Smith Kline-RIT, Rixensart, Belgique

E. Fürer, Institut sérothérapique et vaccinal, Berne, Suisse

C. Loucq, Institut Mérieux, Lyon, France

R. Mollby, Laboratoire suédois de Bactériologie, Stockholm, Suède

Secrétariat

D. Barua, Programme de lutte contre les maladies diarrhéiques, Organisation mondiale de la Santé, Genève, Suisse (*Consultant*)

J. Keja, Programme élargi de vaccination, Organisation mondiale de la Santé, Genève, Suisse

M. H. Merson, Programme de lutte contre les maladies diarrhéiques, Organisation mondiale de la Santé, Genève, Suisse (*Secrétaire*)

P. Sizaret, Division des Produits biologiques, Organisation mondiale de la Santé, Genève, Suisse

A. Vessereau, Division de la Surveillance épidémiologique et Appréciation de la Situation sanitaire et de ses Tendances, Organisation mondiale de la Santé, Genève, Suisse