

UNIVERSITE DE BAMAKO
Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie

TITRE

**EVALUATION DE
L'IMMUNOGENICITE ET
L'ACCEPTABILITE
DU VACCIN CVD 103 HGR.**

**ESSAI RANDOMISE DE PHASE II CHEZ LES ENFANTS
DE 10 A 14 MOIS A DJICORONI-PARA**

THESE

Présentée et soutenue publiquement le ../.../....à....Heures devant la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie du Mali..

Par **Mariam DIANE Epouse DOUMBIA**

Pour obtenir le grade de **Docteur en Médecine (DIPLOME D'ETAT)**

Examineurs

Président du Jury: **Professeur Mamadou Marouf KEITA**

Membres: **Docteur Souleymane DIALLO**

Docteur Mariam SYLLA

Directeur de thèse: **Professeur Samba Ousmane SOW**

Introduction

Le choléra est connu depuis l'antiquité Grecque, c'est une maladie diarrhéique due à *Vibrio cholerae* appartenant aux sérogroupes 01 et 0139. Le germe est un bacille isolé par Koch en Egypte en 1883 [36]. Le nombre de cas de choléra dans le monde est estimé à 5,5 millions par an dont 20.000 décès en Afrique et 100.000 en Asie avec 1/3 des décès concernant les enfants de moins de 5 ans [20].

Au Mali, la première épidémie de cholera est apparue en Novembre 1970, la deuxième entre 1984 et 1986. En 1995, une épidémie de choléra s'est passée dans la région de Mopti avec 1175 cas dont 188 décès, au même moment dans le cercle de Djenné entre Mai et Novembre, il y a eu 55 cas dont 6 décès [20]. Entre novembre 2003 et janvier 2004, une épidémie de choléra a éclaté dans la région de Mopti (centre), faisant 11 morts parmi plus de 150 malades [35].

Vu l'impact du cholera dans le monde, on a jugé nécessaire les modes de prévention y compris les vaccins. Les premiers vaccins contre le cholera constitués de germes totaux vivants de Ferran (1884) et Hafkine (1892) ou de germes inactifs de Kolle (1896), utilisés par voie sous cutanée ne protégeaient que 50 à 70% des vaccinés pour une durée d'environ 6 mois [9]. Les vaccins actuellement disponibles (par exemple Dukoral®) ne concernent que le séro groupe 01, il n'existe pas encore de vaccins destinés à prévenir les infections dues aux sérogroupes 0139 [24]. La tendance actuelle pour le contrôle du choléra est l'utilisation des vaccins vivants atténués produits par génie génétique.

Un vaccin oral vivant atténué contre le choléra, le CVD 103-HgR (Mutachol®, Orochol®), a récemment été homologué au Canada pour les adultes et les enfants de plus de 2 ans [16] et il est autorisé aussi dans les autres pays développés (Suisse et Australie) et les pays en voie de développement (Philippines). Ce vaccin est fabriqué par Berna Biotech et il existe dans 2 formulations. Une formulation à 5×10^8 CFU (Colony Forming Unit) de la souche *V. cholerae*

CVD 103-HgR serotype Inaba (Orochol®), disponible dans certains pays développés) et l'autre à 5×10^9 CFU de la même souche (OrocholE®, disponibles dans certains pays en voie de développement).

Des études faites aux Etats-Unis ont démontré qu'une dose de Orochol® protège contre les biotypes classique et El Tor tant que les sérotypes Ogawa et Inaba de *V. cholerae* avec un taux de séroconversion supérieur à 90% [74, 42] mais ce taux est beaucoup inférieur à 90% dans les pays en voie de développement. L'OrocholE® a été aussi testé chez les enfants âgés de 3 à 18 mois au Chili et les résultats ont démontré que le taux de séroconversion est de 65% et que le mauvais goût empêche la prise de la quantité totale du vaccin. [44] Nous pensons qu'en menant une étude basée sur l'administration du OrocholE® mélangé à la bouillie locale chez les enfants maliens, nous pourrions améliorer la prise du vaccin. Pour cela nous nous sommes fixés les objectifs décrits dans la section suivante.

Objectifs

Primaires :

- Comparer la réponse des anticorps vibriocidaux après une dose unique du CVD 103-HgR administrée soit avec du tampon ou avec de la bouillie chez les enfants maliens.
- Comparer la fréquence de la diarrhée chez les enfants maliens après avoir reçu :
 - CVD 103-HgR avec de l'eau tamponnée contre de l'eau tamponnée seule et
 - CVD 103-HgR avec de la bouillie contre de la bouillie seule

Secondaires :

- Comparer la réactogénicité (autre que la diarrhée) chez les enfants maliens après ingestion des préparations suivantes
 - CVD 103-HgR avec de l'eau tamponnée contre de l'eau tamponnée seule et
 - CVD 103-HgR avec de la bouillie contre de la bouillie seule
- Comparer l'acceptabilité apparente du goût d'une dose de CVD 103-HgR administrée soit avec de l'eau tamponnée ou avec de la bouillie chez les enfants maliens.
- Evaluer l'excrétion du CVD 103-HgR dans les selles après ingestion de la dose unique du CVD 103-HgR avec du tampon et avec de la bouillie.

GENERALITES

1 HISTORIQUE :

Le choléra est une maladie ancienne, dont le caractère épidémique continue de susciter la panique des populations et des politiques sanitaires dans le monde.

L'histoire du choléra remonte à 2 000 ans. L'Inde a été son berceau antique dans les régions du delta du Gange et du Brahmapoutre. Au moyen âge, il sévissait en Inde, au moyen Orient, en Europe et en Chine. Depuis le XIX^{ème} siècle, date de début d'une analyse scientifique de la maladie, on a recensé sept pandémies de choléra, ayant pris leur origine dans le Delta du Gange, le Bangladesh et les territoires limitrophes n'épargnant aucune région du globe, suivant les axes de déplacement de l'homme (commerce, guerre, tourisme pèlerinages) et tuant de centaines de milliers de personnes [56].

Dans l'histoire du cholera sept pandémies se sont succédées :

Le 19^{ème} siècle date de la description de la première pandémie allant de 1817 à 1823 du fait de pérégrination de l'armée anglaise, atteignant successivement l'Asie, le Moyen Orient et l'Afrique de l'Est [19]. Ainsi, les déplacements de l'homme par la route, les eaux et les voies ferrées pour des raisons belliqueuses ou commerciales ont favorisé la propagation de ce fléau [22].

La deuxième pandémie, celle de 1851, apparaîtra d'abord en 1826 en Chine, puis se déplacera d'Ouest en Est pour atteindre l'Europe et de là, l'Afrique du Nord (Algérie) [19].

La troisième pandémie, baptisée pandémie de la machine à vapeur se maintiendra de 1851 à 1852. Elle traversera l'Atlantique pour atteindre l'Amérique Latine. Les Etats Unis et l'Angleterre seront épargnés du fait de l'application des mesures d'hygiène recommandées en 1851 par la conférence sanitaire internationale.

La quatrième pandémie, favorisée par l'ouverture du Canal de Suez (1863), démarre toujours de l'Inde et de la Chine, mais envahit l'Europe en 1863 par le biais des troupes françaises venant de la guerre d'Indochine [19]. Elle gagnera les Etats-Unis à la faveur de la guerre de sécession par le biais des déplacements des populations, elle atteindra la Russie, la Pologne (1866), et pour la troisième fois l'Afrique et la deuxième fois l'Amérique Latine [19].

La cinquième pandémie apparaîtra en 1881 et persistera jusqu'en 1896 sur tous les continents exceptée l'Australie [22]. C'est au cours de cette pandémie que se feront les premières découvertes sur cette maladie. BOUCHET observe pour la première fois le vibrion cholérique au microscope mais n'en donne pas les caractères bactériologiques [33]. Il faudra attendre les premières cultures du vibrion en 1886 par le bactériologiste Allemand Robert KOCH à partir de selles de cholériques lors de l'épidémie d'Alexandrie en Egypte [33, 9,48]. Deux ans plus tard, l'Espagnol FERRAN mettra au point le premier vaccin anticholérique à Barcelone [19, 23, 2].

La sixième pandémie allant de 1899 à 1923 touchera l'Asie, le Moyen-Orient et l'Est de l'Europe. Elle aurait comme supports principaux le pèlerinage qui favoriserait les flambées épidémiques d'une part et d'autre part les pays à hygiène défectueuse ainsi que ceux en guerre ou en révolution [19].

En 1905, la découverte par GOTSCHLICH du biotype El Tor au Sinaï sur des cadavres de pèlerins annonce une transition épidémiologique (c'est à dire de type classique à type El Tor) : la septième pandémie responsable en 1937 d'épidémies localisées en Indonésie dans les îles célèbres [22, 8, 11, 21, 26]. C'est en 1961 que la pandémie va se répandre dans le monde diffusant dans toute l'Indonésie (1961), puis atteignant l'Extrême-Orient, les Indes (1964), le Moyen-Orient (1966), l'Europe de l'Est (1970), l'Afrique de l'Est et de l'Ouest (1970) et l'Océanie (1979). L'extension à l'Amérique du Sud en 1991 a été marquante car le choléra avait disparu de ce continent depuis 1895. Cette extension a été attribuée au retentissement écologique des catastrophes climatiques, (phénomènes El Nino et Ouragan Mitch) [43]. L'équipe massive des camps de réfugiés Rwandais à Goma au Zaïre en 1994 (70 000 cas et 12 000 morts), rappelle l'impact des guerres et des

déplacements de population, ainsi que les brusques flambées épidémiques de 1997-1998 dans la corne de l'Afrique [30].

Au Mali, la première épidémie est apparue en novembre 1970, la deuxième entre 1984 et 1986, celle de 1995 toucha la région de Mopti faisant 1 175 cas et 188 décès entre Mai et Novembre. Dans le cercle de Djenné, pendant la même période, il y a eu 55 cas dont 6 décès signalés [9]. En Août 2003, le Mali a assisté à l'écllosion d'une nouvelle épidémie de choléra dans les régions de Ségou, Mopti, Tombouctou, Koulikoro et le District de Bamako qui a nécessité la mise en place d'un dispositif de surveillance épidémiologique en urgence.

L'histoire du cholera date de l'antiquité et a entraîné des pertes humaines qui malgré les mesures adoptées continue.

2 DEFINITION :

Le choléra est une maladie diarrhéique due à une bactérie : le *Vibrio.cholerae*. Elle se manifeste par des vomissements et des diarrhées fréquentes et essentiellement liquidiennes (eau de riz), entraînant une déshydratation importante pouvant aboutir au collapsus. Les selles sont afécales hydriques ne contenant ni pus, ni sang, ni glaire car il n'y a pas effraction de la muqueuse intestinale, mais une sécrétion hydro-électrolytique par la muqueuse sous l'action de la toxine. Microscopiquement on n'y observe pas de polynucléaires ni de globules rouges.

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le cholera est une infection intestinale aiguë due à une bactérie, *V. cholerae*. La brève période d'incubation va de moins d'un jour à cinq jours et l'entérotoxine produite par le vibron entraîne une diarrhée aqueuse, abondante et indolore qui peut rapidement provoquer une déshydratation grave et entraîner la mort en l'absence d'un traitement rapide. Dans la plus part des cas, la maladie provoque également des vomissements. [54]

Selon la définition de cas d'OMS, on devrait suspecter un cas de choléra quand :

- dans un secteur où la maladie n'est pas connue pour être présente, un patient âgé de 5 ans ou plus développe la déshydratation sévère ou meurt d'une diarrhée liquidienne aiguë ;

- dans un secteur où il y a une épidémie de choléra, un patient âgé de 5 ans ou plus développe la diarrhée liquidienne aiguë, avec ou sans vomissements.

Un cas de choléra est confirmé quand les *Vibrio cholerae* 01 ou 0139 sont isolés chez n'importe quel patient présentant la diarrhée.

Chez les enfants au-dessous de 5 ans, un certain nombre de microbes pathogènes peuvent produire des symptômes similaires à ceux du choléra, telle que la diarrhée eau de riz.

Pour maintenir la spécificité, donc, les enfants au-dessous de 5ans ne sont pas inclus dans la définition de cas du choléra. [14]

3 EPIDEMIOLOGIE :

3.1 Modalités épidémiques et répartition géographique.

On observe deux modalités épidémiques variant en fonction de la zone géographique [26, 69] :

Le Type Explosif :

Il est surtout observé dans les régions sèches parmi les populations indemnes sous forme de poussées épidémiques aiguës avec des foyers disséminés de façon irrégulière, un paroxysme immédiat et une disparition rapide. La contagion principale est directe inter-humaine. Cette modalité est beaucoup plus meurtrière ; 30 à 70% de la population pouvant être atteinte.

Le Type Traînant :

Il est observé dans les régions côtières, lagunaires, humides et fluviales, à forte densité de population et suit souvent une phase épidémique.

Tout cas diagnostiqué nécessite des mesures préventives immédiates et une enquête épidémiologique ; la maladie est à déclaration obligatoire.

3.2 Agent Pathogène

Le *V. cholerae*, découvert en 1883 par Robert KOCH, est une bactérie strictement humaine responsable d'épidémies redoutables de choléra. Bacille Gram négatif, légèrement incurvé, mobile, oxydase positif, le *V. cholerae* appartient à la famille des Vibrionaceae et au genre *Vibrio* qui comporte plusieurs espèces

bactériennes parmi lesquelles *V. cholerae* et *V. parahaemolyticus* sont pathogènes pour l'homme [8].

Les souches responsables de choléra sont de groupes sérologiques 01 et 0139. On décrit trois types sérologiques : Ogawa, Inaba, et Hikojima. Le *V. cholerae* 01 qui a une nature épidémique possède deux biotypes [75]:

le biotype classique, responsable des six premières pandémies

le biotype El Tor, responsable de la septième pandémie.

Le biotype El Tor diffère du biotype classique par certains de ses caractères. Il lyse les hématies de mouton, agglutine les hématies de poulet et résiste au choléra phage IV et à la polymixine B [26,38].

Depuis 1992, une nouvelle souche, *V. cholerae* 0139, est née en Inde, elle est à l'origine de vagues épidémiques, pouvant faire craindre une huitième pandémie [30,54], mais ceci n'a pas encore été confirmé car il semble que cette souche reste cantonnée dans la zone de l'Asie du Sud-Est.

Au plan antigénique, le vibron 01 comprend un antigène H commun à tous les *Vibrio* et un antigène somatique qui est thermostable avec trois déterminants A, B, et C permettant la définition de trois sérotypes selon la combinaison de ces déterminants : Ogawa (combinaison AB), Inaba (AC) et Hikojima (ABC) plus rare [8, 26, 38]. En Afrique Occidentale, c'est le sérotypes Ogawa qui est le plus souvent rencontré avec des possibilités de conversion vers le sérotypes Inaba comme cela a été décrit au Mali lors de l'épidémie de 1995-1996 [10].

Le *V. cholerae* est un germe ubiquitaire retrouvé en grande quantité dans les selles et les vomissements des malades à raison de 10^{10} germes par ml de liquide cholérique [71]. Le *V. cholerae* est résistant aux solutions alcalines qui constituent un milieu de transport. Il est sensible à la dessiccation, à la chaleur (à 55° il est détruit en une heure), à l'acidité, à la concurrence microbienne surtout présente dans les égouts [34, 46] et aux antiseptiques usuels (chlore, eau de javel, etc.). Dans l'environnement, la survie du germe est importante [26] et est variable en fonction des milieux [8, 26, 47] :

1 à 2 jours dans l'eau de rivière

7 à 13 jours dans l'eau de puits

1 à 20 jours dans les aliments souillés et même d'avantage si l'aliment est conservé au réfrigérateur.

Plus de 30 jours dans la sueur

50 jours dans de lagune saumâtre

Plus de 6 mois chez les porteurs chroniques

Parfois des années dans les eaux profondes, les vases, les planctons et les algues.

3.3 Réservoir de germes.

On distingue deux principaux réservoirs de germes : l'homme et les réservoirs aquatiques.

3.3.1 L'Homme.

Le choléra est une maladie exclusivement humaine. On distingue :

Les porteurs sains ou porteurs asymptomatiques ;

Les convalescents, ils peuvent éliminer pendant 6 à 10 jours des vibrions s'ils ne sont pas soumis à une anti-biothérapie efficace ;

Les malades qui éliminent les germes en grande quantité dans les selles et les vomissements [26] ;

Les cadavres dont les excréta sont potentiellement contagieux [69].

3.3.2 Le réservoir aquatique.

Les eaux stagnantes, eaux de lagunes saumâtres, les plantations, les poissons ou les fruits de mer hébergeant les vibrions représentent une source accessoire de contamination [19, 26, 47, 60].

3.4 Mode de Transmission

La transmission peut être directe par les mains sales. Elle est également indirecte par l'eau et les aliments souillés par les déjections infectées. La dose minimale infectante est faible : 10^{10} bactéries par millilitre en milieu alcalin. Les réservoirs sont les porteurs asymptomatiques, les convalescents, les eaux alcalines surtout salées et les coquillages dans lesquels le *Vibrio* peut persister pendant plusieurs mois. Le choléra n'épargne aucune tranche d'âge, cependant il atteint surtout le grand enfant et l'adulte jeune [27].

3.5 Facteurs Favorisants.

La surpopulation, la paupérisation, l'urbanisation sauvage, la dégradation de l'hygiène, les regroupements rituels (pèlerinages) et déplacement humains favorisent les transmissions inter humaines et les contaminations environnementales. Le choléra est « le compagnon des séismes, des inondations et des guerres » [26]. Les facteurs climatiques intriqués, réchauffement de la planète, déforestation, pollution atmosphérique et des eaux, sécheresse, inondations, catastrophes naturelles, ont des conséquences physico-chimiques (salinité, pH, température..) sur le réservoir aquatique, concourant aux résurgences du choléra [7, 67].

3.6 Réceptivité.

La réceptivité au choléra est variable. Parmi les infectés, seul 1% fait un cholera; les autres présentent des formes inapparentes, dépistées par analyses de selles systématiques et recherches d'anticorps [7]. Tous éliminent des bactéries dans leurs selles et participent à la dissémination de la maladie. Il n'existe pas de portage chronique [64].

Les bases moléculaires de cette réceptivité sont mal connues. Les sujets porteurs hétérozygotes du gène CFTR de la mucoviscidose sont relativement résistants à l'action de la toxine cholérique [37] ; cette protection a pu favoriser leur fréquence dans la population caucasienne. L'appartenance au groupe sanguin O, [73] les facteurs d'alcalinité gastrique, la dénutrition, le stress et l'épuisement favorisent aussi la maladie et sa gravité [7].

4 PHYSIOPATHOLOGIE :

Le *V. cholerae* 01 infecte l'homme par voie orale, adhère à la paroi intestinale par ses adhésines, et secrète des cytotoxines [27].

Ainsi, le mécanisme de la diarrhée se fait selon trois étapes :

L'inoculum infectant, qui est de l'ordre de 10^{10} germes par ml ;

La fixation du *V. cholerae* sur la muqueuse de l'intestin grêle par l'intermédiaire des pili puis multiplication ;

La production de toxine.

Après l'adhésion et la multiplication du *V. cholerae* au niveau de la paroi intestinale, s'en suit une sécrétion de cytotoxines thermolabiles (LTI et LTII) et thermostables (STI et STII) constituées d'une sous-unité A et de 5 sous-unités B (gangliosides GM1) des enterocytes.

La sous-unité A, une fois à l'intérieur de la membrane cellulaire, se scinde en deux parties A1 et A2. Seule la partie A1 exerce une activité acide adénosine diphosphorique (ADP) ribosylante sur une protéine GS laquelle va activer constamment l'adénylclyclase et provoquer la formation en excès d'acide adénosine mono phosphorique cyclique (AMPC) à partir de l'acide adénosine triphosphorique (ATP). Cet AMPC modifie les échanges d'eau et d'électrolyte et empêche la pénétration du sodium lié au chlore mais pas celui au glucose et aux acides aminés. Il s'en suit une hypersécrétion d'ions chlore et bicarbonates favorisant la sortie de l'eau vers la lumière intestinale. La sortie d'eau est supérieure à la capacité de réabsorption du colon (environ six litres par jour). Cette vidange massive (environ 15 litres par jour) explique la gravité du tableau clinique et l'urgence médicale. La perte de sodium et de chlore explique la déshydratation intercellulaire tandis que celle du potassium et du bicarbonate explique les vomissements et les crampes musculaires.

A coté de cette toxine cholérique ou CTX (Cholera Toxin) facteur majeur de la pathogénicité du vibron cholérique, on trouve d'autres toxines [19]:

La toxine ZOT (zonula occludens toxin) qui augmente la perméabilité de la muqueuse iléale en affectant les structures de jonctions intercellulaires (zonula occludens) et en diminuant la résistance tissulaire d'où l'induction d'une perte d'eau et d'électrolytes supplémentaires [38, 4].

La toxine ACE (accessory choléra entérotoxin) quant à elle agirait en s'agréant et en s'insérant dans la membrane des cellules cibles pour former des canaux ioniques [4, 40].

5 DIAGNOSTIC.

5.1 Diagnostic Positif

5.1.1 Forme Typique [8, 26, 32, 5].

L'incubation est brève, 2 à 3 jours voire quelques heures en période épidémique ou après contage massif, mais il est de 3 à 7 jours en phase endémique. Le début est brutal, sans prodromes et volontiers nocturne chez un sujet en bonne santé. Il est marqué par une tension épigastrique, des gargouillements, et une angoisse immédiatement suivie d'une évacuation intestinale abondante normale puis diarrhéique, suivie de plusieurs autres brefs intervalles. Des vomissements alimentaires puis bilieux les accompagnent.

La phase d'état est rapidement atteinte en 1 à 2 heures à peine dominée par les signes digestifs. Les selles sont franchement aqueuses, incolores, avec au fond du récipient qui les recueille des flocons blanchâtres d'aspect riziforme. Ces selles sont d'odeur fade ou de poisson frais. Elles sont impérieuses, émises en jet, souillant les vêtements du malade et réalisant une véritable inondation. Les vomissements ont le même caractère que les selles : d'abord en fusée, incoercible, puis sans effort s'écoulant de la bouche du malade. L'importance fuite d'eau et d'électrolytes, entraîne des crampes musculaires très douloureuses ainsi qu'une soif intense difficile à assouvir du fait des vomissements. Ces crampes et ces douleurs atteignent les membres inférieurs et supérieurs, les muscles de la face puis l'abdomen et le thorax. L'aspect du malade est caractéristique : parfaitement lucide mais la voix cassée ou inaudible, le visage hématié, les yeux vitreux, cernés profondément enfoncés dans les orbites, les muscles orbiculaires, les lèvres crispées ce qui donne l'impression de « rire sardonique ». Son visage est cyanosé. Le pouls est rapide, mal râpé, souvent imprenable. La tension artérielle est effondrée, les bruits du cœur sont lointains, la respiration difficile. Les joues sont enfoncées et le pli cutané est persistant révélant la déshydratation du tissu cellulaire. La peau est couverte d'une sueur froide correspondant à une baisse de la température des extrémités alors que la température centrale est presque normale (choléra algide). Même lorsque la déshydratation est déjà importante, le malade reste lucide, parfois agité et irritable. Ces manifestations peuvent être la conséquence d'une

hypoglycémie dont la possibilité de survenue doit être connue et guettée afin d'être bien prévenue. Le mécanisme exact de cette hypoglycémie est loin d'être clair et ne peut toujours être imputé à une malnutrition sévère. La conjonctivite observée peut aller de l'hyperthermie conjonctivale à la kératite avec possibilité de fonte purulente de l'œil [32].

5.1.2 Formes Cliniques

Formes Trompeuses [26] :

Elles sont caractérisées par une diarrhée sanguinolente à la longue mais non d'emblée et des vomissements moins abondants. La température est souvent normale ou un peu élevée vers 37,5° à 38°C ; un accès palustre associé peut donner une fièvre élevée.

Formes dites Choléra « Sec » [26,25] :

Il entraîne la mort subite par collapsus avant que l'inondation intestinale n'ait eu le temps de s'extérioriser ou après l'épisode diarrhéique précurseur, alors que la déshydratation n'est pas encore apparente. Ces formes sont relativement fréquentes mais le malade meurt avant d'arriver au centre de traitement.

Formes Graves [26] :

Elles peuvent guérir spontanément. Les vomissements cèdent les premiers et le malade, pouvant boire et s'alimenter, se réhydrate seul. La diarrhée persiste cependant plusieurs jours, mais la diurèse se rétablit et l'état général s'améliore. L'apparition d'une température à 38°C et de sueurs chaudes est de bon pronostic. Un collapsus secondaire et des troubles neuro-encéphaliques avec agitation et délires sont possibles.

Formes Bénignes [26] :

Elles sont fréquentes et se résument à un tableau de gastro-entérite aiguë non fébrile, ou une diarrhée banale de diagnostic difficile.

Formes selon le terrain [26,39]

Chez les enfants, surtout atteints en phase endémique ou en fin de poussée épidémique, le risque est plus élevé. Les vieillards meurent souvent de défaillance cardiaque ou d'insuffisance rénale secondaire. Chez la femme enceinte,

l'avortement est fréquent surtout au troisième trimestre de la grossesse par acidose et hypoxie.

5.2 Diagnostic de laboratoire [2, 71, 3, 51, 17, 50, 55] :

5.2.1 Analyse des selles :

Le diagnostic de confirmation au laboratoire n'est utile que chez les premiers cas. La coproculture est le moyen le plus adapté, permettant l'isolement du germe et son identification précise (type sérologique). L'examen direct peut, devant un cas typique, permettre le diagnostic étiologique rapide.

Différentes méthodes de prélèvement [17, 50, 55] :

Chez l'homme, soit on fera un écouvillonnage rectal, soit le prélèvement d'un échantillon de selles, soit encore l'immersion de bandes de papier buvard dans les selles que l'on placera dans de petits sachets en plastiques scellés par une bande de cellophane adhésive pour éviter la dessiccation (méthode de BARUA).

Quant il s'agit d'eau contaminée par le *Vibrio*, on peut la filtrer sur du papier filtre imprégné de Kiekselguhr. Ce papier sera placé dans un milieu enrichi en bismuth et sulfite. On peut effectuer des prélèvements au niveau des aliments suspects, ces différents prélèvements seront envoyés immédiatement au laboratoire.

Il est indispensable de disposer dans tout laboratoire tropical d'eau peptonnée, de gélose alcaline, de disques d'oxydase et de sérum anti : 01 afin de pouvoir faire en urgence le diagnostic de choléra.

Les Milieux de Transport :

Les prélèvements sont envoyés au laboratoire à la température de 37°C soit dans un milieu liquide (eau peptonnée hyper salée alcaline) soit dans un milieu solide : le milieu de Cary-Blair ou le milieu taurocholate-tellurite peptone.

Examen :

A l'état frais, l'examen microscopique direct des selles entre lame et lamelle confirme la présence de bacilles légèrement incurvés, en virgule, présentant une mobilité importante de type polaire. La coloration de Gram met en évidence des bacilles Gram négatif [62].

Culture :

Après 6 heures d'incubation une anse recueillie en surface sera ensemencée sur un des milieux solides suivants :

Gélose au Teepol sur laquelle les colonies poussent en 2 heures

Gélose au TCBS (Thiosulfate-Citrate-Bile-Saccharose)

Le milieu de Monsur pendant 12 heures à 37°C, les colonies apparaissent jaunes, grosse, et plates.

La mise en culture permet de confirmer le diagnostic, lequel sera surtout intéressant pour les premiers patients au cours d'une épidémie [62].

- **Identification** [2, 3, 51] :

L'identification se fera par agglutination avec des sérums polyvalents anti 01 ou anti 0139 puis par des sérums monovalents anti-Ogawa, anti-Inaba et anti-Hikojima (sérotypé). On peut effectuer ensuite un typage moléculaire en étudiant le profil de restriction des gènes codant pour les ARN ribosomiaux (Ribotypie) et en détectant des gènes codant pour les toxines CTX, ZOT et ACE par réaction de polymérase en chaîne (PCR). Le typage moléculaire des souches permet le suivi épidémiologique des souches et la mise en évidence de la circulation des clones et leur transmission d'une aire géographique à une autre.

La technique d'anticorps fluorescents peut être utilisée pour une identification rapide du vibron dans l'eau après les avoir concentré sur une membrane filtre selon la même méthode. Il existe aussi des méthodes de diagnostic rapide du *V. cholerae* (moins de 15 minutes) par agglutination, essai immunologique pour la liaison enzymatique (ELISA) ou réaction colorimétrique directement dans les selles. Ces méthodes ont comme inconvénients leur prix de revient élevé avec risque de limitation de leur emploi dans les pays où sévit l'épidémie. Leur avantage est lié à leur simplicité, leur rapidité et leur spécificité car ils permettent de détecter les endotoxines dans les selles même en très faible quantité et lorsque le diagnostic bactériologique est négatif (conditions inadéquates de transport, antibiothérapie préalable).

5.2.2. Analyse sérologique :

Sans intérêt clinique notable en raison de la rapidité de l'évolution du choléra, ce diagnostic sérologique consiste à rechercher dans le sérum, des anticorps vibriocides (lyse du vibron en présence de complément). La présence d'anticorps vibriocides permet de faire le diagnostic rétrospectif du choléra dans le cas où la souche n'a pu être isolée d'où son intérêt dans l'étude épidémiologique du choléra.

5.3 Diagnostic différentiel [68] :

En zone endémique, on risque de poser le diagnostic par excès, surtout en fin d'épidémie, méconnaissant d'autres diarrhées infectieuses. Le prélèvement de selles en vue d'un diagnostic de certitude permet de faire la part entre le choléra et toutes les diarrhées cholériformes provoquées par les autres germes à savoir : les toxi-infections alimentaires (staphylocoques, salmonelles, etc.), les dysenteries bacillaires (shigelloses, campylobactérioses), la dysenterie amibienne, toutes les autres diarrhées bactériennes ou virales et la forme digestive du paludisme. Chez l'enfant, les rota virus ou les colibacilles entérotoxinogènes réalisent des tableaux cliniques similaires : l'apyrexie, une déshydratation supérieures à 7% du poids, un pH fécal supérieur à 7, l'absence de glucose dans les selles sont des arguments en faveur du choléra [75]. En pays indemne de choléra, les cas importés risquent d'être méconnus, jusqu'à ce que la coproculture redresse le diagnostic.

6 EVOLUTION ET PRONOSTIC :

6.1 Evolution :

En l'absence de traitement, le cholera évolue vers un état de grande faiblesse, de léthargie puis la mort survient en 1 à 3 jours, dans 25 à 30% des cas par collapsus cardio-vasculaire. La mortalité est plus importante chez les enfants, les personnes âgées ainsi que les sujets carencés.

Les éléments de surveillance de l'évolution sont cliniques et biologiques :

- **Clinique :**

Il s'agit du pouls qui est filant, d'une baisse de la tension artérielle, d'une apyrexie et d'un état de déshydratation globale avec menace de collapsus et d'anurie en cas de retard de diagnostic. A l'examen clinique, la déshydratation est évidente, parfois il existe une sensibilité abdominale diffuse.

- **Biologique :**

Le bilan sanguin montre une hémococoncentration, des signes de déshydratation globale ou extracellulaire et des perturbations électrolytiques, parfois une insuffisance rénale (augmentation de la créatinine) [62]. Si le malade est rapidement et correctement réhydraté, les divers troubles s'estompent le risque d'issue fatale devient très faible (1 à 5%). La guérison est totale en 2 à 3 jours, sans séquelles et la récupération rapide. Les complications sont rares [60,59,72]. L'insuffisance rénale aiguë anurique par tubulopathie aiguë compliquant l'état de choc hypovolémique est rare, elle peut se compliquer d'une atteinte rénale organique dans les formes sévères tardivement traitées.

Les complications métaboliques sont l'acidose métabolique par perte rapide en bicarbonates et l'hypokaliémie en rapport avec la fuite potassique, pouvant être responsable d'un iléus paralytique. La correction de ces troubles doit être soigneux.

Chez l'enfant, on peut observer des troubles de la conscience ou des convulsions. Il présente une oligurie évoluant rapidement vers l'anurie

6.2. Pronostic :

Selon Lapeyssonie, « une diarrhée sévère suivie de vomissement qui tue les adultes en quelques heures est presque toujours un choléra » [46].

Le pronostic est sévère lorsque la prise en charge n'est pas rapide et efficace.

7 TRAITEMENT :

7.1 Curatif :

Le traitement de plusieurs centaines de cas de choléra en période d'épidémie, en situation de précarité est extrêmement difficile et nécessite une organisation et une logistique rigoureuses, sous peine de mortalité très élevée.

7.1.1 La Réhydratation :

Le traitement curatif comprend une phase de réhydratation initiale de deux à quatre heures pour remplacer les pertes accumulées et une phase de maintenance pour remplacer les pertes au fur et à mesure, jusqu'à régression complète de la diarrhée [75].

Phase Initiale :

Les patients sévèrement déshydratés doivent être perfusés. L'OMS recommande l'usage de Ringer lactate dont la composition est très proche de celle des pertes. En son absence, on peut utiliser un mélange de deux volumes de sérum physiologique et un volume de bicarbonaté isotonique voire uniquement du sérum physiologique qui est associé dès que possible avec une réhydratation orale. Ce mélange permet aussi de corriger les anomalies électrolytiques et acidobasiques[70]. Le rythme de perfusion doit être très rapide : 50 à 100ml/kg/h.

- Les enfants arrivant en état de choc doivent recevoir une perfusion « bolus » de 30ml/kg, puis 40ml/kg dans les deux premières heures. Le risque d'hypoglycémie doit être prévenu par l'adjonction de sérum glucosé.
- Chez l'adulte, la formule 1 000 ml en 15 minutes, puis 10% du poids en 2-4 heures est d'emploi simple.
- Chez le vieillard et l'enfant, le risque d'hyper hydratation doit être dépisté à temps sur l'apparition d'un œdème palpébral et de râles pulmonaires.

L'efficacité de la réhydratation est jugée sur la réapparition du pouls, la disparition du collapsus, de la stupeur, du pli cutané, des crampes et des vomissements, et surtout de la reprise de la diurèse qui doit atteindre au moins 0,5ml/kg/24h, habituellement à la deuxième heure [70].

Les patients peu ou modérément déshydratés doivent être réhydratés d'emblée par voie orale. L'usage d'une sonde naso-gastrique est une alternative intéressante chez le petit enfant.

La phase de maintenance :

Elle est basée sur la réhydratation orale (sauf pour les patients dont la diarrhée reste supérieure à 10 ml/kg/h qui doivent être maintenus sous perfusion). La quantité à absorber peut être aisément calculée par la formule suivante :

Chez l'adulte et l'enfant

Ce traitement est poursuivi jusqu'à la régression de la diarrhée, en moyenne 36 à 48 heures. Les critères de sortie des patients qui ont été proposés sont la tolérance orale > 40 ml/h et la diurèse < ou égale 400 ml/h [70].

Volume des Selles + Volume des Vomissements + 21/24h
--

7.1.2. L'antibiothérapie :

Elle peut réduire jusqu'à 50% l'importance et la durée de la diarrhée et du portage, et donc le risque de contamination secondaire. Elle est mise en route à la fin des vomissements. Elle peut être réservée, en médecine de masse aux formes graves.

Jusqu'à récemment, plusieurs antibiotiques étaient efficaces, avec une posologie simple : Doxycycline 300mg prise unique ou Tétracycline 500mg 4 fois/j pendant trois jours. La situation s'est compliquée depuis l'apparition de souche 01 et 0139 résistantes ou multi résistantes rendant l'antibiogramme indispensable dès le début d'une épidémie [29,49]. Les fluoroquinolones sont actives sur les souches multi résistantes : Ciprofloxacine 250 mg une fois/j pendant 3 jours [69] ou en prise unique d'1 g à prouvé son efficacité [41].

7.2 Mesures Prophylactiques :

Elles consistent dans un contexte de risque épidémique (guerre, déplacement des populations vers des camps de réfugié, etc.) ou d'épidémie dite d'appliquer des mesures d'hygiènes rigoureuses (très difficile dans ces conditions), de faire recours à la vaccination, ou à une antibiothérapie.

7.2.1 Mesures d'hygiène.

Ceux-ci se feront par :

La Confirmation du diagnostic au laboratoire ;

La mise en quarantaine des zones atteintes ;

L'isolement des malades (visites formellement interdites) ;

La désinfection des vomissements à l'eau de javel à 5% pendant quatre heures et des selles au cresylol sodique à 4% ou au lait de chaud pendant six heures [76] ;

La désinfection des ustensiles et vêtements du malade à l'eau de javel ou par ébullition ;

Le lavage des cadavres avec une solution désinfectante et ensevelis dans un

linceul arrosé d'antiseptiques avant enterrement ou incinération.

La désinfection des sols et des murs avec une solution de crésyl à 5% ou de l'eau de javel.

Le personnel soignant doit être expérimenté, rompu aux tâches d'antisepsie et d'asepsie (port de blouses à longues manches, de bottes et de masques, désinfection des mains par le savon, l'alcool ou le javel avant de rentrer à la maison) pour éviter la diffusion des germes.

7.2.2 Chimio prophylaxie :

Elle est en Afrique le moyen le plus pratique et le moins coûteux pour faire face à une épidémie et assurer la protection des individus menacés. De masse, elle permet le contrôle des endémies mais malheureusement, elle n'a jamais réussi à limiter la propagation du choléra pour les raisons suivantes [26] :

La propagation de l'épidémie est très souvent rapide, avant même qu'un traitement de masse puisse être organisé.

L'efficacité du traitement est de trois semaines passé ce délai, les personnes sont à nouveau complètement sensibles à l'infection.

La population toute entière devrait être traitée simultanément, ce qui malgré tout n'empêche pas sa réinfection à partir des sources environnementales (eau contaminée) ou après réintroduction du choléra dans la communauté.

Il est difficile de convaincre tous les membres d'une communauté de prendre un médicament, surtout lorsque la plupart ne sont pas malades [18, 6].

Si la chimio prophylaxie de masse permet de réduire sensiblement le nombre des vibrions circulants, elle contribue aussi à l'apparition rapide des phénomènes de résistance des vibrions aux antibiotiques. Face à la résistance de plus en plus fréquente aux sulfamides, on prescrit des tétracyclines à la posologie de 1 à 1,50 g repartis en 2 à 3 prises quotidiennes pendant trois à quatre jours, ce qui n'est pas réalisable en pratique collective, et sera donc utilisé en chimio prophylaxie sélective ou on peut également utiliser la doxycycline 300 mg en prise unique.

Même si la propagation de l'épidémie sévit, selon la politique de l'OMS, le contact avec le sujet atteint nécessite la prise de doxycycline 300 mg en dose unique.

7.2.3 La Vaccination :

Le vaccin anticholérique parentéral, qui confère une protection incomplète peu fiable et brève a fait l'objet de nombreuses critiques. En effet, l'immunité vaccinale est insuffisante et ne protège que 50% des sujets avec une injection, et 60% avec deux injections pendant seulement six mois théoriquement mais trois à quatre mois en pratique [22, 26, 28]. Ainsi, la vaccination trouve son utilité dans les situations d'extrême urgence dans des populations déplacées (guerres, catastrophes naturelles) vivant en zone d'endémie cholérique. Elle confère également une certaine stabilité d'esprit au niveau de la population du fait de la panique qui s'empare souvent de celle-ci lors des épidémies de choléra. Par contre, elle ne diminue pas la durée de portage des vibrions, par conséquent, on ne doit pas attendre de ces campagnes de vaccination de masse ni l'éradication du choléra, ni la limitation de sa diffusion. En plus, la vaccination peut donner un faux sentiment de sécurité aux personnes et aux autorités sanitaires qui peuvent alors négliger des mesures plus efficaces. La vaccination permet uniquement de réduire l'importance des flambées épidémiques et à cet égard la chimioprophylaxie est sans doute la plus efficace [26].

En fin, les campagnes de vaccination absorbent des ressources financières et humaines déjà limitée qui pourraient aller à des mesures de lutte [31].

L'OMS ne recommande aucun vaccin en période d'épidémie en tant que mesure de santé publique même si leur efficacité et leur intérêt potentiel ne fait pas de doute [12, 52]. Cependant, un vaccin oral (Orochol®) a été utilisé en période d'épidémie dans les Iles Marshall.

Trois types de vaccins sont disponibles : le vaccin sous-cutané classique, le vaccin inactivé oral (DUKORAL®) et le vaccin oral (OROCHOL®).

Le vaccin sous-cutané classique :

Il est constitué par une suspension de germes tués par le phénol ($8 \text{ à } 10 \times 10^9$). Ce vaccin donne une protection de 50% pour une durée de 6 mois. Cette immunité insuffisante fait déconseiller son usage.

Le vaccin inactivé oral :

CHOLERIX (WC/rBS) est constitué de *V. cholerae* 01 entiers tués associés à la sous unité B de la toxine cholérique obtenue sous forme purifiée par génie génétique. Il est administré en solution tampon et deux doses sont nécessaires à au moins sept jours d'intervalle. La protection commence une semaine après l'administration de la deuxième dose et un degré de protection de 80% est obtenue contre *V. cholerae* El Tor pendant 4 à 6 mois puis 50% au bout de trois ans.

Le Vaccin Dukoral® :

Il est composé de 2.5×10^{10} de chacune des souches suivantes : *V. cholerae* 01 souche Inaba inactivée par la chaleur, *V.cholerae* 01 souche El Tor inactivée par formol, *V.cholerae* 01 souche Ogawa inactivée par la chaleur, et *V.cholerae* 01 souche Ogawa inactivée par le formol. Au total, le vaccin contient 1×10^{11} des vibrions et aussi 1 mg de la toxine B subunitaire recombinante.

Ce vaccin stimule les tissus lymphatiques associés à l'intestin (GALT) et provoque une réponse IgA contre les composantes cellulaires. Il prévient la colonisation avec *V.cholera* 01 et les diarrhées en bloquant les CT ou LT. Ce vaccin pourrait éventuellement être préconisé pour le personnel de santé allant travailler auprès des patients ou dans des camps de réfugiés, en période d'épidémie, ou dans les situations épidémiques particulières. Ce vaccin existe depuis le 31 décembre 2004 [34].

Le vaccin oral : OROCHOL®

Ce vaccin est constitué par une seule souche CVD 103-HgR de *V. cholerae* dépourvue de gènes codant pour la sous-unité A de la toxine cholérique (souche mutante vivante), on administre une dose de 5×10^9 CFU qui assure une semaine après la vaccination une protection de 82 à 87% pendant au moins trois mois. Ce vaccin-ci fait l'objet de notre étude.

Il est à signaler que tous ces vaccins ne sont pas efficaces sur des nouvelles souches 0139.

7.3 Mesures pratiques :

7.3.1 Etablissement des soins :

On regroupe tous les cas dans un centre spécial. Les malades doivent occuper un lit pour cholériques, lits percés à leur centre d'un trou permettant le recueil des selles dans un sceau gradué. Tous les cas doivent être déclarés et l'on doit établir une courbe de surveillance épidémiologique hebdomadaire. On identifie les sources de contamination en s'aidant des dossiers cliniques des malades. Si on a les moyens, une étude de cas témoin peut servir pour identifier certains facteurs de risque.

7.3.2 Au niveau des collectivités :

Il faut procéder à des activités d'IEC en s'aidant des médias (radio, télévision, journaux, affiches) et des chefs religieux et / ou coutumiers. Ces activités permettront l'application par les populations des mesures d'hygiène de l'eau et des aliments ainsi qu'un assainissement du milieu.

7.3.3 Au niveau National

La mise en place d'une cellule de lutte contre le choléra est nécessaire avec harmonisation des méthodes de lutte à tous les niveaux grâce d'une part à la formation et au recyclage du personnel de santé en vue de la prise en charge des cas et d'autre part à l'éducation des populations. Les autorités sanitaires doivent équiper les structures sanitaires en matériels essentiels pour les situations d'urgence. Il faudra constituer des équipes mobiles multidisciplinaires de lutte contre le choléra afin de pallier à l'insuffisance de certaines structures sanitaires.

Les populations doivent avoir accès à une eau de boisson saine et à des systèmes adéquats d'évacuation des excréta. Il faut procéder à la notification de tous cas de choléra aux autorités sanitaires afin que celle-ci puissent d'une part élaborer une stratégie commune de lutte destinée à tous les échelons du système de santé et faire d'autre part des enquêtes épidémiologiques sur des flambées afin de repérer les sources de transmission de l'infection.

7.3.4 Au niveau International

Les autorités sanitaires doivent notifier les premiers cas suspects de choléra survenus sur leur territoire aussi rapidement que possible à l'OMS avec confirmation de ces cas au laboratoire. Ensuite, elles se chargeront d'adresser un rapport hebdomadaire du nombre de nouveaux cas de décès. Ces mesures permettront d'une part d'empêcher des restrictions inutiles aux mouvements internationaux de personnes et de marchandises et d'autre part de mobiliser des ressources pour les pays touchés.

Dans le cadre du contrôle de la propagation internationale du choléra, aucun pays n'exige actuellement une vaccination pour les voyageurs entrant sur son territoire. La propagation du choléra étant essentiellement le fait de porteurs sains, il est impossible d'empêcher la circulation de ceux-ci par l'installation d'un cordon sanitaire aux frontières car il existe toujours des mouvements illégaux et clandestins de personnes aux frontières. En plus ces restrictions ont d'une part des conséquences économiques défavorables par l'entrave aux échanges commerciaux des informations officielles sur une flambée épidémique empêchant ainsi la collaboration efficace des organismes internationaux et les pays. En fin, l'installation de ce cordon sanitaire coûteux en main d'œuvre et en ressources qui seraient mieux mises à profit pour des activités plus efficaces.

L'OMS pour sa part, a recommandé aux pays de s'abstenir d'imposer des cordons sanitaires, des quarantaines ou des contrôles aux frontières dans le seul but de prévenir la propagation de choléra. Néanmoins en cas d'épidémie de choléra on découragera au maximum les rassemblements importants [13, 57, 58].

7.3.5 Aux voyageurs :

Les voyageurs se rendant dans des zones où sévit le choléra doivent prendre certaines précautions :

Ne boire que de l'eau bouillie désinfectée par le chlore ou l'iode ;

Ne pas prendre de glaces, à moins d'être sûr qu'elle a été fabriquée avec de l'eau saine ;

Eviter de consommer du poisson ou des fruits de mer ou d'autres aliments crus sauf les fruits et légumes pelés ;

Faire bouillir le lait non pasteurisé avant de le boire ;

Eviter d'acheter les repas aux vendeurs dans la rue.

METHODOLOGIE

1 CADRE ET LIEU D'ETUDE :

Le Mali est un pays situé en Afrique de l'Ouest limité au Nord par l'Algérie, au Nord Ouest par la Mauritanie, au Sud par la Côte d'Ivoire, au Sud-est par le Burkina-Faso, à l'Est par le Niger à l'Ouest par le Sénégal et au Sud Ouest par la Guinée Conakry, Il compte une population estimée à 11 millions d'habitants avec une densité de 8,14 habitants / km² selon une estimation démographique faite en 2003(EDS III).

Le climat malien se caractérise par trois saisons :

- Une saison sèche, de Mars à Juin ;
- Une saison humide (hivernage) de Juin à Septembre ;
- Une inter-saison caractérisée par sa fraîcheur d'Octobre à Février.

L'influence saharienne se manifeste par une invasion de masse d'air sec, l'harmattan. L'économie Malienne est basée principalement sur l'agriculture, l'élevage et l'extraction de quelques produits miniers tel que l'or et le marbre. Le sol Malien renferme également des réserves de fer et de bauxite inexploités [52].

Bamako la capitale se divise en 6 communes comprenant chacune des centres de santé communautaire constituant le premier niveau de la pyramide sanitaire. Dans ses centres de santé sont effectués les soins de santé primaire à des prix très bas afin de satisfaire au maximum la population.

Sur le plan socio-sanitaire, malgré les efforts consentis par la population et les autorités sanitaires, le Mali reste confronté à des difficultés majeures en matière de santé primaire. L'environnement favorise le développement d'un grand nombre de maladies infectieuses. L'accès à l'eau potable n'est pas généralisé et la population ne respecte pas les règles de salubrité et d'hygiène et souffre de carences nutritionnelles sévères.

Le taux de natalité est estimé à 47,8 pour mille avec une mortalité infantile de 119,2 pour mille qui reste très élevée, un médecin pour 50000 personnes en 2003 et une espérance de vie de 46 ans. La tranche d'âge prédominante est celle de 0 à 14

ans comportant 47,2% de la population soit pratiquement la moitié de la population [52].

Notre étude a été réalisée au Centre pour le Développement des Vaccins du Mali (CVD-Mali), service rattaché au Centre National d'Appui à la lutte contre la Maladie (CNAM ; ex-Institut MARCHOUX qui fut installé en 1932) situé à Djicoroni-Para en Commune IV.

Djicoroni-para est un quartier de la Commune IV. Il est situé à l'Ouest du district de Bamako et limité au Nord par Hamdallaye ACI et Lafiabougou, au Sud par le fleuve Niger, à l'est par Bolibana et Bamako-Coura et à l'Ouest par Sébénikoro. Djicoroni-para est vaste et comprend 9 secteurs : Touroukabougou, Djenekabougou, Tintin-Coumba, Abdoulayebougou, Dontèmè 1 et 2, Flabougou, Mariambougou, et Zone de Recasement. Selon le dernier recensement 2001, la population de la commune IV était à 202.283 habitants dont 56.067 à Djicoroni-Para [52].

CVD-Mali est un centre de recherche qui se trouve au CNAM. Il est né d'un accord cadre signé entre le Ministère de la Santé du Mali et le "Center for Vaccine Development" de l'Université de Maryland, Baltimore (CVD-Maryland) en avril 2001. CVD-MALI a les objectifs suivants :

- Evaluer et monitorer l'épidémiologie des maladies évitables par la vaccination.
- Formation du personnel en épidémiologie, en bio-statistique, en vaccinologie, en microbiologie clinique, en immunologie, et en biologie moléculaire.
- Réaliser des études cliniques et de terrain sur les nouveaux vaccins et les nouvelles techniques de dosage des anticorps.
- Apporter un appui technique au Ministère de la Santé du Mali pour un meilleur contrôle des maladies évitables par la vaccination.

2 PERIODE ET TYPE DE L'ETUDE :

2.1 Période :

L'étude a été réalisée d'Octobre 2003 à Avril 2005.

2.2 Type d'Etude :

L'étude a été menée en deux étapes. La première étape était non aveugle mais randomisé et concernait les enfants de 10 à 12 mois d'âge. Chaque enfant était

randomisé soit dans le Groupe A ou dans le Groupe B. Les enfants dans le Groupe A devraient prendre le vaccin Orochol E® (avec le tampon) dans 100 ml d'eau et ceux de Groupe B le vaccin dans 25 ml de bouillie (sans tampon). Dans cette première étape, on a constaté que presque 50% des enfants vaccinés ont fait un épisode de diarrhée (>3 selles liquidiennes/ 24h) pendant les 21 jours de suivi et de ce fait, nous avons jugé nécessaire de changer la conception de l'étude. Par la suite, on a procédé à une deuxième étape où il y avait la randomisation de double aveugle et qui concernait les enfants de 10 à 14 mois au nombre de 94. Ces enfants ont été randomisé à un des groupes inclus dans le tableau ci-dessous :

Tableau I Randomisation des groupes

	Régime				
	Produit Test				
	Jour 0	Jour 14			
Groupe A1	Vaccin	Placebo	Tampon	100mL	24
Groupe A2	Placebo	Vaccin	Tampon	100mL	23
Groupe B1	Vaccin	Placebo	Bouillie	25mL	24
Groupe B2	Placebo	Vaccin	Bouillie	25mL	23

Dans ce type d'étude chaque participant a reçu deux inoculations mais seulement une dose de vaccin. Chacun a été son propre témoin par rapport au premier régime vaccinal reçu : c'est à dire eau tamponnée plus vaccin (groupe A1) versus eau tamponnée seule (groupe A2) et bouillie plus vaccin (groupe B1) versus bouillie seule (groupe B2). L'intervalle entre les deux inoculations (vaccin/placebo) était de 14 jours.

2.3 Population de l'Etude :

Il s'agissait des enfants de 10 à 12 mois, pour la première étape et des enfants de 12 à 14 mois pour la deuxième étape, tous résident à Djicoroni-para, en bon état de santé et correctement vaccinés selon le calendrier du programme élargi de vaccination (PEV).

2.4 Echantillonnage :

La taille de l'échantillon a été estimée, à partir du taux de séroconversion observé avec le vaccin standard (CVD 103-HgR dans l'eau tamponnée), qui était de

60% en acceptant une puissance de 80%, un risque d'erreur à 5% et un taux de perdu de vue à 20% nous avons $n = 134$, soit 67 dans chaque groupe (A et B). Cette taille devant être suffisante pour détecter une augmentation supérieure à 25% du taux avec le vaccin dans la bouillie.

2.4.1 Critères d'inclusion :

Enfant âgé de 10 à 12 mois (première étape) et de 10 à 14 mois (deuxième étape) résident à Djicoroni-para.

Enfant en bon état de santé selon l'examen clinique du dépistage.

Volonté et disponibilité du parent / gardien à participer à l'étude et à respecter les visites de suivi.

Consentement éclairé du parent ou du gardien de l'enfant.

2.4.2 Critères de non inclusion :

Histoire de maladies gastro-intestinales (diarrhée chronique supérieur à un mois)

Histoire d'infections récurrentes (supérieur ou égale à deux épisodes des maladies suivantes : méningite, arthrite septique, pneumonie, typhoïde ou septicémie) ou des maladies en faveur d'une immunodéficience (fièvre au long cours supérieure à un mois, candidose digestive).

Histoire d'une infection de choléra

Histoire d'une vaccination contre le choléra

Enfant n'ayant jamais reçu la vaccination contre la rougeole.

Parent ou Gardienne avec une grossesse ou une histoire d'immunodéficience (traitement immunodépresseur en cours, diarrhée chronique supérieur ou égale à un mois, fièvre chronique supérieure ou égale à un mois, toux chronique supérieure ou égale à un mois, dermatose ou lymphadénopathie généralisée, candidose digestive).

Malnutrition sévère selon le rapport poids-taille inférieur à 5^{ème} percentile.

Enfant présentant une maladie fébrile aiguë au cours des trois jours avant l'inoculation.

Maladie gastro-intestinale aiguë (vomissement ou diarrhée supérieur à 3 fois par 24 heures) au cours des 3 jours avant chaque inoculation.

Enfant ayant reçu une vaccination de routine autre que le vaccin contre la rougeole au cours des 14 derniers jours avant l'inoculation expérimentale.

Enfant ayant reçu le vaccin contre la rougeole au cours des 30 derniers jours avant l'inoculation expérimentale selon la carte de vaccination.

Enfant ayant reçu tout autre vaccin dans le cadre d'une étude d'intervention au cours des 30 jours avant l'inoculation.

Traitement antibiotique (incluant la chloroquine) au cours des 3 jours avant l'inoculation.

Température supérieure à 38,3° C le jour de l'inoculation.

Tout autre condition qui selon l'avis de l'investigateur pourrait entraîner un risque de santé au participant ou interférer avec l'évaluation du vaccin.

2.5. Déroulement et procédure de l'Etude.

Avant toute activité nous avons cherché l'approbation du comité d'éthique de l'Université de Maryland et celui du Mali, cette approbation reçue nous a permis de procéder ainsi :

Une équipe constituée de médecins, d'infirmiers et d'agents sociaux a été formée pour assurer l'accueil, le dépistage pour le recrutement des participants potentiels, l'obtention du consentement, l'inclusion, l'attribution et l'administration du régime et leur suivi.

La première partie de l'étude était basée sur l'obtention du consentement communautaire, le consentement individuel, puis le dépistage de l'enfant. La deuxième partie concernait les vaccinations et les suivis : au total, il y avait deux inoculations pour chaque enfant et des jours de suivi post inoculation. La première inoculation était faite au jour 0 (J0 : jour de l'inoculation) et la deuxième au 14^{ème} jour (J14 : 14 jours après la première inoculation). Le suivi post première inoculation commençait le premier jour après l'inoculation (J1) jusqu'au septième jour et le suivi après la deuxième inoculation était fait le jour suivant la deuxième inoculation j15 à j21, puis une visite à j28, j42 et j77 des prélèvements de sang étaient effectués (3 prélèvements pour chaque enfant, effectués à j0, j14 et j28) ainsi que des écouvillonnages rectaux (au nombre de 8 pour chaque enfant faits à j0, j1, j2, j7, j14, j15, j16 et j21). Les enfants recevaient un cadeau à chaque jour de prélèvement (sang ou écouvillon) à j42 et à j77

2.5.1. Obtention du Consentement Communautaire :

Le consentement communautaire a été obtenu à travers des réunions avec les leaders locaux, les chefs coutumiers, religieux et sociaux du quartier. Au cours de ces réunions les buts, les objectifs, les modalités ainsi que les risques et bénéfices de l'étude ont été expliqués. Leur communauté ne participera à l'étude que s'ils donnent leur accord. C'est seulement après avoir obtenu le consentement communautaire que nous avons commencé la procédure de recrutement et l'approche individuelle du parent ou gardien du participant.

2.5.2. Obtention du Consentement Individuel :

Tous les aspects de l'étude et les conditions de stockage des échantillons prélevés ont été expliqués au parent/gardien de l'enfant. La langue officielle du Mali est le Français, mais seulement 31% la parlent correctement, la plupart des Maliens parlent la langue nationale Bambara mais savent rarement la lire ou l'écrire. Pour cela, nous avons traduit le consentement en français, en Bambara, langue locale parlée à Djikoroni-para, puis elle a été enregistrée sur des cassettes audio qu'on faisait écouter au parent/gardien selon la langue de son choix. Toutes les traductions en langue nationale et locale ont été faites par le service national linguistique et d'alphabétisation du Mali. Ainsi, le personnel de CVD-Mali était disponible pour s'assurer que le parent/gardien de l'enfant avait bien compris le message et pour répondre aux éventuelles questions. Le parent/gardien signait la version en français. Nous avons pris l'empreinte digitale de l'index gauche en plus de la signature (si possible) du parent/gardien ayant donné son consentement pour la participation de son enfant. Un témoin capable de comprendre le consentement signait également la fiche de consentement pour chaque participant illettré. Le personnel CVD-Mali expliquait le consentement et y apposait sa signature.

2.5.3 Le dépistage de l'enfant :

Le dépistage était fait au maximum une semaine avant l'inoculation, basé sur les critères d'inclusion et l'obtention du consentement individuel.

Tous les enfants qui venaient, étaient enregistrés sur une liste.

Il y avait un dossier individuel pour tous les enfants éligibles sur lequel on notait l'initiale de l'enfant, son numéro d'identification, son poids et sa taille. Seuls les enfants répondant aux critères étaient prévus pour la vaccination.

Pour le déroulement de nos activités de vaccination, il y avait cinq salles (dépistage et suivi, randomisation, inoculation et observation post inoculation). Il y avait un médecin dans chaque salle.

2.5.4 Le jour de la première inoculation (J0) :

Salle d'attente : Il y avait une équipe qui procédait à l'enregistrement des enfants par ordre d'arrivée sur une liste d'arrivée. Cette équipe rappelait aussi les parents/gardiens que les enfants devaient rester à jeun une heure avant l'inoculation, si l'enfant mangeait l'heure du dernier repas était notée sur la liste d'arrivée. Quand le tour de l'enfant arrivait l'équipe le conduisait vers la salle d'examen et informait l'enquêteur de son heure d'arrivée ou de son dernier repas.

Salle d'examen : On vérifiait si l'enfant répondait à tous les critères d'éligibilité avant de poursuivre la procédure d'inoculation. Un médecin procédait à l'examen physique complet de chaque enfant, en plus de la prise des différentes constantes (pouls, températures et fréquences respiratoires). Il notait soigneusement l'heure d'arrivée de l'enfant (pour respecter le délai d'une heure entre le dernier repas et l'inoculation), ensuite un infirmier procédait à l'écouvillonnage rectal et un autre au prélèvement de sang. A la fin de l'examen, l'enfant était conduit dans la salle d'inoculation avec son dossier.

Salle de préparation de l'inoculum : Dans cette salle il y avait une équipe chargée de la préparation de l'inoculum. Cette équipe procédait à la randomisation c'est à dire l'attribution au hasard de régime vaccinal à l'enfant.

Il y avait quatre régimes :

bouillie plus vaccin

bouillie seule (placebo)

eau tamponnée plus vaccin

eau tamponnée seule (placebo)

L'attribution de ces différents régimes se faisait par tirage au sort.

Préparation de la bouillie : Faire bouillir 700 ml d'eau minérale dans la casserole, avec les 300ml restant, ajouter la poudre de maïs (3 onces) et bien remuer pour avoir un mélange homogène, après ébullition réduire la flamme et ajouter le mélange tout en remuant, laisser cuire pendant 10 mn en remuant jusqu'à avoir une

consistance épaisse, mesurer 25ml de bouillie avec la pipette et mettre dans chaque pot stérile, laisser refroidir à la température ambiante (20 à 25°). Cette recette est suffisante pour 15 enfants

Salle d'inoculation : L'inoculateur recevait l'enfant et tenait compte de son heure d'arrivée (car l'enfant devrait rester à jeun une heure avant l'inoculation). Il apportait le dossier à l'équipe de la salle de préparation de l'inoculum (randomisation), elle à son tour ramenait le dossier avec l'inoculum. Selon la procédure d'administration. L'enfant devrait prendre l'inoculum en 10 minutes (durée de consommation de l'inoculum), la quantité restante était mesurée.

Salle d'observation post inoculation : Les enfants étaient mis en observation pendant 30 minutes après l'inoculation par un médecin qui leur donnaient les rendez vous, un pédiatre était présent avec tout le matériel nécessaire pour palier à un éventuel choc anaphylactique, une ambulance se tenait prête les jours de vaccination.

2.5.5 La première semaine de suivi (J1 à J7)

Les enfants étaient enregistrés sur une liste d'arrivée puis ils étaient conduits dans la salle d'examen pour le suivi : où on procédait à la prise de la température, l'interrogatoire à la recherche d'événements indésirables prévus (diarrhée, Fièvre, vomissement, anorexie), et les événements indésirables non prévus (tout autre symptôme évoqué par la maman de l'enfant) et l'écouvillonnage rectal à J1, J2 et J7 (à chaque écouvillonnage rectal l'enfant recevait un cadeau un pagne ou un habit) puis le rendez vous était donné pour la deuxième semaine.

2.5.6 La deuxième inoculation :(J14)

On vérifiait si l'enfant remplissait les critères de continuation :

Enfant ne présentant pas une maladie fébrile aiguë au cours des 3 jours avant l'inoculation.

Enfant ne présentant pas une maladie gastro-intestinale aiguë (vomissements ou diarrhées > 3 fois / 24 heures) au cours des 3 jours avant chaque inoculation.

Enfant n'ayant pas reçu un traitement antibiotique au cours des 3 jours avant l'inoculation.

Enfant n'ayant pas une température > à 38.3° C le jour de la vaccination.

Dans la salle d'attente il y avait la même procédure d'enregistrement que pour le J0. Dans la salle d'examen, on procédait à :

- L'interrogatoire des parents/gardiens de l'enfant à la recherche d'événements indésirables sollicités ou non sollicités.
- L'écouvillonnage rectal et le prélèvement de sang.
- Puis l'enfant était conduit dans la salle d'inoculation pour recevoir le régime correspondant selon le tirage au sort initial (voir tableau des régimes).
- Puis la même procédure d'observation post inoculation était appliquée, et on leur donnait rendez-vous pour le suivi de la deuxième semaine (J15 à J21)

2.5.7. La deuxième semaine de suivi (J15 à J21): Les enfants étaient enregistrés sur une liste d'arrivée dans la salle d'attente, puis étaient conduits dans la salle d'examen. pour le suivi ou on procédait à :

- La prise de la température (qui était marquée dans le dossier)
- L'interrogatoire des parents / gardiens de l'enfant à la recherche d'événements indésirables prévues ou non prévues.
- L'écouvillonnage rectal à J15, J16 et J21. Puis on leur donnait rendez-vous pour le J28.

2.5.8. Le J28 : Les enfants étaient enregistrés sur une liste de suivi ; puis dans la salle d'examen on procédait à :

- La prise de la température
- L'interrogatoire du parent/gardien de l'enfant à la recherche d'événements indésirables prévus ou non prévus.
- Le prélèvement de sang (procédure et matériel voir Standard Operating Procedure)
- La remise de cadeau, puis le rendez vous était donné 14 jours plus tard pour le J42.

2.5.9. Le J42 : les enfants étaient enregistrés sur la liste de suivi. Dans la salle d'examen, la température était prise, puis l'interrogatoire du parent/gardien à la recherche des événements indésirables, puis le rendez-vous 35 jours plus tard pour le J77.

Le J77 : L'interrogatoire sur les consultations médicales ou hospitalisation, les tests demandés et les traitements reçus depuis la dernière visite (depuis le j 42).

Ce jour correspondait à la fin de leur suivi et la fin de leur participation dans l'étude.

- **La journée de suivi J77** : correspondait à la fin de leur suivi, donc on remerciait le parent/gardien de l'enfant pour leur disponibilité.

Toutes les étapes étaient rigoureusement supervisées par les investigateurs.

2.6. Techniques de laboratoire

2.6.1. Goutte épaisse

Les enfants fébriles étaient prélevés pour la goutte épaisse.

2.6.2. Ecouvillonnage rectal :

- **Technique** : Mettre l'enfant en position ventrale sur les genoux de sa mère/gardien, écarter délicatement les fesses, introduire l'écouvillon jusqu'au bout du coton(- 1cm)et faire un tour complet.

- **Ensemencement** ; Après l'écouvillonnage rectal, on ensemencait sur le TCBS puis on mettait l'écouvillon dans l'eau peptonée, les deux prélèvements étaient acheminés au laboratoire. Arrivé au laboratoire on les mettait dans l'incubateur (dont la température est 37°C) pendant 24h. Après 24h on faisait la lecture :

- l'écouvillon dans l'eau peptonée était réensemencé sur TCBS et on le mettait dans l'incubateur pendant 24h et la lecture était faite 24h après, s'il y a pousse de colonies ou pas : s'il y a pousse on ré isolait les colonies jaunes sur TSA pour le test d'agglutination (Ogawa ou Inaba)

- le TCBS du 1^{er} jour subissait le même examen c'est à dire observation des colonies, ré isolement pour l'agglutination.

2.6.3 Traitement du sang et dosage des anticorps

Les prélèvements sont faits sur tubes secs et les sérums congelés sont envoyés à CVD Baltimore pour le dosage des anticorps.

2.6.4 Contrôle de qualité de la bouille

Ce contrôle est fait pour se rassurer que le vaccin soit toujours stable. Ceci sera effectué sur le premier et le dernier mélange (vaccin/bouillie) du jour avant et après administration

3- Aspects éthiques :

Etant donné qu'il s'agissait d'un essai vaccinal, le protocole a reçu l'approbation du comité d'éthique de la faculté de médecine, de pharmacie et d'odonto stomatologie.

RESULTATS :

PHASE I

I - Les caractéristiques socio démographiques :

Tableau II : Répartition des participants selon le sexe :

Sexe	A	%	B	%	Total
Masculin	10	47,6	10	52,6	20
Féminin	11	52,4	9	47,4	20
Total	21	100	20	100	40

Le sexe féminin a été prédominant dans le groupe A avec 52,4% tandis que dans le groupe B le sexe masculin a été le plus représenté avec 52,6% . Les deux groupes étaient comparables

$$X^2 = 0,10 \quad p = 0,75.$$

Tableau III : Répartition des participants selon l'âge:

Age (mois)	A	%	B	%	Total
10	5	24	3	15,8	8
11	8	38	10	52,6	18
12	8	38	6	31,6	14
Total	21	100	19	100	40

Les enfants de 11 mois ont été les plus fréquemment rencontrés quelque soit le groupe de traitement. Il n'y avait aucune différence statistiquement significative entre les deux groupes $X^2 = 0.91 \quad p = 0.63.$

II - Les paramètres à l'inclusion

A l'inclusion aucun de nos participants n'avait de problème de santé.

III - La survenue d'évènements indésirables prévues (première semaine post vaccinale)

1- La fièvre : Nous n'avons pas noté de cas de fièvre durant la première semaine

Tableau IV : Répartition des participants selon l'intensité de la diarrhée :

	Groupe A				Groupe B				
	Code1	Code2	Code3	Total	Code1	Code2	Code3	Total	
J1	6	0	0	6	3	2	0	5	0,22
J2	3	1	0	4	1	0	1	2	0,40
J3	1	0	3	4	2	0	0	2	0,50
J4	1	0	1	2	2	0	0	2	0,50
J5	2	1	0	3	2	1	0	3	0,99
J6	1	0	0	1	2	1	0	3	0,43
J7	1	0	0	1	3	1	0	4	0,26
Total	15	2	4	21	15	5	1	21	

Dans le groupe A la diarrhée était plus fréquente à J1, J2 et J3 comparé à la fréquence élevée à J1 et J7 dans le groupe B. La différence n'était pas statistiquement significative.

Tableau V : Répartition des participants selon la proportion de la diarrhée dans les deux régimes :

Proportion des cas de diarrhée J0- J7		
Groupe	N	Proportion
Vaccin + tampon	21	6 0.2857
Vaccin + bouillie	19	6 0.3158

La proportion de diarrhée est légèrement plus élevée avec le vaccin/ bouillie qu'avec le vaccin/tampon.

Tableau VI : Répartition des participants selon l'intensité des vomissements

Vomissements	A				B				P
	Code1	Code2	Code3	Total	Code1	Code2	Code3	Total	
J1	1	0	0	1	0	0	0	0	0,52
J2	0	0	1	1	0	0	0	0	0,52
J3	1	0	0	1	0	0	0	0	0,52
J4	0	0	0	0	0	0	0	0	1
J5	0	0	0	0	0	0	0	0	1
J6	0	0	0	0	0	0	0	0	1
J7	0	0	2	2	2	0	0	2	0,13
Total	2	0	3	5	2	0	0	2	

La plus grande proportion de participants ayant présenté le vomissement a été noté à J7 ; le code3 ayant été le plus représenté dans le groupe A comparé au code1 dans le groupe B. Les deux groupes étaient comparables.

Tableau VII : Répartition des participants selon la proportion des cas de vomissements dans les deux régimes :

Proportion des cas de vomissements J0- J7			
Groupe	n	Proportion	
Vaccin + tampon	21	5	0.2380
Vaccin + bouillie	19	2	0.1052

Tableau VIII : Répartition des participants selon l'intensité de l'anorexie :

Anorexie	A				B				
	Code1	Code2	Code3	Total	Code1	Code2	Code3	Total	P
J1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
J2	0	0	0	0	0	0	0	0	1
J3	0	0	0	0	0	0	0	0	1
J4	0	0	0	0	0	0	0	0	1
J5	0	1	0	1	0	1	0	1	0,73
J6	0	0	0	0	0	1	0	1	0,47
J7	0	0	0	0	0	1	0	1	0,47
Total	0	1	0	1	0	3	0	3	

Tableau IX : Répartition des participants selon la proportion des cas d'anorexie dans les deux régimes :

Proportion des cas d'anorexie J0- J7			
Groupe	n	Proportion	
Vaccin + tampon	21	1	0.0476
Vaccin + bouillie	19	3	0.1578

L'anorexie n'a été observée qu'à J5 dans le groupe A tandis qu'elle a été notée dans le groupe B à J5, J6 et J7. La différence n'était pas statistiquement significative.

IV- La survenue d'évènements indésirables sollicités (deuxième semaine post vaccinale).

Tableau X : Répartition des participants selon l'intensité de la diarrhée

Diarrhée	A				B				P
	Code1	Code2	Code3	Total	Code1	Code2	Code3	Total	
J14	2	2	2	6	3	2	2	7	0,78
J21	2	1	0	3	1	0	1	2	0,34
Total	4	3	2	9 (42,8%)	4	2	3	9 (47,3%)	

La proportion de participants ayant présenté la diarrhée à J14 semblait être plus importante dans le groupe B par rapport au groupe A et inversement à J21.

Tableau XI: Répartition des participants selon l'intensité des vomissements

Vomissements	A				B			
	Code1	Code2	Code3	Total	Code1	Code2	Code3	Total
J14	2	0	0	2	1	1	0	2
J21	2	0	1	3	0	0	0	0
Total	4	0	1	5 (23,8%)	1	1	0	2 (10,5%)

A J14 la proportion de participants ayant vomis étaient la même dans les deux groupes contrairement à j21 où aucun cas de vomissements n'a été observé dans le groupe B comparé à 14,28%(3/21) dans le groupe A.

Tableau XII : Répartition des participants selon l'intensité de l'anorexie

Anorexie	A				B			
	Code1	Code2	Code3	Total	Code1	Code2	Code3	Total
J14	0	0	0	0	0	2	0	2
J21	0	1	0	1	0	0	0	0
Total	0	1	0	1 (4,76%)	0	2	0	2 (10,52%)

A J14 l'anorexie n'a été observé que chez les participants du groupe B tandis qu'à J21 seuls les participants du groupe A ont présenté ce symptôme.

Température : Nous avons noté un seul cas de fièvre dans le groupe B (5,26%) à J14 et un seul dans le groupe A (4,76%) à J21.

PHASE II :

I - Les caractéristiques socio démographiques :

Tableau XIII : Répartition des participants selon le sexe dans le groupe A

Groupe Sexe	A1	A2
Masculin	11	12
Féminin	13	11
Total	24	23
Pourcentage	45,8%	52,2%
	54,2%	47,8%

Dans le groupe A1 le sexe féminin a été prédominant avec 54,2% alors que dans le groupe A2 le sexe masculin avec 52,2%.

Tableau XIV : Répartition des participants selon le sexe dans le groupe B

Groupe Sexe	B1	B2
Masculin	13	12
Féminin	11	11
Total	24	23
Pourcentage	54,2%	52,2%
	45,8%	47,8%

Dans le groupe B1 et B2 le sexe masculin a été fréquemment retrouvé avec respectivement 54,2% et 52,2%.

Tableau XV : Répartition des participants selon l'âge dans le groupe A

Groupe Age (mois)	A1	Pourcentage	A2	Pourcentage
10	3	12,5%	4	17,4%
11	5	20,8%	7	30,4%
12	9	37,5%	4	17,4%
13	7	29,2%	8	34,8%
Total	24	100%	23	100%

Dans le groupe A1 les enfants de 12 mois étaient plus représentés avec 37,5% par contre dans le groupe A2 les enfants de 13 mois avec 34,8%.

Tableau XVI : Répartition des participants selon l'âge dans le groupe B

Age	B1	Pourcentage	B2	Pourcentage
10	3	12,5%	4	17,4%
11	5	20,8%	4	17,4%
12	8	33,3%	7	30,4%
13	5	20,8%	5	21,7%
14	3	12,5%	3	13%
Total	24	100%	23	100%

Dans le groupe B1 et B2 les enfants de 12 mois étaient plus représentés avec respectivement 33,3 % et 30,4 %.

II - la survenue d'événements indésirables prévus (j0-j7)

Tableau XVII : Répartition des participants selon l'intensité des Vomissements observés dans le groupe A :

Groupe J	A1 (n=24) Episodes de vomissement			Total	A2 (n=23) Episodes de vomissement			Total
	Code 1	Code 2	Code 3		Code 1	Code 2	Code 3	
J0	1	0	0	1	0	0	0	0
J1	2	2	0	4	0	0	0	0
J2	0	1	0	1	0	0	0	0
J3	0	1	0	1	0	1	0	1
J4	0	0	1	1	0	0	0	0
J5	0	0	1	1	2	1	0	3
J6	0	1	0	1	2	0	1	3
J7	0	0	0	0	1	0	0	1
Total A1/%				10/41,7	Total A2/%			8/ 34,8

Dans le groupe A1 au total 41,7% de cas de vomissements, contre 34,8 dans le groupe A2.

Tableau XVIII : Répartition des participants selon l'intensité de la diarrhée observée dans le groupe A

Groupe J	A1 (n=24) Episodes de diarrhée Code 1 Code 2 Code 3			Total	A2 (n=23) Episodes de diarrhée Code 1 Code 2 Code 3			Total
	Code 1	Code 2	Code 3		Code 1	Code 2	Code 3	
J0	0	0	0	0	0	0	0	0
J1	1	0	0	1	1	1	0	2
J2	1	0	0	1	1	0	0	1
J3	0	2	1	3	2	0	0	2
J4	0	0	1	1	1	1	0	2
J5	0	1	1	2	0	0	0	0
J6	0	1	1	2	0	1	0	1
J7	3	4	0	7	1	1	0	2
Total A1/ %				17/70,8	Total A2/ %			10/43,5

Dans le groupe A1 il y a eu 70,8% de cas de diarrhée, contre 43,5 dans le groupe A2

Tableau XIX : Répartition des participants selon la proportion de la diarrhée observée dans le groupe A

Proportion de Diarrhée J0- J7			
Groupe	N	Diarrhée	Proportion
Vaccin + tampon	47	17	0.36
Tampon seul	45	9	0.20
Vaccin + bouillie	47	8	0.17
Bouillie seule	46	14	0.30

Nous avons trouvé une faible proportion de diarrhée dans le groupe bouillie avec 0,17%.

Anorexie observée dans le groupe A

Il n'y a pas eu de cas d'anorexie dans le groupe A.

Tableau XX : Répartition des participants selon la survenue de fièvre dans le groupe A :

Groupe	A1	A2
Temp > 38,3°C		
J0	0	0
J1	0	0
J2	0	0
J3	1	0
J4	0	0
J5	0	1
J6	0	1
J7	1	2
Total	2	4

La fièvre a été plus représentée dans le groupe A2.

III - La survenue d'événements indésirables sollicités (J14-J42)

Tableau XXI : Répartition des participants selon vomissements dans le groupe A :

Groupe J	A1 (n=24) Episode de vomissements			Total	A2 (n=23) Episodes de vomissements			Total
	Code 1	Code 2	Code 3		Code 1	Code 2	Code 3	
J14	1	0	0	1	0	0	0	0
J15	0	0	0	0	0	0	0	0
J16	0	0	0	0	0	0	0	0
J17	0	0	0	0	0	0	0	0
J18	0	0	0	0	0	0	0	0
J19	0	0	0	0	0	0	0	0
J20	0	0	0	0	0	0	0	0
J21	0	0	0	0	0	0	0	0
J28	0	0	1	1	1	1	2	4
J42	0	0	0	0	0	1	0	1
Total A1/				2/8,33%	Total A2/ %			5/ 21,7

Dans le groupe A2 nous avons eu 5 cas de vomissements et 2 cas dans le groupe A

Tableau XXII : Répartition des participants selon la survenue de diarrhée dans le groupe A :

Groupe J	A1 (n=24) Episodes de diarrhée			Total	A2 (n=23) Episodes de diarrhée			Total
	Code 1	Code 2	Code 3		Code 1	Code 2	Code 3	
J14	0	0	0	0	0	0	0	0
J15	1	0	0	1	2	2	1	5
J16	0	0	0	0	1	2	0	3
J17	1	0	0	1	0	2	1	3
J18	0	0	0	0	1	2	0	3
J19	1	0	0	1	0	1	1	2
J20	0	1	0	1	0	1	0	1
J21	1	0	0	1	0	0	0	0
J28	0	2	0	2	0	1	3	4
J42	0	0	0	0	1	1	0	2
Total A1/ %				7/ 29,2	Total A2/ %			23/ 100

Dans le groupe A2 100% de cas de diarrhée, 23 cas par contre dans le groupe A1, 7 cas.

Anorexie :

Nous n'avons pas eus de cas d'anorexie dans le groupe A.

Tableau XXIII : Répartition des participants selon la survenue de fièvre dans le groupe A

Groupe	A1	A2
Temp > 38,3°C		
J14	1	0
J15	1	0
J16	1	0
J17	0	0
J18	0	0
J19	0	0
J20	0	0
J21	0	1
J28	0	0
J42	0	0
Total	3	1

Il y a eu 3 cas de fièvre dans le groupe A1 et 1 seul cas le groupe A2.

IV - la survenue d'événements indésirables dans le Groupe B (J0- J7).

Tableau XXIV : Répartition des participants selon l'intensité des vomissements dans le groupe B

Groupe J	B1 (n=24) Episode de vomissements			Total	B2 (n=23) Episode de vomissements			Total
	Code 1	Code 2	Code 3		Code 1	Code 2	Code 3	
J0	0	0	0	0	2	0	0	2
J1	1	0	0	1	0	0	0	0
J2	0	0	0	0	1	0	0	1
J3	0	0	0	0	1	1	0	2
J4	0	0	0	0	0	0	1	1
J5	0	0	0	0	1	0	0	1
J6	0	0	0	0	0	0	1	1
J7	0	0	0	0	2	0	0	2
Total B1/ %				1/ 4,16	Total B2/ %			10/43,48

Les vomissements ont été fréquemment retrouvés dans le groupe B2 (10 cas).

Tableau XXV : Répartition des participants selon l'intensité de la diarrhée dans le groupe B

Groupe J	B1 (n=24) Episodes de diarrhée			Total	B2 (n=23) Episodes de diarrhée			Total
	Code 1	Code 2	Code 3		Code 1	Code 2	Code 3	
J0	0	0	0	0	0	0	0	0
J1	0	0	0	0	1	1	0	2
J2	0	0	1	1	0	1	1	2
J3	1	0	0	1	1	0	1	2
J4	1	2	0	3	1	1	1	3
J5	0	0	1	1	3	0	0	3
J6	1	0	0	1	1	0	1	2
J7	0	1	0	1	1	0	0	1
Total B1/ %				8/ 33,3	Total B2/ %			15/ 65,2

La diarrhée a été plus représentée dans le groupe B2 avec 65,2%.

.Tableau XXVI : Répartition des participants selon la survenue de la **Fièvre** dans le groupe B

Groupe	B1	B2
Temp > 38,3°C		
J0	0	0
J1	0	0
J2	0	0
J3	0	0
J4	0	0
J5	1	0
J6	0	0
J7	0	0
Total	1	0

Un seul cas de fièvre a été noté dans le groupe B1.

Tableau XXVII : Répartition des participants selon l'intensité de l' **anorexie** dans le groupe B

Groupe J	B1 (n=24) Episodes d'anorexie			Total	B2 (n=23) Episodes d'anorexie			Total
	Code 1	Code 2	Code 3		Code 1	Code 2	Code 3	
J0	0	0	0	0	0	0	0	0
J1	0	0	0	0	0	0	0	0
J2	0	0	0	0	0	0	0	0
J3	1	0	0	1	0	0	0	0
J4	1	0	0	1	0	0	0	0
J5	0	0	0	0	0	0	0	0
J6	0	0	0	0	1	0	0	1
J7	0	0	0	0	0	0	0	0
Total B1/ %				2/ 8,33	Total B2/ %			1/ 4,35

Il a été observé 8,33% d'anorexie dans le groupe B1 contre 4,35% le groupe B2

V - survenue d'événements indésirables (J14-J42)

Tableau XXVIII : Répartition des participants selon l'intensité des vomissements dans le groupe B

Groupe J	B1 (n=24) Episode de vomissements			Total	B2 (n=23) Episode de vomissements			Total
	Code 1	Code 2	Code 3		Code 1	Code 2	Code 3	
J14	0	0	0	0	0	0	0	0
J15	0	0	0	0	0	0	0	0
J16	0	0	0	0	0	0	0	0
J17	0	0	0	0	0	0	0	0
J18	0	0	0	0	0	0	0	0
J19	0	0	0	0	0	0	0	0
J20	0	0	0	0	0	0	0	0
J21	0	0	1	1	0	0	0	0
J28	0	0	1	1	1	1	1	3
J42	0	1	0	1	1	1	1	3
Total B1/ %				3/ 12,5	Total B2/ %			6/ 26,1

Dans le groupe B2 nous avons eu 26,1% de vomissements contre 12,5 dans le groupe B1.

Tableau XXIX : Répartition des participants selon l'intensité de la diarrhée dans le groupe B :

Groupe J	B1 (n=24) Episodes de diarrhée			Total Cas	B2 (n=23) Episodes de diarrhée			Total Cas
	Code 1	Code 2	Code 3		Code 1	Code 2	Code 3	
J14	0	0	0	0	0	0	0	0
J15	0	0	1	1	0	0	0	0
J16	0	0	0	0	0	0	0	0
J17	1	1	0	2	0	2	0	2
J18	0	1	1	2	0	1	0	1
J19	1	1	1	3	0	0	1	1
J20	2	0	2	4	0	0	1	1
J21	0	2	2	4	0	1	0	1
J28	2	1	2	5	0	2	1	3
J42	0	2	2	4	0	2	0	2
Total B1/ %				25/ 104,1	Total B2/ %			11/ 47,8

La diarrhée a été plus représentée dans le groupe B1 (25 cas).

Anorexie :

Dans le groupe B aucun cas d'anorexie n'a été observé.

Fièvre :

Dans le groupe B1 aucun cas de fièvre n'a été observé, contrairement au groupe B2 un seul cas a été observé à J19.

Tableau XXX : : Répartition des participants selon la séroconversion

	n	%	95% CI
Phase1			
Group A	1/21	4.76	0.12 – 23.8
Group B	4/19	21.1	6.05 – 45.6
Phase 2			
Group A	3/47	6.4	1.3 – 17.5
Group B	3/47	6.4	1.3 – 17.5
Groupe A	4/68	5.9	1.6 – 14.4
Groupe B	7/66	10.6	4.4 – 20.6

La séroconversion était plus représentée dans le groupe ayant reçu le vaccin mélangé avec la bouillie comparé au groupe recevant le vaccin plus eau. La différence observée n'était pas statistiquement significative.

Tableau XXXI : Répartition des participants selon la quantité restante (Palatabilité) :

Quantité restante	N	100%	Temps moyen pour 100% (min)	Proportion Moyenne Consommée (quand <100%)	>= 70%
Phase 1					
Group A	21	1	7	0,49	7
Group B	19	12	3	0,81	18
Phase 2					
Group A1	24	3	5.7	0.66	9
Group A2	23	7	5.8	0.53	12
Group A1 et A2	47	10*	5.8	0.54	21**
Group B1	24	21	3.7	0.67	22
Group B2	23	22*	3.0	0.48	22
Group B1 et B2	47	43	3.4	0.62	44**
Total group A	68	11***			28****
Total group B	66	55***			62****

$p < 0.001$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0.001$

Le vaccin mélangé avec la bouillie a été plus consommé comparé au vaccin mélangé avec de l'eau.

COMMENTAIRES ET DISCUSSIONS

Notre étude portait sur un essai randomisé phase II avec du vaccin CVD 103 HgR mélangé avec l'eau ou la bouillie chez les enfants maliens âgés de 10 à 14 mois. L'étude a été menée en deux étapes :

La première étape était non aveugle mais randomisé et concernait les enfants de 10 à 12 mois.

La deuxième étape était randomisée à double aveugle et concernait les enfants de 10 à 14 mois.

Un total de 134 enfants a participé à l'étude, 40 à la première étape et 94 à la deuxième étape. A l'inclusion aucun de nos enfants n'avait un problème de santé.

A la première étape le sexe féminin a été prédominant dans le groupe A avec 52,4%, tandis que dans le groupe B le sexe masculin a été le plus représenté avec 52,6%. Les enfants de 11 mois ont été les plus fréquemment rencontrés dans les deux groupes.

Pendant la première semaine post vaccinale la fièvre n'a pas été notée, par contre dans le groupe A la diarrhée était plus fréquente à J1 J2 et J3 (28,51%) comparée à la fréquence élevée à J1 et J7 (31,58%) dans le groupe B. La proportion d'enfants ayant présentés des vomissements a été de 23,8 dans le groupe A et de 10,52% dans le groupe B. L'anorexie n'a été observée qu'à J5 (4,76%) dans le groupe A tandis qu'elle a été noté dans le groupe B à J5 J6 et J7 (15,78%).

Pendant la deuxième semaine la proportion d'enfants ayant présentée la diarrhée à J14 semblait être plus importante dans le groupe B (47,3%) par rapport au groupe A (42,8%). La proportion d'enfants ayant vomit était de (23,8%) dans le groupe A et de 10,52% dans le groupe B. L'anorexie a plus été observée chez les enfants du groupe B 10,52% que dans le groupe A 4,76%. La fièvre n'a été observée que chez un seul enfant de part et d'autre 4,76% et 5,26%.

A la deuxième étape, le sexe féminin a été prédominant avec 54,2% dans le

groupe A1 alors que dans le groupe A2 le sexe masculin avec 52,2%. Dans le groupe B1 et B2 le sexe masculin a été fréquemment retrouvé avec respectivement 54,2% et 52,2%. Les enfants de 12 mois ont été les plus fréquemment retrouvés dans le groupe A1 avec 37,5%, par contre dans le groupe A2 les enfants de 13 mois avec 34,8%. Dans le groupe B1 et B2 les enfants de 12 mois étaient plus représentés avec respectivement 33,3% et 30,4%.

La survenue de vomissements dans le groupe A1 était de (41,7%), par contre dans le groupe A2 seulement 8 enfants (38,4%). La diarrhée a été retrouvée chez 17 enfants 70,8% dans le groupe A1 et 10 enfants 43,5% dans le groupe A2. Il n'y a pas eu de cas d'anorexie dans les deux groupes. La fièvre a été plus représentée dans le groupe A2 et cela de J0 à J7. La survenue d'événements indésirables de J14 à J42 : dans le groupe A nous avons eu 5 cas (8,33) de vomissements dans le groupe A2 et seulement 2 cas (21,7%) dans le groupe A1. La diarrhée a été fréquemment retrouvée dans le groupe A dont 23 cas (100%) dans le groupe A2 et 7 cas (29,2%) dans le groupe A1. Aucun cas d'anorexie dans le groupe A, par contre 3 cas de fièvre dans le groupe A1(12,5%) contre 1 cas dans le groupe A2(4,35%).

La survenue d'événements indésirables dans le groupe B de J0 à J7 : Les vomissements ont été les plus fréquemment retrouvés dans le groupe B2, 10 cas (43,5%) contre 1 seul cas dans le groupe B1(4,17%). Dans le groupe B2, 15 cas de diarrhée(65,22%) contre 8 cas dans le groupe B1(33,3%), 1 seul cas de fièvre a été observé dans le groupe B1(4,17%). Dans le groupe B1, 2 cas d'anorexie(8,33%) contre 1 cas dans le groupe B2(4,35%)

La survenue d'événements indésirables de J14 à J42 : Dans le groupe B2 nous avons eu 6 cas de vomissements(26,1%) et 3 cas dans le groupe B1(12,5%).

La diarrhée a été plus représentée dans le groupe B1, 25 cas (100%). Aucun cas d'anorexie dans le groupe B. Un seul cas de fièvre à J19 dans le groupe B2(4,35%).

La séroconversion a été retrouvée chez 4 enfants sur 68 (5,9%) dans le groupe A et 7 sur 66 (10,6%) dans le groupe B. Parlant de l'acceptabilité du vaccin : à la première étape sur 21 enfants 1 seul a consommé la totalité dans le groupe A (4,76%), par contre dans le groupe B sur 19 enfants 12 ont pris la totalité (63,16%).

A la deuxième étape dans le groupe A1, sur 24 enfants 3 ont pris la totalité (12,5%), par contre dans le groupe A2 sur 23 enfants 7 (30,4%). Dans le groupe B1 sur 24 enfants, 21(87,5%) et dans le groupe B2 sur 23 enfants, 22 ont tout bu (95,6%).

Il s'agissait d'une étude cross over pour déterminer la palatabilité et l'acceptabilité du vaccin CVD 103 HgR chez les enfants de 10 à 14 mois et résident à Djikoroni Para. Il y avait deux régimes vaccinaux : un régime composé de vaccin plus tampon dans 100 ml d'eaux (régime standard destiné au groupe A) et un régime composé de vaccin dans de la bouillie (25 ml, régime test destiné au groupe B), le régime était assigné aux participants par tirage au sort à partir d'une liste de nombre au hasard. Les chiffres pairs étaient du groupe A et les chiffres impairs du groupe B. La taille de l'échantillon était estimé à partir du taux de séroconversion observé avec le vaccin standard, à n=134, cette taille était suffisante pour détecter une augmentation supérieure à 25% du taux de séroconversion avec le vaccin dans la bouillie. Le risque associé en participant à cette étude provenait de l'administration du vaccin, les mêmes effets secondaires étaient attendus aussi bien chez les participants recevant le régime test (vaccin/ bouillie) que ceux recevant le régime standard (vaccin/ eau). On avait l'habitude d'observer comme événements indésirables sollicités (fièvre, vomissements, diarrhée, anorexie). Tous les participants avaient été rigoureusement suivis à la recherche d'événements indésirables au cours des J1 à J7, J14 à J21 et J60.

Les parents étaient informés de nous contacter à tout moment en cas de besoin de soins sanitaires. Un moniteur médical local (LMM) et un comité de monitoring pour la sécurité (SMC) étaient sur place. Tous les effets secondaires attendus et non attendus étaient revu par le comité de monitoring pour la sécurité après avoir inclus les 10 premiers participants puis après les 40 suivants, puis après les 50 suivants et à la fin de l'étude, après chaque réunion ce comité devait autoriser la poursuite ou non de la vaccination. Au cas où un des effets secondaires jugés par le LMM comme étant possible ou probable de façon certaine attribuable au vaccin surviendrait, l'essai serait interrompu et des discussions étaient engagées entre les investigateurs, le SMC et le sponsor.

Cette étude a révélé que seulement 13,4% des volontaires Américains ont développé la diarrhée douce [38]. Par ailleurs une autre étude faite chez les enfants et les adultes Latino américains et Asiatiques a montré la diarrhée douce qui n'a pas été accompagné de malaise, nausée, vomissements ou d'autres effets nuisibles notables notamment chez 12% des volontaires, la réaction immunitaire était forte 92% des volontaires [38] ont développé des anticorps vibriocidaux contre 8,21% dans notre étude.

CONCLUSION

Au terme de notre étude basée sur l'essai randomisé de phase II, nous avons évalué l'immunogénicité, l'acceptabilité et la réactogénicité relatives du vaccin cholera atténué CVD 103 HgR administré oralement avec un tampon de bicarbonate ou avec de la bouillie chez 134 enfants âgés de 10 à 14 mois inclus après obtention de consentement parental.

Après administration de la dose unique de CVD 103 HgR avec le bicarbonate ou avec de la bouillie chez les enfants maliens, seulement **8,21%** ont présenté des anticorps vibriocidaux et les effets secondaires étaient de la diarrhée, des vomissements, de l'anorexie et de la fièvre. Quant à l'acceptabilité, à la première étape dans le groupe A un seul enfant sur 21 (**4,76%**) a consommé la quantité totale, pendant que dans le groupe B, 12 enfants sur 19 (**63,12%**) ont consommé entièrement toute la quantité.

A la deuxième étape dans le groupe A1 sur 24 enfants, 3 (**12,5%**) ont pris la totalité par contre dans le groupe A2 sur 23 enfants, 7 (**30,4%**) ont pris la totalité. Dans le groupe B1 sur 24 enfants, 21 (**87,5%**) ont pris la totalité et dans le groupe B2 22 enfants sur 23 (**95.6%**) ont pris toute la quantité. Il n'y a pas eu l'excrétion du vaccin dans les selles de ces enfants.

RECOMMANDATIONS

Réaliser d'autres études avec de grands échantillons pour permettre de conclure sur l'immunogénicité chez les enfants du vaccin dans la bouillie.

Réaliser d'autres études sur ce vaccin et sur de nouveaux vaccins afin de trouver un vaccin efficace contre le cholera chez les enfants de moins d'un an.

Encourager l'utilisation de vaccins oraux en association avec les céréales locaux couramment utilisés dans la nourriture des enfants.

Apprendre aux mères et gardiens d'enfants et à toutes les communautés les mesures d'hygiène permettant de prévenir le cholera.

Encourager l'utilisation du vaccin CVD 103 HGR chez les adultes en situation d'épidémie de manière à prévenir la propagation de l'infection.