



HAL
open science

Vaccination anti-pneumococcique chez les sujets à risque d'infections invasives à pneumocoques et prévention de l'hyporéponse

Mathilde Bahuaud

► To cite this version:

Mathilde Bahuaud. Vaccination anti-pneumococcique chez les sujets à risque d'infections invasives à pneumocoques et prévention de l'hyporéponse. Immunologie. Université Sorbonne Paris Cité, 2018. Français. NNT : 2018USPCB067 . tel-02510357

HAL Id: tel-02510357

<https://theses.hal.science/tel-02510357>

Submitted on 17 Mar 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Université Paris Descartes

Ecole doctorale SORBONNE PARIS CITE

U1016-Institut Cochin/Equipe Batteux

Vaccination anti-pneumococcique chez les sujets à risque d'infections invasives à pneumocoque et prévention de l'hyporéponse

Par Mathilde BAHUAUD

Thèse de doctorat d'Immunologie

Dirigée par le Pr Frédéric BATTEUX

Présentée et soutenue publiquement le 27 Septembre 2018

Devant un jury composé de :

Madame le Pr Amélie SERVETTAZ, PU-PH, Rapporteur

Monsieur le Pr Stéphane PAUL, PU-PH, Rapporteur

Madame le Dr Emmanuelle VARON, PH, Examineur

Madame le Pr Odile LAUNAY, PU-PH, Examineur

Monsieur le Pr Frédéric BATTEUX, PU-PH, Directeur de thèse

 Except where otherwise noted, this work is licensed under <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

Table des matières

CHAPITRE 1. INFECTIONS A PNEUMOCOQUES ET PREVENTION	2
I. Streptococcus pneumoniae.....	2
1. Historique	2
2. Bactériologie	2
3. Identification.....	3
4. Facteurs de virulence.....	4
a) Capsule polysaccharidique	5
b) Pneumolysine	6
c) Paroi bactérienne	6
d) Protéine de surface	6
5. Distribution des sérotypes	7
a) Prévalence des sérotypes de portage	8
b) Prévalence des sérotypes d'infections invasives	8
II. Infections à pneumocoques	10
1. Portage.....	10
2. Colonisation et dissémination	11
a) Colonisation de la muqueuse	11
b) Adhésion aux cellules épithéliales	15
c) Dissémination.....	16
3. Physiopathologie des infections	17
4. Sujets à risques	18
5. Traitements.....	18
6. Résistance aux antibiotiques	18
CHAPITRE 2. VACCINATION	21
I. Définition et Description	21
a) Innocuité	21

b) Protection.....	21
c) Durabilité.....	21
d) Immunité de groupe	22
2. Différents types de vaccins	22
a) Vaccins vivants atténués	23
b) Vaccins entiers tués ou inactivés	23
c) Vaccins sous-unitaires.....	24
d) Vaccins anatoxiques.....	24
II. Immunologie de la vaccination	24
1. principaux effecteurs de la réponse vaccinale	24
a) Les anticorps	25
b) Les lymphocytes T	26
2. Immunité innée : première étape de la réponse vaccinale	27
3. Réponse thymo-dépendante (TD)	29
a) Réaction extra folliculaire	29
b) Réaction via les centres germinatifs	31
4. Réponse thymo-indépendante (TI).....	32
a) Réponse thymo-indépendante de type 1	33
b) Réponse thymo-indépendante de type 2	33
c) Réponse thymo-indépendante de type 3	35
III. Vaccins anti-pneumococciques	36
1. Vaccin anti-pneumococciques polysidique (PPV).....	36
2. Vaccin anti-pneumococciques conjugué (PCV)	36
3. Historique des Recommandations vaccinales anti-pneumococciques.....	37
IV. Hyporéponse Vaccinale	40
1. Définition	40
2. Historique de l'Hyporéponse	40
a) Vaccin polysaccharidique anti-Haemophilus type b	41
b) Vaccins polysaccharidiques anti-Méningococciques	41
c) Vaccin polysaccharidique anti-Pneumococciques.....	43
3. Mécanismes de l'Hyporéponse.....	45

a) Le vaccin polysaccharidique anti-pneumococcique entraine la déplétion des L _B mémoires spécifiques.....	45
b) Le vaccin polysaccharidique anti-méningococcique entraine l'apoptose des L _B mémoires spécifiques.....	46
c) Les PS du pneumocoque entraînent l'abrogation des centres germinatifs et déplètent le pool de plasmocytes.....	47
d) Les PS ont un effet supprimeur sur le système BAFF des cellules B	48
CHAPITRE 3. TRAVAUX PERSONNELS	51
I. Immunogénicité du vaccin conjugué anti-pneumococcique	54
1. Article 1.....	54
II. Nouvelle stratégie vaccinale combinée : PCV13 + PPV23	74
1. Article 2.....	74
2. Article 3.....	83
III. Etude de l'Hyporéponse induite par le vaccin polysaccharidique	94
1. Article 4.....	94
CHAPITRE 4. DISCUSSION	125
CHAPITRE 5. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	131
ANNEXES	133
BIBLIOGRAPHIE	149

Liste des Abréviations

Ac	Anticorps	LES	Lupus Erythémateux Systémique
Ag	Antigène	LLOQ	Limites de quantification
BCR	B cell Receptor	L_T	Lymphocyte T
CPA	Cellule Présentatrice d'antigène	LT_{FH}	Lymphocyte T folliculaire
APRIL	A Proliferation-Inducing Ligand	MenC-PS	Vaccin polysaccharidique anti- méningococcique C
B1	Lymphocyte B1	MenC-CV	Vaccin conjugué anti- méningococcique C
BAFF	B Cell-Activating Factor of the TNF Family	MZ	Lymphocytes B de la zone marginale
BAFFR	BAFF Receptor	nanA	Neuraminisade A
BCMA	B Cell Maturation Antigen	nanB	Neuraminidase B
CD	Cluster de différenciation	OPA	Test d'Opsonophagocytose
DC	Cellule Dendritique	PAF	Facteur d'activation plaquettaire
GalNac	N-acétyl-D-galactosamine	PAMP	Pathogen Associated Molecular patterns
GC	Centre Germinatif	PCV	Vaccin anti-pneumococcique conjugué
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité	PRR	Patterns Recognition Receptor
CNRP	Centre National de Référence du Pneumocoque	PHRC	Protocole Hospitalier de Recherche Clinique
CPP	Comité de Protection des Personnes	Ply	Pneumolysine
DO	Densité Optique	PPV	Vaccin anti-pneumococcique polysaccharidique
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent assay	PR	Polyarthrite rhumatoïde
Fab	Fragment antigen-binding	PS	Polysaccharide
Fc	Fragment Cristallisable	PSDP	Pneumocoque de sensibilité diminuée à la pénicilline
FDC	Cellule Dendritique Folliculaire	PspA	Protéine A de surface
FO	Lymphocyte B Folliculaire	PspC	Protéine C de surface
HR	Hyporéponse	slgA	IgA sécrétoire
Ig	Immunoglobuline		
IIP	Infections invasives à pneumocoque		
IL	Interleukine		
L_B	Lymphocyte B		

<i>TACI</i>	Transmembrane activator and calcium-modulating cyclophilin ligand interactor
<i>TD</i>	Réponse Thymo-Dépendante
<i>TI</i>	Réponse Thymo-Indépendante
<i>TLR</i>	Toll Like Receptor

Liste des Figures

Figure1.	Classification des sérotypes de pneumocoques. Correspondance entre les nomenclatures américaines et danoises	4
Figure2.	Principaux facteurs de virulence du pneumocoque (extrait de Kadioglu et al. ⁴).....	5
Figure3.	Evolution de l'incidence des infections invasives à pneumocoque (extrait du rapport d'activité 2016 du CNRP).....	9
Figure4.	Distribution des sérotypes des souches isolées d'hémoculture pour les enfants et les adultes	9
Figure5.	Distribution des sérotypes des souches isolées de liquide cébrospinal (LCS) pour les enfants et les adultes	10
Figure6.	Mécanismes d'échappement du pneumocoque aux barrières naturelles de l'Hôte (extrait de Mook-Kanamori et al. ³²)	12
Figure7.	Classification des infections à pneumocoque : les infections invasives et non invasives...	17
Figure8.	Evolution des souches de <i>S. pneumoniae</i> de sensibilité diminuée à la pénicilline (PSDP) en France d'après les données du CNRP.	19
Figure9.	Sensibilité à la pénicilline par sérotype des souches de pneumocoques isolées d'infections invasives en 2015 (extrait du rapport d'activité du CNRP pour 2016 ²⁷).	20
Figure10.	Les différents types de vaccins.....	22
Figure11.	Mécanismes d'action des anticorps (extrait de Janeway's Immunobiology, 9th edition ⁸⁷)	25
Figure12.	Différents sous types de lymphocytes T auxiliaires	27
Figure13.	Activation d'un lymphocyte T CD4 par une cellule présentatrice d'antigène (CPA) via l'induction de trois signaux distincts (extrait de Janeway's Immunobiology, ⁸⁷)	29

Figure14. Schéma récapitulatif modifié des réponses thymo-indépendantes (A) et thymo-dépendantes (B) induites par les vaccins anti-pneumococciques (extrait de Siegrist et al ¹⁰⁷).....	35
Figure15. Schéma vaccinal selon les recommandations du Haut Conseil de Santé Publique, en date du 10 Mars 2017. Il concerne les enfants de plus de 2 ans immunodéprimés ou à risque d'IIP ainsi que les adultes immunodéprimés ou à risque d'IIP.....	39
Figure16. Exemple d'Hyporéponse. Evolution de la concentration en anticorps après un rappel par le vaccin conjugué (PCV) en gris, ou par le vaccin polysaccharidique (PPV), en violet.....	40
Figure17. Résumé de différentes études cliniques démontrant l'hyporéponse induite par le PPV23 (extrait et modifié à partir de Papadatou et al. ¹⁴²)	44
Figure18. Expression des récepteurs du système BAFF : BAFFR, TACI et BCMA (extrait de Sakai et al ¹⁴⁹)	50
Figure19. Avantages et inconvénients des deux stratégies vaccinales proposées	131

I. STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE

1. HISTORIQUE

En 1881, deux microbiologistes, George M. Sternberg aux Etats-Unis et Louis Pasteur en France, décrivent de façon indépendante l'un de l'autre, des bactéries de forme coccoïde dans la salive ; Pasteur dans la salive d'un enfant décédé de la rage et Sternberg dans sa propre salive. Pasteur¹ et Sternberg injectèrent la salive à des lapins, retrouvés morts 36h après l'inoculation et dont le sang contenait les bactéries. Bien que des diplocoques en forme légèrement allongée aient déjà été décrits dans la littérature, les deux chercheurs furent les premiers à démontrer le potentiel pathogène de ces bactéries chez l'animal. La bactérie découverte fut nommée « microbe septicémique de la salive » par Pasteur et « *Micrococcus pastori* » par Sternberg. Différents noms suivront : en 1886, Fraenkel la renomme *Pneumococcus*, se référant à sa capacité à induire une pneumonie, puis en 1920, elle sera classée sous le nom de *Diplococcus pneumoniae*. Ce n'est qu'à partir de 1974 qu'elle est classée dans le groupe *Streptococcus*, principalement en raison de sa croissance en courtes chainettes en milieu liquide.

2. BACTERIOLOGIE

Streptococcus pneumoniae, (*S. pneumoniae* ou pneumocoque), fait partie de l'embranchement taxonomique des Firmicutes, de la classe des Bacilli, de l'ordre des Lactobacillales et de la famille des *Streptococcaceae*². Le genre *Streptococcus* regroupe plusieurs espèces pathogènes pour l'Homme, dont *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae* et *Streptococcus suis*.

Le pneumocoque est une bactérie encapsulée Gram positif, de forme légèrement allongée, d'environ 0,5 à 1,25 micromètre de diamètre. A l'examen microscopique, on observe un aspect de diplocoque en flamme de bougie, en « 8 » ou en courte chainette si culture en milieu liquide.

Il s'agit d'une bactérie mésophile, dont la culture est favorisée en anaérobiose stricte ou tout au moins une atmosphère enrichie en CO₂. Le pneumocoque ne possède ni catalase, ni peroxydase, ce qui induit l'accumulation d'eau oxygénée dans le milieu ; accumulation en partie responsable de son autolyse. Cultivé sur gélose au sang, on observe une hémolyse α (halo verdâtre) autour des colonies. On le distingue des autres Streptococci par sa sensibilité à l'Optochine (éthylhydrocupréine)².

La surface du pneumocoque est composée d'une capsule de polysaccharides qui forme l'enveloppe externe de la bactérie³. Puis vient ensuite la paroi cellulaire qui contient six couches formées de peptidoglycane, d'acide téichoïque et d'acide lipotéichoïque. Des pilis ont également été observés à la surface de nombreuses souches de pneumocoque. Enfin, on dénombre une quantité très importante de protéines de surface ; certaines étant des lipoprotéines associées à la membrane, d'autres à la paroi cellulaire⁴.

3. IDENTIFICATION

Afin de le différencier des autres espèces pathogènes et commensales vivant dans le nasopharynx, niche écologique principale du pneumocoque, il est indispensable de pouvoir l'identifier et le caractériser. Dans un premier temps, les techniques de microbiologie classiques sont utilisées pour l'identification de *S. pneumoniae*. L'apparition d'une hémolyse de type α en condition aérobie, une coloration de Gram positif où l'on observe des diplocoques ou des coques en chaînettes ainsi qu'un test de catalase négatif permettent de confirmer la présence d'un *Streptococcus spp*. La sensibilité de la bactérie en présence d'un disque d'optochine permet de confirmer l'espèce *Streptococcus pneumoniae*. En ce qui concerne le sérotypage, la réaction de Quellung ou réaction de Neufeld, est considéré comme le test de référence. Il permet de vérifier la réactivité capsulaire vis à vis d'antisérums. Des tests d'agglutinations avec des particules de latex sensibilisées par des anticorps spécifiques sont également utilisés.

La caractérisation antigénique des pneumocoques se fait essentiellement à l'aide de la capsule. A l'heure actuelle plus de 97 sérotypes de pneumocoques ont été découverts, regroupés en 46 sérogroupes basés sur leurs similitudes antigéniques, numérotés de 1 à 48 (les groupes 26 et 30 ne sont pas utilisés)⁵ (Figure1). Il existe deux nomenclatures utilisées

pour caractériser les sérotypes : la nomenclature danoise (dite de Kauffmann-Lund) est la plus couramment utilisée au détriment de la nomenclature américaine (Henrichsen), actuellement très peu utilisée.

USA	Denmark	USA	Denmark	USA	Denmark	USA	Denmark	USA	Denmark
1	1	21	21	41	34	61	35C	81	44
2	2	22	22F	42	33B	62	35A	82	48
3	3	23	23F	43	11A	63	22A	83	12A
4	4	24	24F	44	18A	64	23B	84	47A
5	5	25	25F	45	40	65	24A	?	10B
6	6A	26	6B	46	23A	66	35B	?	10C
7	7A	27	27	47	35A	67	32A	?	11D
8	8	28	28F	48	7B	68	9V	?	12B
9	9N	29	29	49	9L	69	39	?	16A
10	10F	30	15A	50	7C	70	33F	?	25A
11	11F	31	31	51	7F	71	38	?	33D
12	12F	32	32F	52	47F	72	45	6C	6C
13	13	33	9A	53	11C	73	46		
14	14	34	10A	54	15B	74	41A		
15	15F	35	35F	55	18B	75	43		
16	16F	36	36	56	18C	76	11B		
17	17F	37	37	57	19A	77	15C		
18	18F	38	41F	58	19B	78	17A		
19	19F	39	33C	59	19C	79	28A		
20	20	40	33A	60	24B	80	42		

Figure1. Classification des sérotypes de pneumocoques. Correspondance entre les nomenclatures américaines et danoises

4. FACTEURS DE VIRULENCE

S. pneumoniae exprime un large éventail de facteurs de virulence (Figure 2) qui peuvent être soit présents à sa surface ou sécrétés. Ces derniers interviennent dans les interactions spécifiques avec les cellules de l'hôte, qui interfèrent avec les mécanismes d'élimination par le système de l'immunité inné, qui contribuent de manière significative à des lésions tissulaires au site local d'infection et qui favorisent une réponse inflammatoire systémique de l'hôte.

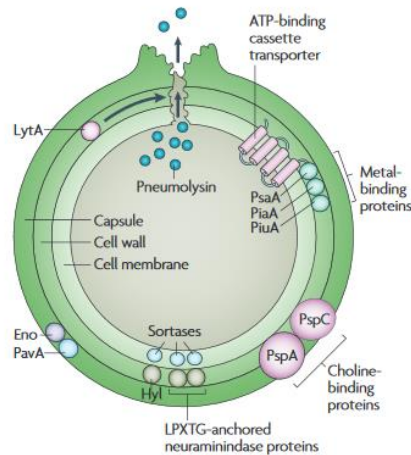


Figure2. Principaux facteurs de virulence du pneumocoque (extrait de Kadioglu et al.⁴)

a) Capsule polysaccharidique

La capsule constitue le facteur de virulence le plus important du pneumocoque. Elle forme la couche la plus externe des cellules de *S. pneumoniae* et a une épaisseur d'environ 200 à 400 nm⁶. À l'exception du sérotype 3, la capsule est attachée de manière covalente à la surface externe du peptidoglycane de la paroi cellulaire⁷. Un total de 97 sérotypes structurellement et sérologiquement distincts est reconnu à ce jour⁵, incluant les nouveaux sérotypes 6D⁸, 6F et 6G⁹, 11E¹⁰, 20A et 20B¹¹. Ces sérotypes sont regroupés en 46 sérogroupes, basés sur leurs similitudes antigéniques. La production de capsule est indispensable pour la virulence du pneumocoque et est fortement anti-phagocytaire¹². Bien que des souches non encapsulées soient associées à des infections superficielles, telles que la conjonctivite^{13,14}, des isolats cliniques provenant d'autres sites stériles sont toujours encapsulés, et les dérivés spontanés non encapsulés de ces souches sont en grande partie avirulents. La plupart des sérotypes de pneumocoque sont fortement chargés au pH physiologique, ce qui peut directement modifier les interactions avec les phagocytes¹⁵. La capsule forme également un bouclier inerte empêchant la fixation des IgG. Des données récentes suggèrent que la capsule peut également réduire la quantité totale de complément déposé sur la surface bactérienne, notamment le composant du complément C3b^{4,16}. La virulence de *S. pneumoniae* est liée à l'épaisseur de la capsule¹⁷. Les pneumocoques des différents sérotypes diffèrent nettement quant à leur capacité à provoquer une maladie. Cela reflète probablement leur capacité relative à résister à la phagocytose, ainsi que des différences dans leur capacité à déclencher

une réponse immunitaire humorale¹². Par exemple, Hostetter a rapporté des différences dépendantes du sérotype quant à la quantité et au site de fixation du C3b à la surface des cellules pneumococques opsonisées. Des différences ont également été observées dans le traitement de dégradation du C3b lié au iC3b et au C3d¹⁸.

b) Pneumolysine

La pneumolysine (Ply) fait partie de la famille des cytolysines cholestérol-dépendantes synthétisées par les bactéries Gram-positives. Elle est produite sous la forme d'une protéine soluble de 52 kDa qui s'oligomérisent dans la membrane des cellules cibles pour former un large pore transmembranaire en forme d'anneau. Le pore, de 260 Å de diamètre, est composé d'environ 40 sous-unités monomériques. Lors de sa conversion d'un monomère soluble en un oligomère inséré dans la membrane, la pneumolysine subit une série de changements structurels spectaculaires¹⁹. On pense que les oligomères sont responsables de l'activité cytolytique de la toxine et des nombreuses activités de modulation cellulaire. La pneumolysine est responsable de l'inhibition des battements ciliaires sur l'épithélium respiratoire et l'épendyme cérébral, de l'inhibition du burst oxydatif des phagocytes, de l'induction de la synthèse des cytokines et de l'activation des lymphocytes T CD4^{20,21}. Il a également été démontré que la pneumolysine activait la voie classique du complément indépendamment de son activité de modulation cellulaire²².

c) Paroi bactérienne

La paroi de *S. pneumoniae* est composée de peptidoglycanes, d'acides teichoïques majoritairement représentés par le polysaccharide C, commun à toutes les souches de pneumocoques, d'acides lipoteichoïques et de phosphorylcholine. Cette dernière est un phospholipide hydrophobe caractéristique des bactéries colonisant les voies respiratoires supérieures (*Haemophilus influenzae*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* ainsi que des souches pathogènes et commensales du genre *Neisseria*) jouant un rôle important dans l'inflammation. De plus, elle permet l'ancrage des protéines liant la choline²³.

d) Protéine de surface

Le pneumocoque produit plusieurs protéines de surface lui permettant d'interagir avec les composantes de l'hôte lors de la colonisation et de sa dissémination. L'analyse des génomes de différentes souches pneumococciques ont permis de regrouper les protéines de surface en trois grands groupes selon leurs motifs: les lipoprotéines, les protéines liant la choline et les protéines contenant un motif LPxTG

Les Lipoprotéines. A l'heure actuelle, plus de 40 lipoprotéines de surface pneumococciques ont été décrites²⁴ dont certaines comme PpmA et SlrA ainsi que les lipoprotéines de surface PsaA, PiA et PiuA sont impliquées dans la virulence du pneumocoque²⁵.

Les protéines liant la choline. La protéine de surface PspA, ancrée aux résidus choline des acides teichoïques et lipoteichoïques facilite l'invasion systémique du pneumocoque en inhibant la voie alterne du complément. Elle intervient au niveau du dépôt du C3b, facteur du complément qui s'associe aux antigènes bactériens, et/ou inhiberait la formation de la C3 convertase qui permet d'amplifier l'activation de la voie alterne du complément. D'autre part, la PspA est capable de se lier à la lactoferrine, protégeant ainsi la bactérie de l'activité bactéricide de l'apolactoferrine. La LytA est une amidase qui par son action autolytique, permet la libération de la pneumolysine.

Les protéines d'ancrage LPxTG. Les neuraminidases nanA et nanB aident à l'adhésion aux cellules épithéliales et à la colonisation du système respiratoire²⁶.

5. DISTRIBUTION DES SEROTYPES

Bien qu'il existe 46 sérogroupes de *S. pneumoniae*, seule une dizaine de sérogroupes sont responsables d'infections invasives à pneumocoque (IIP)²⁷. Il existe une très grande hétérogénéité entre les sérotypes au niveau de leur virulence ou de leur immunogénicité. De plus, tous les sérotypes n'ont pas la même capacité de dissémination ou de colonisation. La prévalence des sérotypes diffère en fonction :

- du site de l'infection
- du potentiel invasif
- de la région géographique
- de l'âge de l'hôte

Ainsi, la prévalence des sérotypes de portage ou des sérotypes impliqués dans les infections invasives ne seront pas les mêmes pour l'Asie, l'Afrique, l'Amérique ou l'Europe. Nous détaillerons dans ce paragraphe, la prévalence des sérotypes pour la France, selon les données du centre national de référence du pneumocoque (CNRP) pour la période 2015-2016²⁷.

a) Prévalence des sérotypes de portage

Grâce à la vaccination systématique depuis 2001 par le PCV7, puis par le PCV13 en 2010, permettant ainsi la vaccination de plus de 97% d'enfants de moins de 2 ans, la proportion d'enfants porteurs de pneumocoques a significativement diminuée pour atteindre 60% en 2015-2016 (contre 71% en 2002-2003). Les sérotypes vaccinaux inclus dans les vaccins conjugués ont peu à peu laissé la place à des sérotypes de remplacements. Seul le 19F (inclus dans le PCV7), représente 3,7% des souches de portage. Les six sérotypes additionnels du PCV13 sont quant à eux retrouvés à moins de 3%. Concernant les sérotypes dits de remplacements, deux sérotypes dépassent les 10%, il s'agit du 11A et du 15B/C, deux sérotypes inclus dans le PPV23. Viennent ensuite les sérotypes 23B, 21, 23A, 10A, 35B et 35F.

b) Prévalence des sérotypes d'infections invasives

Les effets bénéfiques de la vaccination anti-pneumococcique par les vaccins conjugués 7- et 13-valents sont également visibles sur l'incidence des infections invasives à pneumocoque (IIP), et ce quel que soit l'âge (Figure 3). En effet, depuis 2001-2002, les IIP ont significativement diminuées, notamment chez les enfants de moins de 2 ans, pour atteindre 16,3 cas/100 000 en 2015 (contre 30,3 cas/100 000 en 2001-2002). Il faut attendre en revanche 2011 (introduction du PCV13) pour observer cette diminution dans les autres groupes d'âge.

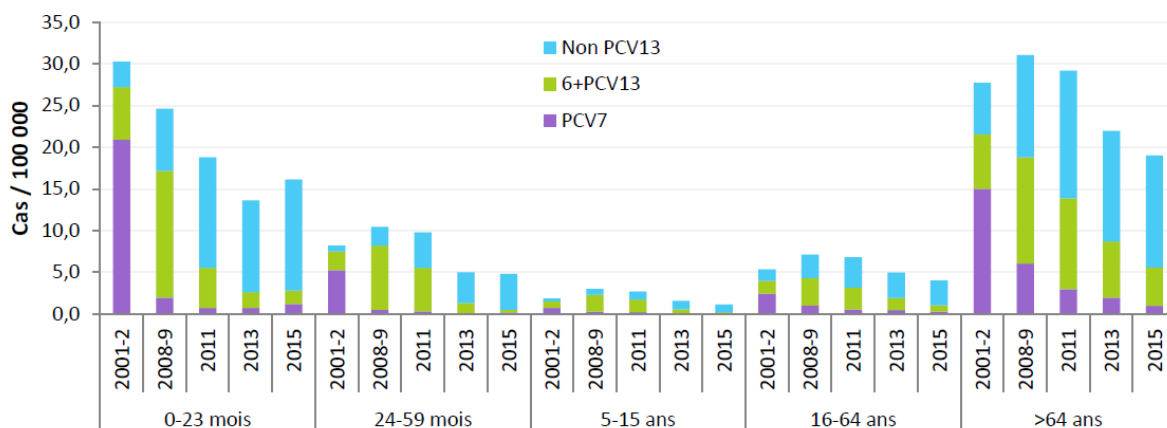


Figure3. Evolution de l'incidence des infections invasives à pneumocoque (extrait du rapport d'activité 2016 du CNRP). PCV7 : sérotypes inclus dans le vaccin PCV7 (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F) ; 6+PCV13 : 6 sérotypes additionnels inclus dans le PCV13 (1, 3, 5, 6A, 7F, 19A) ; Non PCV13 : sérotypes non inclus dans les vaccins conjugués.

Concernant la prévalence des sérotypes dans les infections invasives, on note la quasi-disparition des sérotypes vaccinaux et l'émergence d'une grande diversité de sérotypes non vaccinaux. De façon globale et tous âges confondus, deux sérotypes prédominent : le sérotype 3 (inclus dans le PCV13) et le sérotype 12F (inclus dans le PPV23). Plusieurs sérotypes sont en augmentation par rapport à 2013, comme les sérotypes 8, 22F et 9N. Les sérotypes 15A et 24F sont quant à eux assez stables. Enfin, on note une diminution des sérotypes 7F et 19A, deux sérotypes du PCV13. La fréquence respective de ces sérotypes varie selon l'âge et la nature du prélèvement. Les figures 4 et 5 illustrent la variation de distribution des sérotypes.

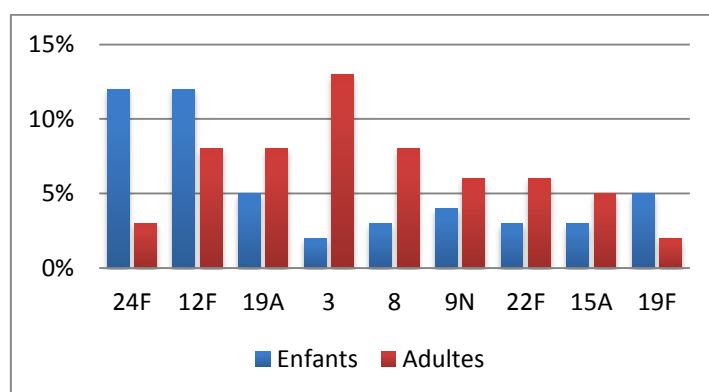


Figure4. Distribution des sérotypes des souches isolées d'hémoculture pour les enfants et les adultes (> 15 ans).

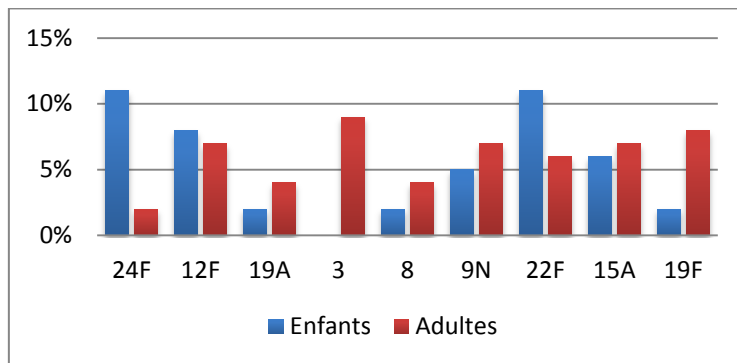


Figure5. Distribution des sérotypes des souches isolées de liquide cébrospinal (LCS) pour les enfants et les adultes (> 15 ans).

II. INFECTIONS A PNEUMOCOQUES

1. PORTAGE

Le nasopharynx humain est la principale niche écologique de *S. pneumoniae*, où il entraîne habituellement une colonisation asymptomatique. De précédentes études montrent que la colonisation du rhinopharynx par *S. pneumoniae* est un processus dynamique, évoluant dans le temps et est influencée par de nombreux facteurs. Il y a plus de trente ans, Gray & Dillon²⁸ ont étudié la dynamique de la colonisation du rhinopharynx par le pneumocoque, en se basant sur l'étude du sérotypage. Dans les pays du nord, la première colonisation par une souche de pneumocoque a lieu vers 6 mois, avec l'acquisition en moyenne de 1 à 3 sérotypes en 3 ans. Elle est plus précoce dans les populations des pays en développement, plutôt vers 2-3 mois. Des études rapportent chez le nourrisson bien portant un pourcentage de portage de *S. pneumoniae* variant de 12% entre 1 et 3 mois à 60% à 24 mois^{27,29}. Cette colonisation atteint son maximum vers 2-3 ans, puis décline progressivement, pour atteindre 10% chez l'adolescent et 2 à 9% chez l'adulte. Différents facteurs influencent la fréquence du portage comme la vie en collectivité, l'importance de la fratrie ou l'existence d'une infection concomitante³⁰⁻³². L'utilisation d'un traitement antibiotique diminue la fréquence du portage, mais l'effet est transitoire et la colonisation reprend en moins d'un mois. Ces souches de portage subissent néanmoins une forte pression de sélection par les antibiotiques. En conséquence, les sérotypes impliqués dans le portage seront les plus résistants aux antibiotiques³³.

2. COLONISATION ET DISSEMINATION

a) *Colonisation de la muqueuse*

Pour la plupart des individus, la colonisation sera asymptomatique et les enfants seront des porteurs sains. Dans certains cas, notamment si le système immunitaire est affaibli, le pneumocoque va traverser les barrières naturelles de l'hôte et entraîner une infection invasive ou non en fonction du site d'infection. La transmission inter-individu se fait par voie aérienne, principalement au moyen de gouttelettes expulsées en toussant ou en éternuant. L'adhérence et la réplication sont les principales propriétés du pneumocoque qui favorise la colonisation.

A partir des sites colonisés, la dissémination de la bactérie nécessite de traverser les barrières naturelles de l'hôte. Il existe plusieurs types de barrières naturelles au niveau du tractus respiratoires empêchant les pneumocoques de se lier à la surface de la muqueuse respiratoire : une barrière physique constituée des cellules épithéliales, du mucus respiratoire et du microbiote. A cette barrière s'ajoutent des cellules du système immunitaire et des médiateurs solubles comme des peptides antibactériens, des anticorps et des cytokines.

Le pneumocoque a développé plusieurs stratégies pour surmonter ces obstacles et atteindre la couche de cellules épithéliales respiratoires (Figure 6).

Barrière Physique. En recouvrant les cellules épithéliales, le mucus assure la protection de ces dernières par le piégeage des agents pathogènes. Le pneumocoque a su développer trois mécanismes distincts pour lutter contre les effets de cette barrière naturelle. Un premier mécanisme réside dans la capsule qui, chargée négativement, repousse naturellement les résidus d'acide sialique du mucus, diminuant ainsi la probabilité de piégeage de la bactérie³⁴. Deuxièmement, le pneumocoque exprime plusieurs exoglycosidases, dont la neuraminidase A (nanA), la bêta-galactosidase A (BgaA), la bêta-N-acétylglucosaminidase (StrH) et la neuraminidase B (nanB), capables de déglycosyler les glycoconjugués de mucus, diminuant ainsi sa viscosité et donc sa capacité de piégeage^{35,36}. Enfin, la pneumolysine (Ply), une toxine formant des pores, diminue le battement ciliaire des cellules épithéliales, permettant

ainsi au pneumocoque de se lier aux cellules épithéliales sans être éliminé avec le mucus (Figure 6A).

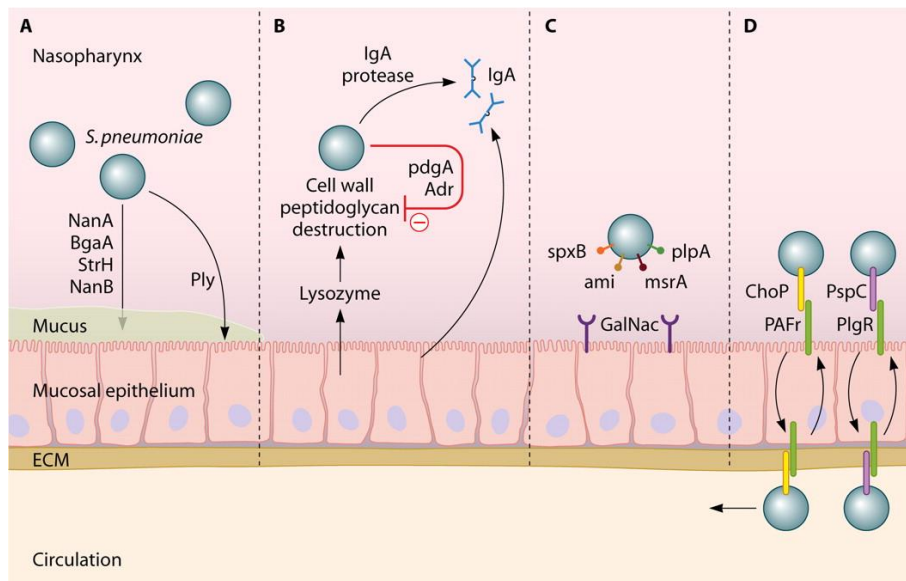


Figure6. Mécanismes d'échappement du pneumocoque aux barrières naturelles de l'Hôte (extrait de Mook-Kanamori et al.³²)

Médiateurs solubles. Le lysozyme est une muramidase qui clive le peptidoglycane, un polymère de sucres et d'acides aminés présents dans la paroi cellulaire de nombreux pathogènes, y compris *S. pneumoniae*³⁷. Le pneumocoque exprime à sa surface deux enzymes, la peptidoglycane N-acétylglucosamine-déacétylase A (PdgA) et une O-acétyltransférase (Adr), capables de déacétyler les molécules de peptidoglycane sur la surface du pneumocoque, rendant ainsi la bactérie résistante au lysozyme³⁷⁻³⁹ (Figure 6B).

Au lysozyme, s'ajoutent des médiateurs solubles des composants du système immunitaire inné de l'hôte, tels que l'IgA sécrétoire (sIgA), la lactoferrine⁴⁰ et des composants du système du complément^{41,42} qui ciblent également le pneumocoque.

Le sIgA interfère au niveau de la fixation du pneumocoque sur la muqueuse nasopharyngée^{43,44} et facilite l'opsonisation des bactéries, permettant la phagocytose par les cellules présentatrices d'antigène (CPA) et les neutrophiles⁴⁵. Le pneumocoque est capable de limiter l'action des sIgA par différents mécanismes : un mécanisme structural par la présence à la surface de la bactérie de la capsule qui empêche la liaison de sIgA⁴⁶ et par la sécrétion d'une métalloprotéase ciblant spécifiquement l'immunoglobuline humaine A1

(IgA), qui constitue plus de 90% des IgA dans les voies respiratoires humaines. Le clivage de l'IgA1 à la surface du pneumocoque libère le fragment Fc de l'IgA, le fragment Fab restant lui lié à la bactérie. L'absence de Fc empêche le recrutement et l'activation des cellules du système immunitaire de l'hôte et donc l'élimination du pneumocoque. En outre, le fragment Fab restant de sIgA se lie au polysaccharide, exposant ainsi les protéines liant la choline et diminuant la charge négative de la capsule, ce qui facilite également l'adhésion bactérienne à la cellule épithéliale (figure 6B)⁴⁷.

La lactoferrine est un chélateur naturel de cations divalents notamment du fer. Elle est présente dans plusieurs fluides corporels humains, y compris la salive et les sécrétions nasales⁴⁸. La lactoferrine agit en trappant le fer nécessaire au métabolisme bactérien. La lactoferrine non liée (apolactoferrine) a également des propriétés bactéricides directes, indépendantes de l'effet chélateur du fer, vis-à-vis de divers pathogènes, dont *S. pneumoniae*⁴⁰. Le mécanisme par lequel l'apolactoferrine détruit les bactéries n'est pas complètement clair, mais il semble perturber la cellule bactérienne, conduisant à la lyse cellulaire⁴⁹. La lactoferrine est également présente dans les neutrophiles et peut favoriser la phagocytose bactérienne et la destruction⁵⁰. Le pneumocoque prévient la destruction médiée par l'apolactoferrine par l'expression de la protéine A de surface (PspA), une protéine liant la choline exprimée sur la membrane des pneumocoques. PspA se lie à l'apolactoferrine humaine au niveau de son site actif, inhibant ainsi la destruction bactérienne médiée par l'apolactoferrine⁴⁰.

Un quatrième élément du système immunitaire inné exprimé au niveau des muqueuses est le système du complément. L'activation du complément entraîne le clivage de plusieurs fragments, conduisant à l'opsonisation et à la phagocytose des bactéries, au recrutement de leucocytes et à l'assemblage d'un complexe d'attaque membranaire (CAM) formant des pores dans la membrane du pathogène, induisant une lyse cellulaire⁵¹. Le complément joue un rôle clé dans la réponse immunitaire contre *S. pneumoniae*. En effet, plusieurs études ont montré chez les souris et chez des patients présentant des déficits en complément, une sensibilité accrue aux infections invasives à pneumocoque^{41,52,53}. Il existe trois voies d'activation du complément : la voie classique, la voie alterne et la voie des lectines.

Le pneumocoque a développé différents moyens pour diminuer l'opsonisation et la phagocytose médiées par le complément. Comme décrit précédemment, la plupart des souches virulentes de pneumocoque possède une capsule composée de polysaccharides,

servant de barrière non spécifique, réduisant significativement le dépôt de complément sur la surface bactérienne et limitant l'interaction ultérieure avec les phagocytes^{4,16}. Des études dans des modèles murins, confirment ce rôle de protection de la capsule, puisque des pneumocoques non encapsulés administrés par voie systémique étaient avirulents⁵⁴.

Deuxièmement, les protéines de surface du pneumocoque comme PspA, PspC ou la pneumolysine ciblent des composants spécifiques du complément, réduisant ainsi la clairance bactérienne médiée par celui-ci. PspA, constamment exprimée par diverses souches de pneumocoques, inhibe le C1q et le dépôt de C3b⁵⁵. PspC lie le facteur H humain, bloquant ainsi la formation de la C3 convertase alterne (C3bBb), conduisant à une production plus faible de C3b et limitant l'opsonophagocytose^{56,57}. Les pneumocoques peuvent également s'accrocher aux érythrocytes par un processus appelé adhérence immunitaire, dépendant de la liaison des composants du complément C3b, C4b, C1q et MBL à la fois au pneumocoque et au récepteur érythrocytaire CR1^{56,58}. Les complexes immuns contenant les pneumocoques, liés aux érythrocytes par le complément, sont ensuite transférés aux macrophages. Des études *in vitro* récentes ont montré que PspA et PspC agissaient en synergie pour limiter l'adhérence par le complément et le transfert aux phagocytes⁵⁶.

Enfin, la pneumolysine, libérée au cours de l'autolyse pneumococcique, lie facilement et bloque la portion Fc des IgG, qui active la voie classique du complément. Ce blocage augmente la virulence bactérienne et limite l'opsonophagocytose⁵⁹.

Cocolonisation. Le nasopharynx peut être colonisé par plus de 700 espèces microbiennes différentes, incluant la flore commensale, les microbes colonisateurs transitoires et les espèces pathogènes^{60,61}. La survie microbienne dépend donc de stratégies coopératives et compétitives, dont plusieurs ont été récemment décrites dans le contexte de l'infection pneumococcique^{62,63}.

Les liens entre l'infection virale et l'infection bactérienne subséquente ont fait l'objet d'études approfondies^{30,64,65}. Une exposition antérieure au virus de la grippe a été associée à une infection invasive à pneumocoque secondaire^{66,67}. L'importance de la pré-exposition au virus de la grippe a été soulignée récemment lors de la pandémie de grippe H₁N₁, dans laquelle un tiers des cas mortels de grippe H₁N₁ présentaient des signes de pneumonie

bactérienne concomitante⁶⁸. Les mécanismes impliqués dans la susceptibilité accrue aux IIP après une infection par le virus de la grippe restent méconnus, mais pourraient être liés à une modification de l'expression des molécules d'adhésion. Il a été démontré que l'exposition antérieure à une infection virale augmentait l'expression des molécules d'adhésion des cellules épithéliales. En effet, lors d'une infection par le virus influenza, la neuraminidase clive les résidus terminaux d'acide sialique, facilitant ainsi la liaison du pneumocoque aux cellules épithéliales de la muqueuse après l'exposition virale.

Les interactions entre les différentes bactéries colonisantes du nasopharynx peuvent également inhiber la croissance bactérienne, avoir un effet synergique et même favoriser des échanges de matériel génétique. Des données épidémiologiques ont montré un effet négatif de la colonisation concomitante de *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus pneumoniae*^{69,70}. En effet, des études *in vitro* ont démontré que la production d'H₂O₂ induite par le pneumocoque entraînait la mort de *S. aureus*. Certaines bactéries peuvent utiliser la réponse immunitaire de l'hôte à leur profit comme le montre la destruction rapide du pneumocoque par les neutrophiles lors de la cocolonisation avec *Haemophilus influenzae*. Des composants cellulaires de *H. influenzae* stimuleraient aussi la phagocytose du pneumocoque médiée par le complément⁷¹. Enfin, plusieurs sérotypes de *S. pneumoniae* peuvent coloniser le nasopharynx au même instant, entraînant une compétition intra-espèce aboutissant à la croissance d'un seul sérotype⁷². Un des mécanismes proposés pour cette compétition intra-espèce serait l'utilisation de bactériocines, appelées pneumocines chez les pneumocoques. Il s'agit de petits peptides capables de tuer des bactéries de la même espèce ou d'espèces apparentées⁷³. De plus, le pneumocoque est naturellement capable d'intégrer de l'ADN de pathogènes tués et étroitement apparentés dans son propre génome, obtenant ainsi un avantage concurrentiel⁷². Des pneumocoques déficients en bactériocines ont été rapidement remplacés, dans des cultures *in vitro*, par des souches apparentées ou des pneumocoques d'autres sérotypes⁶³.

b) Adhésion aux cellules épithéliales

Déjà décrite dans les paragraphes précédents, la capsule pneumococcique est avantageuse pour contourner les barrières de l'hôte et atteindre la muqueuse respiratoire mais couvre de

ce fait les sites de liaison de la paroi bactérienne pour se fixer aux cellules épithéliales. Le pneumocoque peut ajuster ses propriétés de liaison à son environnement par un processus appelé variation de phase⁷⁴⁻⁷⁶, pendant lequel la quantité de polysaccharide dans la capsule varie d'une phase opaque (capsule épaisse) à une phase transparente (capsule mince), recouvrant ou exposant des sites de liaison sur la surface du pneumocoque⁷⁶. Pendant la phase de colonisation, une capsule épaisse empêche le piégeage de la bactérie par le mucus ainsi que de la fixation des immunoglobulines et du complément, empêchant ainsi l'opsonophagocytose^{77,78}. Une fois l'épithélium nasopharyngé atteint, la phase transparente devient proéminente, dévoilant plusieurs molécules d'adhésion afin de se fixer à l'épithélium de l'hôte^{75,76}. Le pneumocoque se lie ainsi aux glycoconjugués exprimés sur les cellules épithéliales de la muqueuse respiratoire, N-acétyl-D-galactosamine (GalNac). Les molécules de liaison pneumococciques interagissant avec les glycoconjugués de l'hôte restent à ce jour encore très peu connues. Cependant, plusieurs gènes bactériens impliqués dans la liaison avec GalNac ont été identifiés, comme *spxB*, *ami*, *msrA* et *plpA*^{79,80} (Figure 6C). Leurs produits géniques sont impliqués soit directement dans la liaison aux glycoconjugués soit indirectement en induisant une augmentation de la régulation de leurs molécules de liaison sur la muqueuse épithéliale⁸⁰.

c) *Dissémination*

Une fois fixé sur les cellules épithéliales, *S. pneumoniae* est capable d'effectuer une migration dans la circulation sanguine par transcytose à travers les cellules épithéliales par deux mécanismes. La phosphorylcholine (ChoP), présente à la surface du pneumocoque, est capable de se fixer sur le récepteur du facteur d'activation plaquettaire (PAF) à la surface des cellules épithéliales et endothéliales activées⁸¹. En liant le récepteur PAF, le pneumocoque peut entrer dans la voie de recyclage du récepteur PAF, qui transporte la bactérie à la membrane basale de la cellule épithéliale hôte, entraînant la dissémination de la bactérie⁸¹ (Figure 6D). Un second mécanisme implique la fixation de la protéine pneumococcique liant la choline, PspC (aussi appelée CbpA ou SpsA), au niveau de la partie extracellulaire du récepteur poly-Ig (pIgR). Une fois fixé, le pneumocoque utilise la voie de recyclage du pIgR, analogue à la voie du récepteur PAF, pour être transporté entre les membranes apicales et basales de la cellule épithéliale^{43,82} par un mécanisme de transcytose.

Une fois dans la circulation sanguine, le pneumocoque peut atteindre les sites d'infections plus éloignés et entraîner des infections invasives. Il traverse les endothéliums en utilisant la voie du PAF et du récepteur plgR en sens inverse pour gagner les tissus. Enfin, des brèches ostéoméningées favorisent le passage du pneumocoque et le risque de méningite.

3. PHYSIOPATHOLOGIE DES INFECTIONS

Le pneumocoque est une bactérie à multiplication extracellulaire dont la lyse bactérienne entraîne la libération de composants, dont la Pneumolysine. Cette libération va provoquer une réaction inflammatoire très forte, qui participe aux lésions tissulaires et dont dépend la gravité de la maladie⁸³.

Il existe deux sortes d'infections à pneumocoque : les infections invasives et non invasives (Figure 7). On parle d'infections non invasives lorsque la bactérie est retrouvée au niveau des muqueuses, par extension à partir de leur réservoir (rhinopharynx). Parmi les infections non invasives on retrouve les otites moyennes aiguës, les sinusites ou encore les pneumonies. On parle d'infections invasives lorsque la bactérie est retrouvée dans des sites éloignés du réservoir et dont la colonisation survient après la phase d'invasion (bactériémie) qui a généralement lieu au niveau de la muqueuse pharyngée ou alvéolaire⁸⁴. On peut noter dans cette catégorie les bactériémies, qui permettent l'invasion du pneumocoque ou les méningites. On retrouve également les pneumonies et des infections plus rares comme les ostéomyélites, les endocardites ou encore les arthrites.

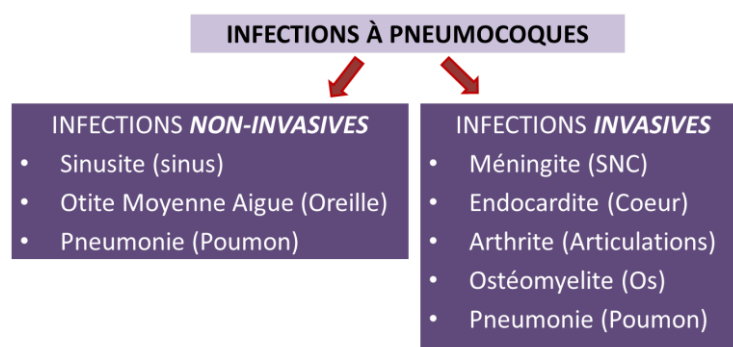


Figure7. Classification des infections à pneumocoque : les infections invasives et non invasives

4. SUJETS A RISQUES

Les infections invasives à Pneumocoques (IIP) peuvent survenir lorsque deux situations coïncident: d'une part, la colonisation de l'hôte par un sérotype du pneumocoque à laquelle il n'a pas encore acquis d'immunité et, d'autre part, une altération des barrières naturelles ou du système immunitaire de l'hôte. Les IIP sont observées aux âges extrêmes (moins de 2 ans ou plus de 65 ans); chez les patients présentant des pathologies sous-jacentes telles que la splénectomie, asplénie, drépanocytose thalassémie majeure, drépanocytose, myélome multiple, hypo-gammaglobulinémie, syndrome de Wiskott-Aldrich, alcoolisme, hépatopathie chronique, insuffisance rénale chronique, cancer, malnutrition, diabète, patients atteints de brèche ostéoméningée, ainsi que les porteurs d'implants cochléaires. L'utilisation de médicaments immunosuppresseurs / immunomodulateurs, est également un facteur de risque de développer une infection invasive à pneumocoque.

5. TRAITEMENTS

Le traitement des infections à pneumocoques repose principalement sur l'administration d'antibiotiques. Les principaux utilisés sont les bêta-lactamines, les macrolides et les fluoroquinolones. En cas de résistances aux antibiotiques de première ligne, la vancomycine et les tétracyclines peuvent être utilisés.

En traitement préventif, deux vaccins anti-pneumococciques sont disponibles actuellement ; un vaccin polysaccharidique et un vaccin conjugué. Ces vaccins seront décrits plus en détails dans le chapitre 2 : Vaccination.

6. RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

Le pneumocoque possède une résistance naturelle aux aminosides (résistance de bas niveau), à l'acide nalidixique, à l'acide fusidique (résistance de bas niveaux), aux quinolones de première génération et possède une sensibilité naturelle à de nombreux antibiotiques (dont les bêta-lactamines, les tétracyclines et les macrolides). La pénicilline G a longtemps été l'antibiotique de choix et la réalisation d'un antibiogramme considérée comme superflue.

Au fil des années et de l'utilisation de plus en plus importante de traitements antibiotique, des souches de pneumocoques ont acquis une résistance vis-à-vis de ces antibiotiques. Observée depuis 1984, la proportion des pneumocoques de sensibilité diminuée aux pénicillines (PSDP) et aux macrolides a montré une diminution de façon significative à partir de 2003. Cette diminution s'est poursuivie jusqu'en 2012, où elle semble se stabiliser depuis. En 2015, la proportion de PSDP au sein de l'échantillon étudié était de 25%²⁷ (Figure 8).

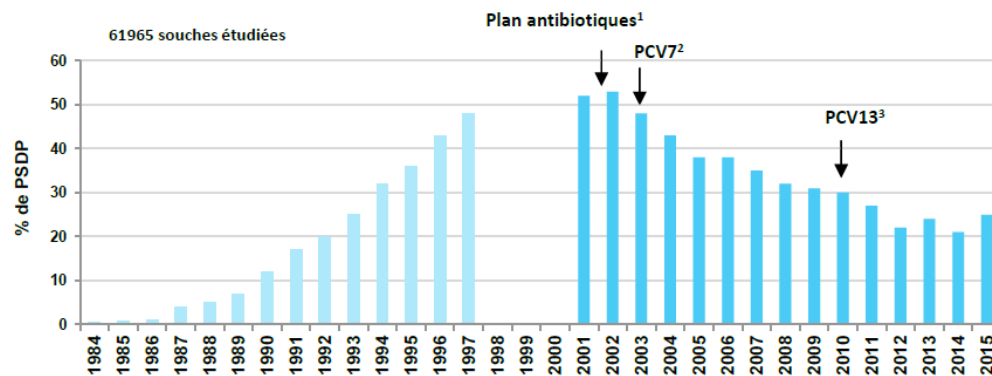


Figure 8. Evolution des souches de *S. pneumoniae* de sensibilité diminuée à la pénicilline (PSDP) en France d'après les données du CNRP (extrait du rapport d'activité du CNRP pour 2016²⁷). 1 : plan national pour préserver l'efficacité des antibiotiques, novembre 2001 ; 2 : introduction du PCV7 ; 3 : remplacement du PCV7 par le PCV13

La consommation d'antibiotiques joue en effet un rôle important dans le développement et l'acquisition de résistances par le pneumocoque. Selon le rapport de la surveillance de la consommation des antibiotiques⁸⁵, réalisée par le réseau ATB-Raisins en 2015 pour Santé Publique France, la consommation d'antibiotiques a connu une période de stabilité (2012-2013) suivi d'une baisse (- 2,1 % entre 2013 et 2014). Malheureusement, une progression de la consommation de +2,7 % sur la période a été observée entre 2014 et 2015 (augmentation non statistiquement significative). Si l'on compare nos données nationales de 2015, par rapport à d'autres pays européens pour lesquels des données de consommations d'antibiotiques sont disponibles, la France est l'un des pays où la consommation d'antibiotiques à l'hôpital, rapportée à la population nationale, était supérieure de 6,3 % par rapport à la moyenne européenne. Cette consommation fait de la France le 9^{ème} pays le plus consommateur parmi les 23 pays ayant fourni des données.

Selon le rapport d'activité 2016 du Centre National de Référence du Pneumocoque (CNRP)²⁷, en 2015, le sérotype 19A représentait 20,6% des souches de sensibilité diminuée à la pénicilline dans la population générale, bien que ce sérotype ne soit retrouvé que dans 6,2% des souches responsables d'infections invasives (Figure 9). Venaient ensuite les souches 19F (12,3%), 15A (18,4%) et 24F (12,3%). Parmi les souches les plus résistantes aux bêta-lactamines, on retrouve les sérotypes 14, 19F et 19A, inclus dans le PCV13, le sérotype 11A inclus dans le PPV23 et deux sérotypes non vaccinaux le 15A et le 35B. De façon intéressante, 5 sérotypes sur les six les plus fréquents dans les infections invasives (> 5% des infections invasives) sont sensibles à la pénicilline. Il s'agit des sérotypes 3, 8, 9N, 12F et 22F. Ces sérotypes sont rarement retrouvés dans le rhinopharynx des porteurs sains car leur durée de portage est courte ; ils sont donc peu exposés à la pression des antibiotiques²⁷.

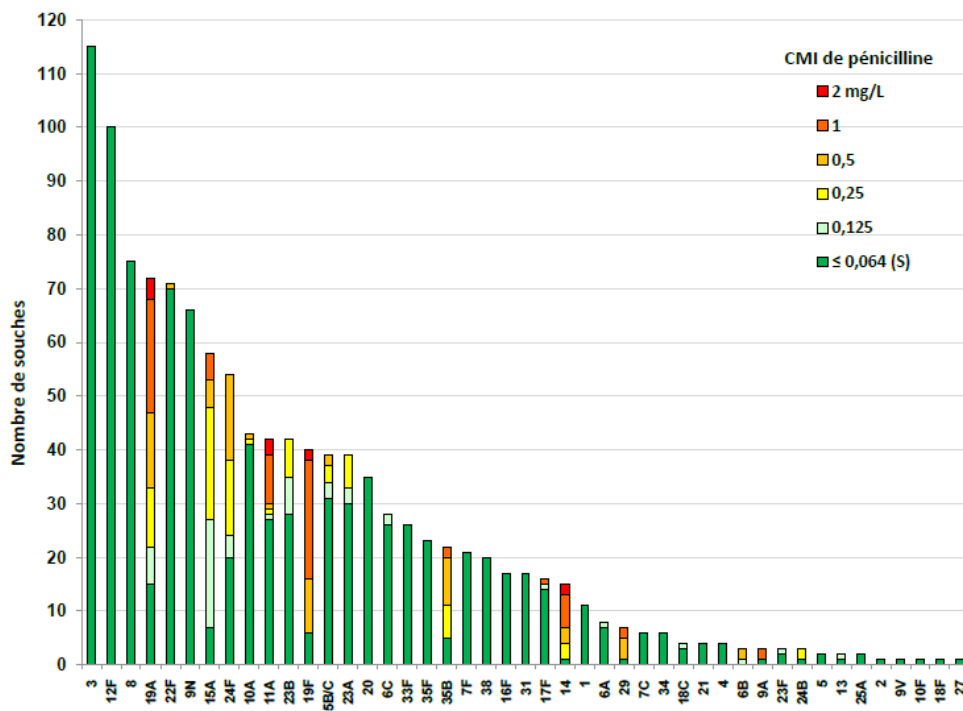


Figure9. Sensibilité à la pénicilline par sérotype des souches de pneumocoques isolées d'infections invasives en 2015 (extrait du rapport d'activité du CNRP pour 2016²⁷).

I. DEFINITION ET DESCRIPTION

Un vaccin est une préparation médicale donnée en vue de conférer une résistance accrue à une infection. Les vaccins utilisent une grande variété de substances, allant du microorganisme tué ou inactivé à des antigènes recombinants, permettant à l'organisme de développer une réponse immune en entraînant la production rapide et efficace d'anticorps dirigés contre le pathogène responsable de l'infection.

Un vaccin efficace doit répondre à différents critères.

a) Innocuité

Les vaccins sont administrés de façon massive et quotidienne, un très grand nombre de personne est susceptible de recevoir au moins une injection au cours de sa vie. Le vaccin ne doit donc pas causer la maladie pour laquelle il protège ni entraîner une morbi-mortalité.

b) Protection

La définition même d'un vaccin est la capacité d'induire une protection de l'individu contre un ou plusieurs agents infectieux. Il se doit donc d'être capable d'induire une immunité protectrice dans la population générale contre ces pathogènes et ce quel que soit l'âge, le statut immunologique, les comorbidités).

c) Durabilité

De plus, il est parfois impossible de pratiquer des rappels réguliers (pour des populations rurales ou nomades par exemple), un vaccin se doit donc de générer une réponse qui persiste au maximum dans le temps et protège de nombreuses années.

d) Immunité de groupe

Une vaccination efficace doit conférer ce qu'on appelle une immunité de groupe, définie comme le phénomène par lequel la propagation d'une maladie contagieuse peut être enrayée dans une population si un certain pourcentage d'individus est immunisé. En effet, plus le taux de personnes immunisées augmente et plus le réservoir naturel d'individus susceptibles d'être infectés diminue rendant le risque de transmission très faible. Par conséquent, même les personnes non vaccinées à cause d'une contre-indication individuelle à la vaccination (femmes enceintes, nouveau-nés, etc.) seront protégées de l'infection si la majorité de la population est vaccinée. Au-dessus d'un certain seuil, il devient impossible pour la maladie de se maintenir dans la population et elle finit par disparaître. Ce seuil dépend, entre autres, de la contagiosité de la maladie. Ainsi au cours du XXe siècle, la vaccination de masse contre la variole a permis d'atteindre son seuil d'immunité de groupe (situé aux environs de 85 %) et donc d'éliminer totalement cette maladie.

2. DIFFERENTS TYPES DE VACCINS

Il existe quatre grands types de vaccins (Figure 10):

- Vaccins vivants
- Vaccins entiers tués ou inactivés
- Vaccins sous-unitaires
- Vaccins anatoxiques

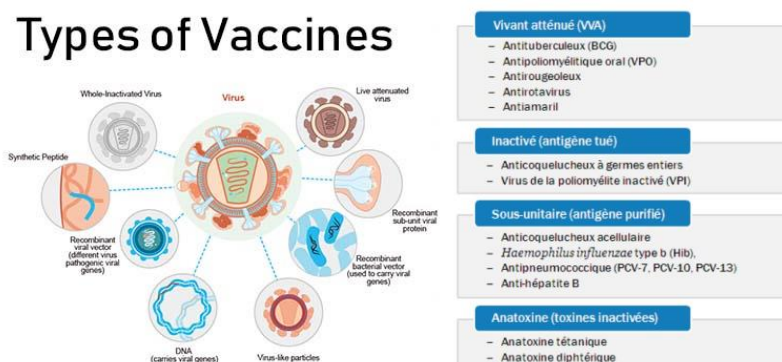


Figure10. Les différents types de vaccins

a) Vaccins vivants atténués

Sous certaines conditions, les microorganismes peuvent être atténués et perdre ainsi leur caractère pathogène, tout en étant capable de développer une réponse immunitaire chez un hôte exposé. Un vaccin vivant atténué utilise cette propriété et permet de stimuler une réponse immunitaire en induisant une infection cliniquement bénigne par immunisation avec un agent infectieux atténué ayant perdu son pouvoir pathogène. La réponse immunitaire induite protégera l'individu vacciné contre une infection par un germe virulent de même nature.

Il existe différentes façons d'atténuer le pouvoir pathogène d'un microorganisme.

Certains sont naturellement atténués par leur incapacité à induire une infection chez un hôte donné, bien qu'ils puissent induire une immunisation chez ces individus. Le premier vaccin utilisé par Jenner en 1796 est un bon exemple de vaccin vivant atténué puisqu'il contenait le virus de la Vaccine (Cowpox ou variole de la vache), virus transmissible à l'homme mais asymptomatique alors qu'il entraîne chez les bovidés et équidés une maladie infectieuse de type Variole. De nos jours, l'atténuation se fait principalement par sélection de mutants avirulents ou peu virulents, à force de passage en série chez un nouvel hôte ou sur cultures cellulaires.

Les vaccins vivants possèdent l'avantage d'induire une réponse immunitaire optimale, induite par de faibles doses d'antigène avec une protection très longue. En revanche, du fait de l'aspect vivant du pathogène et sa capacité à proliférer, ces vaccins peuvent induire une maladie clinique et sont contre-indiqués chez l'immunodéprimé.

Quelques exemples de vaccins: BGC, rougeole, oreillons, fièvre jaune.

b) Vaccins entiers tués ou inactivés

Il est également possible d'inactiver un pathogène par traitement chimique (formol, propiolactone) ou physique (rayonnements ou chaleur) afin de le rendre plus sûr pour la vaccination. Ces traitements tuent les microorganismes qui ne sont plus capables de se répliquer, mais leurs protéines constitutives ont conservé leur pouvoir immunogène intact

et elles provoquent ainsi une réponse immunitaire. Afin d'augmenter l'efficacité de ces vaccins, l'association avec un adjuvant peut être nécessaire.

Quelques exemples de vaccins : coqueluche (vaccin à germes entiers), rage, hépatite A

c) Vaccins sous-unitaires

Ces vaccins sont composés d'antigènes purifiés de microorganisme produits par culture ou recombinaisons génétiques. De même que les vaccins tués, les vaccins sous-unitaires gardent les propriétés antigéniques du pathogène tout en évitant sa multiplication dans l'organisme. Ces vaccins sont moins immunogènes et nécessitent également l'association à un adjuvant de l'immunité ou le couplage à une protéine porteuse.

Quelques exemples de vaccins : pneumocoque, grippe, hépatite B, haemophilus type b (Hib), méningocoque.

d) Vaccins anatoxiques

Certaines infections sont dues à des toxines sécrétées par les agents infectieux plutôt que par l'agent infectieux lui-même. Il est nécessaire dans ces cas-là, d'induire une réponse immunitaire dirigée non pas contre le pathogène mais directement contre la toxine. Les vaccins toxoïdes ou anatoxiques sont composés de ces toxines inactivées chimiquement, par la chaleur ou par recombinaison génétique. Une toxine ainsi rendue inoffensive est alors fréquemment appelée un « toxoïde » ou plus généralement une « anatoxine ».

Quelques exemples de vaccins : tétanos, diphtérie.

II. IMMUNOLOGIE DE LA VACCINATION

1. PRINCIPAUX EFFECTEURS DE LA REPONSE VACCINALE

Les vaccins protègent en induisant des effecteurs capables de contrôler rapidement la réplication du/des pathogène(s) ou en inactivant leur composant toxique. Ces effecteurs

immuns sont essentiellement les fruits de l'immunité à médiation humorale: lymphocytes B, plasmocytes, anticorps et de l'immunité à médiation cellulaire : lymphocytes T.

a) Les anticorps

Les anticorps confèrent une protection par trois mécanismes⁸⁶ (Figure 11) :

- Neutralisation : en se fixant aux pathogènes ou à leur toxine, les anticorps empêchent leur pénétration à l'intérieur des cellules cibles
- Oponisation : lorsqu'ils sont fixés aux pathogènes, les anticorps peuvent faciliter la phagocytose de ces derniers via la fixation de leur fragment Fc sur les récepteurs aux Fc des macrophages ou polynucléaires neutrophiles
- Activation du complément : la fixation des anticorps sur les pathogènes peut entraîner l'activation de la voie classique du complément résultant, entre autre, à la formation de complexes d'attaques membranaire à la surface du pathogène et entraînant sa destruction.

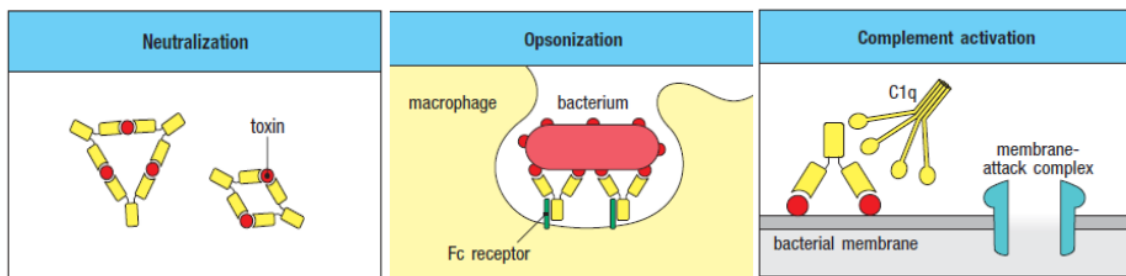


Figure11. Mécanismes d'action des anticorps (extrait de Janeway's Immunobiology, 9th edition⁸⁷)

Les anticorps sont produits par les plasmocytes, cellules dérivées des LB matures spécifiques de l'antigène. Les lymphocytes B matures peuvent être classés selon leurs marqueurs phénotypiques et leur localisation anatomique : les L_B folliculaires (FO) chez la souris ou L_B naïfs chez l'Homme, L_B de la zone marginale (MZ) et les lymphocytes B1⁸⁸. Les FO circulent dans les follicules lymphoïdes, les cellules MZ sont localisées dans le sinus marginal de la rate et les cellules B1 sont retrouvées en majorité dans les cavités péritonéales et pleurales⁸⁹. Les B1 peuvent être divisées en B1a et B1b. Ces deux sous-types cellulaires se distinguent par leur développement, leur phénotype et leur fonction mais ont des localisations anatomiques similaires. Les FO sont impliqués dans la réponse immunitaire thymo-dépendante (TD) alors

que les antigènes thymo-indépendant (TI) stimuleront une réponse médiée par les lymphocytes de la zone marginale et les lymphocytes B1⁸⁸.

b) Les lymphocytes T

Les Lymphocytes T sont de deux types : les Lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques (L_T CD8⁺) et les lymphocytes T CD4⁺ helpers ou auxiliaires (L_T CD4⁺). Ces lymphocytes ne préviennent pas l'infection mais permettent de réduire, contrôler et d'éliminer des pathogènes intracellulaires ou extracellulaires par la sécrétion de cytokines ou de chimiokines⁹⁰.

- Les L_T CD8⁺ entraînent la destruction des cellules infectées par la sécrétion de perforine ou de granzyme, par la voie Fas - Fas ligand ou par la sécrétion de cytokines antimicrobiennes et pro-inflammatoires.

- Les L_T CD4⁺ permettent d'aider les cellules impliquées dans la réponse immune. Il existe 7 types de L_T CD4⁺, dont l'activation varie en fonction du type de pathogène (Figure 12): T-helper 1 (Th1) : sont impliqués principalement dans la protection contre les pathogènes intracellulaires (virus, *Mycobacterium tuberculosis*); Th2 : répondent aux pathogènes extracellulaires notamment les parasites (helminthes) certaines bactéries ; Th9 : répondent aux pathogènes extracellulaires ; Th17 : sont impliqués dans la défense des muqueuses (*S. pneumoniae*, *M. tuberculosis*, *Bordetella pertussis*)^{91,92}, répondent aux germes extracellulaires notamment les levures ; Th22 : sont impliqués dans l'inflammation tissulaire ; T_{FH} (folliculaire helpers) : interviennent principalement dans la coopération lymphocytes B- Lymphocytes T^{93,94} et donc dans la production d'anticorps ; Treg (Régulateurs) : régulent la réponse immunitaire en inhibant les lymphocytes T auxiliaires.

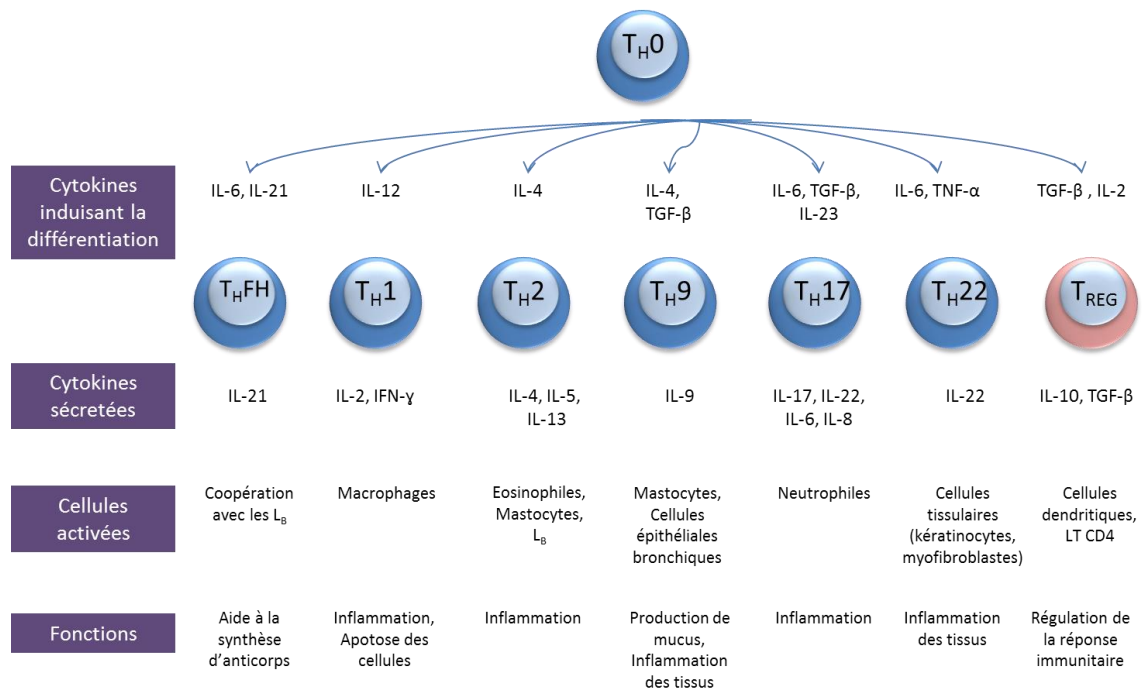


Figure12. Différents sous types de lymphocytes T auxiliaires

2. IMMUNITE INNEE : PREMIERE ETAPE DE LA REPOSE VACCINALE

Afin d'être efficace, un vaccin se doit d'induire une réaction inflammatoire, qui attirera au site de l'injection les cellules de l'immunité innée, qui activeront par la suite, de manière adaptée, les cellules de l'immunité adaptative et induiront une mémoire immunitaire à long terme. L'immunité innée est activée lors de la reconnaissance d'un signal de danger émis suite à l'interaction spécifique entre des récepteurs du soi appelés PRR (Pattern Recognition Receptors) et des molécules du non-soi appelées PAMP (Pathogen Associated Molecular Patterns) présentes au niveau des microorganismes, pathogènes ou non⁸⁷.

Les cellules dendritiques (DC), les monocytes et les macrophages expriment à leur surface des PRR, dont les principaux sont les TLR (Toll-like receptors). La fixation d'un motif PAMP sur un récepteur PRR entraîne la production de cytokines pro-inflammatoires, de chimiokines ainsi que l'expression de molécules de co-stimulation. Ces molécules de la famille B7 (CD80 et CD86) permettent l'activation des lymphocytes T_{CD4+}. Les cytokines et chimiokines quant à elles, attirent et provoquent l'extravasation des monocytes, granulocytes, cellules NK (Natural Killer) ainsi que la génération d'un microenvironnement inflammatoire dans lequel les monocytes se différencient en macrophages et les DC

immatures s'activent deviennent matures et migrent dans les ganglions lymphatiques par la voie lymphatique pour stimuler la réponse immunitaire.

La plupart des vaccins non vivants nécessite l'aide d'adjuvants afin d'induire des signaux de dangers suffisamment forts pour activer le système de l'immunité innée. Un adjuvant est défini comme « tout produit qui augmente l'immunogénicité des substances avec lesquelles elles sont mélangées ». Les adjuvants diffèrent des protéines porteuses par le fait que ceux-ci ne forment pas de liaison stable avec l'antigène.

Les adjuvants améliorent généralement l'immunogénicité de deux manières différentes. Premièrement, les adjuvants transforment les antigènes protéiques solubles en particules, qui peuvent être facilement ingérées par les cellules présentatrices d'antigène (CPA) phagocytaire telles que les macrophages et les DC. Par exemple, l'antigène peut être adsorbé sur des particules d'adjuvant (tel que l'alun), émulsifié dans des gouttelettes d'huiles minérales, ou être incorporé dans des particules colloïdales d'ISCOM (Immune Stimulatory complexes). Par ailleurs, ces formulations permettent une libération prolongée de l'antigène augmentant aussi considérablement sa demi-vie. Deuxièmement, les adjuvants contiennent des PAMPs qui provoquent une forte réponse immunitaire innée. Lorsqu'ils se fixent à la surface des cellules phagocytaires, les PAMPs contenus dans l'adjuvant stimulent la production de cytokines inflammatoires et induisent l'activation des CPA. Celles-ci, lorsqu'elles sont activées, augmentent l'expression à leur surface de molécules de co-stimulation, importantes pour l'activation des cellules T. Ces CPA augmentent également l'expression des molécules du CMH de classe I et de classe II. Enfin, l'activation entraîne une modification de l'expression des récepteurs de homing à leur surface ce qui entraîne une migration des DC dans les ganglions lymphatiques les plus proches du site d'injection, par exemple inguinal ou axillaire pour des vaccinations respectivement dans le quadriceps ou le deltoïde.

Dans les ganglions lymphatiques, les DC activées peuvent rencontrer les lymphocytes T naïfs spécifiques du peptide qu'elles présentent et permettent leur activation. La Figure 13 illustre les trois types de signaux induits par la liaison d'une CPA avec un lymphocyte T CD4+. La liaison du complexe CMH-peptide antigénique avec le récepteur T (TCR) et avec le co-récepteur CD4 transmet un signal à la cellule annonçant la rencontre avec le peptide. Afin que l'activation soit effective, un deuxième signal, appelé signal de co-stimulation, doit être

émis via la même CPA. Ainsi, le CD28 présent à la surface du L_T se fixe sur les molécules B7 (B7.1 et B7.2) de la CPA. Cette interaction induit le signal 2, dont la conséquence est l'augmentation de la prolifération et la survie de la cellule T. Enfin, un troisième signal médié principalement par des cytokines favorisera la prolifération et la différenciation des L_T CD4+ en différents de cellules T auxiliaires. Ces lymphocytes ainsi activés et différenciés pourront par la suite activer un L_B spécifique du même antigène qu'il vient lui-même de rencontrer dans la zone B du même ganglion.

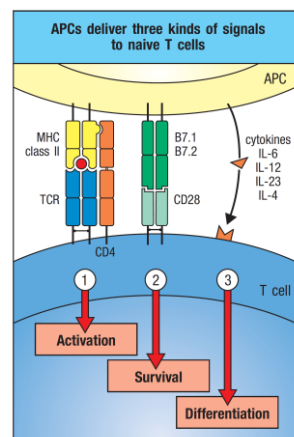


Figure13. Activation d'un lymphocyte T CD4 par une cellule présentatrice d'antigène (CPA) via l'induction de trois signaux distincts (extrait de Janeway's Immunobiology, 9th edition⁸⁷)

3. REPOSE THYMO-DEPENDANTE (TD)

La plupart des antigènes (Ag) protéiques induisent une réponse que l'on appelle thymo-dépendante (TD), c'est-à-dire que la réponse immune vaccinale induite par ces antigènes nécessite la coopération entre les lymphocytes B (L_B) et les lymphocytes T (L_T)⁹⁵ (Figure 14B).

a) Réaction extra folliculaire

Les lymphocytes B (L_B) naïfs générés dans la moelle osseuse résident dans les organes lymphoïdes périphériques jusqu'à ce qu'ils rencontrent un antigène spécifique de leur récepteur de surface (BCR)⁹⁶. Au sein du follicule, les lymphocytes B survivent grâce à la sécrétion par les cellules stromales, les cellules dendritiques (DC) et les cellules dendritiques folliculaires (FDC) de BAFF (B-cell activating factor belonging to the TNF family), une cytokine appartenant à la famille des TNF, dont les L_B possèdent un récepteur à leur surface, BAFF-R.

La fixation de l'antigène au niveau du BCR du L_B initie l'activation de la cellule et entraîne l'augmentation de l'expression du récepteur $CCR7^{97}$. Ce récepteur à chimiokine reconnaît $CCL19$ et $CCL21$, sécrétés par les cellules stromales de la zone T du ganglion, ce qui favorise la migration des L_B activés à l'interface entre les zones B et zones T des organes lymphoïdes. A cette jonction, ils seront exposés à des DC récemment activées ainsi que des LT_{FH} . Au cours de la réponse immune, les LT_{FH} sont activés dans la zone T via les DC. Lorsque des L_T naïfs sont activés, certains prolifèrent, se différencient en cellules effectrices et sortent des tissus lymphoïdes. D'autres vont exprimer le récepteur à chimiokine $CXCR5$ à leur surface et seront attirés par la sécrétion de $CXCL13$ par les FDC en bordure de la zone B. Ainsi, Les LT_{FH} pourront rencontrer les L_B activés qui ont migré au même endroit et augmenter la probabilité qu'ils puissent reconnaître le même antigène.

Afin de recevoir de l'aide d'une cellule T, le L_B doit présenter à sa surface l'Ag sous une forme que le L_T peut reconnaître. Il s'agit de la reconnaissance combinée. La liaison entre les deux lymphocytes spécifiques du même peptide antigénique entraîne l'augmentation à la surface des LT_{FH} , de l'expression de $CD40$ ligand ($CD40L$) qui se fixe alors sur le $CD40$ exprimé à la surface des L_B . Ce couplage du $CD40$ avec son ligand se traduit par un signal de survie au niveau du L_B et l'induction de molécules de co-stimulation, notamment celles de la famille B7. De plus, le LT_{FH} activé exprime le $CD30$ ligand ($CD30L$) dont le récepteur $CD30$ se trouve à la surface des L_B . La liaison $CD30L$ - $CD30$ entraîne l'activation du L_B . Les LT_{FH} sécrètent plusieurs cytokines qui régulent la prolifération et la production d'anticorps (ac) par les L_B . La plus importante est l' $IL21$, produite précocement au cours de la réponse immune, qui permet la prolifération et la différenciation des L_B en activant le facteur de transcription $STAT3$. L' $IL21$ a également un effet autocrine sur les LT_{FH} .

Après leur rencontre, les L_B et L_T sortent de la jonction entre les zones T et B pour continuer la prolifération et la différenciation et créent un foyer d'expansion clonale qui apparaît dans un délai de 5 jours à compter de l'infection ou de l'immunisation⁹⁶. Dans la rate, les cellules migrent au niveau de la zone T et de la pulpe rouge. Dans les ganglions lymphatiques, le foyer primaire est localisé au niveau des cordons médullaires. Au sein de ces foyers d'expansion clonale, les L_B en prolifération se différencient en plasmablastes, cellules B capable de sécréter des anticorps tout en gardant leur capacité d'interaction avec les LT_{FH} . Au bout de quelques jours, les plasmablastes cessent leur prolifération, meurent ou se

différencient en plasmocytes⁹⁶. Certains plasmocytes restent dans les organes lymphoïdes où ils survivent peu, tandis que la majorité migre dans la circulation sanguine où la production d'anticorps continue.

La réaction extra folliculaire est une réaction permettant la production rapide d'IgM⁹⁸. Ces immunoglobulines circulent dans la circulation sanguine quelques jours seulement après l'infection ou l'immunisation. Au cours de la réaction extra folliculaire, les lymphocytes B ne subissent pas d'hypermutation somatique ; les anticorps produits sont de faible affinité. Enfin, les mécanismes intervenant dans cette réaction extra folliculaire n'entraînent pas de production de L_B mémoires⁹⁸.

b) Réaction via les centres germinatifs

Si 95% des lymphocytes B activés se transforment en plasmablastes au niveau extra-folliculaire, une petite partie des LB activés migre dans un follicule primaire pour former un centre germinatif (CG) avant de se différencier en plasmocytes et L_B mémoires^{96,99}. Les follicules primaires sont présents dans les ganglions lymphatiques en absence d'infection et contiennent des lymphocytes B au repos ainsi que des FDC. Ces cellules dendritiques folliculaires attirent les L_B naïves, activées et les LT_{FH} en sécrétant la chimiokine CXCL13 dont le récepteur CXCR5 est exprimé à la surface de ces cellules. La sécrétion d'IL21 par les FDC et les LT_{FH} induit des signaux de survie et d'activation chez le L_B, qui va subir une prolifération clonale massive^{100,101}. Ainsi, un CG sera constitué que de clones correspondant à une seule cellule B spécifique d'un Ag. Cette prolifération intense est associée à des remaniements majeurs au niveau de l'immunoglobuline :

- l'hypermutation somatique porte sur la région variable V des Ig. Elle diversifie le répertoire des Ig par l'introduction de mutations ponctuelles dans les régions V des deux chaînes lourdes et légères, ce qui modifie l'affinité de l'anticorps pour l'Ag
- la commutation de classe ne concerne que la région constante C. Elle remplace la région C_μ originale par une autre région ce qui augmente la diversité fonctionnelle du répertoire d'immunoglobulines : les classes d'Ig sont : IgG, IgA, IgE, IgM et IgD. Seules les 4 premières sont sécrétées.

Après avoir subi l'hypermutation somatique et la commutation de classe, certains L_B se différencient en plasmocytes ou en L_B mémoires^{96,102,103}.

Plasmocytes. Sous l'action de BLIMP-1, (B-lymphocytes-induced Maturation Protein 1), un répresseur de transcription des gènes impliqués dans la prolifération, commutation de classe et la maturation d'affinité, les L_B cessent de proliférer, se différencient en plasmocytes et augmentent la synthèse et la sécrétion d'immunoglobulines. Les plasmocytes nouvellement formés diminuent l'expression de CXCR5 au profit de CXCR4, afin de pouvoir sortir du centre germinatif et gagner les tissus périphériques.

Certains plasmocytes à longue durée de vie migrent dans la moelle osseuse et continuent la sécrétion d'Ac.

Lymphocytes B mémoires. Bien que les cellules B mémoires expriment à leur surface des Ig, elles n'ont pas la capacité de sécréter des anticorps. Leur fonction principale est d'induire une réponse immunitaire plus rapide lors d'une seconde immunisation que lors de la première. Les LB persistent en l'absence d'antigènes mais peuvent être réactivés lors d'une réexposition à un pathogène. Leur réactivation est rapide et entraîne la production d'Ac de meilleure affinité et en quantité plus importante que lors de la réponse immunitaire primaire. Les L_B mémoires sortent du CG et migrent vers les organes lymphoïdes via la circulation sanguine. Ces cellules ne produisent pas d'anticorps et dans ce sens, ne confèrent pas de protection directe. Leur réactivation entraîne une prolifération et une différenciation extrêmement rapide en plasmocytes qui secrètent une grande quantité d'Ac de très haute affinité¹⁰³.

4. REPONSE THYMO-INDEPENDANTE (TI)

Certains antigènes microbiens sont capables d'induire une réponse thymo-indépendante (TI) (Figure 14A). Ces antigènes sont composés bien souvent de molécules composées de motifs répétitifs, comme par exemple les polysaccharides bactériens. Ces Ag se fixent directement sur le récepteur de surface des lymphocytes B (BCR). Il existe deux classes d'Ag TI : les TI-1 et les TI-2, qui activent les LB via des mécanismes différents. Les polysaccharides des bactéries *S. pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* et *Salmonella typhi* sont des antigènes TI-2.

a) Réponse thymo-indépendante de type 1

Les antigènes de type TI-1 peuvent induire la division cellulaire des L_B sans l'intervention des L_T. Ces Ag activent les L_B de façon polyclonale, c'est-à-dire qu'ils induisent la prolifération et la différenciation de la plupart des L_B quelle que soit leur spécificité antigénique. Certains Ag TI-1, comme le lipopolysaccharide (LPS) ou les ARN bactériens, activent les TLR exprimés à la surface des L_B et agissent comme un mitogène. Pour cela, ils sont communément appelés mitogènes des cellules B. La réponse immune aux Ag TI-1 joue un rôle important dans la défense contre les pathogènes extracellulaires, en intervenant plus rapidement que la réponse TD. En revanche, ces Ag TI-1 n'induisent pas de maturation de l'affinité ou la production de L_B mémoires, deux processus dépendants de la coopération avec les L_T.

b) Réponse thymo-indépendante de type 2

Les antigènes TI-2 sont principalement des molécules composées de séquences répétitives, comme par exemple les PS bactériens. Alors que les Ag TI-1 sont capables d'activer aussi bien les L_B immatures que matures, les Ag TI-2 n'activent que les L_B matures ; les L_B immatures étant inactivés en présence d'épitopes répétitifs.

Les réponses aux Ag TI-2 sont principalement médiées par les lymphocytes de la zone marginale (MZ) et les lymphocytes B1⁹⁸.

Lymphocytes de la zone marginale. Les cellules de la zone marginale apparaissent chez la souris aux alentours de 1 mois de vie. Ces cellules ne recirculent pas et semblent être à longue durée de vie^{104,105}. La zone marginale de la rate se situe entre la pulpe blanche (composée de follicules lymphoïdes B et T) et la pulpe rouge (appelée ainsi de par la couleur donnée par le sang qui y influe avant de retourner dans la circulation).

Les Lymphocytes B1. En plus des MZ et des FO, il existe une troisième sous-population lymphocytaire : les lymphocytes B1. Au contraire des cellules MZ, ces cellules apparaissent très tôt dans le développement. Elles sont peu représentées dans les organes lymphoïdes secondaires, leurs niches principales étant les cavités péritonéales et pleurales. Les cellules B1 sont la principale source d'anticorps «naturels», anticorps circulants produits de manière constitutive, sécrétés avant toute infection. La plupart des anticorps produits par les cellules

B1 reconnaissent les antigènes polysaccharidiques capsulaires, ces cellules jouent un rôle essentiel dans le contrôle des infections par des virus ou des bactéries. Une caractéristique importante des L_B B1 est qu'ils sont capables de produire des IgM sans coopération avec des L_T . Alors que les fonctions précises des cellules B1 ne sont encore définies, il a été démontré que les souris déficientes en lymphocytes B1 sont plus sensibles à l'infection par *Streptococcus pneumoniae*. Le rôle des B1 humains est sujet à controverse.

Les antigènes TI-2 agissent probablement en liant simultanément un nombre important de récepteurs des lymphocytes B (BCR) sur la surface des L_B matures spécifiques de l'antigène. Les DC et les macrophages peuvent fournir des signaux de co-stimulation pour l'activation des lymphocytes B par les antigènes TI-2. L'un de ces signaux co-stimulateurs est la cytokine BAFF, sécrétée par les DC dont le récepteur TACI est présent à la surface des L_B . La concentration des épitopes de l'antigène TI-2 est critique; une liaison excessive au niveau du BCR rend les cellules B matures et immatures non réactives ou anergiques, alors qu'une concentration trop faible peut être insuffisante pour l'activation. Une fois activées, les LB se différencient en plasmocytes, subissent quelques mutations de classes et produisent des anticorps de faible affinité. Après leur différenciation via la voie extrafolliculaire, les plasmocytes spécifiques des antigènes TI-2 migrent dans la pulpe rouge de la rate où ils persistent quelques temps puis meurent par apoptose⁸⁷.

De nombreux pathogènes bactériens extracellulaires sont entourés d'une capsule polysaccharidique leur permettant de résister à la phagocytose. En empêchant leur digestion par les phagocytes, les bactéries encapsulées ne sont plus présentées à la surface des macrophages sous forme de peptides. Il n'y a donc pas de stimulation des L_T . Les IgM anti-polysaccharidique de capsule rapidement produites via les MZ ou les B1, se fixent sur la bactérie, permettant son ingestion et sa digestion par les phagocytes au début de l'infection. Bien que n'induisant pas ou peu de mémoire, cette réponse TI permet d'induire une réponse très rapide dès les premières heures de l'infection, et ce, surtout pour les bactéries encapsulées où la réponse TD n'est pas induite¹⁰⁶.

c) Réponse thymo-indépendante de type 3

Il existe un troisième type de réponse thymo-indépendante appelée de type 3. Cette réponse n'est pas caractérisée par la nature de l'Ag qui la stimule mais plutôt par le type de cellules auxiliaires impliquées dans cette réponse, à savoir les cellules appartenant au lignage myéloïde. La nature des antigènes susceptibles de recruter ces cellules auxiliaires myéloïdes ainsi que le contexte physiopathologique conduisant à leur recrutement ne sont pas connus à l'heure actuelle. Divers travaux ont montré la capacité des neutrophiles, basophiles et mastocytes de coopérer avec les lymphocytes B et d'induire la prolifération et la différenciation de ceux-ci en plasmocytes¹⁰⁷⁻¹⁰⁹.

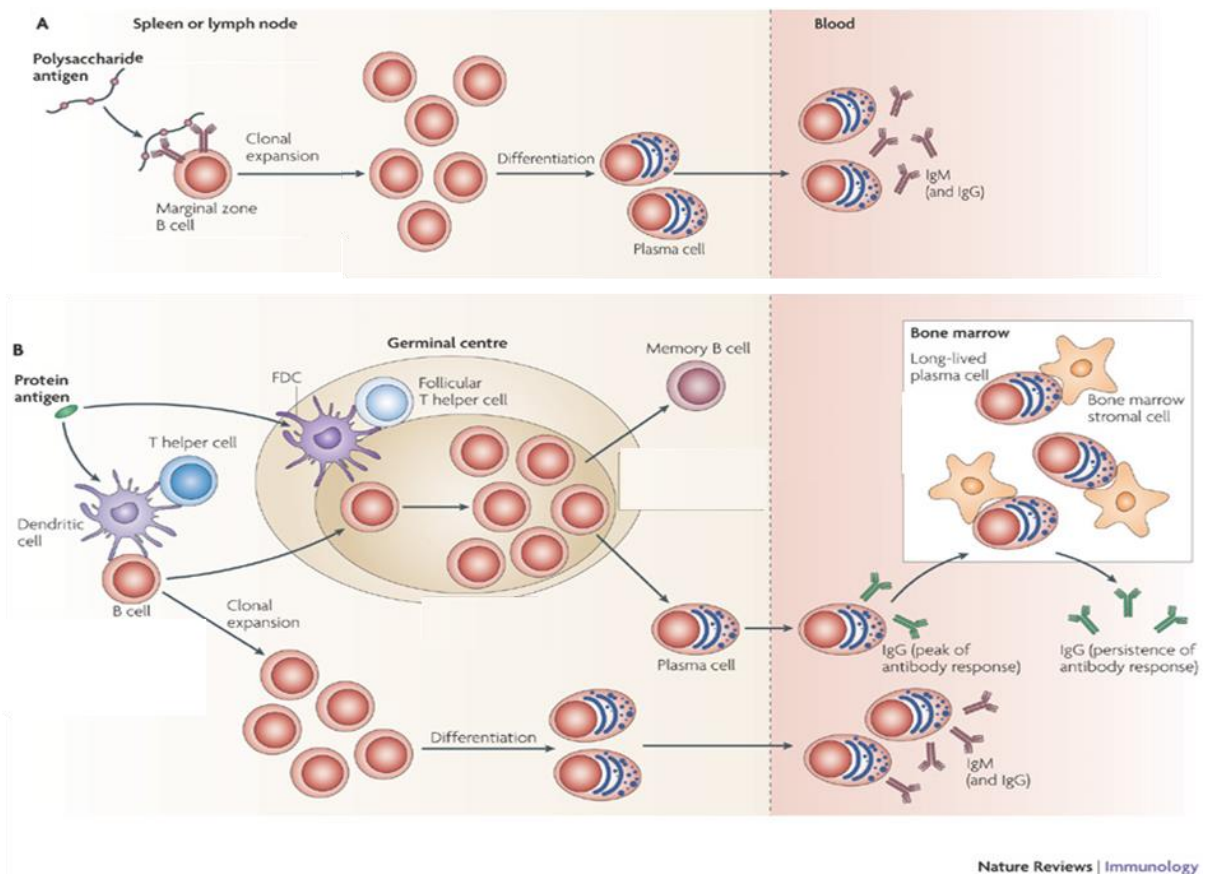


Figure14. Schéma récapitulatif modifié des réponses thymo-indépendantes (A) et thymo-dépendantes (B) induites par les vaccins anti-pneumococciques (extrait de Siegrist et al¹¹⁰).

III. VACCINS ANTI-PNEUMOCOCCIQUES

1. VACCIN ANTI-PNEUMOCOCCIQUES POLYSACCHARIDIQUE (PPV)

Le Pneumo23[®] (PPV23) est un vaccin anti-pneumococcique polysaccharidique mis sur le marché à partir de 1981. Il est recommandé chez les enfants de plus de 2 ans et les adultes présentant des facteurs de risque d'infection invasive à pneumocoque (IIP) (asplénie, anémie falciforme, dysfonction splénique ; maladie cardio-pulmonaire chronique ; alcoolisme, tabagisme, cirrhose, maladie rénale chronique, syndrome néphrotique ; brèche ostéoméningée avec perte de liquide céphalorachidien ; diabète ; infection à VIH et autres affections chroniques associées à une immunosuppression (lymphome de Hodgkin, myélome multiple, immunosuppression pour la transplantation d'organes); porteur d'implant cochléaire).

Une dose du vaccin PPV23 contient 25 µg de chacun des 23 sérotypes (1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F 19A, 20, 22F, 23F, 33F). Le PPV23 couvre 67% des méningites et 56% des bactériémies chez les enfants de moins de 2 ans et 70% des méningites et bactériémies pneumococciques chez les adultes de plus de 65 ans²⁷.

L'immunogénicité des sérotypes varie, mais est globalement faible chez les personnes âgées ainsi que chez les patients immunodéprimés, qui font partie de la population la plus à risque de développer des IIP. Le vaccin n'entraînant pas de réponse mémoire T dépendante, une revaccination tous les 5 ans peut être recommandée chez certains patients.

2. VACCIN ANTI-PNEUMOCOCCIQUE CONJUGUE (PCV)

Depuis 2001, une vaccination généralisée des enfants âgés de 2 mois à 5 ans par un vaccin anti-pneumococcique conjugué 7-valent (Prevenar7[®]) a été introduite en France afin de réduire les infections invasives à pneumocoques, les pneumonies bactériennes ou non et les infections auriculaires moyennes aiguës. La couverture sérologique a été progressivement étendue depuis 2009 avec la mise sur le marché du Prevenar13[®] (PCV13) remplaçant le Prevenar7[®] (PCV7). Le Prevenar13[®] a obtenu une autorisation de mise sur le marché européen pour les adultes présentant un risque de d'infections à pneumocoque fin 2013. Il s'agit d'un vaccin conjugué 13-valent contenant le polysaccharide capsulaire purifié

de 13 sérotypes (2 à 4 µg de chacun des sérotypes: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 3, 5, 6A, 7F, 19A) conjugué à l'anatoxine diphtérique (CRM197). Le PCV13 couvre 16,3 % des sérotypes impliqués dans les méningites et 18,5% des bactériémies chez les enfants de moins de 2 ans et 24 à 27% des sérotypes impliqués dans les méningites et 28% à 30% des bactériémies chez les adultes de plus de 16 ans²⁷.

Le couplage des antigènes polysaccharidiques pneumococques, antigènes thymo-indépendants, à une protéine porteuse, les transforme en antigènes thymo-dépendants. Ceci présente deux avantages: une meilleure immunogénicité, comme cela a été amplement démontré chez les jeunes enfants de moins de 2 ans ne répondant pas au vaccin PPV23 et l'induction d'une réponse immunitaire mémoire lors de la vaccination de rappel. Le vaccin conjugué est recommandé pour les enfants de moins de 5 ans et les adultes à risque. De nombreuses études chez des enfants immunocompétents ont démontré une efficacité clinique en termes d'immunisation et de protection contre les infections invasives, mais aussi en termes de réduction du pourcentage d'infections et des souches de pneumocoques résistantes à la pénicilline²⁷. Enfin, l'étude CAPITA¹¹¹ menée chez des adultes de plus de 65 ans, a montré une efficacité du PCV13 vis-à-vis des pneumonies communautaires (CAP) à sérotype vaccinal de 46%, vis-à-vis des CAP non bactériémiques non invasives de 45% et des IIP de 75%, dans la population « per protocole ».

3. HISTORIQUE DES RECOMMANDATIONS VACCINALES ANTI-PNEUMOCOCCIQUES

1981. Le vaccin Pneumo23® (PPV23) (Sanofi Pasteur) est le premier vaccin anti-pneumococcique à être disponible sur le marché français. Il obtient son autorisation de mise sur le marché (AMM) en 1981. Ce vaccin est alors indiqué pour la prévention des infections à pneumocoques, en particulier des pneumonies, dues aux sérotypes contenus dans le vaccin, chez les sujets à risque, à partir de l'âge de 2 ans :

- sujet âgé de plus de 65 ans, particulièrement personne âgée vivant en institution
- sujet immunocompétent fragilisé ou susceptible d'être fréquemment hospitalisé (diabète, bronchite chronique, insuffisance respiratoire, insuffisance cardiaque, terrain alcoolotabagique),

- sujet immunodéprimé : splénectomisé, drépanocytaire, syndrome néphrotique,
- sujet porteur d'une brèche ostéoméningée

Le schéma vaccinal proposait une injection de Pneumo23, suivie d'un rappel tous les 5 ans¹¹².

2001. Le Prevenar®, vaccin conjugué 7-valences, obtient l'AMM chez les nourrissons et les enfants de moins de deux ans. En Europe, l'efficacité du Prevenar sur la survenue d'IIP est estimée entre 65 % et 79 % lorsqu'on considère la couverture vaccinale des sérogroupes à l'origine de maladies invasives. Le schéma vaccinal proposé était variable en fonction des âges :

- Nourrissons de moins de 6 mois : trois doses, avec un intervalle d'au moins un mois entre les doses. Une quatrième dose est recommandée au cours de la deuxième année de vie.
- Nourrissons âgés de 7 à 11 mois : deux doses, avec un intervalle d'au moins un mois entre les doses. Une troisième dose est recommandée au cours de la deuxième année de vie.
- Enfants âgés de 12 à 23 mois : deux doses, avec un intervalle d'au moins 2 mois entre les doses. L'utilité d'une dose de rappel à la suite de ces schémas vaccinaux n'a pas été établie.

2008. Modification du schéma vaccinal avec la stratégie 2+1, c'est-à-dire vaccination à 2 mois et 4 mois d'âge, puis un rappel à 12 mois. Les recommandations sont élargies aux enfants de 2 à 5 ans à risque d'IIP. Ceux-ci reçoivent deux doses de vaccin conjugué à deux mois d'intervalle suivies au moins deux mois après d'une dose de vaccin polysaccharidique¹¹³.

2010: Remplacement du Prevenar par le Prevenar13® (PCV13), conférant une protection élargie à 13 sérotypes avec 6 sérotypes additionnels par rapport au Prevenar (1, 3, 5, 6A, 7F et 19A)¹¹⁴.

2013. Elargissement de l'AMM du Prevenar13, chez les adultes et les enfants âgés de 2 à 17 ans, immunodéprimés à risque d'IIP. Les recommandations vaccinales changent pour les patients immunodéprimés à partir de 2 ans, avec l'apparition du schéma combiné : une dose de PCV13 suivie deux mois plus tard d'une dose de PPV23¹¹⁵.

2017. Le Haut conseil de santé publique étend aux adultes de tous âges non immunodéprimés mais à risque de développer des IIP¹¹⁶. Les recommandations établies sont résumées dans la figure 15.

2018. La vaccination par le Prevenar13[®] devient une vaccination obligatoire chez les nourrissons depuis le 01/01/2018. Le schéma vaccinal reste la stratégie 2+1, c'est-à-dire une dose à 2 mois et une autre à 4 mois d'âge puis un rappel à 11 mois.

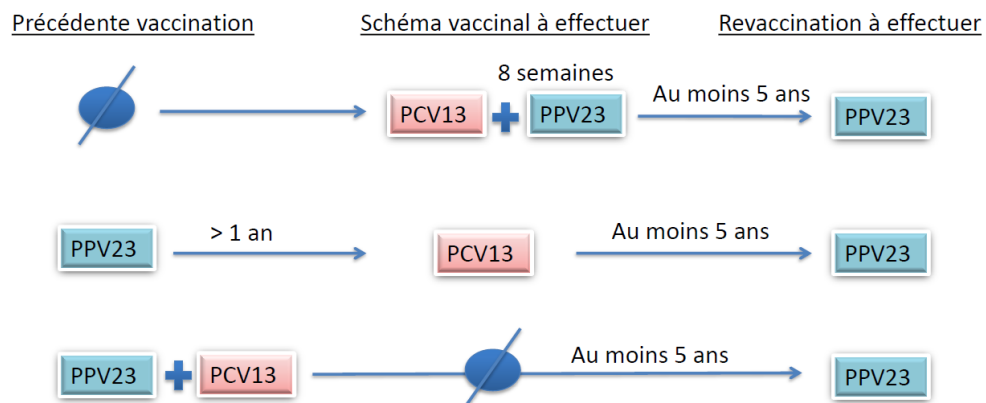


Figure15. Schéma vaccinal selon les recommandations du Haut Conseil de Santé Publique, en date du 10 Mars 2017. Il concerne les enfants de plus de 2 ans immunodéprimés ou à risque d'IIP ainsi que les adultes immunodéprimés ou à risque d'IIP.

IV. HYPORÉPONSE VACCINALE

1. DEFINITION

L'hyporéponse est définie comme l'incapacité d'un individu, après stimulation par une seconde dose vaccinale, à obtenir une réponse immunitaire égale ou supérieure à la réponse induite par la primo vaccination. La concentration d'anticorps obtenue après la seconde immunisation est inférieure à celle induite par la première (Figure 16).

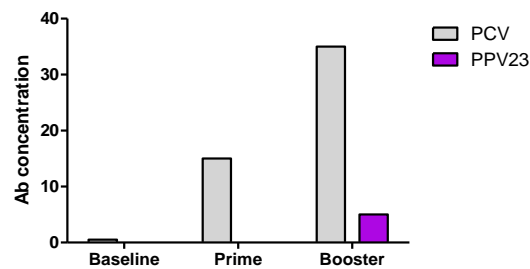


Figure16. Exemple d'Hyporéponse. Evolution de la concentration en anticorps après un rappel par le vaccin conjugué (PCV) en gris, ou par le vaccin polysaccharidique (PPV), en violet.

2. HISTORIQUE DE L'HYPORÉPONSE

La première hyporéponse (HR) vaccinale a été décrite en 1959 chez des nouveaux nés¹¹⁷. En effet, il a été démontré qu'une HR pouvait apparaître lorsque la vaccination commençait dans les premiers jours de vie. Ainsi, des enfants immunisés à la naissance par une dose de vaccin combiné Diphtérie-Tétanos-Coqueluche (acellulaire)(DTaCoq) suivie par le schéma vaccinal classique, présentaient des taux significativement plus bas que les enfants vaccinés par le schéma classique uniquement¹¹⁸. Des résultats similaires ont été retrouvés avec le vaccin DTwCoq (vivant entier)¹¹⁹. Cette HR est liée à l'âge précoce du sujet vacciné et non à la composition du vaccin en lui-même.

Le premier phénomène d'HR induite par des PS a été observée chez des souris immunisées par des PS de pneumocoque¹²⁰. Felton et al. décrivait dans une étude de 1955, que des souris stimulées par des doses croissantes de PS du pneumocoque, voyaient leur système immunitaire « paralysé ». Ces souris, soumises ensuite à une stimulation par du pneumocoque vivant mouraient plus rapidement que les souris non stimulées. Les auteurs montraient une persistance des PS dans le sérum des souris 15 à 18 mois après

immunisation. Ils n'observaient pas de différences entre les différentes voies d'injections des PS que ce soit en intrapéritonéal, intradermique ou intraveineux.

Parmi les vaccins polysaccharidiques, trois d'entre eux ont été décrits pour pouvoir induire une hyporéponse vaccinale chez l'Homme : le vaccin PS anti-Haemophilus type b (Hib), vaccin PS anti-méningococcique C et le vaccin PS anti-pneumococcique.

a) Vaccin polysaccharidique anti-Haemophilus type b

Il n'a pas été démontré d'hyporéponse avec une vaccination par des doses successives de vaccins PS Hib. Une étude finlandaise a suivie et évaluée plus de 50 000 enfants immunisés par deux doses de vaccin PS Hib à 3 ans d'intervalles¹²¹. Quel que soit l'âge de l'enfant lors de la première vaccination (de 3 à 47 mois), des concentrations d'anticorps similaires ont été observées par rapport à un groupe control du même âge, n'ayant reçu que la dose plus tardive.

En revanche, une moins bonne réponse a pu être observée chez des enfants ayant développés des infections à *H. influenzae* type b puis vaccinés par du vaccin polysaccharidique. L'HR décrite ici n'est pas provoquée par des doses successives de vaccins polysaccharidiques mais plutôt par la combinaison d'une immunité naturelle induite par la bactérie suivie d'une immunité induite par la vaccination polysaccharidique^{122,123}.

Le vaccin polysaccharidique a été remplacé par un vaccin conjugué et n'est plus utilisé actuellement.

b) Vaccins polysaccharidiques anti-Méningococciques

L'hyporéponse induite par les PS de *Neisseria meningitidis* séro groupe C (MenC-PS) a été décrite dans la littérature chez les adultes¹²⁴, adolescents¹²⁵ et enfants¹²⁶ ainsi que chez les nouveaux-nés¹²⁷.

Une étude réalisée en Gambie par Leach et al.¹²⁷ chez plus de deux cent enfants, a comparé la primo vaccination avec une ou plusieurs doses d'un vaccin conjugué contre le méningocoque des groupes A et C (MenAC-CV) versus deux doses de vaccin

polysaccharidique MenAC-PS, avant l'âge de 6 mois. Les auteurs montrent que les enfants vaccinés avec deux doses de vaccin polysaccharidique présentaient des titres d'anticorps anti-méningocoque C inférieurs à ceux des enfants témoins. Parmi les nourrissons vaccinés par le vaccin MenAC-CV à 6 mois, certains reçurent une dose de MenAC-PS à 24 mois ; tous furent vaccinés à l'âge de 5 ans par une dose de MenAC-PS. Les résultats de l'étude montrent des titres d'anticorps 6 fois inférieurs pour les enfants ayant été vaccinés par le MenAC-PS à 24 mois¹²⁸.

Des résultats similaires ont été observés quel que soit l'âge du sujet vacciné, avec des titres d'anticorps anti-méningocoque C plus faibles retrouvés chez les patients ayant reçu une primo vaccination par le vaccin MenC-PS par rapport aux patients vaccinés seulement par le MenC-CV seul^{125,129-132}.

Les polysaccharides du méningocoque semblent entraîner des phénomènes d'HR d'intensité différente. En effet, des réponses différentes ont été observées en fonction des sérogroupes du méningocoque : les PS spécifiques du séro groupe A (MenA-PS) et ceux du séro groupe C (MenC-PS) ne semblent pas stimuler le système immunitaire selon les mêmes mécanismes.

Des études ont montré que les MenA-PS étaient capables d'induire une réponse immunitaire chez les enfants de moins de 18 mois^{133,134}, sans pour autant être capable d'induire une mémoire immunitaire dans cette population^{127,128,134}. Toutefois, une exposition précédente aux MenA-PS ne semble pas avoir d'effet délétère sur la réponse lors de nouvelles expositions aux polysaccharides. Chez l'adulte en revanche, une seconde dose de MenAC-PS, injectée six mois après la première, met en évidence des titres d'anticorps diminué d'environ 1/3 par rapport aux titres retrouvés après la première vaccination¹³⁵.

L'impact de doses répétées de polysaccharides a moins été étudié pour les sérogroupes Y et W135. Dans l'étude de Keyserling et al.¹³¹ chez les adolescents ayant reçus les deux vaccins, des titres d'anticorps diminués ont été retrouvés pour tous les sérogroupes, bien que la diminution soit plus importante pour le MenC-PS.

Une étude clinique réalisée en Ouganda a évalué l'immunogénicité induite par des doses entières (50 µg) ou fractionnées (5 µg ou 10 µg) de MenACWY-PS chez 120 enfants

(âgés de 2 à 19 ans) puis par une dose entière de MenACWY-PS, un an après la première vaccination. Concernant les enfants ayant reçus une dose entière en primo vaccination, une hyporéponse a été observée pour tous les sérogroupes à l'exception du séro groupe Y. La diminution de la concentration du vaccin a été bénéfique puisqu'on ne retrouve plus d'HR pour les sérogroupes C, W135 et Y lorsque les enfants ont reçus des doses fractionnées. L'effet de la concentration est plus modéré sur le séro groupe A puisqu'une HR est observée à la concentration 10 µg, mais plus à 5 µg.

Ainsi, il semble que l'HR induite par des doses répétées de PS du méningocoque C ne puisse être totalement inversée par des injections de vaccins conjugué (MenC-CV). Cela suggère que la production de cellules mémoires induites par le vaccin MenC-CV est probablement altérée par le vaccin MenC-PS ; indépendamment du schéma vaccinal. Enfin, le phénomène d'HR induite par les polysaccharides du méningocoque se révèle être dose dépendant, avec toutefois des effets variables selon les sérogroupes.

c) Vaccin polysaccharidique anti-Pneumococcique

L'hyporéponse vaccinale induite par le vaccin polysaccharidique anti-pneumococcique a été décrite chez les enfants^{136,137} et chez les adultes¹³⁸⁻¹⁴⁰. Les études décrites dans la figure 17 illustrent l'effet délétère du PPV23 sur la réponse vaccinale. Ces études montrent également que quel que soit l'ordre de vaccination (PPV23 avant ou après le PCV), on retrouvait cette hyporéponse.

Etudes	Stratégie vaccinale	Population	Conclusions
Sigurdardottir et al.¹³⁷ (2014)	PCV9/PCV9/PCV13 PCV9/PPV23/PCV13	Enfants < 10 ans	Réponse diminuée au PCV13 pour les enfants ayant reçus le PPV23
Russell et al.¹³⁶ (2010)	PCV7/1/5 ^{ème} PPV23 PCV7/PPV23/1/5 ^{ème} PPV23	Nourrissons < 24 mois	Réponse diminuée pour les enfants ayant reçus deux doses de PPV23
De Roux et al.¹⁴⁰ (2008)	PCV7/PCV7 PCV7/PPV23 PPV23/PCV7	Adultes > 70 ans	Réponse diminuée pour les adultes ayant reçus le PPV23 en première vaccination

Musher et al.¹³⁹ (2008)	PCV7/PPV23 PPV23/PCV7 PPV23 avant inclusion	Adultes avec antécédents d'IIP	Réponse diminuée pour les adultes ayant reçus le PPV23 en première vaccination
Orthopopoulos et al.¹⁴¹ (2009)	PCV7/PPV23/PPV23 PCV7/PCV7/PPV23 0-3 doses PPV23 avant inclusion	Adultes aspléniques β -thalassémiques	PPV23 à répétitions entraîne une hyporéponse pour certains sérotypes
Dransfield et al.¹⁴² (2009) Papadatou et al.¹⁴³ (2014)	PCV7 ou PCV13 PPV23 1-4 doses PPV23 avant inclusion	Adultes avec BPCO / Adultes aspléniques β -thalassémiques	Vaccinations précédentes par le PPV23 induisent une diminution de la réponse pour le PCV7/PCV13 et le PPV23. Impact du PPV23 dépend du délai entre les doses et du nombre d'injection
Lazarus et al.¹⁴⁴ (2011) Clutterbuck et al.¹³⁸ (2012)	PCV7/PPV23/PCV7 PCV7/PCV7/PPV23 PPV23/PCV7/PCV7	Adultes 50-70 ans	PPV23 induit une diminution de la réponse au PCV7 donné ultérieurement

Figure17. Résumé de différentes études cliniques démontrant l'hyporéponse induite par le PPV23 (extrait et modifié à partir de Papadatou et al.¹⁴⁵)

Dransfield et al.¹⁴² et Papadatou et al.¹⁴³ ont observé l'effet d'une dose de PPV23 préalable sur la vaccination par le PCV7/13 et par le PPV23. Ils ont montré que le PPV23 induisait une hyporéponse pour la vaccination par le vaccin conjugué mais également sur le vaccin polysaccharidique. Dans une étude chez les patients aspléniques β -thalassémiques, Orthopoulos et al.¹⁴¹ ont observé une hyporéponse de magnitude différente entre les sérotypes testés. Ce phénomène semble être lié, expliquent les auteurs, aux différences structurelles entre les différents sérotypes de pneumocoque. Ces différences de réponse ont également été décrites pour les sérotypes du méningocoque¹³¹.

L'hyporéponse ne semble pas être un phénomène induit exclusivement par les vaccins polysaccharidiques. Il semble en effet que l'immunité naturelle puisse entraîner un effet délétère sur les vaccinations ultérieures comme cela a déjà été décrit pour l'*Haemophilus influenzae* type b^{122,123}. Une étude a évalué la réponse vaccinale au PCV7 chez des enfants présentant des antécédents d'IIP¹⁴⁶. Des concentrations faibles des anticorps responsables

des IIP ont été retrouvées, mettant en évidence une possible hyporéponse vaccinale induite par l'immunité naturelle qui découle de l'infection. Dagan et al. ont trouvé des résultats assez similaires pour le portage¹⁴⁷.

3. MECANISMES DE L'HYPORÉPONSE

Les mécanismes immunitaires impliqués dans l'hyporéponse (HR) ne sont pas connus mais plusieurs mécanismes agissant seuls ou de concert ont été proposés. La mesure de la concentration en anticorps avant et après vaccination a permis de mettre en évidence ce phénomène dans plusieurs études réalisées chez l'Homme et chez la souris. De plus, une hyporéponse a été observée aussi bien avec la vaccination par les polysaccharides (PS) du méningocoque ou ceux du pneumocoque.

En revanche, peu d'études ont cherché à observer ce phénomène au niveau cellulaire ou à en comprendre les mécanismes. Trois équipes se sont intéressées à l'HR et leurs travaux ont permis de proposer des hypothèses sur les mécanismes impliqués dans ce phénomène^{138,148-150}.

a) Le vaccin polysaccharidique anti-pneumococcique entraîne la déplétion des L_B mémoires spécifiques

L'équipe d'Andrew Pollard, de l'Oxford Vaccine Group, de l'université d'Oxford, au Royaume-Uni, a cherché à quantifier les cellules spécifiques des PS anti-pneumococciques vaccinaux. Ils ont mené une étude clinique chez 150 volontaires sains âgés de 50 à 70 ans, vaccinés selon trois schémas vaccinaux différents¹³⁸. Les stratégies vaccinales étaient composées de trois injections successives de vaccins, espacées de 6 mois : 1) deux doses de vaccin anti-pneumococcique conjugué Prevenar suivies d'une dose de vaccin polysaccharidique Pneumovax (PCV7+PCV7+PPV23) ; 2) une dose de Prevenar suivie d'une dose de vaccin polysaccharidique Pneumovax puis à nouveau une dose de Prevenar (PCV7+PPV23+PCV7) ; 3) une dose de vaccin polysaccharidique suivie de deux doses de vaccin conjugué (PPV23+PCV7+PCV7).

Les auteurs ont montré qu'une injection de PPV23 entraînait une diminution du nombre de lymphocytes B mémoires (L_B mémoires) présents avant la vaccination. En effet, lors de l'inclusion, 86% des patients présentaient des L_B mémoires spécifiques du pneumocoque

pour au moins un sérotype sur les sept testés, bien qu'il n'y ait aucun antécédent de vaccination. Une dose de PCV7 ne suffisait pas afin de restaurer le nombre de L_B mémoires puisque les patients vaccinés par la stratégie combinée PPV23+PCV7 montraient des taux de L_B mémoires inférieurs à ceux n'ayant reçus qu'une dose de PCV7. En revanche, une deuxième injection de PCV7 induisait une augmentation du taux de L_B mémoires, bien que celui-ci soit inférieur au taux pré-vaccinal.

Ainsi, cette étude a mis en évidence un effet délétère du vaccin polysaccharidique sur les L_B mémoires spécifiques du pneumocoque et ce quel que soit le schéma vaccinal (PPV23 donné avant ou après le PCV). Cet effet semble être transitoire et pourrait être compensé par des injections répétées de vaccin conjugué. Bien que l'efficacité de doses répétées de PCV7 soit limitée dans cet étude, elle a été démontrée dans la vaccination anti-méningococciques, avec néanmoins des délais plus importants entre les doses¹⁵¹

Les auteurs suggèrent que la longue durée de vie des PS démontrée *in vivo*¹²⁰, pourraient entraîner la déplétion ou l'épuisement du pool de L_B mémoires, conséquences d'une stimulation antigénique chronique.

b) Le vaccin polysaccharidique anti-méningococcique entraîne l'apoptose des L_B mémoires spécifiques

Dans un article publié à la même période que la publication précédente, l'équipe d'Ingeleif Jonsdottir, est allée un peu plus loin dans la mécanistique de l'HR. Là où Pollard et al¹³⁸. observaient une déplétion des L_B mémoires, Jonsdottir et al. ont montré que cette déplétion était la conséquence d'une apoptose induite par les PS bactériens¹⁵⁰.

Dans un modèle murin de souris âgées d'une semaine, ils ont quantifié les lymphocytes B naïfs et mémoires spécifiques des vaccins conjugués et polysaccharidiques du méningocoque dans la rate et la moelle osseuse (MO). La capacité de prolifération des cellules (mesurée par injection de BrdU) et l'apoptose (mesurée par l'annexin V) ont été observées par cytométrie en flux.

Les auteurs ont montré qu'une injection de vaccin polysaccharidique MenC-PS précédée d'une ou plusieurs injections de vaccin conjugué (MenC-CRM) entraînait la diminution des L_B naïfs, des L_B mémoires et des plasmocytes dans la rate. Des résultats similaires ont été retrouvés dans la moelle, avec des taux de plasmocytes après vaccination par le MenC-PS inférieurs à ceux des souris immunisées par le MenC-CRM ou par le placebo. En revanche, bien qu'inférieure à la quantité stimulée par le vaccin conjugué, la quantité de L_B mémoires induits par le MenC-PS dans la rate était supérieure au groupe placebo.

Par ailleurs, leurs résultats montrent dans la rate une quantité plus importante de cellules apoptotiques parmi les B spécifiques des PS, après vaccination par le MenC-PS par rapport au MenC-CRM ou le placebo. Cette apoptose a lieu dans le 12h suivant l'immunisation par le MenC-PS.

Ainsi, cette étude confirme chez la souris, la déplétion des L_B mémoires observée par l'équipe de Pollard chez l'Homme, que ce soit avec les PS du méningocoque ou du pneumocoque. Bien que le vaccin polysaccharidique soit capable d'activer les L_B mémoires dans la rate, ceux-ci ne se différencient pas en plasmocytes et ne migrent pas dans la rate. Les auteurs suggèrent que la déplétion observée des L_B mémoires pourrait être la conséquence de l'induction de l'apoptose par les PS dans cette population cellulaire.

c) Les PS du pneumocoque entraînent l'abrogation des centres germinatifs et déplètent le pool de plasmocytes

Après avoir étudié l'hyporéponse induite par les PS du méningocoque, l'équipe de Jonsdottir s'est ensuite intéressée aux PS du pneumocoque. Ils se sont également intéressés aux L_B mémoires et aux plasmocytes. Cet article apporte un œil nouveau sur l'action directe des PS au niveau de la rate.¹⁴⁸ En effet, les auteurs ont regardé par Immunohistochimie, la présence et la composition des centres germinatifs (GC) dans les rates des souris vaccinées par les polysaccharides couplés à la toxine tétanique et /ou par les polysaccharides seuls. Afin d'évaluer la spécificité de l'HR induite par les PS, le nombre de plasmocytes spécifiques à la protéine porteuse, toxine tétanique a été mesuré.

Les résultats de cette étude viennent confirmer ceux retrouvés chez l'Homme¹³⁸ et ceux chez la souris pour les PS du méningocoque¹⁵⁰. En effet, il a été observé une déplétion du pool des plasmocytes dans la rate et dans la moelle des souris immunisées selon le schéma vaccinal comprenant une vaccination par les polysaccharides conjugués (PS-TT) suivis d'une vaccination par les polysaccharides seuls (PS). En revanche, cette déplétion ne touche pas les plasmocytes spécifiques de la toxine tétanique puisque des taux similaires ont été mesurés quel que soit le schéma de vaccination.

En observant des coupes de rates et en les marquant en immunohistochimie, les auteurs ont remarqué une diminution des centres germinatifs (GC) induits par les PS-TT, après vaccination par les PS. Ces GC semblaient moins matures, contenaient moins de follicules et moins de L_B mémoires dans la zone marginale.

Enfin, l'effet délétère des PS n'est pas aggravé par des doses répétées de vaccin polysaccharidique puisque le nombre de plasmocytes reste inchangé après une, deux ou trois doses de PS.

Ainsi, les résultats de cette étude suggèrent que l'hyporéponse est spécifique et ne touche que les cellules spécifiques des PS. Cette étude démontre qu'une seule dose de PS est suffisante pour entraîner la déplétion complète du pool de L_B mémoires précédemment induites par la vaccination PS-TT. Cette diminution ainsi que celle des plasmocytes pourraient être la conséquence de l'abrogation par les PS des centres germinatifs induits par les PS-TT. De plus, les PS semblent bloquer le homing des plasmocytes nouvellement formés dans la moelle mais ne semblent pas avoir d'effet délétère sur les plasmocytes à longue durée de vie ayant déjà migrés dans la moelle.

d) Les PS ont un effet supprimeur sur le système BAFF des cellules B

L'équipe du laboratoire des Polysaccharides Bactériens de l'U.S Food and Drug Administration (FDA) s'est intéressée à l'effet des PS sur la réponse des cellules B (LB et

plasmocytes) à la stimulation par BAFF (B Cell Activating Factor of the TNF Family) et APRIL (A Proliferation-Inducing Ligand)¹⁴⁹.

BAFF et APRIL sont des cytokines appartenant à la super famille du TNF (Tumor Necrosis Factor) et jouent un rôle dans les fonctions et la maintenance des lymphocytes B matures et des plasmocytes¹⁰⁵⁻¹⁰⁸. Ces deux cytokines ont pour récepteurs BAFFR (BAFF receptor), TACI (Transmembrane Activator and Calcium-modulator and cyclophilin ligand Interactor) et BCMA (B-Cell Maturation antigen)^{152,153}. BAFF peut se fixer sur les trois récepteurs tandis qu'APRIL ne se fixe que sur TACI et BCMA. BAFFR et TACI sont exprimés sur une grande partie des cellules issue de la lignée leucocytaire (Figure 18). BCMA est exprimé principalement à la surface des plasmocytes et est indispensable au développement et la survie de ces cellules¹⁵⁴. De nombreuses études ont montré le rôle crucial de BAFF dans le développement des cellules B, notamment les cellules B1b^{152,155-157}. BAFF est également impliquée dans la différenciation cellulaire lors des réponses à l'antigène thymo-indépendante^{158,159}.

L'équipe d'Akkoyunlu a observé in vivo et in vitro l'effet des PS du méningocoque C (MenC-PS) et du streptocoque du groupe B, sérotype V (GBS-V)¹⁴⁹. Leurs résultats ont montré que les PS MenCPS et GBS-V inhibaient la sécrétion de BAFF par les cellules dendritiques et affectaient la réponse des lymphocytes B et des plasmocytes à la stimulation de BAFF et APRIL. De plus, le traitement de cellules par les PS entraînait une diminution de la capacité sécrétoire d'IgA, IgG et IgM sous la stimulation de BAFF et APRIL. Ce résultat est la conséquence de l'action des PS sur les L_B qui sont incapables de poursuivre leur développement en plasmocytes et meurent par apoptose. Une diminution de l'expression de TACI et BAFFR à la surface des L_B (aussi bien les FO, MZ, naïves et B1) après stimulation par les PS a été mise en évidence dans cette étude. Enfin, les auteurs ont pu observer une inhibition de la voie NF-κB chez les L_B exposés au PS.

Ainsi, dans cette étude, les auteurs ont mis en évidence l'effet suppresseur des PS sur le système BAFF dont l'origine principale serait la diminution d'expression des récepteurs BAFFR et TACI à la surface des L_B. En revanche, aucun effet sur le troisième récepteur appartenant à la famille BAFF, BCMA, principalement exprimé par les plasmocytes et impliqué dans la maintenance et la survie de ces cellules. Cette équipe a montré dans une autre étude, l'importance de TACI dans la maintenance et la survie des lymphocytes B1b

chez la souris¹⁵⁷. Or, ces cellules semblent jouer un rôle crucial dans la réponse thymo-indépendante (TI), induite par les PS bactériens notamment^{88,89,160,161}.

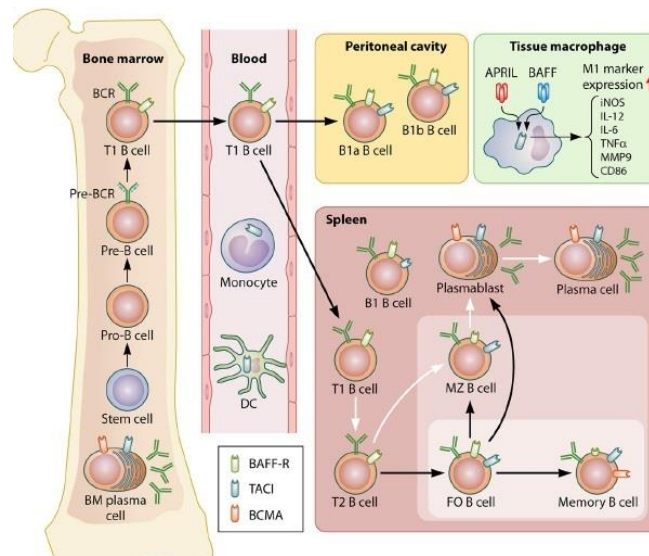


Figure18. Expression des récepteurs du système BAFF : BAFFR, TACI et BCMA (extrait de Sakai et al¹⁵²)

En conclusion, l'effet suppresseur ayant été montré avec les PS du méningocoque, dont le vaccin polysaccharidique entraîne une d'hyporéponse vaccinale, nous pensons que l'un des mécanismes impliqués dans l'hyporéponse induite par les PS pourrait être la diminution des récepteurs BAFFR et TACI à la surface des L_B. L'absence de ces récepteurs empêche ainsi la fixation de BAFF et APRIL à la surface de ces cellules qui ne répondent donc plus à la stimulation de ces cytokines. N'ayant plus de signal de survie, les cellules entrent en apoptose et ne se développent pas en plasmocytes. Cet effet suppresseur des PS sur l'expression de TACI et BAFFR affecte particulièrement les cellules B1b, cellules jouant un rôle prépondérant dans les réponses TI notamment induite par les PS du pneumocoque.

Nous présentons dans ce chapitre nos articles publiés sur la vaccination anti-pneumococcique chez les sujets immunodéprimés ainsi que sur l'hyporéponse induite par le vaccin polysaccharidique.

Les travaux que nous présentons se sont déroulés en trois temps :

Dans un premier temps, nous avons évalué l'immunogénicité du vaccin conjugué Prevenar13® (PCV13) chez des patients atteints de myélome indolent. Les patients immunodéprimés sont à haut risque de développer des infections invasives à pneumocoques (IIP). De nombreuses études d'immunogénicité, fondées sur la mesure de la concentration et de la capacité opsonisante des anticorps anti-pneumococcique ont démontré une supériorité du vaccin conjugué (PCV) par rapport au vaccin polysaccharidique (PPV) vis-à-vis de la plupart des sérotypes communs. L'utilisation de ce vaccin conjugué chez les patients mauvais répondeurs à la stimulation par les antigènes polysaccharidiques permettrait d'obtenir une meilleure réponse et avoir une meilleure efficacité vaccinale¹⁶². Nous avons ainsi voulu étudier dans cette première partie, la réponse immune induite par la vaccination par le PCV chez des patients atteints de myélome indolent. L'immunogénicité et la persistance de la réponse ont été évaluées par les techniques sérologiques de références de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) mises au point au laboratoire : technique ELISA et un test d'Opsonophagocytose (OPA) mesurant l'activité fonctionnelle des anticorps. Nos résultats ont démontré une faible persistance à long terme de la protection conférée par une dose de PCV chez les patients atteints de myélome indolent. Une dose de PCV13 ne semble pas être suffisante pour induire une protection suffisante chez les patients SMM.

L'introduction de la vaccination par le Prevenar chez le nourrisson a permis une diminution de la prévalence des sérotypes vaccinaux dans les infections invasives à pneumocoques (IIP), laissant émerger des sérotypes non contenus dans le vaccin conjugué.

Certains de ces sérotypes émergents sont par chance couverts par le vaccin polysidique 23-valences. En 2013, le haut conseil en santé publique (HCSP) recommande une nouvelle stratégie vaccinale pour les patients à risque d'IIP, combinant les deux types de vaccins anti-pneumococcique. Le schéma vaccinal recommandé est le suivant : une première dose de vaccin conjugué 13-valences, réputé plus immunogène de par la conjugaison du polysaccharide avec une protéine porteuse, suivie 8 semaines plus tard, d'une dose de vaccin polysaccharidique 23-valences afin d'élargir la couverture vaccinale aux 10 sérotypes supplémentaires inclus dans ce vaccin.

Dans cette deuxième partie, nous avons étudié la réponse vaccinale induite par cette stratégie combinée chez des patients atteints de lupus érythémateux systémique (étude VACCILUP) ainsi que chez des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde. Nous avons également comparé la stratégie combinée versus une injection seule de PPV23. Nos résultats n'ont pas montré de supériorité de la stratégie combinée par rapport à la vaccination par le vaccin polysaccharidique seul. De plus, nous avons observé un effet délétère du vaccin polysaccharidique sur la réponse immune induite précédemment par le vaccin conjugué.

Cet effet délétère du PPV23 sur la réponse induite par le PCV a été décrit dans la littérature et est appelé hyporéponse. Les mécanismes entraînant l'apparition de ce phénomène ne sont pas encore connus mais des études suggèrent qu'ils seraient liés à la toxicité des polysaccharides (PS) du vaccin sur les lymphocytes B mémoires et plasmocytes en induisant leur apoptose^{138,148}. De plus, il a été démontré que les PS avaient une longue demi-vie avec des PS retrouvés dans le sérum de souris jusqu'à 18 mois après leur immunisation par du PS¹²⁰. Nous savons que le vaccin polysaccharidique anti-méningococcique entraîne également un phénomène d'hyporéponse. Gold et al. ont étudié le rôle de la concentration en PS dans la vaccination anti-méningococcique¹⁶³. Ils ont démontré qu'une diminution de la concentration en PS du méningocoque entraînait une diminution, voir l'absence, d'hyporéponse. La concentration en PS du vaccin polysaccharidique Pneumovax® (PPV23) est 7 à 10 fois plus élevée que celle du vaccin conjugué Prevenar13® (PCV13). Notre hypothèse était donc que l'hyporéponse pouvait être réduite si l'on diminuait la dose de PPV23.

Nous avons donc étudié dans une troisième partie, l'impact de la concentration en PS sur la réponse vaccinale et sur la survenue de l'hyporéponse dans un protocole clinique sur des volontaires sains. Nous avons voulu évaluer également s'il était possible en modulant le schéma vaccinal de prévenir l'hyporéponse en augmentant le délai entre les doses de PCV et PPV. Cette étude a été faite dans un modèle murin d'hyporéponse, développé pendant ce travail de doctorat. Chez l'Homme, nos résultats n'ont pas montré d'effet bénéfique d'une vaccination par une dose réduite ni sur la réponse vaccinale ni sur l'hyporéponse. Ce qui suggère que la toxicité du PS sur les lymphocytes B mémoires et les plasmocytes n'était pas dépendante de la concentration en PS. Par ailleurs, une deuxième injection de PPV23 (dose pleine ou réduite), à distance du schéma combiné a montré une hyporéponse vaccinale très inférieure à celle observée après la première vaccination de PPV23 et semble indiquer un bénéfice d'un délai plus important entre les doses vaccinales. Cette hypothèse a pu être confirmée grâce à notre modèle murin d'hyporéponse dans lequel nous avons pu observer les effets bénéfiques d'une dose retardée de PPV23 par rapport au schéma classique combiné.

I. IMMUNOGENICITE DU VACCIN CONJUGUE ANTI-PNEUMOCOCCIQUE

1. ARTICLE 1

Immunogénicité et persistance du vaccin conjugué anti-pneumococcique 13-valences (PCV13) chez des patients atteints de myélome multiple indolent non traités : Etude pilote

Immunogenicity and persistence of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV13) in patients with untreated smoldering multiple myeloma (SMM): a pilot study

Mathilde Bahuaud, Hélène Bodilis, Marion Malphettes, Anaïs Maugard Landre, Caroline Matondo, Didier Bouscary, Frédéric Batteux, Odile Launay, Jean-Paul Fermand.

Publié dans Heliyon, Novembre 2017

Cette étude a été réalisée afin d'évaluer l'immunogénicité d'une dose de Prevenar13 chez des patients atteints de myélome multiple indolent, non traités.

Le myélome multiple indolent (SMM) est une maladie asymptomatique progressant fréquemment en myélome multiple (MM), forme plus sévère de la maladie et particulièrement à haut risque d'infections invasives à Pneumocoques (IIP). Afin de protéger au mieux les patients, il est important de définir le schéma vaccinal optimal. Si le vaccin polysaccharidique est faiblement immunogène chez les patients MM, le vaccin conjugué n'a jamais été testé chez les patients atteints de MM ni de SMM.

Nous avons évalué chez 20 patients atteints de SMM, la réponse vaccinale au vaccin conjugué anti-pneumococcique. Les concentrations en anticorps spécifiques de 7 sérotypes ont été mesurées avant vaccination, 1, 6 et 12 mois après vaccination par ELISA et par la technique d'Opsonophagocytose (OPA). L'objectif principal de l'étude était la proportion de patients répondeurs à au moins 5 sérotypes sur les 7 testés en ELISA, un mois après la vaccination.

Un mois après la vaccination, 12 patients (60%) étaient considérés répondeurs en ELISA et 8 (40%) en OPA, mais seulement 7 patients (35% du total) en ELISA sur les 12 répondeurs avaient une immunité persistante 6 mois après. L'immunité induite par la vaccination diminue rapidement un an après la vaccination. En effet, on observe des moyennes géométriques des concentrations (GMC) en anticorps à M12 similaires aux GMC pré-vaccinales.

Ces résultats suggèrent une réponse fonctionnelle faible chez les patients atteints de SMM accompagnée d'une diminution rapide des taux d'anticorps dans les mois qui suivent la vaccination.

En conclusion, nous avons démontré que le vaccin conjugué anti-pneumococcique induit une réponse fonctionnelle chez seulement 40% des patients SMM, mais également et surtout que la réponse induite est transitoire et décroît très rapidement. Des injections répétées de vaccins conjugués ou la combinaison avec le vaccin polysaccharidique semblent être des alternatives appropriées pour maintenir une protection efficace et de longue durée.

Received:
11 April 2017
Revised:
27 September 2017
Accepted:
26 October 2017

Cite as: Mathilde Bahuaud, Hélène Bodilis, Marion Malphettes, Anaïs Maugard Landre, Caroline Matondo, Didier Bouscary, Frédéric Batteux, Odile Launay, Jean-Paul Fermand. Immunogenicity and persistence of the 13-valent Pneumococcal Conjugate Vaccine (PCV13) in patients with untreated Smoldering Multiple Myeloma (SMM): A pilot study. Heliyon 3 (2017) e00441. doi: 10.1016/j.heliyon.2017.e00441



Immunogenicity and persistence of the 13-valent Pneumococcal Conjugate Vaccine (PCV13) in patients with untreated Smoldering Multiple Myeloma (SMM): A pilot study

Mathilde Bahuaud^a, Hélène Bodilis^b, Marion Malphettes^c, Anaïs Maugard Landre^b, Caroline Matondo^a, Didier Bouscary^d, Frédéric Batteux^{a,*}, Odile Launay^b, Jean-Paul Fermand^c

^a Plateforme d'Immunomonitoring Vaccinal, Laboratoire d'Immunologie, Groupe hospitalier Cochin-Broca-Hôtel Dieu, AP-HP, Paris, France

^b Centre d'Investigation Clinique Cochin-Pasteur (CIC1417), Groupe hospitalier Cochin-Broca-Hôtel Dieu, AP-HP, Paris, France

^c Service d'Immuno-Hématologie clinique, Groupe hospitalier Saint-Louis-Lariboisière-Fernand Widal, APHP, Paris, France

^d Service d'Hématologie clinique, Groupe hospitalier Cochin-Broca-Hôtel Dieu, AP-HP, Paris, France

* Corresponding author.

E-mail address: frederic.batteux@aphp.fr (F. Batteux).

Abstract

Smoldering multiple myeloma (SMM) is an asymptomatic clonal plasma cell disorder that frequently progress to multiple myeloma (MM), a disease at high risk of pneumococcal infections. Moreover, if the polysaccharide vaccine is poorly immunogenic in MM, the 13-valent conjugated vaccine has never been tested in clonal plasma cell disorders. We evaluated its immunogenicity for 7 serotypes in 20 patients \geq 50 years of age with smoldering multiple myeloma (SMM) pre and post routine-vaccination with PCV13.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.heliyon.2017.e00441>

2405-8440/   2017 Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Concentrations of IgG specific for 7 serotypes were measured at baseline, 1, 6, and 12 months after vaccination by standardized ELISA and an Opsonophagocytic Assay (OPA). The primary endpoint was the proportion of patients responding to at least 5 of the 7 serotypes by ELISA at one month.

At 1 month post vaccination, 12 patients (60%) were responders by ELISA, among whom 8 were also responders by OPA. At 6 months, 6 (30% of total) of the 12 responders had persistent immunity, and only 2 (10% of total) at 12 months. These results suggested a partial response in this population and a rapid decrease in antibody levels in the first months of vaccination.

Although one injection of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine is immunogenic in some patients with SMM, the response is transient. Repeated injections are likely to be needed for effective and sustained protection.

Keywords: Immunology, Vaccines, Infectious disease

1. Introduction

Smoldering multiple myeloma (SMM) is an asymptomatic clonal plasma cell (PC) disorder defined by the presence of a serum monoclonal protein of ≥ 30 g/L and/or 10% to 60% clonal bone marrow PCs with no evidence of end-organ damage [1]. SMM is distinguished from monoclonal gammopathy of undermined significance (MGUS) primarily for clinical reasons, because the risk of progression to malignancy in the first 5 years after diagnosis is different: 10% per year in SMM vs 1% per year in MGUS [2].

SMM is biologically heterogeneous; it is a clinically defined entity comprising a subset of patients with biological premalignancy (ie, MGUS) and a subset with biological malignancy (ie, multiple myeloma) who have not yet developed hypercalcemia, renal failure, anemia, or lytic bone lesions and/or other myeloma-defining events [3]. Thus, SMM includes patients who behave like those with MGUS (with a very low rate of progression) and those who develop clinical symptoms and end-organ damage within the first 2 years of diagnosis [4]. It is therefore very important to achieve a good prevention against infectious agents in this subpopulation of patients who can rapidly progress into multiple myeloma a more severe and immune compromised form of the disease particularly at risk for pneumococcal infection. Immunoglobulin levels and the ability to mount a humoral response to infection or vaccination are reduced in patients with MM [5]. Infectious complications, and particularly invasive pneumococcal infections, are frequent during MM course (incidence is 15 times higher than that observed in a control population) and represent a major cause of morbidity and mortality [6, 7].

Two pneumococcal vaccines are available in France: a 23-valent polysaccharide vaccine (Pneumo23[®], PPV23) and a 13-valent conjugate polysaccharide vaccine

2 <http://dx.doi.org/10.1016/j.heliyon.2017.e00441>
2405-8440/© 2017 Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

(Prevenar13[®], PCV13). Both vaccines induce the synthesis of anti-capsular IgG with both neutralizing and opsonizing capacities [8].

The 23 polysaccharides included in PPV23 are involved in 85–90% of invasive pneumococcal infections in Europe and in the USA [9]. Vaccination with PPV23 is recommended for at-risk adults and children > 2 years of age. Since this unconjugated vaccine does not induce antigen memory, a booster is sometimes proposed after 5 years. However, the recall responses are sometimes impaired by the hyporesponse phenomenon observed for polysaccharide vaccine [10] [11].

The PCV13 vaccine contains purified capsular polysaccharide from 13 serotypes conjugated to a mutant of diphtheria toxoid (CRM197). The coupling of T-cell independent pneumococcal polysaccharide antigens to a carrier protein transforms them into T-cell dependent antigens. The conjugate vaccine is recommended for children less than 5 year of age and licensed for adults and immunocompromised patients. Many studies in immunocompetent children have shown clinical efficacy in terms of immunization and protection against invasive disease, but also in terms of reducing the percentage of infection and carriage of penicillin-resistant and nonresistant *Pneumococcus* (PRP) strains [12, 13, 14].

In MM patients, PPV23 is poorly immunogenic, with ~40% response rate [15, 16]. Furthermore, there is an increased risk of inducing hyporesponsiveness after multiple injections of polysaccharide antigen performed every 5 years.

Most data on immunogenicity of these pneumococcal vaccines, used alone or in a combined schedule, were collected from children, HIV positive individuals, transplant recipients, or sickle cell disease patients [17]. To the best of our knowledge, there are no studies on the immunogenicity of PCV13 among MM patients, and there is no referenced strategy for pneumococcal vaccination in this population. Thus, there is an urgent need to analyze the potential benefit of PCV administered in this at-risk population. Therefore, we conducted a pilot study in 20 patients with smoldering multiple myeloma to determine the immunogenicity of PCV13 and the persistence of the response for one year post vaccination.

2. Material and methods

2.1. Study population

The study protocol was approved by the ethical committee (Protocol 2012/27NICB) and we received informed consent for all patients.

20 patients aged ≥ 50 years with smoldering multiple myeloma (SMM) who had not previously received a pneumococcal vaccine, were enrolled in this study for routine-vaccination against pneumococcus. Patients were defined as SMM if they met the following criteria: 1) Serum paraprotein ≥ 30 g/L, AND/OR 2) Clonal

plasma cells from 10% to 60% on bone marrow sample, AND 3) No myeloma-related organ impairment. Patients were enrolled in 2012 in St Louis Hospital and Cochin Hospital.

2.2. Vaccination

SMM patients were included after having received one dose of PCV13 (Prevenar13[®]; Pfizer) in during a routine-visit according to recommendations (baseline). Blood samples were obtained at baseline and 1 month, 6 months, and 12 months.

2.3. Serological evaluation

2.3.1. ELISA

IgG antibody concentrations for seven serotypes (4, 6B, 9 V, 14, 18C, 19F and 23F) were determined using a modified enzyme linked immunosorbent [www.vaccine.uab.edu] [18]. We choose to analyse the seven PCV7 serotypes for the availability of these serology in our lab, their reproducibility and robustness.

Briefly, 96-well plates (Corning, Inc., Corning, NY) were coated with a serotype-specific pneumococcal PS antigen (American Type Culture Collection, Manassas, VA) and incubated 5 hours at 37 °C. Reference sera (007sp), QC sera, or patient specimens were pre-absorbed with 5 µg/ml pneumococcal C-polysaccharide (Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark) and 10 µg/ml serotype 22F capsular polysaccharide (American Type Culture Collection) for 30 minutes at room temperature before being serially diluted. After washing plates, serially diluted serum was added and plates were incubated at room temperature for 2 hours. Plates were then washed, and alkaline phosphatase-conjugated goat anti-human immunoglobulin G (IgG; Southern Biotech, Birmingham, AL) was added. After another 2 hour incubation and washing, substrate (p-nitrophenyl phosphate in diethanolamine buffer, pH 9.8) was added to the plates. After a final incubation, the optical density was measured at 405 nm. Anti-pneumococcal antibody levels were determined in each specimen by analysis of linear regression plots compared with the reference serum (007sp) (National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC)).

There is in the paediatric population a threshold of protection commonly admitted by 0.35 µg/ml, which serves as a reference for all pneumococcal immunogenicity studies in children. Currently, there are no validated correlates of pneumococcal vaccine protection in adults. Several studies have defined a response criteria for pneumococcal vaccine particularly adapted for evaluation of long-term protection in immunocompromised patients [19, 20]. These criteria include: a two fold

increase in serotype specific IgG vaccine concentration and an IgG-concentration $\geq 1\mu\text{g/ml}$ over the pre-vaccination levels [21].

2.3.2. Opsonophagocytic assay

Whereas ELISA is at that time the gold standard method for the evaluation of pneumococcal vaccine immunogenicity, Opsonophagocytic assay gives more information about how functional the immune response is and results would be more effective and relevant to in vivo immunity when evaluated by OPA, and tend to replace ELISA for vaccine immunogenicity evaluation. Opsonophagocytic activities of antibodies for seven serotypes (4, 6B, 9 V, 14, 18C, 19F and 23F) were measured by a multiplexed opsonophagocytic killing assay (MOPA, [www.vaccine.uab.edu] [22]). All serum samples were incubated at 56 °C for 30 min before being tested. Sera were serially diluted in round-bottom 96-well plates (Corning Inc., Corning, NY). Frozen aliquots of target pneumococci were thawed, washed twice, diluted to a bacterial density of $\sim 50,000\text{CFU/ml}$, and added to the plates. After 30 min of incubation at room temperature with shaking at 700 rpm, complement and HL60 cells (ATCC) that had been differentiated to phagocytes were added to each well. Plates were incubated in a tissue culture incubator (37 °C, 5% CO₂) with shaking at 700 rpm. After a 45-min incubation, plates were placed on ice for 20 min. Ten μl of each well were spotted onto four different Todd-Hewitt broth-yeast extract agar plates. After application of an overlay agar containing one of four antibiotics to each agar plate and overnight incubation at 37 °C, the number of bacterial colonies in the agar plates was enumerated.

Opsonization titers (OT) were defined as interpolated reciprocal serum dilution that kills 50% of the bacteria in the assay. The assay sensitivity is the lowest dilution of sera tested (limit of detection LOD), which is normally 4 for undiluted sera, and is the same for each serotype. However, to quantify functional antibodies with more precision, the lower limit of quantification was determined for each serotype-specific assay during assay validation.

The LLOQs for the various serotypes were: serotype 4: 24; serotype 6B: 131; serotype 9 V: 38; serotype 14: 85; serotype 18C: 47; serotype 19F: 74 and serotype 23F: 30.

For OPA titers higher than the LLOQ were considered accurate and their values were reported. Titters below the LLOQ were set to a value of 2 (half of LOD) [23].

In our study, immunological response for a serotype was defined as at least an Opsonisation titer \geq LLOQ and four fold increase from baseline in OPA.

2.4. Statistics analysis

Primary endpoint was the proportion of patients developing an immunological response toward at least 70% of serotypes at one month in ELISA. These Patients, developing an immunological response toward at least 70% of serotypes at one month, were defined as responders. Patient characteristics were compared using Mann-Whitney's Ranks test for quantitative variable and Fisher's exact test for categorical variable. The percentages of responders are provided together with their 95% confidence interval (95%CI). Quantitative variables were compared using Student's *t*-test and categorical variables were compared using the chi-square test. All tests were 2-sided at the level of 0.05. All analyses were performed using Graph Pad Prism 5.0 software (GraphPad, San Diego, CA).

3. Results

3.1. Population data

Twenty patients with SMM were recruited for the study. The median age of the study population was 62 years (range 50–74) with 15 females (75%) and 5 males (25%). Fourteen patients had IgG MM, five had IgA MM, and one had Bence Jones MM. No one received a treatment for their SMM. We compared the age, gender, type and quantity of monoclonal immunoglobulin, quantity of IgG – IgA – IgM and percentage of plasma cells in bone marrow (Table 1). We also did a phenotypic analysis in our patients (CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD5, CD38, CD27, CD16-CD56)(data not shown). We did not find any significant differences between responders and non-responders group.

3.2. Pneumococcal serotype-specific Ig concentrations and titers

3.2.1. Prior to immunization

There were no significance differences at baseline in antibody levels and titers between the Non-Responders group (NR) (n = 8) and Responders group (R) (n = 12) (Table 2).

Table 1. Demographics and Disease Status.

N = 20	Non-responders	Responders	p-value
Age: median (range) years	63.3 (56.5–74.6)	62.6 (56.3–73.1)	0.7 [£]
Gender: female/male	5/3	10/2	0.35 [#]
Predominant type of monoclonal Ig: IgG/IgA/Bencejones	5/2/1	9/3/0	0.76 [#]

[#]referred to Fisher's exact test, [£] referred to Mann-Whitney's Ranks test.

Table 2. Geometric mean (95% CI) Concentrations by ELISA (a) and Titers by OPA (b) of IgG Antibody to Seven Pneumococcal Serotypes.

a)					
Serotypes		Baseline	M1	M6	M12
4	NR	0.21 (0.1–0.4)	0.56 ^S (0.3–1.2)	0.35 (0.1–0.8)	0.37 (0.1–0.9)
	R	0.26 (0.1–0.5)	1.36 ^S (0.5–3.5)	0.65 (0.3–1.4)	0.43 (0.2–0.8)
6B	NR	0.68 (0.4–1.2)	0.95 (0.4–2.1)	0.82 (0.4–1.9)	0.71 (0.3–1.6)
	R	0.69 (0.5–1.1)	3.31 ^{S,#} (1.9–5.6)	1.15 (0.6–2.2)	1.08 (0.5–2.2)
9V	NR	0.53 (0.3–1.0)	0.78 (0.4–1.5)	0.61 (0.2–1.5)	0.47 (0.2–1.2)
	R	0.52 (0.3–0.9)	2.93 ^{S,#} (1.4–6.0)	1.04 (0.5–2.3)	0.92 (0.4–1.9)
14	NR	1.08 (0.4–2.9)	3.47 (1.0–12)	2.71 (0.9–8.1)	2.05 (0.4–10.0)
	R	1.08 (0.6–2.0)	10.84 ^S (5.1–23.0)	5.7 ^S (2.6–12.6)	3.75 ^S (1.3–10.5)
18C	NR	0.53 (0.3–1.0)	1.46 ^S (0.4–1.5)	0.76 (0.3–1.8)	0.68 (0.2–2.0)
	R	0.57 (0.3–1.0)	4.59 ^{S,#} 2.5–8.4)	1.36 ^S (0.7–2.5)	1.29 (0.9–1.8)
19F	NR	1.13 (0.6–2.0)	2.51 ^S (1.4–4.5)	1.27 (0.7–2.4)	1.45 (0.7–3.0)
	R	1.15 (0.6–2.3)	5.39 ^{S,#} (2.9–9.9)	3.06 ^{S,#} (1.5–6.1)	1.56 (0.7–3.3)
23F	NR	0.51 (0.2–1.1)	1.3 (0.4–4.0)	0.96 (0.3–3.0)	0.85 (0.2–3.2)
	R	0.62 (0.2–1.7)	3.92 ^S (1.2–12.8)	1.18 (0.4–3.2)	0.98 (0.4–2.6)
b)					
Serotypes		Baseline	M1	M6	M12
4	NR	2 (2–2)	13.4 (4.4–40.5)	6.4 (2.5–16.2)	4.2 (1.8–9.8)
	R	2 (2–2)	19.9 ^S (3.7–107.1)	29.5 ^{S,#} (6.4–136.0)	10.4 ^S (1.2–86.9)
6B	NR	4.4 (1.4–14.2)	7.5 (1.6–35.4)	4.8 (1.3–18.4)	3.2 (1.1–8.7)
	R	2 (2–2)	259.7 ^{S,#} (43.0–1568)	44.1 ^S (5.1–382.3)	25.5 ^S (2.4–271.7)
9V	NR	3.7 (1.5–9.6)	4.8 (1.7–13.2)	5.6 (1.7–18.6)	4.3 (1.4–13.7)
	R	3.2 (1.0–10.1)	133.9 ^{S,#} (50.0–358.4)	21.5 (3.8–122.5)	5.4 (1.1–26.2)
14	NR	4.2 (1.4–12.3)	43.9 ^S (7.1–269.7)	32.9 ^S (6.6–165.4)	4.9 (1.3–19.0)
	R	3.8 (0.8–18.0)	529.7 ^{S,#} (62.7–4474)	268.7 ^S (42.3–1707)	60.7 ^S (5.0–736.9)
18C	NR	5.3 (1.7–16.2)	45.6 ^S (10.2–203.8)	14.6 (3.1–69.3)	6.0 (1.7–21.6)
	R	3.5 (0.9–12.7)	618.6 ^{S,#} (180.2–2124)	182.9 ^S (87.3–383.6)	67.1 ^S (9.0–496.8)
19F	NR	3.0 (1.2–7.0)	5.9 (1.7–20.8)	4.2 (1.4–12.7)	3.2 (1.1–8.9)
	R	3.4 (0.9–12.5)	113.6 ^{S,#} (11.6–1112)	14.2 (1.4–145.3)	19.9 (1.4–290.7)
23F	NR	2.4 (1.6–3.8)	8.7 (2.1–32.9)	4.3 (1.4–13.4)	2.8 (1.3–5.8)
	R	4.2 (1.2–14.8)	207.6 ^{S,#} (33.8–1273)	35.3 (4.6–270.0)	24.8 (4–156)

Note: Responders at one month were defined as at least an IgG- two fold increased from baseline and ≥ 1 $\mu\text{g/ml}$ by ELISA and as at least a four-fold increased from baseline and \geq lower limits of quantification (LLOQ) by OPA, for more than 5 serotypes. Data are in geometric means: antibody concentrations are in $\mu\text{g/ml}$ (95% confidence limits). R: Reponders group, NR: Non-reponders group, ^S $p < 0.05$ vs. baseline, [#] $p < 0.05$ vs. NR group.

By ELISA, only serotypes 14 (NR: 1.08 µg/ml (0.4–2.9)/R: 1.08 (0.6–2.0) µg/ml) and 19F (NR: 1.13 µg/ml (0.6–2.0)/R: 1.15 µg/ml (0.6–2.3) µg/ml) had antibodies levels above the 1 µg/ml threshold in pre-vaccination samples. Nine patients (45%) had antibody concentrations \geq 1 µg/ml for these two serotypes. The lowest antibody level was for serotype 4, with a GMC of 0.21 µg/ml (0.1–0.4) for Non Responders group and 0.26 µg/ml (0.1–0.5) for Responders group. Two patients (one in both groups) (10%) had antibody concentrations \geq 1 µg/ml for this serotype. Six patients (30%) had as antibody concentrations \geq 1 µg/ml in ELISA for at least 3 serotypes (data not shown).

By OPA none of the serotypes had GMTs above the LLOQ at baseline. The highest antibody titer was for serotype 18C, with a GMT of 5.3 (1.7–16.2) for Non Responders group. As in ELISA, serotype 4 had the lowest titer (NR: 2 (2–2)/R: 2 (2–2)).

3.2.2. Impact of vaccination

At 1 month post vaccination, 12 patients (60%) were responders by ELISA (Fig. 1a). In the Non-Responder group, the GMC increased significantly ($>$ 2-fold) from baseline for 3 serotypes: serotypes 4 (0.21 µg/ml to 0.56 µg/ml, $p = 0.026$), 18C (0.53 µg/ml to 1.46 µg/ml, $p = 0.037$), and 19F (1.13 µg/ml to 2.51 µg/ml, $p = 0.021$). GMC increased significantly in the Responders group for all serotypes from baseline (Table 2). GMCs in the Responders group were significantly higher than those in the Non-Responders group for serotypes 6B (3.31 µg/ml vs 0.95 µg/ml; $p = 0.011$), 9 V (2.93 µg/ml vs 0.78 µg/ml; $p = 0.009$), 18C (4.59 µg/ml vs 1.46 µg/ml; $p = 0.005$) and 19F (5.39 µg/ml vs 2.51 µg/ml; $p = 0.035$).

Serotype 4 was the least immunogenic serotype with a GMC total (define as GMC of R and NR together) of 0.87 µg/ml. Only 8 patients (40%) had antibodies levels \geq 1 µg/ml for this serotype. Serotype 14 had the highest GMC total with 6.13 µg/ml. 18 patients (95%) had antibodies levels \geq 1 µg/ml for this serotype.

The functional activity of the anti-polysaccharide antibody was assessed by the Opsonophagocytic Assay (OPA) (Fig. 1b). In our study, 8 patients (40%) had functional antibodies against *Streptococcus pneumoniae* at one month after immunization and were considered responders. For the Non-Responders group, none of the seven serotypes had GMTs above the LLOQ. In the Responders group, antibody titers from all serotypes increased significantly ($>$ 4 fold) from baseline. Except for serotype 4, antibody titers for all serotypes in the Responders group were significantly higher than those of Non-Responders group.

These results show that despite the overall low response rate (40%), PCV13 induces the production of functional antibodies.

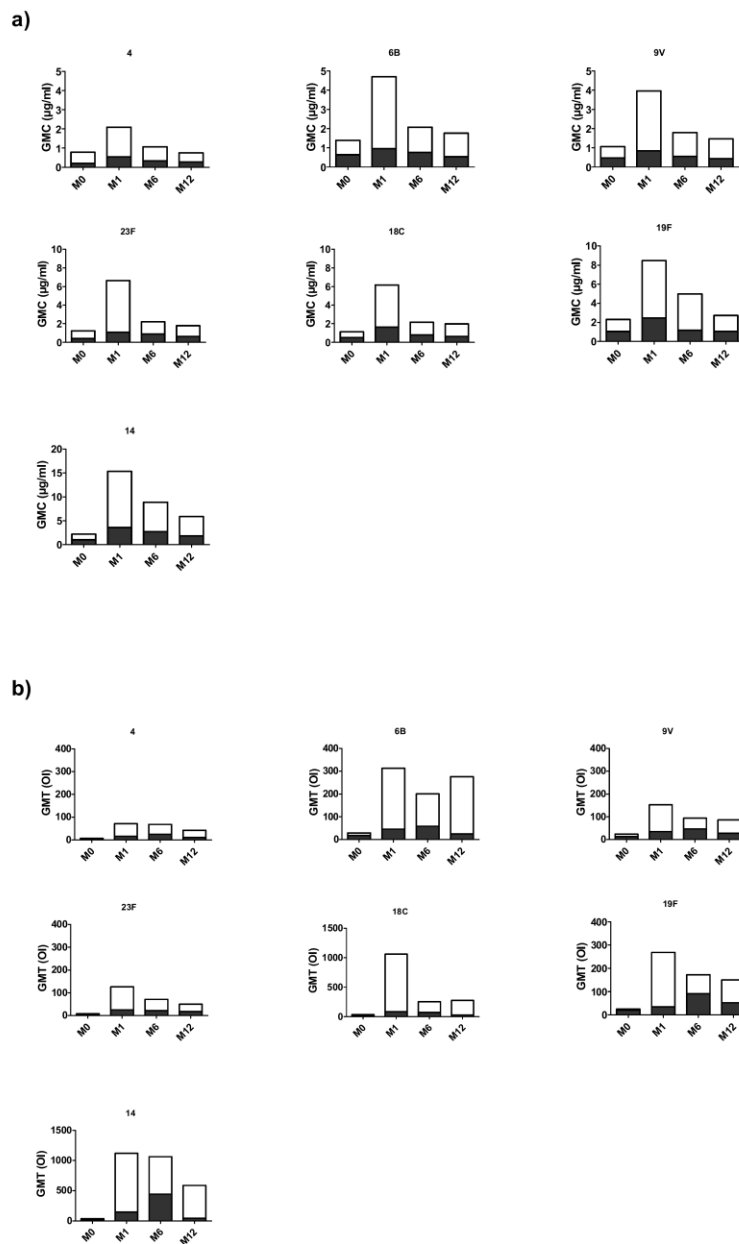


Fig. 1. Geometric mean of concentration in µg/ml (GMC) by ELISA(a) and titers (GMT) by OPA (b) of IgG Antibody to Seven Pneumococcal Serotypes between Responders and Non Responders. Comparison between the GMC by ELISA (a) and GMT by OPA (b) of the Responders (in white) and Non Responders (in grey).

9 <http://dx.doi.org/10.1016/j.heliyon.2017.e00441>
 2405-8440/© 2017 Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.

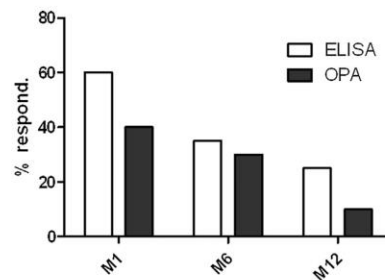


Fig. 2. Percentages of responders for pneumococcal vaccine at 1, 6 and 12 months after vaccine. For ELISA, responders patients for each serotype at a specific time point were defined as at least a twofold increase in IgG anti-PS concentration from baseline and a concentration of IgG anti-PS ≥ 1 $\mu\text{g/ml}$ for each serotype. Patients were assigned as responder when more than 5 serotypes upon the 7 serotypes tested fit with those criteria. For OPA, responders patients for each serotype at a specific time point were defined as at least a fourfold increase in Ig anti-PS titers from baseline and a titer of Ig anti-PS \geq LLOQ for each serotype. Patients were assigned as responder when more than 5 serotypes upon the 7 serotypes tested fit with those criteria.

3.2.3. Persistence of the response after immunization

The proportion of responders at 6 months is shown in Fig. 2. Seven (35%) patients had persistent immunity by ELISA and only six (30%) by OPA.

By ELISA, we observed a decrease in GMC for all serotypes in both groups compared to those in the one month post immunization samples (Table 2). No serotypes were significantly higher than baseline for Non-Responders group. GMCs in this group were ≥ 1 $\mu\text{g/ml}$ for only serotypes 14 [2.71 $\mu\text{g/ml}$ (0.9–8.1)] and 19F [1.27 $\mu\text{g/ml}$ (0.7–2.4)]. The decrease in GMCs from 1 month to 6 months after immunization was significant in the Responders group for serotypes 6B ($p = 0.009$) and 18C ($p < 0.001$). Despite this decrease in GMC, all serotypes except serotype 4 [0.65 $\mu\text{g/ml}$ (0.3–1.4)] had a GMC ≥ 1 $\mu\text{g/ml}$.

A similar decrease was observed in OPA in both groups (Fig. 3). For the Responders group, all serotypes except 9 V, 19F and 23F were significantly higher than the baseline. But only serotype 4 ($p = 0.0247$) was significantly higher than the Non-Responders group.

Only 5 patients (25%) were considered to be responders by ELISA at 12 months after immunization (Fig. 2). Only serotype 14 had a GMC significantly higher than baseline ($p = 0.022$) after one year. For the six remaining serotypes, a small continued decrease was observed and GMC reached baseline levels. There were no significant differences between Non-Responders and Responders groups.

By OPA, we found only 2 patients (10%) to be responders at 12 months after immunization. Serotype 18C was the only serotype with GMTs above the LLOQ with all others below this threshold one year after immunization.

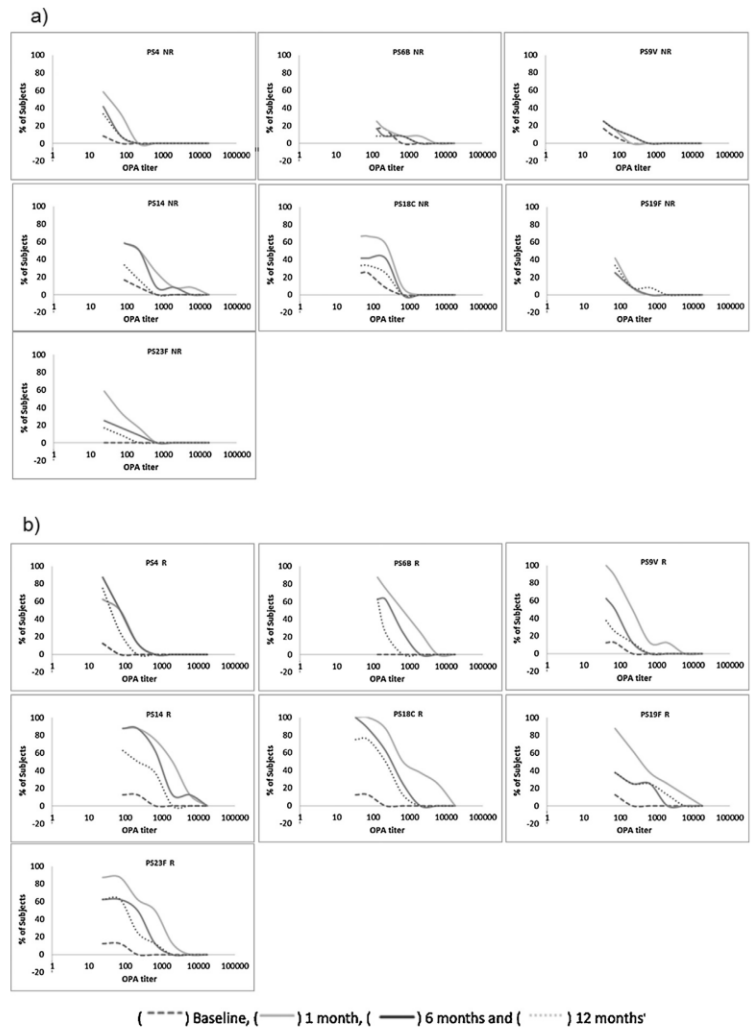


Fig. 3. Reverse Cumulative Distribution Curves for OPA titers. Anti-pneumococcal OPA titers are depicted on the x-axis using a log scale. The cumulative percentage of Subjects with given OPA titers is in the y-axis for patients considered as Non Responders (NR) in a) and as Responders (R) in b).

4. Discussion

Here, we evaluated in a pilot study the immunogenicity of PCV13 using both OPA and ELISA methods in 20 patients with smoldering multiple myeloma (SMM) and the persistence of a protective immunity for one year after vaccination. Although the conjugated vaccine is immunogenic at one month, the persistence of antibody is

11 <http://dx.doi.org/10.1016/j.heliyon.2017.e00441>
 2405-8440/© 2017 Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

weak with a severe decrease at 6 month after immunization with antibody concentrations close to basal levels one year post vaccine.

To our knowledge, this study is the first to evaluate the immunogenicity of pneumococcal vaccination in SMM patients. Pneumococcal vaccines have been evaluated in MGUS and in MM patients [24, 25]. However, SMM patients differ from MM patients as they have no evidence of end-organ damage and/or other myeloma-defining events. SMM patients also differ from MGUS because the risk of progression to malignancy in the first 5 years after diagnosis is 10% per year in SMM vs. 1% per year in MGUS. It is therefore very important to achieve a good protection against infectious agents in this subpopulation of patients who can rapidly progress into multiple myeloma a more severe and immune compromised form of the disease particularly at risk for pneumococcal infection [7].

There have been multiple studies exploring vaccination of MM patients with the polysaccharide vaccine. For example, Hinge et al. investigated the serological response to Pneumovax[®] in sixty MM patients [16]. They found that 33% of the patients responded to the vaccine, and that this response was statistically associated with the severity of the disease and the response to chemotherapy. Robertson et al. found, in a random group of MM patients, a 40% response one month post vaccination [26]. Schmid et al. found that 43% of patients with MM or Waldenström at different stages of the diseases responded to the vaccine [25]. Taken together, these studies demonstrated that PPV23 is poorly immunogenic in MM patients with response rates ranging from 33% to 43%.

So far, ELISA was the only technique used to quantify antibody levels in these studies. Methods able to evaluate the opsonophagocytic capabilities of anti-PS antibodies have been developed based on the idea that the primary mechanism for protection against invasive pneumococcal disease is mediated by opsonophagocytic antibodies. Therefore, the in-vitro determination of opsonophagocytic activity of antibodies to pneumococcal capsular polysaccharide may represent a better surrogate marker for in-vivo protection [27]. Poor correlations between ELISA and OPA have been found in particular populations such as elderly adults and immunodeficient patients who produced antibodies with low opsonophagocytic capabilities [27]. These nonfunctional antibodies may be able to bind to polysaccharide coated on a plate and thus be positive on ELISA, but are not able to opsonize whole bacteria [28]. Interestingly, a recent paper found a good correlation between ELISA and OPA after pneumococcal vaccine in MGUS but not in MM patients [24]. In our hands as in MGUS patients, we found a good correlation between ELISA and OPA in SMM patients (supplementary data), except for baseline with only 2 serotypes (14 and 18C) on the seven tested which had good correlations between the two tests (Fig. 4).

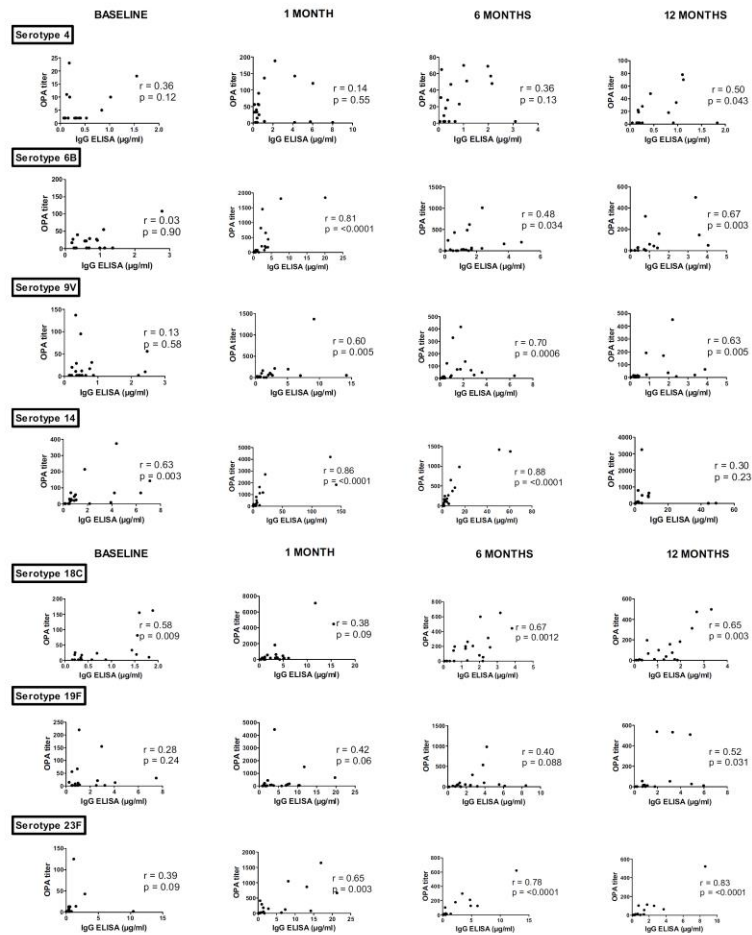


Fig. 4. Correlation between anti-pneumococcal Ig concentration (ELISA) and opsonophagocytic antibody titers (OPA) per serotypes and per visite. Values on the *x* and *y* axes differ between the different pneumococcal serotypes. *r* and *p* values were calculated by the Spearman rank sum test.

One injection of PCV13 in SMM patients induces the production of functional antibodies in only 40% of recipients one month after immunization and results in poor long-term protection, with only 10% of recipients positive one year after immunization.

Due to the heterogeneity of patients enrolled in the various clinical trials performed so far to evaluate pneumococcal vaccine efficacy, the small size of our population (20 patients) and the different techniques used to evaluate the immunogenicity of the anti-PS response (ELISA and OPA), caution should be used when comparing our results with those of previous studies. However, the percentage of responders,

evaluated by ELISA in our SMM population, seems to be quite similar with those reported in MM patients vaccinated with either PPV or PCV.

The poor immunogenicity of one dose of pneumococcal conjugated vaccine has been reported in immunocompromised patients with an other hematological malignancy. Sinisalo et al. evaluated the immunogenicity of one dose of the 7-valent conjugate vaccine in patients with chronic lymphocytic leukemia [29]. They found that 40% of the patients responded to at least 6 serotypes of the vaccine, and that the timing for vaccination during the course of the disease has an impact on this response. Highest antibody responses were found in patients vaccinated in an early stage of disease (i.e. before initiation of chemotherapy and the development of hypogammaglobulinaemia).

Some authors suggest that 2 or 3 doses of PCV (or higher single doses) could increase the immunogenicity of the vaccine in immunocompromised patients. Indeed, in a recent study in elderly (patients >70 years) [30], vaccination with a double dose of PCV (1 ml) was more immunogenic than vaccination with a single dose. Such strategy could be useful to achieve good protection against pneumococcal infection with PCV vaccine in SMM. In addition, administration of PPV23 at least two month after PCV has been recommended in some immunocompromised patients. The conjugate and non-conjugate vaccines activate the T-dependent and T-independent anti-pneumococcal responses respectively and enlarge the serotype coverage to 23 pneumococcal serotypes. Such strategy could also be of help to increase vaccine immunogenicity and durability of the response.

Declarations

Author contribution statement

Mathilde Bahuaud: Conceived and designed the experiments; Performed the experiments; Analyzed and interpreted the data; Contributed reagents, materials, analysis tools or data; Wrote the paper.

Helene Bodilis: Conceived and designed the experiments; Analyzed and interpreted the data.

Marion Malphettes, Anais Maugard Landre, Didier Bouscary, Odile Launay, Jean-Paul Fermand: Conceived and designed the experiments.

Caroline Matondo: Performed the experiments.

Frédéric Batteux: Contributed reagents, materials, analysis tools or data; Wrote the paper.

Funding statement

This work was supported by Pfizer Inc. (RFIZ2012).

Competing interest statement

The authors declare the following conflict of interests: Odile Launay; participated in industry-sponsored clinical trials that included Pneumococcal vaccines

Additional information

No additional information is available for this paper.

Acknowledgements

The author thanks Robert Burton for his critical reading of the manuscript.

References

- [1] S.V. Rajkumar, M. Dimopoulos, A. Palumbo, J. Blade, G. Merlini, M.V. Mateos, S. Kumar, J. Hillengass, E. Kastritis, P. Richardson, O. Landgren, B. Paiva, A. Dispenzieri, B. Weiss, X. LeLeu, S. Zweegman, S. Lonial, L. Rosinol, E. Zamagni, S. Jagannath, O. Sezer, S.Y. Kristinsson, J. Caers, S.Z. Usmani, J.J. Lahuerta, H.E. Johnsen, M. Beksac, M. Cavo, H. Goldschmidt, E. Terpos, R.A. Kyle, K.C. Anderson, B.G. Durie, J.F. Miguel, International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma, *Lancet Oncol.* 15 (12) (2014) e538–48.
- [2] R.A. Kyle, E.D. Remstein, T.M. Therneau, A. Dispenzieri, P.J. Kurtin, J.M. Hodnefield, D.R. Larson, M.F. Plevak, D.F. Jelinek, R. Fonseca, L.J. Melton 3rd, S.V. Rajkumar, Clinical course and prognosis of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma, *N. Engl. J. Med.* 356 (25) (2007) 2582–2590.
- [3] S.V. Rajkumar, Multiple myeloma: 2012 update on diagnosis, risk-stratification, and management, *Am. J. Hematol.* 87 (1) (2012) 78–88.
- [4] O. Landgren, A. Waxman, Multiple myeloma precursor disease, *JAMA* 304 (21) (2010) 2397–2404.
- [5] G. Kalambokis, L. Christou, E. Tsianos, Multiple myeloma presenting with an acute bacterial infection, *Int. J. Lab Hematol.* 31 (4) (2009) 375–383.
- [6] R. Perry, R. Heibel, M. Oken, Influence of treatment and response status on infection risk in multiple myeloma, *Am. J. Med.* 71 (6) (1981) 935–940.
- [7] J. Twoney, Infections complicating multiple myeloma and chronic lymphocytic leukemia, *Arch. Intern. Med.* 132 (4) (1973) 562–565.

- [8] C. Felmann, R. Anderson, Review: current and new generation pneumococcal vaccines, *J. Infect.* 69 (4) (2014) 309–325.
- [9] WHO, Pneumococcal Vaccines WHO positionpaper 2012, *Weekly Epidemiological Report*, 2012. <http://www.who.int/wer>.
- [10] E.A. Clutterbuck, R. Lazarus, L.M. Yu, J. Bowman, E.A. Bateman, L. Diggle, B. Angus, T.E. Peto, P.C. Beverley, D. Mant, A.J. Pollard, Pneumococcal conjugate and plain polysaccharide vaccines have divergent effects on antigen-specific B cells, *J. Infect. Dis.* 205 (9) (2012) 1408–1416.
- [11] K.L. O'Brien, M. Hochman, D. Goldblatt, Combined schedules of pneumococcal conjugate and polysaccharide vaccines: is hyporesponsiveness an issue? *Lancet Infect. Dis.* 7 (9) (2007) 597–606.
- [12] M. Rose, M. Gruendler, R. Schubert, R. Kitz, J. Schulze, S. Zielen, Safety and immunogenicity of sequential pneumococcal immunization in preschool asthmatics, *Vaccine* 27 (38) (2009) 5259–5264.
- [13] D. Navarro, A. Escribano, L. Cebrián, C. Gimeno, L. García-Maset, J. García-de-Lomas, Spanish Pneumococcal Infection Study Network, Type-specific antibodies to pneumococcal capsular polysaccharide acquired either naturally or after vaccination with Prevenar in Children with underlying chronic or recurrent lung diseases, *Clin. Vaccine Immunol.* 13 (6) (2006) 665–670.
- [14] M. Rose, C. Hey, S. Kujumdshiev, V. Gall, R. Schubertand, S. Zielen, Immunogenicity of pneumococcal vaccination of patients with cochlear implants, *J. Infec. Dis.* 190 (3) (2003) 551–557.
- [15] H.M. Lazarus, M. Lederman, A. Lubin, R.H. Herzig, G. Schiffman, P. Jones, A. Wine, H.M. Rodman, Pneumococcal vaccination: the response of patients with multiple myeloma, *Am. J. Med.* 69 (3) (1980) 419–439.
- [16] M. Hinge, H. Hingels, H. Slotved, I. Mølle, Serologic response to a 23-valent pneumococcal vaccine administered prior to autologous stem cell transplantation in patients with multiple myeloma, *APMIS* 120 (11) (2012) 935–940.
- [17] M. Fletcher, P. Balmer, E. Bonnet, N. Dartois, PCVs in individuals at increased risk of pneumococcal disease: a literature review, *Expert Rev. Vaccines* 14 (7) (2015) 975–1030.
- [18] C.M. Wernette, C.E. Frasch, D. Madore, G. Carlone, D. Goldblatt, B. Plikaytis, W. Benjamin, S.A. Quataert, S. Hildreth, D.J. Sikkema, H. Käyhty, I. Jonsdottir, M.H. Nahm, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay for quantification of Human Antibodies to Pneumococcal Polysaccharides, *Clin. Diagn. Lab Immunol.* 10 (4) (2003) 514–519.

- [19] F. Lombardi, S. Belmonti, M. Fabbiani, M. Morandi, B. Rossetti, G. Tordini, R. Cauda, A. De Luca, S. Di Giambenedetto, F. Montagnani, Immunogenicity and safety of the 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine versus the 23-Valent Polysaccharide vaccine in Unvaccinated HIV-Infected Adults: A pilot Prospective Controlled Study, *PLoS One* 11 (6) (2016) e0156523.
- [20] A. de Roux, N. Schmidt, M. Rose, S. Zielen, M. Pletz, H. Lode, Immunogenicity of the pneumococcal polysaccharide vaccine in COPD patients. The effect of systemic steroids, *Respir. Med.* 98 (12) (2004) 1187–1194.
- [21] C. Sadlier, S. O'Dea, K. Bennett, J. Dunne, N. Conlon, C. Bergin, Immunological efficacy of pneumococcal vaccine strategies in HIV-infected adults: a randomized clinical trial, *Sci. Rep.* 6 (2016) 32076.
- [22] R.L. Burton, M.H. Nahm, Development and validation of a fourfold multiplexed opsonization assay (MOPA4) for pneumococcal antibodies, *Clin. Vaccine Immunol.* 13 (9) (2006) 1004–1009.
- [23] C. Juergens, S. Patterson, J. Trammel, D. Greenberg, N. Givon-Lavi, D. Cooper, A. Gurtman, W.C. Gruber, D.A. Scott, R. Dagan, Post Hoc analysis of a randomized double-blind trial of the correlation of functional and binding antibody responses elicited by the 13-valent and 7-valent pneumococcal conjugate vaccines and association with nasopharyngeal colonization, *Clin. Vaccine Immunol.* 21 (9) (2014) 1277–1281.
- [24] J. Karlsson, L. Roalfe, H. Hogevik, M. Zancolli, B. Andréasson, D. Goldblatt, C. Wennerås, Poor correlation between pneumococcal IgG and IgM titers and opsonophagocytic activity in vaccinated patients with multiple myeloma and waldenstrom's macroglobulinemia, *Clin. Vaccine Immunol.* 23 (4) (2016) 379–385.
- [25] G.P. Schmid, R.P. Smith, A.L. Baltch, C.A. Hall, G. Schiffman, Antibody response to pneumococcal vaccine in patients with multiple myeloma, *J. Infect. Dis.* 143 (4) (1981) 590–597.
- [26] J.D. Robertson, K. Nagesh, S.N. Jowitt, M. Dougal, H. Anderson, K. Mutton, M. Zambon, J.H. Scarffe, Immunogenicity of vaccination against influenza: *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* type B in patients with multiple myeloma, *Br. J. Cancer* 82 (7) (2000) 1261–1265.
- [27] J.Y. Song, M.A. Moseley, R.L. Burton, M.H. Nahm, Pneumococcal vaccine and opsonic pneumococcal antibody, *J. Infect. Chemother.* 19 (3) (2013) 412–425.

- [28] S. Park, M.H. Nahm, Older Adults have a low Capacity to opsonize Pneumococci due to low IgM Antibody response to Pneumococcal Vaccinations, *Infect. Immun.* 79 (1) (2017) 314–320.
- [29] M. Sinisalo, J. Vilpo, M. Itälä, M. Väkeväinen, J. Taurio, J. Aittoniemi, Antibody response to 7-valent conjugated pneumococcal vaccine in patients with chronic lymphocytic leukaemia, *Vaccine* 26 (1) (2007) 82–87.
- [30] H. Lode, B. Schmoele-Thoma, W. Gruber, N. Ahlers, P. Fernsten, S. Baker, A. Razmpour, G. Siber, J. Hackell, S. Lockhart, O. Burkhardt, T. Welte, A. de Roux, Dose-ranging study of a single injection of pneumococcal conjugate vaccine (1 ×, 2 ×, or 4 ×) in healthy subjects aged 70 years or older, *Vaccine* 29 (31) (2011) 4940–4946.

II. NOUVELLE STRATEGIE VACCINALE COMBINEE : PCV13 + PPV23

1. ARTICLE 2

Immunogénicité d'une stratégie de revaccination combinée anti-pneumococcique (vaccin conjugué 13-Valences + vaccin polysaccharidique 23-Valences) chez des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde

Immunogenicity and Persistence of a Prime-Boost Re-Vaccination Strategy for Pneumococcal Vaccines (13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine + 23-Valent Pneumococcal Polysaccharide Vaccine) in Patients with Rheumatoid Arthritis

Mathilde Bahuaud, Constance Beaudouin-Bazire, Marine Husson, Anna Molto, Odile Launay, Frédéric Batteux, Maxime Dougados

Publié dans Human Vaccines & Immunotherapeutics, Février 2018

Nous avons réalisé cette étude afin d'évaluer l'immunogénicité du schéma vaccinal anti-pneumococcique chez des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde. Ces patients ont un risque accru de développer des infections à pneumocoques par rapport à la population générale. Depuis 2013, le Haut Conseil de la Santé Publique recommande pour les patients traités par immunosuppresseurs ayant préalablement reçu une dose de vaccin polysaccharide anti-pneumococcique (PPV23), une stratégie combinée (PCV13 + PPV23) de revaccination trois ans plus tard. Nous avons conduit une étude pilote chez 24 patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (PR) traités par méthotrexate (MTX) et anti-TNF pour évaluer l'immunogénicité induite par cette stratégie vaccinale. Nous avons également pu évaluer dans cette population, la persistance des anticorps anti-polysaccharidiques deux ans après la revaccination.

Vingt-quatre patients atteints de PR, traités par MTX + anti-TNF, vaccinés depuis au moins trois ans à la date d'inclusion par du PPV23, ont été inclus après avoir reçu une dose de vaccin conjugué 13-valences (PCV13) suivie 8 semaines plus tard par une dose de PPV23 lors

de visites de routine. Les patients ont été prélevés à l'inclusion, 4 mois, 12 mois et 24 mois après l'injection du PCV13. Les concentrations d'IgG spécifiques de 10 sérotypes (7 communs aux deux vaccins: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F et 23F, et 3 non communs, inclus seulement dans le PPV23: 10A, 12F et 15B) ont été mesurées par la technique de référence ELISA et par Opsonophagocytose (OPA), une technique mesurant la fonctionnalité des anticorps (seuls les 7 sérotypes communs ont été testés en OPA). Un taux d'IgG spécifiques $\geq 1.3 \mu\text{g/mL}$ en ELISA et un titre d'opsonisation \geq aux valeurs de quantifications (LLOQ) du laboratoire en OPA ont été utilisés pour définir la protection à long terme. L'objectif principal était la proportion de patients protégés en ELISA pour 70% des sérotypes testés, quatre mois après.

A l'inclusion, 33% des patients (7 sérotypes communs) et 32% (3 sérotypes non communs) étaient considérés comme protégés. Des taux de protection similaires ont été retrouvés pour les 7 sérotypes communs et les 3 non communs à 4 mois (63% vs 55%), 12 mois (54% vs 50%) et 24 mois (52% vs 55%) après la vaccination. Si on observe une stabilité des anticorps en ELISA, la technique d'OPA, plus fonctionnelle, nous montre un taux de patients protégés qui diminue à 24 mois avec seulement 19% de patients protégés, pour atteindre un taux plus faible que le taux de patients protégés lors de l'inclusion (29% en OPA).

Bien que la stratégie de revaccination anti-pneumococcique combinée induise à court terme une bonne protection chez les patients atteints de PR traités par méthotrexate et anti-TNF, cette protection ne persiste pas au-delà de deux ans où les taux d'anticorps diminuent en deçà des taux pré-vaccinaux. Nous n'avons pas observé d'efficacité supérieure du vaccin conjugué comparé au vaccin polysidique puisque les taux de protection observés pour les deux vaccins sont similaires 12 et 24 mois post-injection. Nos résultats questionnent les avantages de cette stratégie combinée versus un PPV23 ou PCV13 seul, en mettant en avant une possible hyporéponse induite par le PPV23 contre la réponse immune induite par la primo-injection du vaccin PCV13.

RESEARCH PAPER



Immunogenicity and persistence of a prime-boost re-vaccination strategy for pneumococcal vaccines in patients with rheumatoid arthritis

Mathilde Bahuaud^a, Constance Beaudouin-Bazire^b, Marine Husson^a, Anna Molto^b, Odile Launay^c, Frédéric Batteux^a, and Maxime Dougados^b

^aPlateforme d'Immunomonitoring Vaccinal, Laboratoire d'Immunologie, Groupe hospitalier Cochin-Broca-Hôtel Dieu, AP-HP, Paris, France; ^bService de Rhumatologie B, Groupe hospitalier Cochin-Broca-Hôtel Dieu, APHP, Paris, France; ^cCentre d'Investigation Clinique Cochin-Pasteur (CIC1417), Groupe hospitalier Cochin-Broca-Hôtel Dieu, AP-HP, Paris, France

ABSTRACT

Objectives: Patients with rheumatoid arthritis (RA) are at an increased risk of Pneumococcal infections. Immunogenicity and persistence of a prime-boost revaccination strategy using 13-valent/23-valent anti-pneumococcal vaccines was evaluated in patients with RA treated by Methotrexate (MTX) and anti-TNF.

Method: Twenty-four patients with RA received one dose of PCV13 (Prevenar13[®]; Pfizer) followed two months later by one dose of PPV23 (Pneumovax[®], Merck). Concentrations of IgG specific for 7 serotypes common to both vaccines and 3 uncommon serotypes, included only in the PPV23 were measured by ELISA and Opsonophagocytic Assay (OPA) at baseline and after 4, 12 and 24 months post-vaccine.

Results: Similar percentages of protection were found at 4 months (63% vs. 55%), 12 months (54% vs. 50%) and 24 months (52% vs. 55%) for the 7 common and 3 uncommon serotypes when antibody titers were assayed by ELISA. Based on functional antibody measurements by OPA, a decrease of protected patients was observed 24 months after vaccine with only 19% of patients protected compared to 29% at baseline.

Conclusion: Although the combined pneumococcal revaccination strategy induces good protection in the short term in RA patients, this protection does not persist beyond two years with levels of functional antibody decreasing below pre-vaccine levels. We did not observe a higher efficacy of the conjugate vaccine compared to the polysaccharide vaccine. Our results clearly question the advantage of the prime-boost strategy as it highlights the possible hyporesponse induced by PPV23 against the immune response elicited by the primo-injection of the PCV13 vaccine.

ARTICLE HISTORY

Received 16 November 2017

Revised 16 January 2018

Accepted 3 February 2018

KEYWORDS

Rheumatoid arthritis;
Pneumococcal vaccines;
Methotrexate; anti-TNF;
ELISA; OPA


Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is the most common inflammatory joint disease, affecting approximately 1% of the population worldwide. Patients with rheumatoid arthritis (RA) are at an increased risk of some serious vaccine-preventable infections.^{1,2} Pneumococcal infections are one of the most prevalent vaccine-preventable infectious diseases that have been associated with increased hospitalizations and/or death among patients with RA.^{4,5} Nowadays, two types of pneumococcal vaccines are available: a 23-valent polysaccharide vaccine and conjugated vaccines with serotypic coverage from 7 to 13. The 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine (PPV23) has been licensed in 1983 and has a large serotypic coverage with 23 pneumococcal serotypes. This vaccine is less immunogenic than the newly developed conjugated vaccines (PCV10, PCV13).⁶ These new vaccines due to T-cell dependent immune responses induce high level of memory B-cells to trigger an immunological memory.⁷

Although a class of biologic disease-modifying anti-rheumatic drugs (bDMARDs) has significantly improved the treatment of RA, these drugs are immunomodulator and

thus associated with an increased risk of several types of infections,⁸ and with a potential impact on vaccine efficacy.^{9,10} In line with these observations, a lower vaccine-specific IgG levels has been observed following pneumococcal vaccination in arthritis patients treated with methotrexate compared to those on TNF inhibitors, to those without DMARD and to healthy controls.¹¹⁻¹³ With respect to non-TNF biologics, rituximab or abatacept but not tocilizumab may also impair antibody responses to pneumococcal conjugated vaccine.¹⁴⁻¹⁷ In view of these data highlighting the increased risk of infectious diseases in RA patients especially for those receiving immunosuppressive treatments and the awareness and performance of vaccinations, clear recommendations for vaccinations under the use of biological agents are needed.

Since 2013, French vaccine recommendations committee considered as the best strategy for immune-suppressed patients, previously vaccinated by one dose of PPV23, a revaccination three years after by a prime-boost strategy consisting in a primo-vaccination by PCV13 (Prevenar13[®]) followed by a revaccination at 8 weeks by PPV23

CONTACT Mathilde Bahuaud  mathilde.bahuaud@aphp.fr  Plateforme d'Immunomonitoring Vaccinal, Laboratoire d'Immunologie, Groupe hospitalier Cochin-Broca-Hôtel Dieu, AP-HP, Paris, France.

© 2018 Taylor & Francis

(Pneumo23[®]) to enlarge the serotypic coverage.¹⁸ To our knowledge, no information was available with respect to the short (4 months) and long term (12 and 24 months) efficacy of the prime-boost strategy PCV13+PPV23 vaccines in immunocompromised patients in particularly MTX + anti-TNF-treated RA patients.

Material and methods

Study population

Twenty-four adults patients with rheumatoid arthritis (RA) treated by methotrexate (MTX) and anti-TNF were enrolled in this study for routine-vaccination against *Streptococcus pneumoniae*. All patients signed written informed consent. All patients received a previous vaccination by the pneumococcal polysaccharide vaccine PPV23, at least three years before enrolment. Patients were enrolled between September 2014 and September 2015 in Rheumatology B department, Cochin Hospital, Paris (Fig. 3).

Vaccination

RA patients were included after having received one dose of PCV13 (Prevenar13[®]; Pfizer) followed two months later by one dose of PPV23 (Pneumovax[®], Merck) during routine-visits according to recommendations. Blood samples were obtained at baseline, 4 months, 12 months and 24 months following PCV13 immunization.

Serological evaluation

We evaluated antibody concentrations for ten serotypes (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 10A, 12F and 15B) by ELISA and seven (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F) by OPA. For the evaluation of the combined strategy, we selected 7 serotypes included in both vaccines (seven serotypes that were tested routinely in our laboratory: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F). To see the impact of the PPV23 vaccination only, we selected 3 serotypes included only in the polysaccharide vaccine: 10A, 12F and 15B. These three serotypes were also known to be responsible of invasive pneumococcal infection in France.¹⁹

ELISA

IgG antibody concentrations for ten serotypes (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 10A, 12F and 15B) were determined using a modified enzyme linked immunosorbent (ELISA).²⁰ Patient's sera were pre-absorbed with a solution containing 5 µg/ml pneumococcal C-polysaccharide (Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark) and 10 µg/ml serotype 22F capsular polysaccharide (American Type Culture Collection). Anti-pneumococcal antibody levels were determined in each specimen by analysis of linear regression plots compared with the reference serum (007sp) (National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC)).

There is in the paediatric population a threshold of protection commonly admitted by 0.35 µg/ml, which serves as a

reference for all pneumococcal immunogenicity studies in children. Currently, there are no validated correlates of pneumococcal vaccine protection in adults. Several studies have defined a response criteria for pneumococcal vaccine particularly adapted for evaluation of long-term protection in immunocompromised patients.^{22,23} Based on recommendations of the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology and as used in previous study in RA patients, an at least two-fold increase in antibody level was an indicator of positive antibody responsive to the vaccine (i.e., ratio of post-vaccination and pre-vaccination antibody levels) and a concentration ≥ 1.3 µg/ml, an indicator of protection. Patients developing an immunological response (two-fold increased) toward at least 70% of serotypes at four months were considered as Responders. For the evaluation of the long-term protection, patients with an IgG-concentration ≥ 1.3 µg/ml for at least 70% of the serotypes were considered as Protected.

OPA

Opsonophagocytic activities (OPA) were measured for seven serotypes (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F) at baseline, 4 months, 12 months and 24 months by a multiplexed opsonophagocytic killing assay (MOPA), [www.vaccine.uab.edu] previously described.²¹ Opsonization titers (OT) were defined as interpolated reciprocal serum dilution that kills 50% of the bacteria in the assay. The assay sensitivity is the lowest dilution of sera tested (limit of detection LOD), which is normally 4 for undiluted sera, and is the same for each serotype. However, to quantify functional antibodies with more precision, the lower limit of quantification (LLOQ) was determined for each serotype-specific assay during assay validation. The LLOQs for the various serotypes were: serotype 4: 24; serotype 6B: 131; serotype 9V: 38; serotype 14: 85; serotype 18C: 47; serotype 19F: 74 and serotype 23F: 30.

For OPA titers higher than the LLOQ were considered accurate and their values were reported. Titers below the LLOQ were set to a value of 2 (half of LOD).²⁴ In our study, patients developing an immunological response (four-fold increased) toward at least 70% of serotypes at four months were considered as Responders. For the evaluation of the long-term protection, patients with an OT \geq LLOD for at least 70% of the serotypes were considered as Protected.

Statistics analysis

For each serotype, the geometric mean concentrations (GMC) and titers (GMT) and the corresponding 95% confidence intervals (CI) were calculated. Primary endpoint was the proportion of patients developing an immunological response toward at least 70% of serotypes at four months in ELISA. Patient characteristics were compared using Mann-Whitney's Ranksum test for quantitative variable and Fisher's exact test for categorical variable. The percentages of responders are provided together with their 95% confidence interval (95%CI). Quantitative variables were compared using Student's t-test and categorical variables were compared using the chi-square test. All tests were 2-sided at the level of 0.05. All analyses were performed using Graph Pad Prism 5.0 software (GraphPad, San Diego, CA).

Results

Pneumococcal serotype-specific Ig concentrations and determination of immune response to vaccination

Serotype-specific IgG response was evaluated for 7 common polysaccharides (4, 6B, 9V, 18C, 14, 19F, and 23F) contained in both PCV13 and PPV23 vaccine. At four months post immunization (M4), 33% of patients (8/24) were considered responders as defined by a two-fold increase in the IgG-concentration from baseline toward at least 70% of serotypes (Fig. 1). For the responders-group, geometric mean of concentrations (GMC) with 95% Confidence interval (CI) at four months increased for all serotypes compared to baseline but differences were significant for only serotypes 4 (GMC: 0.6 µg/ml (CI: 0.3–1.3) at baseline vs 1.8 µg/ml (1–3.4) at M4, p = 0.0379) and 19F (3.5 µg/ml (1.7–7.3) at baseline vs 12.8 µg/ml (3.9–41.3) at M4, p = 0.0281) (Table 1). Antibody levels decreased drastically one year after immunization as only two patients' remains responders after 12 months (8%). These patients were still responder 2 years after vaccination. Functional activity of polysaccharides specific-antibodies was tested by MOPA. Same percentages of responders were found (29% at M4, 14% at M12 and 10% at M24) indicating the production of functional antibodies (Table 2).

Serotype-specific IgG response was evaluated for 3 polysaccharides (10A, 12F and 15B) contained only in PPV23 but not in PCV13 vaccine in order to evaluate the specific impact of the PPV23 vaccination performed two months after the PCV13 vaccine. Because of lack of sera, two patients could not be tested for these three uncommon serotypes. Four months post immunization, 36% of patients (8/22) were considered responders (Fig. 1). Interestingly, only 4 of them were responders for the 7 common serotypes tested. For the responders-group, geometric mean of concentrations at four months increased for all serotypes compared to baseline but differences was significant for only serotype 10A (1.4 µg/ml (0.6–3.2) at baseline vs

Table 1. Geometric mean (95% CI) Concentrations by ELISA of IgG Antibody at baseline, 4, 12 and 24 months after immunization.

Serotypes		Baseline	M4	M12	M24
4	NR	0.6 (0.4–0.9)	0.9 (0.5–1.4)	0.7 (0.4–1.2)	0.7 (0.3–1.6)
	R	0.6 (0.3–1.3)	1.8 [§] (1–3.4)	1.2 (0.6–2.3)	1.8 (0.7–4.3)
6B	NR	1.6 (0.8–3.1)	2 (1.1–3.8)	1.6 (0.8–3.3)	2.0 (0.8–4.6)
	R	1.9 (0.7–5.4)	6.6 (2.3–18.3)	3.7 (1.3–10.1)	3.7 (1.0–14.4)
9V	NR	1.1 (0.6–2.2)	1.7 (0.9–3.2)	1.5 (0.8–2.9)	1.6 (0.6–4.5)
	R	2.6 (0.9–7.3)	6.5 [§] (2.5–17.2)	3.6 (1.1–11.8)	2.9 (0.5–16.3)
14	NR	6.3 (2.7–15)	10 (4.5–22.1)	8.7 (3.3–22.4)	6.9 (1.7–28.2)
	R	4.4 (1.5–13)	9.9 (3.7–26.6)	8.4 (3–22.6)	8.2 (3.2–21.4)
18C	NR	1.2 (0.7–2.1)	2.1 (1.3–3.4)	1.6 (0.9–2.9)	1.8 (0.6–5.2)
	R	3.2 [§] (1.4–7.3)	9.4 [§] (3.9–23)	6.3 [§] (2.6–14.9)	2.6 (0.6–15.3)
19F	NR	1.7 (0.9–3.1)	2.3 (1.5–3.5)	2 (1.1–3.6)	3.1 (1.1–8.2)
	R	3.5 (1.7–7.3)	12.8 [§] (3.9–41.3)	8.2 [§] (2.7–24.7)	2.5 (0.6–10.6)
23F	NR	1.3 (0.6–3)	1.6 (0.7–3.5)	1.2 (0.5–2.9)	1.2 (0.4–3.3)
	R	1.1 (0.4–3.4)	3.7 (1.1–13)	2.5 (0.8–7.7)	1.2 (0.2–5.6)
10A	NR	1.2 (0.3–4.9)	1.7 (0.4–7.4)	1.7 (0.4–7.1)	2.0 (0.7–5.34)
	R	1.4 (0.6–3.2)	6.7 [§] (2.4–18.9)	3.9 (1.4–10.4)	6.2 (1.1–35.9)
12F	NR	0.4 (0.1–1.3)	0.5 (0.1–1.9)	0.6 (0.2–1.7)	0.6 (0.2–2.1)
	R	0.6 (0.3–1.1)	2.1 (0.7–6.2)	1.4 (0.5–3.9)	1.0 (0.4–2.6)
15B	NR	2.8 (0.5–15.9)	3.3 (0.5–20.1)	3.1 (0.5–19.5)	3.5 (0.7–18.1)
	R	4 (1.5–10.4)	11.3 (3.4–38.1)	8 (2.5–25.7)	5.6 (1.0–32.4)

Note: Responders at four month were defined as at least an IgG- two fold increased from baseline by ELISA. Data are in geometric means: antibody concentrations are in µg/ml (95% confidence limits). R: Responders group, NR: Non-responders group, [§]p<0.05 vs. baseline

6.7 µg/ml (2.4–18.9) at M4, p = 0.0148). One year after immunization, half of the responders at M4 (18%) had enough antibodies to be still considered as responders. The decrease of antibody levels was stable since these 4 patients were still responders 2 years after vaccination.

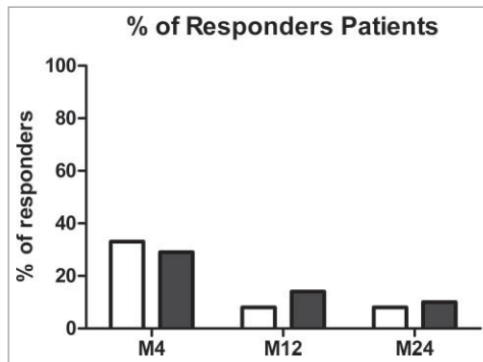


Figure 1. Percentages of responders patients for pneumococcal vaccine at 4, 12 and 24 months after immunization in ELISA (white) and in OPA (black). Note: Responders patients for each serotype at a specific time point were defined as a two-fold increase of IgG anti-PS compared to baseline by ELISA (in white) and a titer four-fold increase from baseline of Ig anti-PS by OPA (in black) for each serotype. Patients were assigned as responders when more than 70% of serotypes tested fit with those criteria.

Evaluation of protective level of Pneumococcal serotype-specific Ig after immunization

For the evaluation of the protection, a second criterion was applied where an IgG-concentration ≥ 1.3µg/ml in ELISA and ≥ Lower limits of quantifications (LLOQ) in OPA for at least 70% of the serotypes was required to be considered protected.²²

At baseline, in ELISA, 33% of patients were considered protected for the 7 common serotypes and 32% of patients for the 3 uncommon serotypes. After vaccination, protection for the 7 common reached 63% of patients versus 55% for the 3 uncommon. Despite a more severe decrease 12-month after immunization for the 7 common serotypes (54% of patients protected compared to 63% at M4 versus 50% for the 3 uncommon compared to 55% at M4), the protection remains stable over the years, with similar percentage of protection 2 years after vaccination (52% for the 7 common serotypes versus 55% for the 3 uncommon serotypes), indicated no higher efficacy of the PCV13 for long term protection on the PPV23.

Although the Opsonophagocytic Assay showed similar percentage of patients protected at baseline and four months after

Table 2. Geometric mean (95% CI) Titer by OPA of Ig Antibody at baseline, 4, 12 and 24 months after immunization.

Serotypes		Baseline	M4	M12	M24
4	NR	9.8 (4.4–21.5)	41.7 (25–69.4)	18.7 (7.7–45.4)	32.2 (11.8–88)
	R	4.2 (1.2–15.2)	120.4 (28.8–503.2)	42.2 (12.2–146.1)	14.5 (3.0–71.2)
6B	NR	31 (10.9–88.6)	132.2 (63.8–274.2)	96.9 (44–213.1)	60.5 (15.7–234)
	R	13.9 (1.2–166.2)	178.1 (26.1–1216)	119.9 (27.1–530)	29.7 (1.3–705.2)
9V	NR	27.2 (11.1–66.6)	58 (27.6–122)	31.7 (11.1–90.8)	41.9 (11.8–148.6)
	R	15.6 (2.5–99.2)	79.2 (16.7–375.5)	41.1 (6.8–248.8)	17.2 (1.5–199)
14	NR	86.1 (31.3–236.6)	145.5 (63.8–331.6)	124 (49–314)	59.1 (12.3–284.4)
	R	11.2 (1.2–102.9)	137.6 (24.3–779.7)	61.3 (6.3–598.5)	25.8 (2.2–302.5)
18C	NR	55.7 (20.4–152.3)	89.7 (36.6–220)	74.4 (29.1–190.2)	51.2 (8.8–298.5)
	R	9.3 (1.4–61.5)	118.1 (18.4–758.9)	23.2 (2.2–244.8)	13.1 (0.9–186.3)
19F	NR	57.2 (26.5–123.3)	188.7 [§] (89.5–397.5)	125.1 (62.5–250.2)	87.2 (18.8–405.6)
	R	28.5 (11.8–68.8)	200.5 [§] (68.9–582.9)	131.8 [§] (35.1–494.7)	46.2 (4.5–475.8)
23F	NR	19 (7.1–51.2)	29.1 (9.2–91.7)	27.8 (8.6–89.3)	18.5 (3.2–107.5)
	R	5.4 (1–29)	45.3 (7.1–287.1)	12.6 (2.5–63.8)	4.7 (1.1–20.7)

Note: Responders at four month were defined as at least a four-fold increased from baseline. Data are in geometric means: Opsonisation titer (95% confidence limits). R: Responders group, NR: Non-responders group.
[§]p < 0.05 vs. baseline

vaccination (respectively 29% and 71%), protection did not stay stable over the time as found for ELISA, and decreased drastically 2 years post immunization with only 19% patients still protected in OPA, a rate inferior than baseline (29%)(Fig. 2).

Population data

Twenty-four patients with RA were recruited for the study (Fig. 3). All patients were treated with combined Methotrexate (MTX) + anti-TNF. The time of introduction of MTX treatment was similar in Protected patients and Non Protected patients with medians respectively at 11.7 years for the Non Protected patients and 10.5 years for the Protected patients. No differences were observed in the time of

introduction of anti-TNF treatment with medians at 5.8 years for Non Protected patients and 6.2 years for the Protected patients. The median age of the study population was 62.5 years (range 32–71) with 18 females (75%) and 6 males (25%) (Table 3). There were no differences between the median age and gender of the Protected patients compared to the Non Protected patients. Previous pneumococcal vaccination times were similar in both groups with medians respectively at 5.25 years for Non Protected and 5.11 years for the Protected patients. Interestingly, the presence of Rheumatoid Factor (RF) in sera of more Protected patients compared to Non-Protected patients (respectively 79% versus 56%) seems to have a positive impact in protection. In opposite, presence of antibody anti-citrullinated protein (CCP) seems to be a negative indicator for protection, as we found more antibody anti-CCP in Non-Protected patient's sera patients (78% versus 64% for Protected patients). There were no significantly differences observed between the two groups for the other biological or clinical data tested (ESR, CRP, IgG, IgA, IgM, DAS28). None of our patients developed any type of pneumococcal disease during the 24 months of the study.

Discussion

Here, we evaluated in a pilot study the immunogenicity of the prime-boost revaccination strategy using PCV13 vaccination followed by PPV23 vaccination 8 weeks later in 24 patients with Rheumatoid Arthritis (RA) treated by Methotrexate (MTX) and anti-TNF. The persistence of a protective immunity for two years after revaccination was also evaluated in our population.

We chose to evaluate RA patients treated with MTX because this drug is the most common DMARD used first line.²⁵ and because a lower vaccine-specific IgG levels has been observed following pneumococcal vaccination in arthritis patients

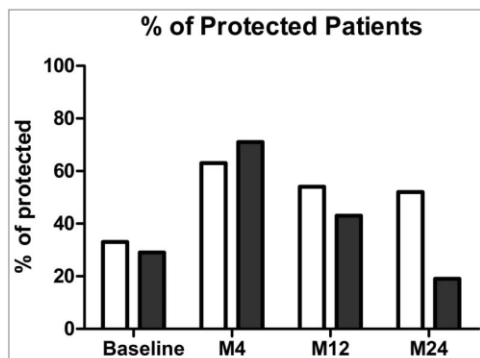


Figure 2. Percentages of protected patients for pneumococcal vaccine at baseline, 4, 12 and 24 months after immunization in ELISA (white) and in OPA (black). Note: Protected patients for each serotype at a specific time point were defined as at least a concentration of IgG anti-PS $\geq 1.3 \mu\text{g/ml}$ in ELISA (in white) and a titer of Ig anti-PS \geq LLOQ in OPA (in black) for each serotype. Patients were assigned as protected when more than 70% of serotypes tested fit with those criteria.

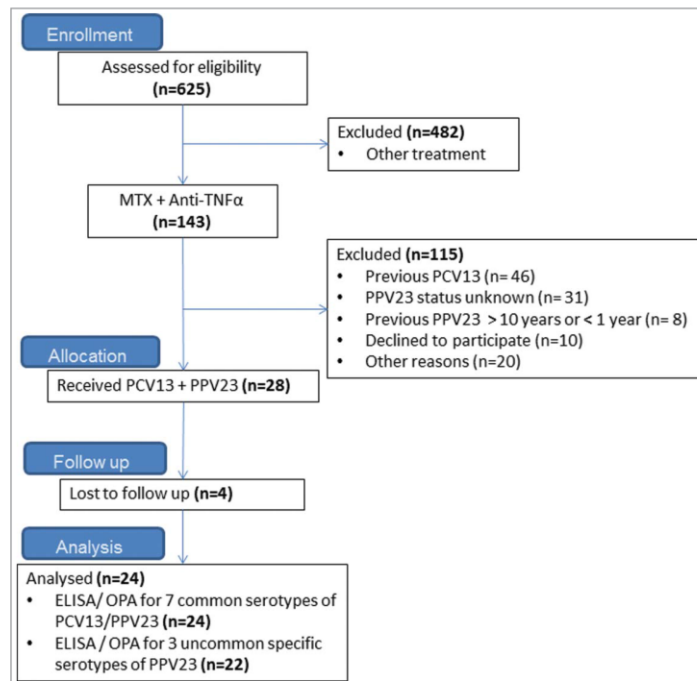


Figure 3. Flow chart illustrating the study population. Note: All Patients were recruited in Rhumatology B Department, Cochin Hospital, AP-HP, Paris, France.

treated with methotrexate alone or in combination with anti-TNF compared to those on TNF inhibitors alone, to those without DMARD and to healthy controls.^{11,12,26}

Based on recommendations of the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology,²² and as used in previous study evaluating pneumococcal vaccine in RA patients, an at least two-fold increase in antibody level was an indicator of

positive antibody response to the vaccine and an antibody concentration $\geq 1.3 \mu\text{g/ml}$ as protection. Patients developing an immunological response toward at least 70% of serotypes were considered as responders and patients developing an immunological protection toward at least 70% of serotypes were considered as protected. In contrast with previous studies evaluating pneumococcal vaccine in RA patients that evaluated the serologic response by testing antibodies concentrations against 2 serotypes (6B and 23F) included in both PCV13 and PPV23, we have tested antibodies concentrations against ten different polysaccharides. Seven were contained in both PCV13 and PPV23 vaccine and three only contained in PPV23. The lack of control groups is a limitation of our study that is counterbalanced by the large number of anti-PS antibodies tested here that allows us to compare in a same group of immunocompromised patients the antibody response and protection elicited by the combination of PCV13 and PPV23 vaccine against the seven common serotype versus the response elicited by the PPV23 alone using the 3 uncommon serotype.

Four months post immunization, we observed 33% of responders patients to the seven common serotypes and 36% to the three uncommon serotypes included in the PPV23 only (10A, 12F and 15B). Our results are in line with previous observation evaluating PPV23 and PCV7 vaccine. Indeed, the percentage of responder evaluated by a two-fold increase in antibody concentration versus baseline were 40% for serotype 23F and 20% for serotype 6B upon PCV7 vaccine,¹¹ and 53% for 23F and 45% for 6B after PPV23 vaccination in patients

Table 3. Comparison of Demographic and disease status pre-vaccination for the Protected and Non Protected Patients.

Characteristic	Protected (n = 15)	Non Protected (n = 9)	p
Age; years, median SD (range)	56 (32–71)	64 (50–70)	0.2959
Sex; % female	73	78	0.5108 [#]
DAS28	2.29	2.79	0.2866
RF titer; mg/l, median	31.67	16	0.6818
RF; % of positive	79 ⁺	56	0.0008 [#]
anti-CCP titer; median	71.62	50.75	0.8981
anti-CCP; % of positive	64 ⁺	78	0.0423 [#]
ESR; mm/hour, median	13.76	7.9	0.5906
CRP; mg/l, median	2.83	1.65	0.0628
IgG	11.19	10.77	0.5928
IgA	2.18	2.55	0.3672
IgM	1.03	1.28	0.5931
Previous PPV23 vaccination; years, median	5.11	5.25	0.5144

Note: comparison of biological values for Protected patients group versus non-Protected patients group at baseline. DAS28 = Disease Activity Score; ESR = Erythrocyte Sedimentation Rate; CRP = C Reactive Protein, Ab anti-CCP = Anti-citrullinated protein antibody, PPV23 = 23-valent anti-pneumococcal vaccine. # referred to Fisher's exact test; others p values were calculated by Mann-Whitney's Ranksum test

treated with MTX+anti-TNF.¹² However, no significant difference in the efficacy of both vaccines could be observed.²⁷ This conclusion is consistent with studies in immunocompetent patients,^{28,29} who found no differences between the combined strategy versus PCV alone in healthy adults aged 50–80. Moreover, pneumococcal vaccines elicit a poor antibody response in RA patients compared to healthy patients. Indeed, Melmed et al found 84% of responders to one dose of PPV23 in healthy controls,³⁰ and different studies showed percentage of responders after one injection of PCV7 from 72% to 84% depending on the serotype.^{31,32}

Interestingly, more patients positive for anti-cyclic citrullinated peptide (CCP) antibody were found in our non-protected compared to protected patients. In opposite, more protected patients were found positive for rheumatoid factor (RF) than the non-protected patients. Anti-CCP antibody positivity is an established diagnostic factor for severe disease activity and joint damage and a prognostic factor for aggressive disease in rheumatoid arthritis (RA) which is not the case for RF. Thus, the association of poor vaccine response in patients positive for anti-CCP may be related to the less immunogenicity of the vaccine in the more severe and aggressive forms of RA.^{33,34}

To our knowledge, this is the first study describing the long-term evolution of the anti-polysaccharides antibody response after pneumococcal vaccination especially in the case of a prime boost strategy. If the percentage of protection is quite equivalent for the seven common and the three uncommon serotype, the more intense drop in antibody response for the seven common serotype compared to the three uncommon may suggest a negative impact of the PPV23 vaccine on the PCV13 response. Inferior rate found in OPA at 2 years post-immunization compared to baseline (19% at 24 months versus 29% at baseline) improves this hypothesis of a negative impact. Such phenomenon has been extensively described and called hyporesponsiveness and may be due to the toxicity of polysaccharides contained in PPV23 vaccine against anti-PS memory B cells generated after PCV13 vaccination.^{35,36}

The prime boost strategy combining conjugated and unconjugated pneumococcal vaccine is recommended for immunocompromised patients and thus particularly indicated in RA patients treated with MTX because of the poor immunogenicity of both type of pneumococcal vaccine in this case. Our results clearly question the advantage of the prime-boost strategy versus PPV23 or PCV13 alone as it highlights the possible hyporesponse induced by PPV23 against the immune response elicited by the primo-injection of the PCV13 vaccine.

Disclosure of potential conflicts of interest

OL participated in industry-sponsored clinical trials that included Pneumococcal vaccines. The other authors declare no conflict of interest for this manuscript.

Acknowledgments

The authors thank Maryse Mezieres (Service de Rhumatologie B, Cochin, Paris, France) for trial monitoring and handling.

Grant support

No funding

ORCID

Mathilde Bahaud  <http://orcid.org/0000-0001-6454-0370>

References

- Doran MF, Crowson CS, Pond GR, O'Fallon WM, Gabriel SE. Frequency of infection in patients with rheumatoid arthritis compared with controls: A population-based study. *Arthritis Rheum.* 2002;46:2287–93. doi:10.1002/art.10524. PMID:12355475.
- Ferreira I, Isenberg D. Vaccines and biologics. *Ann Rheum Dis.* 2014;73:1446–54. doi:10.1136/annrheumdis-2014-205246. PMID:24845388.
- De Keyser F. Choice of biologic therapy for patients with rheumatoid arthritis: the infection perspective. *Curr Rheumatol Rev.* 2011;7:77–87. doi:10.2174/157339711794474620. PMID:22081766.
- Van Assen S, Elkayam O, Agmon-Levin N, Cervera R, Doran MF, Dougados M, Emery P, Geborek P, Ioannidis JPA, Jayne DRW, et al. Vaccination in adult patients with auto-immune inflammatory rheumatic diseases: A systematic literature review for the European League Against Rheumatism evidence-based recommendations for vaccination in adult patients with auto-immune inflammatory rheumatic diseases. *Autoimmun Rev.* 2011;10:341–52. doi:10.1016/j.autrev.2010.12.003. PMID:21182987.
- Van Assen S, Agmon-Levin N, Elkayam O, Cervera R, Doran MF, Dougados M, Emery P, Geborek P, Ioannidis JPA, Jayne DRW, et al. EULAR recommendations for vaccination in adult patients with auto-immune inflammatory rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis.* 2011;70:414–22. doi:10.1136/ard.2010.137216. PMID:21131643.
- Dinleyici EC. Current status of pneumococcal vaccines: lessons to be learned and new insights. *Expert Rev Vaccines.* 2010;9:1017–22. doi:10.1586/erv.10.86. PMID:20822344.
- Aliberti S, Mantero M, Mirsaeidi M, Blasi F. The role of vaccination in preventing pneumococcal disease in adults. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20:52–8. doi:10.1111/1469-0691.12518. PMID:24410778.
- Bongartz T, Sutton AJ, Sweeting MJ, Buchan I, Matteson EL, Montori V. Anti-TNF Antibody Therapy in Rheumatoid Arthritis and the Risk of Serious Infections and Malignancies: Systematic Review and Meta-analysis of Rare Harmful Effects in Randomized Controlled Trials. *JAMA.* 2006;295:2275. doi:10.1001/jama.295.19.2275. PMID:16705109.
- McMahan ZH, Bingham III CO. Effects of biological and non-biological immunomodulatory therapies on the immunogenicity of vaccines in patients with rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther* [Internet]. 2014 [cited 2017 May 29]; 16. Available from: <http://arthritis-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13075-014-0506-0>. doi:10.1186/s13075-014-0506-0.
- Rahier J-F, Moutschen M, Van Gompel A, Van Ranst M, Louis E, Segart S, Masson P, De Keyser F. Vaccinations in patients with immune-mediated inflammatory diseases. *Rheumatology.* 2010;49:1815–27. doi:10.1093/rheumatology/keq183. PMID:20591834.
- Kapetanovic MC, Saxne T, Sjöholm A, Truedsson L, Jönsson G, Geborek P. Influence of methotrexate, TNF blockers and prednisolone on antibody responses to pneumococcal polysaccharide vaccine in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology.* 2006;45:106–11. doi:10.1093/rheumatology/kei193. PMID:16287919.
- Kapetanovic MC, Roseman C, Jönsson G, Truedsson L, Saxne T, Geborek P. Antibody response is reduced following vaccination with 7-valent conjugate pneumococcal vaccine in adult methotrexate-treated patients with established arthritis, but not those treated with tumor necrosis factor inhibitors. *Arthritis Rheum.* 2011;63:3723–32. doi:10.1002/art.30580. PMID:21834061.
- Hua C, Barneche T, Combe B, Morel J. Effect of methotrexate, anti-tumor necrosis factor α , and rituximab on the immune response to influenza and pneumococcal vaccines in patients with rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis: immune response to

- influenza and pneumococcal vaccines in ra. *Arthritis Care Res.* 2014;66:1016–26. doi:10.1002/acr.22246.
14. Crnkic Kapetanovic M, Saxne T, Jönsson G, Truedsson L, Geborek P. Rituximab and abatacept but not tocilizumab impair antibody response to pneumococcal conjugate vaccine in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2013;15:R171. doi:10.1186/ar4358. PMID:24286269.
 15. Mori S, Ueki Y, Akeda Y, Hirakata N, Oribe M, Shiohira Y, Hidaka T, Oishi K. Pneumococcal polysaccharide vaccination in rheumatoid arthritis patients receiving tocilizumab therapy. *Ann Rheum Dis.* 2013;72:1362–6. doi:10.1136/annrheumdis-2012-202658. PMID:23345600.
 16. Migita K, Akeda Y, Akazawa M, Tohma S, Hirano F, Ideguchi H, Kozuru H, Jiuchi Y, Matsumura R, Suematsu E, et al. Effect of abatacept on the immunogenicity of 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccination (PPSV23) in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther* [Internet]. 2015 [cited 2017 May 29]; 17. Available from: <http://arthritis-research.com/content/17/1/357>.
 17. Winthrop KL, Silverfield J, Racewicz A, Neal J, Lee EB, Hrycaj P, Gomez-Reino J, Soma K, Mebus C, Wilkinson B, et al. The effect of tofacitinib on pneumococcal and influenza vaccine responses in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2016;75:687–95. doi:10.1136/annrheumdis-2014-207191. PMID:25795907.
 18. Haut Conseil de la Santé Publique. HSCP. Avis relatif aux recommandations de la vaccination pour les adultes et les enfants âgés de plus de 2 ans à risque d'infection invasive à pneumocoque. [Internet]. 2013 Available from: <http://www.hcsp.fr/explorer.cgi/avisrapportsdomaine?clefr=355>.
 19. Varon E, Janoir C. Rapport d'activité 2016 - Épidémiologie 2015 [Internet]. 2016 Available from: <http://cnr-pneumo.com/docs/rapports/CNRP2016.pdf>.
 20. Wernette CM, Frasch CE, Madore D, Carlone G, Goldblatt D, Plikaytis B, Benjamin W, Quataert SA, Hildreth S, Sikkema DJ, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of human antibodies to pneumococcal polysaccharides. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003;10:514–9. PMID:12853378.
 21. Grabar S, Groh M, Bahuaud M, Le Guern V, Costedoat-Chalumeau N, Mathian A, Hanslik T, Guillemin L, Batteux F, Launay O. Pneumococcal vaccination in patients with systemic lupus erythematosus: A multicenter placebo-controlled randomized double-blind study. *Vaccine* [Internet]. 2017 [cited 2017 Aug 24]; Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X17310204>. doi:10.1016/j.vaccine.2017.07.094.
 22. Orange JS, Ballou M, Stiehm ER, Ballas ZK, Chinen J, De La Morena M, Kumararatne D, Harville TO, Hesterberg P, Koleilat M, et al. Use and interpretation of diagnostic vaccination in primary immunodeficiency: A working group report of the Basic and Clinical Immunology Interest Section of the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;130:S1–24. doi:10.1016/j.jaci.2012.07.002. PMID:22935624.
 23. Lopez B, Boucher A, Bahuaud M, Mortuaire G, Melliez H, Launay D, Terriou R, Wemeau-Stervinou L, Wallaert B, Faure K, et al. Specific Polysaccharide Antibody Deficiency Revealed by Severe Bacterial Infections in Adulthood: A Report on 11 Cases. *Clin Infect Dis.* 2017;65:328–31. doi:10.1093/cid/cix284. PMID:28379361.
 24. Juergens C, Patterson S, Trammel J, Greenberg D, Givon-Lavi N, Cooper D, Gurtman A, Gruber WC, Scott DA, Dagan R. Post Hoc Analysis of a Randomized Double-Blind Trial of the Correlation of Functional and Binding Antibody Responses Elicited by 13-Valent and 7-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccines and Association with Nasopharyngeal Colonization. *Clin Vaccine Immunol.* 2014;21:1277–81. doi:10.1128/CVI.00172-14. PMID:24990907.
 25. Visser K, Katchamart W, Loza E, Martinez-Lopez JA, Salliot C, Trudeau J, Bombardier C, Carmona L, van der Heijde D, Bijlsma JWJ, et al. Multinational evidence-based recommendations for the use of methotrexate in rheumatic disorders with a focus on rheumatoid arthritis: integrating systematic literature research and expert opinion of a broad international panel of rheumatologists in the 3E Initiative. *Ann Rheum Dis.* 2009;68:1086–93. doi:10.1136/ard.2008.094474. PMID:19033291.
 26. Kapetanovic MC, Nagel J, Nordström I, Saxne T, Geborek P, Rudin A. Methotrexate reduces vaccine-specific immunoglobulin levels but not numbers of circulating antibody-producing B cells in rheumatoid arthritis after vaccination with a conjugate pneumococcal vaccine. *Vaccine.* 2017;35:903–8. doi:10.1016/j.vaccine.2016.12.068. PMID:28081972.
 27. Kapetanovic MC, Roseman C, Jönsson G, Truedsson L. Heptavalent pneumococcal conjugate vaccine elicits similar antibody response as standard 23-valent polysaccharide vaccine in adult patients with RA treated with immunomodulating drugs. *Clin Rheumatol.* 2011;30:1555–61. doi:10.1007/s10067-011-1856-5. PMID:21956234.
 28. Goldblatt D, Southern J, Andrews N, Ashton L, Burbidge P, Woodgate S, Pebody R, Miller E. The Immunogenicity of 7-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine versus 23-Valent Polysaccharide Vaccine in Adults Aged 50–80 Years. *Clin Infect Dis.* 2009;49:1318–25. doi:10.1086/606046. PMID:19814624.
 29. Ridha I, MacIntyre CR, Lindley R, Gao Z, Sullivan JS, Yuan FF, McIntyre PB. Immunological responses to pneumococcal vaccine in frail older people. *Vaccine.* 2009;27:1628–36. doi:10.1016/j.vaccine.2008.11.098. PMID:19100304.
 30. Melmed GY, Agarwal N, Frenck RW, Ippoliti AF, Ibanez P, Papadakis KA, Simpson P, Barolet-Garcia C, Ward J, Targan SR, et al. Immunosuppression impairs response to pneumococcal polysaccharide vaccination in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol.* 2010;105:148–54. doi:10.1038/ajg.2009.523. PMID:19755964.
 31. Sinisalo M, Vilpo J, Itälä M, Väkeväinen M, Taurio J, Aittoniemi J. Antibody response to 7-valent conjugated pneumococcal vaccine in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Vaccine.* 2007;26:82–7. doi:10.1016/j.vaccine.2007.10.053. PMID:18053620.
 32. Crum-Cianflone NF, Huppler Hullsiek K, Roediger M, Ganesan A, Patel S, Landrum ML, Weintrob A, Agan BK, Medina S, Rahkola J, et al. A randomized clinical trial comparing revaccination with pneumococcal conjugate vaccine to polysaccharide vaccine among hiv-infected adults. *J Infect Dis.* 2010;202:1114–25. doi:10.1086/656147. PMID:20795819.
 33. Van der Linden MPM, Batstra MR, Bakker-Jonges LE, Foundation for Quality Medical Laboratory Diagnostics, Detert J, Bastian H, Scherer HU, Toes REM, Burmester G-R, Mjaavatten MD, et al. Toward a data-driven evaluation of the 2010 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism criteria for rheumatoid arthritis: Is it sensible to look at levels of rheumatoid factor? *Arthritis Rheum.* 2011;63:1190–9. doi:10.1002/art.30200. PMID:21538311.
 34. Lamerato L, Price K, Szymialis R, Eaddy M, Ogonnaya A, Shih H-C, Ahmad H. Comparative evaluation of treatment patterns and healthcare utilization of newly-diagnosed rheumatoid arthritis patients by anti-cyclic citrullinated peptide antibody status. *J Med Econ.* 2018;21(3):231–240. doi:10.1080/13696998.2017.1391819. PMID:29027497.
 35. Bjarnarson SP, Benonisson H, Del Giudice G, Jonsdottir I. Pneumococcal polysaccharide abrogates conjugate-induced germinal center reaction and depletes antibody secreting cell pool, causing hyporesponsiveness. *PLoS ONE.* 2013;8:e72588. doi:10.1371/journal.pone.0072588. PMID:24069152.
 36. Clutterbuck EA, Lazarus R, Yu L-M, Bowman J, Bateman EAL, Diggle L, Angus B, Peto TE, Beverley PC, Mant D, et al. Pneumococcal conjugate and plain polysaccharide vaccines have divergent effects on antigen-specific b cells. *J Infect Dis.* 2012;205:1408–16. doi:10.1093/infdis/jis212. PMID:22457293.

2. ARTICLE 3

Vaccination anti-pneumococcique chez des patients atteints de lupus érythémateux systémique: Etude multicentrique randomisée double aveugle.

Pneumococcal vaccination in patients with systemic lupus erythematosus: A multicenter placebo-controlled randomized double-blind study

Sophie Grabar, Matthieu Groh, Mathilde Bahuaud, Véronique Le Guern, Nathalie Costedoat-Chalumeau, Alexis Mathian, Thomas Hanslik, Loïc Guillevin, Frédéric Batteux, Odile Launay, for the VACCILUP study group

Publié dans Vaccine, Août 2017

Dans cette étude, nous avons voulu comparer l'immunogénicité de la stratégie combinée versus le vaccin polysaccharidique seul chez des patients atteints de lupus érythémateux systémique. Nous avons également souhaité évaluer l'innocuité de la stratégie combinée chez ces patients.

Ainsi, 42 patients lupiques stables, ont été inclus dans une étude clinique, randomisée en double aveugle et multicentrique. Vingt-cinq patients reçurent une dose de vaccin conjugué 7-valences Prevenar7 (PCV7) à l'inclusion suivie 6 mois plus tard par une injection de Pneumovax (PPV23). Les patients (n=17) inclus dans le groupe contrôle reçurent quant à eux un placebo à l'inclusion et une dose de PPV23 à 6 mois. L'immunogénicité des schémas vaccinaux a été évaluée par ELISA et par OPA contre les 7 sérotypes inclus dans le PCV7 (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F et 23F). L'objectif principal de l'étude était le nombre de patient répondeurs pour au moins 5 des 7 sérotypes testés en ELISA, à la visite S28 (un mois après l'injection de PPV23). Un patient était considéré répondeur pour un sérotype s'il montrait à la visite S28 une augmentation de la concentration en anticorps d'au moins deux fois par rapport à la visite d'inclusion et une concentration $\geq 1\mu\text{g/ml}$.

Quatre semaines après la vaccination par le PPV23 (visite S28), le taux de répondeurs à au moins 5 des 7 sérotypes communs aux deux vaccins, était de 72% dans le groupe PPV23 seul versus 76% dans le groupe ayant reçu la stratégie combinée (groupe PCV7-PPV23). Au bout d'un an, ces taux diminuent et atteignent 52% pour le groupe PPV23 seuls et 59% pour le groupe PPV23-PCV7, ne montrant ainsi pas de supériorité de la stratégie combinée par rapport au PPV23 seul. De plus, grâce au schéma de l'étude, il nous a été possible d'évaluer chez nos patients lupiques l'effet des deux vaccins seuls, quatre semaines après la vaccination. Encore une fois, nos résultats suggèrent que chez les patients lupiques, le PCV7 seul n'est pas plus immunogène que le PPV23 seul.

Enfin, le pourcentage de patients ayant un ratio des concentrations post-vaccination/pré-vaccination >1 , est similaire entre les deux stratégies vaccinales avec des taux allant de 82% à 100%, excluant ainsi un phénomène d'hyporéponse.

En conclusion, nos résultats montrent l'innocuité et l'immunogénicité à court terme des vaccins anti-pneumococques chez les patients lupiques. Cependant, aucun effet bénéfique de la primo vaccination par le vaccin conjugué sur la réponse vaccinale par rapport au vaccin polysaccharidique seul n'a été observé, aussi bien en ELISA qu'en OPA. Ces résultats viennent confirmer ceux que nous avons retrouvés dans l'article précédant chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde. En revanche, nous ne retrouvons pas d'effet délétère de la vaccination par le vaccin polysaccharidique sur la réponse vaccinale induite par le vaccin conjugué (résultats non montrés dans l'article). Il semblerait que le schéma vaccinal plus tardif (c'est-à-dire une vaccination par le PPV23 six mois après le PCV7/13 au lieu de deux mois à l'heure actuelle) limité ou diminue le phénomène d'hyporéponse.



Contents lists available at ScienceDirect

Vaccine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vaccine

Pneumococcal vaccination in patients with systemic lupus erythematosus: A multicenter placebo-controlled randomized double-blind study



Sophie Grabar^{a,b,1}, Matthieu Groh^{c,1,2}, Mathilde Bahuaud^d, Véronique Le Guern^c, Nathalie Costedoat-Chalumeau^c, Alexis Mathian^f, Thomas Hanslik^g, Loïc Guillevin^c, Frédéric Batteux^d, Odile Launay^{e,h,i,*}, for theVACCILUP study group

^a Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité AP-HP, Unité de Biostatistique et Epidémiologie, Groupe Hospitalier Cochin Broca Hôtel-Dieu, Paris, France

^b INSERM, UPMC Université Paris 06, Institut Pierre Louis d'épidémiologie et de Santé Publique (IPLESP UMRS 1136), F75013 Paris, France

^c Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité AP-HP, Service de Médecine Interne, Centre de Référence National pour les Maladies Auto-Immunes Rares (Vascularites et Sclérodémie Systémique), Paris, France

^d Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité AP-HP, Département d'Immunologie Biologique, Groupe Hospitalier Cochin Broca Hôtel-Dieu, Paris, France

^e Inserm, CIC 1417, Paris, France

^f Université Pierre et Marie Curie, Sorbonne Paris Cité AP-HP, Service de Médecine Interne 2, Centre de Référence National pour le Lupus et le Syndrome des Antiphospholipides, institut E3M, Paris, France

^g Université Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines, APHP, Service de Médecine Interne, Hôpital Ambroise Paré, Boulogne-Billancourt, France

^h Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité AP-HP, Groupe Hospitalier Cochin Broca Hôtel-Dieu, Fédération d'Infectiologie, Paris, France

ⁱ Inserm, F-CRIN I-REIVAC, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 April 2017

Received in revised form 24 July 2017

Accepted 26 July 2017

Available online 4 August 2017

Keywords:

Systemic lupus erythematosus
Conjugate pneumococcal vaccine
Pneumococcal polysaccharide vaccine
Immunosuppression

ABSTRACT

Background: Invasive pneumococcal disease and respiratory tract infections are both frequent and severe in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). This study aimed to compare the immunological efficacy and safety of pneumococcal vaccination with the 23-valent polysaccharide (PPS) vaccine alone to a sequential immunization with the 7-valent pneumococcal conjugate (PnCj) vaccine followed by PPS in patients with SLE and stable disease.

Methods: Multicenter randomized placebo-controlled double-blind trial: PPS vaccine alone (placebo-PPS group) or PnCj vaccine followed by PPS vaccine (PnCj-PPS group) 24 weeks later. The primary endpoint was the rate of responders at week 28 to at least 5 of the 7 serotypes (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F and 23F) shared by both PPS and PnCj. Pneumococcal IgG antibodies' opsonophagocytic activity (OPA) were also assessed.

Results: Twenty-five patients in the placebo-PPS group and 17 in the PnCj-PPS group were included in a modified intention-to-treat analysis. The primary endpoint was reached in 72% (18/25) in the placebo-PPS and 76% (13/17) in the PnCj-PPS group ($p = 0.75$). There was no difference in the rates of responders with OPA. At week 52, 13/18 (72%) patients in the placebo-PPS group and 10/13 (77%) patients in the PnCj-PPS group ($p = 0.77$) that met the primary endpoint at week 28 were still responders to $\geq 5/7$ serotypes shared by both PPS and PnCj vaccines. Nine SLE flares were reported in 6 patients (4 in the placebo-PPS and 2 in the PnCj-PPS groups respectively, $p = 0.70$).

Conclusion: Sequential administration of PnCj vaccine followed by PPS vaccine is safe and shows short-term immunological efficacy in patients with SLE but was not superior to the PPS vaccine alone.

Conclusion: Trial registration: www.clinicaltrials.gov, NCT NCT00611663

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

* Corresponding author at: Fédération d'Infectiologie, Hôpital Cochin, 27 rue du Faubourg St Jacques, 75679 Paris cedex 14, France.

E-mail address: odile.launay@aphp.fr (O. Launay).

¹ Dr. Grabar and Dr. Groh contributed equally to this work.

² Present address: Université Pierre et Marie Curie, Sorbonne Paris Cité AP-HP, Department of Internal Medicine, Hôpital St Louis, Paris, France.

1. Introduction

Despite improvement of survival over the last decades, patients with systemic lupus erythematosus (SLE) have an increased mortality rate as compared with the general population [1,2]. Infections are one of the leading causes of death in this context [2–4].

The excess risk of infections reported during the course of SLE is likely to be multifactorial, with factors (e.g. lymphopenia, functional asplenia) inherent to SLE [5] and others (e.g. the use of glucocorticoid and/or immunosuppressants) [6,7] acquired during the course of the disease. Both retrospective [8–11] and prospective studies [7] underline that invasive pneumococcal disease and respiratory tract infections are both frequent and severe in the context of SLE. Moreover, pneumonia is the leading cause of avoidable hospitalizations in this setting [12]. Preventing infections is necessary in order to improve both short and long-term prognoses.

Pneumococcal immunization is recommended in immunocompromised hosts [13,14] and in patients with autoimmune inflammatory rheumatic diseases (including SLE), regardless of their level of immunosuppression [15,16]. Previous studies have shown that the 23-valent pneumococcal polysaccharide (PPS) vaccine alone is safe in SLE patients [17–24] but data regarding the short-term immunogenicity of such vaccination are conflicting, and some studies report on a decreased rate of responders among SLE patients as compared to the general population. Moreover, since polysaccharide antigens induce specific antibody production in a T-lymphocyte-independent manner, the 23-valent PPS vaccine is associated with poor long-term immunogenicity and is unable to prime a booster response in case of subsequent re-exposure [25]. The pneumococcal conjugate (PnCj) vaccine, initially developed for children aged <2 years (who fail to mount an adequate immune response to the 23-valent vaccine alone), has led to a significant decrease of pneumococcal infections in young infants [26]. In the latter vaccine, polysaccharide antigens are linked to a protein-carrier that stimulates T-helper cells and thus enhances the vaccine's immunogenicity. Previous studies in immunocompromised hosts (e.g. HIV infection, Hodgkin's lymphoma, solid organ transplantation) [27–31] have shown that the PnCj vaccine was associated with increased immunogenicity as compared to vaccination with the PPS vaccine alone.

Neither immunization with the PnCj vaccine nor the sequential administrations of both PnCj and PPS vaccines (combined strategy) have been assessed in patients with SLE. The primary objective of this study was, in adult patients with SLE and stable disease, to compare the immunological efficacy and safety of pneumococcal vaccination with the PPS vaccine alone to a vaccination schedule combining PnCj and PPS vaccines.

2. Patients and methods

2.1. Study population

Patients aged between 18 and 75 years with SLE (defined by the 1997 American College of Rheumatology classification criteria) [32] and stable disease (i.e. no modification of the treatment within 2 months before inclusion) were enrolled. Eligible patients had to be treated with at least one of the following drugs: (1) hydroxychloroquine, (2) ≥ 5 mg of daily prednisone or equivalent, (3) systemic glucocorticoids at any dose in combination with at least one immunosuppressant (mycophenolate mofetil, azathioprine or methotrexate). Patients were excluded if they met one of the following criteria: HIV, HBV or HVC infection; medical history of allergy to any vaccine component; pneumococcal vaccination in the 5 past years; vaccination (any vaccine) in the previous month; intravenous immunoglobulin infusion within three months; splenectomy; bleeding disorders with contraindication to intramuscular injections; active malignancy; cirrhosis; acute infection in the previous month; treatment with rituximab in the previous year. Women of childbearing age without contraception, with a positive urine β -hCG test before vaccination or

with a desire of pregnancy within 7 months after inclusion were excluded.

2.2. Study design

The Vaccination in Lupus (VACCILUP, ClinicalTrials.gov NCT00611663) study was a Phase IIb multicenter randomized double-blind placebo-controlled trial comparing two pneumococcal vaccination strategies in patients with SLE. Patients were centrally randomized (1:1) to receive either (1) sequential administration of both the 7-valent PnCj vaccine at baseline followed by the 23-valent PPS vaccine at week 24 (PnCj-PPS group) or (2) vaccination with placebo at baseline and the 23-valent PPS vaccine at week 24 (placebo-PPS group). Randomization was stratified by centers, by the use of immunosuppressants (other than glucocorticoids) and by chronic kidney disease (defined by an estimated GFR <80 ml/mn). The "Unité de Recherche Clinique" centrally managed the randomization that was established using a computerized generator that used block size of 4. The study was conducted in 8 rheumatology and internal medicine departments in France. The protocol complied with the Declaration of Helsinki and French law for biomedical research and was approved on the 16th October 2007 by the national Ethic Committee "Comité de Protection des Personnes Ile-de France III" (approval n° 2477). Written informed consent was obtained from each patient.

Patients underwent physical examination at inclusion, weeks 4, 24, 28 and 52. Disease activity was assessed using Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI) [33] and physician's global disease assessment. Blood samples were collected from all patients at each study visit and tested for routine biochemical, hematological tests (including CD4/CD8 cell counts) and analysis of the immune response induced by the pneumococcal vaccination.

2.3. Vaccines

Either Pneumo 23® or Pneumovax 23® (Sanofi Pasteur MSD) were used as 23-valent PPS vaccines targeting serotypes 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F and 33F of *Streptococcus pneumoniae*. The PnCj vaccine, Prevenar® (Pfizer), is a pneumococcal 7-valent vaccine targeting serotypes 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F of *Streptococcus pneumoniae* in which antigens are conjugated to mutant diphtheria protein CRM₁₉₇. Vaccines and placebo (serum glucose 5%, 0.5 mL) were administered by intramuscular injections in the deltoid muscle.

2.4. Immunogenicity assessments

Immunogenicity measurements were performed in a central laboratory (Cochin hospital) blinded to the trial arm. IgG antibody concentrations for the 7-pneumococcal serotypes shared by both PPS and PnCj vaccines (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F and 23F) were measured at each study visit using a modified enzyme linked immunosorbent [www.vaccine.uab.edu] [34]. Briefly, 96-well plates (Corning, Inc., Corning, NY) were coated with a serotype-specific pneumococcal polysaccharide antigen (American Type Culture Collection, Manassas, VA) and incubated 5 h at 37 °C. Reference sera (007sp), quality control sera, or patient specimens were pre-absorbed with 5 μ g/ml pneumococcal C-polysaccharide (Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark) and 10 μ g/ml serotype 22F capsular polysaccharide (American Type Culture Collection) for 30 min at room temperature before being serially diluted. After washing plates, serially diluted serum was added and plates were incubated at room temperature for 2 h. Plates were then washed, and alkaline phosphatase-conjugated goat anti-human immunoglobulin G (IgG; Southern Biotech, Birmingham, AL) was

added. After another 2-h incubation and washing, substrate (p-nitrophenyl phosphate in diethanolamine buffer, pH 9.8) was added to the plates. After a final incubation, the optical density was measured at 405 nm. Anti-pneumococcal antibody levels were determined in each specimen by analysis of linear regression plots compared with the reference serum (007sp).

Opsonophagocytic activities (OPA) were measured at baseline and at week 28 by a multiplexed opsonophagocytic killing assay (MOPA, [www.vaccine.uab.edu] [35]). All serum samples were incubated at 56 °C for 30 min before being tested. Sera were serially diluted in round-bottom 96-well plates (Corning Inc., Corning, NY). Frozen aliquots of target pneumococci were thawed, washed twice, diluted to the proper bacterial density, and added to the plates. After 30 min of incubation at room temperature with shaking at 700 rpm, complement and HL60 cells (ATCC) that had been differentiated to phagocytes were added to each well. Plates were incubated in a tissue culture incubator (37 °C, 5% CO₂) with shaking at 700 rpm. After a 45-min incubation, plates were placed on ice for 20 min. Ten µl of each well were spotted onto four different

Todd-Hewitt broth-yeast extract agar plates. After application of an overlay agar containing one of four antibiotics to each agar plate and overnight incubation at 37 °C, the number of bacterial colonies in the agar plates was enumerated. Opsonization titers were defined as interpolated reciprocal serum dilution that kills 50% of the bacteria in the assay. The lowest titer of opsonophagocytic antibody that could be measured by our method was 8, based on the dilution of undiluted serum in the incubation well. Serum specimens not demonstrating a 50% reduction of CFU in the OPA at the lowest serum dilution (1:8) were assigned a titer of 4, enabling statistical analyses of the data sets.

2.5. Safety assessments

Diary cards were provided to patients in order to record injection-site- (pain, erythema, edema, skin nodule) and systemic- (fever, asthenia, headache, arthralgia, myalgia) adverse events (AE) that occurred within 5 days after vaccination. In addition, all AE with a medically attended visit up to 52 weeks after

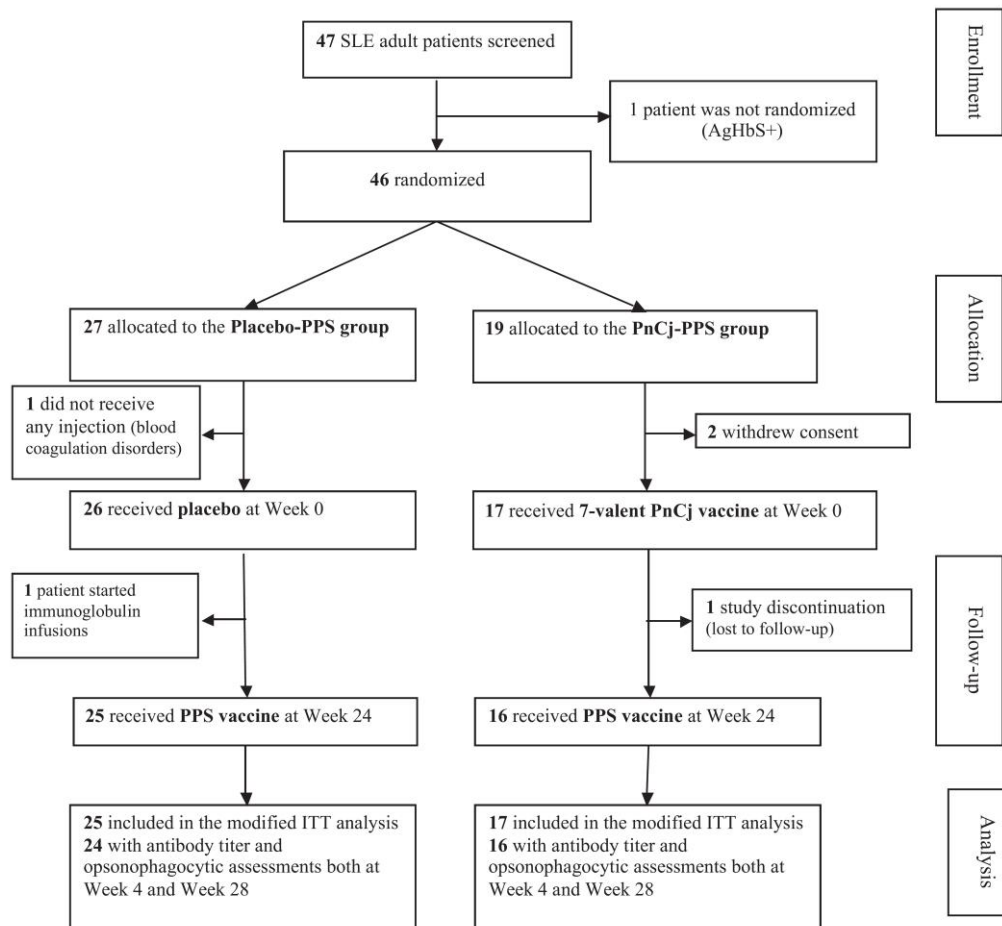


Fig. 1. Flow chart of patient enrollment.

Table 1
Baseline demographic and clinical characteristics of patients.

	Total N = 42	placebo-PPS group N = 25	PnCj-PPS group N = 17
Age, years, median (IQR)	39.5 (33.3–50.7)	35.7 (31.3–48.2)	41.4 (36.4–50.7)
Female gender, n (%)	37 (88)	23 (92)	14 (82)
History of SLE			
Age at first symptoms, years, median (IQR)	25.7 (18.6–33.7)	26.9 (17.6–31.5)	24.4 (21.1–37.6)
Age at diagnosis, years, median (IQR)	27.0 (20.0–34.0)	27.0 (18.6–33.8)	27.5 (20.7–37.8)
Time between diagnosis and pneumococcal vaccination, years, median(IQR)	7.3 (3.7–15.1)	7.2(4.5–14.2)	7.6(3.1–18.6)
SLEDAI score at study enrollment, n (%)			
<4	32 (76)	18 (72)	14 (82)
≥4	10 (24)	7 (28)	3 (18)
Treatments, n (%)			
Antimalarials	39 (93)	24 (96)	15 (88)
Corticosteroids	36 (86)	22 (88)	14 (82)
Mean (SD) daily prednisone	7 (2)	7 (2)	7 (2)
>10 mg of daily prednisone	10 (24)	5 (20)	5 (29)
Immunosuppressants	16 (38)	9 (36)	7 (41)
Renal insufficiency (<80 mL/min), n (%)	6 (14)	4 (16)	2 (12)
Leucocytes, × 10 ³ /mm ³ , median (IQR)	6.5 (5.2–8.4)	6.9 (4.2–8.9)	6.4 (5.2–7.6)
Lymphocytes, × 10 ³ /mm ³ , median (IQR)	1.2 (0.9–1.6)	1.3 (1.1–1.6)	1.0 (0.9–1.6)
<10 ³ /mm ³ , n (%)	12 (32)	5 (23)	7 (47)
C3, g/L, median (IQR)	0.9 (0.8–1.1)	0.9 (0.8–1.2)	1.0 (0.9–1.0)
C4, g/L, median (IQR)	0.2 (0.1–0.2)	0.2 (0.1–0.2)	0.2 (0.1–0.2)
Anti-DNA antibodies, U/mL, median (IQR)	22.0 (7.0–73.0)	19.0 (5.5–73.5)	34.0 (7.0–71.0)

IQR: interquartile range; SLE: Systemic lupus erythematosus; SLEDAI: SLE disease activity index.

baseline evaluation were recorded at each study visit. Disease activity was assessed at each visit using the SLEDAI score. A flare of SLE was defined as an increase of ≥3 points of the SLEDAI score requiring treatment intensification. An adjudication committee of independent physicians blinded to the trial arm graded the severity of all AE and reviewed all cases of disease flares. SLE flares that occurred after an obvious trigger (*i.e.* treatment non-adherence, tapering of immunosuppression within 2 months prior to the flare, sun exposure) or >12 weeks after the vaccine injection were considered likely not to be related to the vaccination protocol.

2.6. Sample size and statistical analysis

The primary endpoint was the proportion of responders at week 28 to at least 5 of the 7 tested pneumococcal serotypes. The response to a specific serotype was defined as both a 2-fold increase of pneumococcal IgG antibody titers (ELISA) between baseline and week 28 and an antibody titer ≥1 µg/ml at week 28. Secondary efficacy endpoints included: serotype-specific IgG titers at week 28, the rates of patients responding to either 0; 1 or 2; 3 or 4; 5–7 serotypes, and the rates of responders to each serotype as assessed by OPA. For the latter, the response to a specific serotype was defined by both at least a fourfold increase of the opsonization index (OI, defined by the serum dilution killing 50% of the bacterial inoculum) between baseline and week 28, and an OI ≥8 at week 28. Data were analyzed following a modified intention-to-treat analysis including all patients who received at least the first vaccine or placebo dose. Patients with missing data were considered as non-responders.

Based on the results of the PNEUMOVAC study in HIV-infected patients, we hypothesized that the combined strategy would lead to an increase of 30% of the rate of responders at week 28 (70% vs. 40%) [29]. Taking into account early study discontinuations, with 80% of statistical power and a two-sided alpha risk of 0.05, 53 patients had to be enrolled in both trial arms. Data were analyzed blinded to the trial arm. Patient characteristics are reported as the number and percentage for categorical variables and as the median (IQR) for continuous variables. The percentages of responders in both arms are provided together with their 95% confidence interval (95%CI). Quantitative variables were compared using Student's *t*-test and categorical variables were compared

using the chi-square test. All tests were 2-sided at the level of 0.05. All analyses were performed using SAS version 9.3 (SAS Institute, Inc., Cary, North Carolina, USA).

3. Results

3.1. Study patients

Forty-seven patients were included between May 2008 and November 2011 among which 46 underwent randomization (Fig. 1): 27 in the placebo-PPS group and 19 in the PnCj-PPS group. One patient in the placebo-PPS group (blood coagulation disorders) and 2 patients in the PnCj-PPS group (consent withdrawal) did not receive any vaccine. One patient started immunoglobulin infusions after vaccination with placebo but before receiving PPS. Overall, 25 patients in the placebo-PPS group and 17 patients in the PnCj-PPS group were included in a modified intention-to-treat analysis.

The demographic and clinical characteristics of the 2 groups were well balanced and are described in Table 1. SLE was diagnosed with a median (IQR) of 7.3 [3.7–15.1] years and SLEDAI score was ≥4 for 76% of the patients. Overall, 39 (93%) patients were under treatment with antimalarials (hydroxychloroquine or chloroquine) at study entry, 36 (86%) received glucocorticoids (among which 10 (24%) received >10 mg of daily prednisone) and 16 (38%) were treated with immunosuppressants (mycophenolate mofetil n = 8; azathioprine n = 5; methotrexate n = 3).

3.2. Immunogenicity according to antibody titers (ELISA)

Four weeks after the first injection (placebo or PnCj vaccine), the rates of responders to at least 5 serotypes shared by both PPS and PnCj vaccines were 0% (0/25) in the placebo-PPS and 35% (6/17) in the PnCj-PPS group ($p = 10^{-3}$), while the rates of responders to all 7 serotypes were 0% (0/25) in the placebo-PPS group and 12% (2/17) in the PnCj-PPS group ($p = 0.08$) (Table 1).

At week 28 (*i.e.* 4 weeks after the PPS injection in both groups), the proportion of responders to at least 5 serotypes shared by both PPS and PnCj vaccines (primary endpoint) was 72% (18/25; 95% CI, 51–88) in the placebo-PPS group and 76% (13/17; 95% CI, 50–93) in the PnCj-PPS group ($p = 0.75$) (Table 2). Patients showing no

Table 2
Proportion of responders and antibody titers (ELISA) against the 7-pneumococcal serotypes shared by both PPS and PnCj (placebo-PPS group: n = 25; PnCj-PPS group: n = 17).

	Week 0		Week 4		Week 24		Week 28		Week 52	
	placebo-PPS	PnCj-PPS	placebo-PPS	PnCj-PPS	placebo-PPS	PnCj-PPS	placebo-PPS	PnCj-PPS	placebo-PPS	PnCj-PPS
Responders to at least 5 serotypes, n (%)	–	–	0	6 (35.3)	0	5 (29.4)	18 (72.0) ^a	13 (76.5) ^a	13 (52.0)	10 (58.8)
Responders to all 7 serotypes, n (%)	–	–	0	2 (11.8)	0	2 (11.8)	6 (24.0) ^b	7 (41.2) ^b	4 (16.0)	4 (23.5)
Responders by number of serotypes, n (%)										
0	–	–	24 (96.0)	2 (11.8)	25 (100)	4 (23.5)	4 (16.0)	3 (17.6)	5 (20.0)	5 (29.4)
1–2	–	–	1 (4.0)	1 (5.9)	0	1 (5.9)	2 (8.0)	0	3 (12.0)	0
3–4	–	–	0	8 (47.1)	0	7 (41.2)	1 (4.0)	1 (5.9)	4 (16.0)	2 (11.8)
5–7	–	–	0	6 (35.3)	0	5 (29.4)	18 (72.0)	13 (76.5)	13 (52.0)	10 (58.8)
Titer ≥ 1 µg/ml, n (%)										
4	7 (28.0)	6 (35.3)	7 (28.0)	12 (70.6)	7 (28.0)	12 (70.6)	19 (76.0)	14 (82.4)	16 (64.0)	11 (64.7)
6B	16 (64.0)	13 (76.5)	17 (68.0)	16 (94.1)	15 (60.0)	15 (88.2)	22 (88.0)	15 (88.2)	21 (84.0)	13 (76.5)
9V	11 (44.0)	10 (58.8)	12 (48.0)	16 (94.1)	12 (48.0)	16 (94.1)	22 (88.0)	16 (94.1)	20 (80.0)	13 (76.5)
14	19 (76.0)	12 (70.6)	19 (76.0)	16 (94.1)	19 (76.0)	15 (88.2)	23 (92.0)	16 (94.1)	21 (84.0)	13 (76.5)
18C	11 (44.0)	10 (58.8)	11 (44.0)	13 (76.5)	12 (48.0)	13 (76.5)	21 (84.0)	15 (88.2)	18 (72.0)	12 (70.6)
19F	19 (76.0)	16 (94.1)	20 (80.0)	16 (94.1)	18 (72.0)	15 (88.2)	23 (92.0)	16 (94.1)	22 (88.0)	13 (76.5)
23F	12 (48.0)	10 (58.8)	13 (52.0)	13 (76.5)	12 (48.0)	13 (76.5)	19 (76.0)	14 (82.4)	17 (68.0)	11 (64.7)
Ratio titer/Week 0, mean (SD)										
4	–	–	1.0 (0.2)	7.6 (12.3)	1.0 (0.2)	3.4 (4.4)	5.6 (6.3)	14.6 (37.7)	3.8 (4.1)	4.4 (3.6)
6B	–	–	1.0 (0.2)	5.2 (5.2)	0.9 (0.2)	3.6 (4.2)	10.4 (16.9)	5.1 (4.9)	4.5 (4.6)	5.6 (6.5)
9V	–	–	1.0 (0.2)	8.3 (10.0)	1.1 (0.3)	4.1 (3.4)	6.5 (5.1)	6.5 (4.8)	4.7 (4.1)	5.6 (4.8)
14	–	–	1.0 (0.2)	35.7 (107.9)	1.0 (0.2)	11.6 (27.0)	27.8 (39.7)	15.5 (23.4)	14.2 (19.2)	13.3 (19.9)
18C	–	–	0.9 (0.2)	14.6 (23.7)	0.9 (0.2)	11.0 (28.5)	7.8 (7.4)	14.7 (38.5)	5.5 (6.3)	4.2 (2.5)
19F	–	–	1.0 (0.2)	2.2 (2.4)	0.9 (0.1)	1.6 (1.0)	4.5 (3.7)	4.0 (3.1)	8.7 (25.8)	7.3 (14.0)
23F	–	–	1.0 (0.4)	10.1 (11.5)	1.0 (0.4)	5.9 (6.7)	10.9 (16.2)	9.5 (7.7)	7.0 (8.8)	10.0 (10.8)
Ratio titer/Week 0 ≥ 2, n (%)										
4	–	–	0 (0)	10 (58.8)	0 (0)	7 (41.2)	17 (68.0)	13 (76.5)	12 (48.0)	11 (64.7)
6B	–	–	0 (0)	10 (58.8)	0 (0)	7 (41.2)	18 (72.0)	13 (76.5)	15 (60.0)	11 (64.7)
9V	–	–	0 (0)	12 (70.6)	1 (4.0)	10 (58.8)	18 (72.0)	11 (64.7)	13 (52.0)	9 (52.9)
14	–	–	0 (0)	9 (52.9)	0 (0)	9 (52.9)	18 (72.0)	14 (82.4)	17 (68.0)	10 (58.8)
18C	–	–	0 (0)	15 (88.2)	0 (0)	13 (31.0)	18 (72.0)	14 (82.4)	19 (76.0)	12 (70.6)
19F	–	–	0 (0)	3 (17.6)	0 (0)	4 (23.5)	17 (68.0)	11 (64.7)	12 (48.0)	7 (41.2)
23F	–	–	1 (4.0)	11 (64.7)	1 (4.0)	11 (64.7)	19 (76.0)	12 (70.6)	15 (60.0)	12 (70.6)

Patients with missing data were considered as non-responders: 1 patient in each treatment group from W0 to W28; at W52: 1 additional patient in the placebo-PPS group and 3 in the PnCj-PPS group.

^a Primary endpoint: $p = 0.75$ (Chi-square test).

^b $p = 0.24$ (Chi-square test).

response to any of the 7-shared serotypes were 16% (4/25) in placebo-PPS group and 18% (3/17) in PnCj-PPS group ($p = 0.24$). Likewise, there was no difference between groups in the rates of responders to the 7 serotypes shared in both vaccines (24% (6/25; 95% CI, 9–45) in the placebo-PPS group and 41% (7/17; 95% CI, 18–67) in PnCj-PPS group ($p = 0.24$)). When using a modified threshold of 0.35 µg/ml for antibody titers, the latter definition improved the rates of vaccine response (76.0% in the placebo-PPS versus 76.5% in the PnCj-PPS group, $p = 1.0$) but there was again no difference in between both study groups (Supplemental Tables 1 and 2). Next, there were no differences between the rates of responders in patients (regardless of their vaccine schedule) treated with and without immunosuppressants (75% and 73% respectively, $p = 1.0$), and in those receiving ≤10 mg and >10 mg of baseline daily prednisone (69% and 90% respectively, $p = 0.25$).

At week 52, 13/18 (72%) patients in the placebo-PPS group and 10/13 (77%) patients in the PnCj-PPS group ($p = 0.77$) that otherwise met the primary endpoint at week 28 were still responders to at least 5 serotypes shared by both PPS and PnCj vaccines. Overall, at week 52, the rates of responders for ≥5 serotypes were 52% (13/25) in the placebo-PPS group and 59% (10/17) in the PnCj-PPS group ($p = 0.66$).

3.3. Immunogenicity according to functional antibody titers (OPA)

OPA titers at baseline and at week 28 are reported in Fig. 2. At baseline, very low-to-low agreement was observed between

immune responses measured by ELISA and OPA (Cohen's kappa coefficients ranging from 4% (serotype 19F) to 29% (serotype 23F)). At week 28, although there was for some serotypes (e.g. serotypes 6B, 9V, 18C and 23F) a trend towards better immunogenicity induced by the PnCj-PPS group, the rates of responders to at least 5 serotypes shared by both PnCj and PPS were similar in the two groups: (28% (7/25) in the placebo-PPS group vs. 35% (6/17) in the PnCj-PPS group; $p = 0.38$).

3.4. Safety

No respiratory tract infection was reported over the study period. At least one AE was reported in 19 patients (76%) of the placebo-PPS group and in 15 patients (88%) of the PnCj-PPS group ($p = 0.32$). Sixty percent of patients had at least one expected site injection AE, among which pain was the most frequent (Table 3). Forty-eight percent of patients had at least one general AE among which headache was the most frequent.

During follow-up, 9 SLE flares were reported in 6 patients (4 in the placebo-PPS group and 2 in the PnCj-PPS group, $p = 0.70$). Such flares occurred within week 24 in 3 and 0 patient(s) in the placebo-PPS and PnCj-PPS groups, respectively ($p = 0.14$) and between weeks 24 and 52 in 2 patients each ($p = 0.68$). A single SLE flare in the placebo-PPS group was considered possibly related to the vaccination protocol. The latter consisted of mild polyarthritides occurring 71 days after vaccination with PPS and resolved after the increase of glucocorticoids. Of note, the rate of patients with

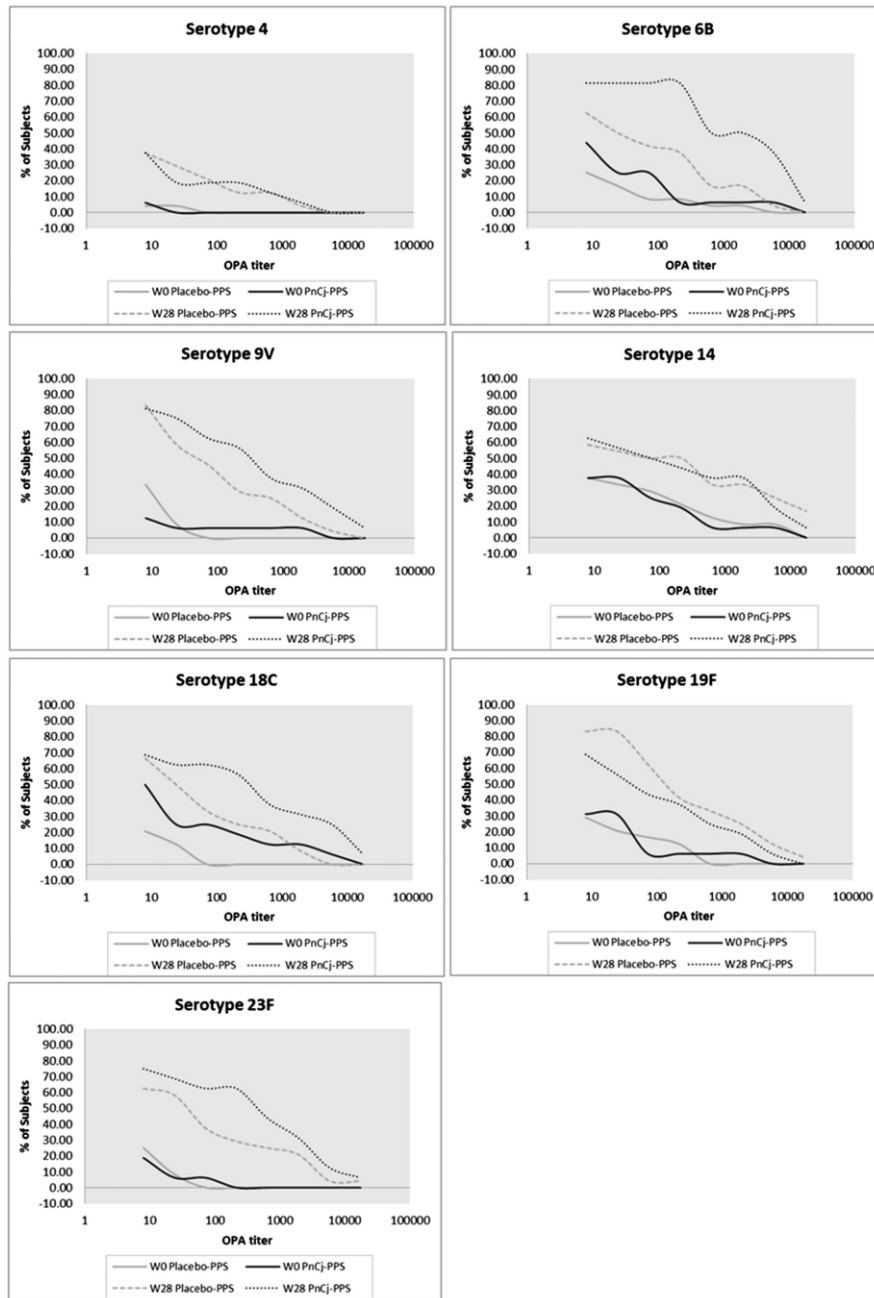


Fig. 2. Rates of responders (assessed by antibodies' opsonophagocytic activity) at week 0 and week 28.

Table 3
Site injection and systemic adverse events between baseline and week 52.

Adverse events	Total N = 42	placebo-PPS group N = 25	PnCj-PPS group N = 17
Number (%) of patients with ≥ 1 adverse event ^a	34 (81)	19 (76)	15 (88)
Number of adverse events	162	75	87
Site injection adverse events (%) within 5 days after vaccination ^b	85 (52)	27 (36)	58 (67)
Pain	28 (17)	11 (15)	17 (19)
Erythema	18 (11)	6 (8)	12 (14)
Induration	17 (10)	3 (4)	14 (16)
Edema	14 (9)	4 (5)	10 (11)
Skin nodule	8 (5)	3 (4)	5 (6)
Systemic adverse events (%) within 5 days after vaccination ^b	43 (26)	22 (29)	21 (24)
Fever	1 (1)	0	1 (1)
Asthenia	9 (6)	4 (5)	5 (6)
Headache	16 (10)	9 (12)	7 (8)
Arthralgia	9 (6)	6 (8)	3 (3)
Myalgia	8 (5)	3 (4)	5 (6)
Unexpected/other systemic adverse events (%) within 5 days after vaccination ^b	26 (16)	19 (25)	6 (7)
Urticaria	4 (2)	4 (5)	0
Nausea	3 (2)	3 (4)	0
Diarrhea	2 (1)	1 (1)	1 (1)
Vomiting	1 (1)	1 (1)	0
Others	14 (9)	10 (13)	4 (5)
Number (%) of SLE flares ^{b,c}	9 (6)	7 (9)	2 (2)
Number (%) of patients with ≥ 1 SLE flare ^{b,c}	6 (14)	4 (16)	2 (12)
Number (%) of patients with ≥ 1 SLE flare ^c occurring between weeks 0 and 24 ^a	3 (7)	3 (12)	0
Among which n (%) of patients whose flare ^c was possibly related to the vaccination protocol ^d	0	0	0
Number (%) of patients with ≥ 1 SLE flare ^c occurring between weeks 24 and 52 ^a	4 (10)	2 (8)	2 (12)
Among which n (%) of patients whose disease flare was possibly related to the vaccination protocol ^d	1 (2)	1 (4)	0

^a % Relative to the total number of patients.^b % Relative to the total number of adverse events.^c SLE flare: defined as an increase of ≥ 3 points of the SLEDAI score requiring treatment intensification.SLEDAI scores ≥ 4 and both complement and anti-dsDNA levels remained stable in both groups over the study period (Table 4).**Table 4**
Disease parameters in both trial arms over the study period.

	S0		S4		S24		S28	
	placebo-PPS	PnCj-PPS	placebo-PPS	PnCj-PPS	placebo-PPS	PnCj-PPS	placebo-PPS	PnCj-PPS
SLEDAI (/10) n (%)								
<4	18 (72.0)	14 (82.4)	23 (92.0)	17 (100)	23 (92.0)	15 (93.8)	22 (91.7)	14 (87.5)
≥ 4	7 (28.0)	3 (17.6)	2 (8.0)	0	2 (8.0)	1 (6.3)	2 (8.3)	2 (12.5)
C3, g/L median (IQR)	0.88 (0.76–1.20)	0.96 (0.86–1.04)	0.89 (0.83–1.17)	0.89 (0.82–1.03)	0.97 (0.82–1.11)	0.87 (0.84–1.08)	0.93 (0.82–0.98)	0.95 (0.78–1.00)
C4, g/L median (IQR)	0.18 (0.11–0.24)	0.17 (0.13–0.21)	0.19 (0.13–0.23)	0.16 (0.13–0.19)	0.18 (0.14–0.21)	0.18 (0.10–0.19)	0.17 (0.14–0.21)	0.17 (0.12–0.19)
Anti-dsDNA, UI/mL median (IQR)	19.0 (5.5–73.5)	34.0 (7.0–71.0)	35.0 (7.0–62.0)	26.0 (11.0–84.0)	36.0 (11.0–52.0)	30.0 (8.0–68.0)	28.0 (11.0–51.0)	23.0 (8.0–48.0)

IQR: interquartile range.

At S24, SLEDAI score was missing for 1 patient in the PnCj-PPS group; at S28, SLEDAI score was missing for 1 patient in the Placebo-PPS group and 2 patients in the PnCj-PPS group.

4. Discussion

Reducing the burden of infections is a major concern for physicians treating patients with SLE. Means to do so include tapering glucocorticoid [36] and/or immunosuppressant doses, promoting the prescription of antimalarials [8] and timely vaccinations. Current guidelines regarding the prevention of infections of both immunocompromised hosts [13] and patients with autoimmune inflammatory rheumatic diseases [15,16] recommend that pneumococcal immunization be performed. In the present study, sequential administration of the 7-valent PnCj vaccine followed by the 23-valent PPS vaccine was compared to the PPS vaccine alone in patients with SLE and stable disease. Four weeks after the PPS vaccine injection, the rate of responders to at least 5 serotypes of the 7 serotypes shared by both PPS and PnCj vaccines (primary endpoint) was 72% in the placebo-PPS group and 76% in the PnCj-PPS group. After one year, these rates decreased and dropped to 52% in the placebo-PPS group and 59% in the PnCj group. Hence, unlike previous studies in immunocompromised hosts [29,31] but in line with the study of Tobudic et al. in 62 renal transplant patients [37] and that of Penaranda in 202 HIV-infected patients [38], we were unable to confirm in our population of SLE patients the potential benefit of a strategy combining the sequential administration of both PnCj and PPS vaccines.

Despite the lack of difference between the rates of responders in the two vaccination groups, it is important to underscore that this trial is the first to assess the safety and efficacy of the PnCj vaccine in patients with SLE. As reported previously in patients with SLE undergoing influenza [39,40] or routine vaccinations [41], pneumococcal vaccination with a conjugated vaccine was safe and did not trigger SLE flares. Next, although there is a time shift between the two vaccination groups, the effects of both PnCj (week 4 of the PnCj-PPS group) and PPS (week 28 of the placebo-PPS group) vaccines alone 4 weeks after immunizations can be compared. Hence, our results suggest that the PnCj vaccine alone was not more immunogenic than the PPS vaccine alone in patients with SLE (Table 2). The results with OPA led to the same conclusion (data not shown).

It is unclear why the basal level of antibodies against pneumococcal polysaccharides are found elevated at a level upper than 0.35 $\mu\text{g/ml}$ and even 1 $\mu\text{g/ml}$ in the lupus population (Table 2). A report has hypothesized that some anti-dsDNA antibodies might cross-react with bacterial polysaccharides [42] but our data do not support this hypothesis (Spearman's correlation coefficient between baseline anti-dsDNA antibodies' and serotype-specific pneumococcal antibodies' titers ranging from -0.229 to 0.064 ; NS). Moreover, others have already reported such an increase in the basal levels of antibodies against pneumococcal polysaccharides in both SLE [22] and HIV+ [43] pneumococcal vaccine-naïve patients. As pneumococci are commensal bacteria that can colo-

nize the oropharynx, one might speculate that they might induce subclinical immunization in immunocompromised patients.

Measurement of antibody concentrations with ELISA is the recommended method for market authorization of pneumococcal vaccines. Yet, OPA is considered as the reference method for assessing the protective efficacy of pneumococcal antibodies [44–46]. To our knowledge, the present study is the first to report on OPA titers after pneumococcal vaccination of patients with SLE. Although there was for some serotypes (*i.e.* serotypes 6B, 9V, 18C and 23F) a trend towards better immunogenicity for the PnCj-PPS group (Fig. 2), there was no significant difference at week 28 in the rates of responders for ≥ 5 serotypes assessed by OPA. Overall, the rates of responders were lower in both groups with OPA than with ELISA, and neither ELISA nor OPA titers showed a clear superiority of the PnCj-PPS group over the placebo-PPS group. Previous studies in which both OPA and ELISA tests were assessed suggested that there might be some discrepancies between both laboratory methods, and that these could be influenced by the pneumococcal serotype analyzed [28,30,43,47]. In the present study, very low-to-low agreement was observed between baseline immune responses measured by ELISA and OPA.

Our study has some limitations. First, we were not able to enroll the expected number of patients and consequently the study power to detect significant differences between vaccination groups was decreased. Despite growing evidence regarding both the burden of infections and the safety of non-live vaccines in patients with autoimmune inflammatory rheumatic diseases, it is likely that there continues to be an increased risk perception of vaccination by both patients and physicians in this context [48,49]. Next, our results cannot be extrapolated to patients with SLE treated with other biologics (namely B-cell and IFN α -targeted therapies) and/or immunosuppressants (*e.g.* cyclophosphamide or calcineurin inhibitors) that were not included in the present survey. Last, the 7-valent PnCj vaccine was recently replaced in both infants [50], elderly [51] and immunocompromised hosts [13] by a 13-valent PnCj vaccine. Yet, this study is the first to report in patients with SLE on the safety and efficacy of a conjugated vaccine, and to report on vaccines' immunogenicity with the functional OPA.

In conclusion, our results demonstrate the safety and short-term immunological efficacy of both PPS and PnCj vaccines in the context of SLE. Hence, our findings further support the fact that pneumococcal vaccination should be performed in this setting. Yet, priming with PnCj vaccine before PPS vaccine was not superior to PPS vaccine alone in both ELISA and OPA. Last, since more than 40% of patients failed to mount memory immune responses at week 52, our findings underline the need of future studies with new vaccines and/or innovative schedule designs in order to enhance protection of patients with SLE against pneumococcal infections.

Acknowledgements

The authors thank Philippe Guilpain, Cécile Janssen and Selim Trad for being members of the adverse events' adjudication committee; URC-CIC Paris Descartes Necker/Cochin (Séverine Poinant and Adèle Belleino) and Corinne Desaint (CIC 1417, Paris, France) for trial monitoring and handling, preparation, and submission of all required research ethics and regulatory documents for implementation, monitoring and data management of the study and DEC-AGEPS.

Funding

Supported by a grant from the "Programme Hospitalier de Recherche Clinique", French Ministry of Health (PHRC 2007-AOM06008).

Disclosure statement

MG, OL: research grant from Pfizer. All other authors have declared no conflicts of interest.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.07.094>.

References

- [1] Uramoto KM, Michet CJ, Thumboo J, Sunku J, O'Fallon WM, Gabriel SE. Trends in the incidence and mortality of systemic lupus erythematosus, 1950–1992. *Arthritis Rheum.* 1999;42:46–50.
- [2] Bernatsky S, Boivin J-F, Joseph L, Manzi S, Ginzler E, Gladman DD, et al. Mortality in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2006;54:2550–7.
- [3] Cervera R, Khamashta MA, Font J, Sebastiani GD, Gil A, Lavilla P, et al. Morbidity and mortality in systemic lupus erythematosus during a 10-year period: a comparison of early and late manifestations in a cohort of 1,000 patients. *Medicine (Baltimore)* 2003;82:299–308.
- [4] Goldblatt F, Chambers S, Rahman A, Isenberg DA. Serious infections in British patients with systemic lupus erythematosus: hospitalisations and mortality. *Lupus* 2009;18:682–9.
- [5] Uthman I, Soucy JP, Nicolet V, Sénécal JL. Autopsplenectomy in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1996;23:1806–10.
- [6] Noël V, Lortholary O, Casassus P, Cohen P, Gènereau T, André MH, et al. Risk factors and prognostic influence of infection in a single cohort of 87 adults with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2001;60:1141–4.
- [7] Bosch X, Guilabert A, Pallarés L, Cervera R, Ramos-Casals M, Bové A, et al. Infections in systemic lupus erythematosus: a prospective and controlled study of 110 patients. *Lupus* 2006;15:584–9.
- [8] Ruiz-Irastorza G, Olivares N, Ruiz-Arzuza I, Martínez-Berriotxo A, Egurube M-V, Aguirre C. Predictors of major infections in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 2009;11:R109.
- [9] Luijten RKM, Cuppen BVJ, Bijlsma JWJ, Derksen RHW. Serious infections in systemic lupus erythematosus with a focus on pneumococcal infections. *Lupus* 2014;23:1512–6.
- [10] Tektonidou MG, Wang Z, Dasgupta A, Ward MM. Burden of serious infections in adults with systemic lupus erythematosus: a national population-based study, 1996–2011. *Arthritis Care Res* 2015;67:1078–85.
- [11] Feldman CH, Hiraki LT, Winkelmayr WC, Marty FM, Franklin JM, Kim SC, et al. Serious infections among adult Medicaid beneficiaries with systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. *Arthritis Rheumatol* 2015;67:1577–85.
- [12] Ward MM. Avoidable hospitalizations in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2008;59:162–8.
- [13] Rubin LG, Levin MJ, Ljungman P, Davies EG, Avery R, Tomblyn M, et al. 2013 IDSA clinical practice guideline for vaccination of the immunocompromised host. *Clin Infect Dis* 2014;58:e44–e100.
- [14] Centers for Disease Control and Prevention. Advisory committee on immunization practices (ACIP) recommended immunization schedule for adults aged 19 years and older – United States, 2013. *MMWR*. 2013;62:9–11.
- [15] van Assen S, Agmon-Levin N, Elkayam O, Cervera R, Doran MF, Dougados M, et al. EULAR recommendations for vaccination in adult patients with autoimmune inflammatory rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* 2011;70:414–22.
- [16] Mathian A, Arnaud L, Adoue D, Agard C, Bader-Meunier B, Baudouin V, et al. Prevention of infections in adults and adolescents with systemic lupus erythematosus: Guidelines for the clinical practice based on the literature and expert opinion. *Rev Med Interne* 2016;37:307–20.
- [17] Klippel JH, Karsh J, Stahl NI, Decker JL, Steinberg AD, Schiffman G. A controlled study of pneumococcal polysaccharide vaccine in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1979;22:1321–5.
- [18] Jarrett MP, Schiffman G, Barland P, Grayzel AL. Impaired response to pneumococcal vaccine in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1980;23:1287–93.
- [19] McDonald E, Jarrett MP, Schiffman G, Grayzel AL. Persistence of pneumococcal antibodies after immunization in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1984;11:306–8.
- [20] Croft SM, Schiffman G, Snyder E, Herrmann K, James K, Jarrett MP. Specific antibody response after in vivo antigenic stimulation in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1984;11:141–6.
- [21] Lipnick RN, Karsh J, Stahl NI, Blackwelder WC, Schiffman G, Klippel JH. Pneumococcal immunization in patients with systemic lupus erythematosus treated with immunosuppressives. *J Rheumatol* 1985;12:1118–21.
- [22] Elkayam O, Paran D, Caspi D, Litinsky I, Yaron M, Charboneau D, et al. Immunogenicity and safety of pneumococcal vaccination in patients with rheumatoid arthritis or systemic lupus erythematosus. *Clin Infect Dis* 2002;34:147–53.

- [23] Elkayam O, Ablin J, Caspi D. Safety and efficacy of vaccination against streptococcus pneumonia in patients with rheumatic diseases. *Autoimmun Rev* 2007;6:312–4.
- [24] Tarján P, Sipka S, Maródi L, Nemes E, Lakos G, Gyimesi E, et al. No short-term immunological effects of Pneumococcus vaccination in patients with systemic lupus erythematosus. *Scand J Rheumatol* 2002;31:211–5.
- [25] Murdaca G, Orsi A, Spanò F, Puppo F, Durando P, Icardi G, et al. Influenza and pneumococcal vaccinations of patients with systemic lupus erythematosus: current views upon safety and immunogenicity. *Autoimmun Rev* 2014;13:75–84.
- [26] Poehling KA, Talbot TR, Griffin MR, Craig AS, Whitney CG, Zell E, et al. Invasive pneumococcal disease among infants before and after introduction of pneumococcal conjugate vaccine. *JAMA* 2006;295:1668–74.
- [27] Molrine DC, George S, Tarbell N, Mauch P, Diller L, Neuberg D, et al. Antibody responses to polysaccharide and polysaccharide-conjugate vaccines after treatment of Hodgkin disease. *Ann Intern Med* 1995;123:828–34.
- [28] Feikin DR, Elie CM, Goetz MB, Lennox JL, Carlone GM, Romero-Steiner S, et al. Randomized trial of the quantitative and functional antibody responses to a 7-valent pneumococcal conjugate vaccine and/or 23-valent polysaccharide vaccine among HIV-infected adults. *Vaccine* 2001;20:545–53.
- [29] Lesprit P, Pédrone G, Molina J-M, Goujard C, Girard P-M, Sarrazin N, et al. Immunological efficacy of a prime-boost pneumococcal vaccination in HIV-infected adults. *AIDS* 2007;21:2425–34.
- [30] Kumar D, Rotstein C, Miyata G, Arlen D, Humar A. Randomized, double-blind, controlled trial of pneumococcal vaccination in renal transplant recipients. *J Infect Dis* 2003;187:1639–45.
- [31] Chan CY, Molrine DC, George S, Tarbell NJ, Mauch P, Diller L, et al. Pneumococcal conjugate vaccine primes for antibody responses to polysaccharide pneumococcal vaccine after treatment of Hodgkin's disease. *J Infect Dis* 1996;173:256–8.
- [32] Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997;40:1725.
- [33] Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis Rheum* 1992;35:630–40.
- [34] Wermette CM, Frasch CE, Madore D, Carlone G, Goldblatt D, Plikaytis B, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of human antibodies to pneumococcal polysaccharides. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003;10:514–9.
- [35] Romero-Steiner S, Libutti D, Pais LB, Dykes J, Anderson P, Whitin JC, et al. Standardization of an opsonophagocytic assay for the measurement of functional antibody activity against *Streptococcus pneumoniae* using differentiated HL-60 cells. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997;4:415–22.
- [36] Tedeschi B, Arnaud L, Hie M, Mathian A, Amoura Z. Successful treatment of combined proliferative and membranous lupus nephritis using a full corticosteroid-free regimen. *Ann Rheum Dis* 2014;73:474–5.
- [37] Tobudic S, Plunger V, Sunder-Plassmann G, Riegersperger M, Burgmann H. Randomized, single blind, controlled trial to evaluate the prime-boost strategy for pneumococcal vaccination in renal transplant recipients. *PLoS One* 2012;7:e46133.
- [38] Peñaranda M, Payeras A, Cambra A, Mila J, Riera M. Majorcan Pneumococcal Study Group. Conjugate and polysaccharide pneumococcal vaccines do not improve initial response of the polysaccharide vaccine in HIV-infected adults. *AIDS* 2010;24:1226–8.
- [39] Mathian A, Devilliers H, Krivine A, Costedoat-Chalumeau N, Haroche J, Huong DB-LT, et al. Factors influencing the efficacy of two injections of a pandemic influenza A (H1N1) nonadjuvanted vaccine in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2009;2011(63):3502–11.
- [40] Kostianovsky A, Charles P, Alves J-F, Goulet M, Pagnoux C, Le Guern V, et al. Immunogenicity and safety of seasonal and 2009 pandemic A/H1N1 influenza vaccines for patients with autoimmune diseases: a prospective, monocentre trial on 199 patients. *Clin Exp Rheumatol* 2012;30:S83–9.
- [41] Grimaldi-Bensouda L, Le Guern V, Kone-Paut I, Aubrun E, Fain O, Ruel M, et al. The risk of systemic lupus erythematosus associated with vaccines: an international case-control study. *Arthritis Rheumatol* 2014;66:1559–67.
- [42] Chowdhry IA, Kowal C, Hardin J, Zhou Z, Diamond B. Autoantibodies that bind glomeruli: cross-reactivity with bacterial antigen. *Arthritis Rheum* 2005;52:2403–10.
- [43] Bhorat AE, Madhi SA, Laudat F, Sundaraiyer V, Gurtman A, Jansen KU, et al. Immunogenicity and safety of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in HIV-infected individuals naive to pneumococcal vaccination. *AIDS* 2015;29:1345–54.
- [44] Jódar L, Butler J, Carlone G, Dagan R, Goldblatt D, Kiyhyt H, et al. Serological criteria for evaluation and licensure of new pneumococcal conjugate vaccine formulations for use in infants. *Vaccine* 2003;21:3265–72.
- [45] Romero-Steiner S, Frasch CE, Carlone G, Fleck RA, Goldblatt D, Nahm MH. Use of opsonophagocytosis for serological evaluation of pneumococcal vaccines. *Clin Vaccine Immunol* 2006;13:165–9.
- [46] Hu BT, Yu X, Jones TR, Kirch C, Harris S, Hildreth SW, et al. Approach to validating an opsonophagocytic assay for *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005;12:287–95.
- [47] Cordonnier C, Ljungman P, Juergens C, Maertens J, Selleslag D, Sundaraiyer V, et al. Immunogenicity, safety, and tolerability of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine followed by 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplant aged ≥ 2 years: an open-label study. *Clin Infect Dis* 2015;61:313–23.
- [48] Hanslik T, Wechsler B, Vaillant JN, Audrain L, Prinseau J, Baglin A, et al. A survey of physicians' vaccine risk perception and immunization practices for subjects with immunological diseases. *Vaccine* 2000;19:908–15.
- [49] Lawson EF, Trupin L, Yefin EH, Yazdany J. Reasons for failure to receive pneumococcal and influenza vaccinations among immunosuppressed patients with systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum* 2015;44:666–71.
- [50] Angoulvant F, Levy C, Grimprel E, Varon E, Lorrot M, Biscardi S, et al. Early impact of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine on community-acquired pneumonia in children. *Clin Infect Dis* 2014;58:918–24.
- [51] Bonten MJM, Huijts SM, Bolkenbaas M, Webber C, Patterson S, Gault S, et al. Polysaccharide conjugate vaccine against pneumococcal pneumonia in adults. *N Engl J Med* 2015;372:1114–25.

III. ETUDE DE L'HYPORÉPONSE INDUITE PAR LE VACCIN POLYSACCHARIDIQUE

1. ARTICLE 4

Prévention de l'hyporéponse par la modulation (temps et doses) du schéma vaccinal anti-pneumococcique

Prevention of hyporesponsiveness by modulation of schedule and doses of pneumococcal vaccine immunization

Mathilde Bahuaud, Anna Monier, Hélène Bodilis, Elodie Lachiche, Leila Kara, Marine Gil, Odile Launay, Frédéric Batteux

Dans cette étude, nous avons voulu étudier, dans un premier temps, l'impact de la modulation de la dose de PS sur l'hyporéponse. Notre hypothèse était que l'hyporéponse pouvait être réduite si l'on diminuait la dose de PPV23. Soixante volontaires sains ont été inclus dans un protocole hospitalier de recherche clinique (PHRC). Tous les volontaires reçurent à l'inclusion une dose de PCV13, suivie deux mois plus tard d'une dose pleine ou réduite (1/5^{ème}) de PPV23. L'immunogénicité des schémas vaccinaux a été évaluée par ELISA contre 10 sérotypes communs aux deux vaccins (3, 4, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F) et 3 sérotypes inclus uniquement dans le PPV23 (10A, 12F and 15B). Un volontaire était considéré répondeur s'il montrait une augmentation de la concentration en anticorps après vaccination d'au moins deux fois par rapport à la visite d'avant vaccination, pour au moins 9 sérotypes sur les 13 testés. Un volontaire était considéré protégé s'il montrait une concentration en anticorps \geq à 1 μ g/ml pour au moins 9 sérotypes sur les 13 testés. Enfin, l'hyporéponse a été mesurée en calculant la proportion de volontaires ayant un ratio de concentration en anticorps post/pré vaccination $<$ 1, indiquant une diminution de la concentration post-vaccination par rapport aux taux pré-vaccinaux.

Nos résultats ont montré qu'une injection de PCV13 induisait une bonne réponse vaccinale chez les sujets sains avec 83% des volontaires répondeurs un mois après l'immunisation par le PCV13. Une telle réponse n'a pas pu être observée après immunisation par le PPV23,

puisque aucun volontaire n'a présenté de doublement de sa concentration post-vaccinale. De plus, une hyporéponse a clairement été mise en évidence chez 60% des volontaires ayant reçu une dose pleine et 78% avec une dose réduite. L'hyporéponse était plus importante avec la dose réduite. Notre hypothèse est qu'une pleine dose de PPV23 induit une hyporéponse mais induit également une réponse immune extra folliculaire entraînant la sécrétion d'anticorps anti-pneumococciques par les plasmocytes. Cette production de nouveaux anticorps minimise ainsi l'impact de l'hyporéponse induite par le PPV23. Nos résultats montrent qu'un 1/5^{ème} de dose n'est pas assez immunogène pour induire la production d'anticorps comme peut le faire la pleine dose. Ainsi, dans ce cas-là, nous observons une diminution plus importante des anticorps. Notre étude démontre que les mécanismes impliqués dans l'hyporéponse ne sont pas dus à la forte concentration en PS dans le vaccin polysaccharidique.

Nous avons ensuite voulu évaluer si la modulation du schéma vaccinal pouvait diminuer l'hyporéponse. Ainsi, 10 mois après la première dose de PPV23, les volontaires inclus dans l'étude, reçurent une seconde dose pleine ou réduite de PPV23. La réponse immune induite par cette seconde vaccination n'a permis de doublement de la concentration chez aucun volontaire. Cette seconde injection de PPV23 induit une hyporéponse, plus modérée que lors de la première immunisation qui est observée chez seulement 10 à 28 % des volontaires, en fonction des stratégies vaccinales. L'hyporéponse la plus faible a été observée pour les volontaires ayant reçu une dose réduite suivie d'une dose pleine. Ces résultats semblent mettre en lumière l'importance de la durée entre les injections de vaccins dans l'apparition de l'hyporéponse. En effet, plus l'injection de PPV23 sera effectuée à distance du PCV13, moins forte sera l'hyporéponse. Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons développé au sein du laboratoire un modèle murin d'hyporéponse. Nous avons ainsi pu tester chez ces souris l'impact d'une dose retardée versus une dose « classique », induisant l'hyporéponse. Les souris ayant reçu la dose retardée ne présentaient plus ou peu d'hyporéponse.

Enfin, une récente publication montrait un effet suppresseur des PS du méningocoque sur le système BAFF des lymphocytes B et des plasmocytes. Afin de pouvoir d'observer les cellules spécifiques des PS, nous avons mis au point un PS couplé à de la biotine afin de pouvoir

marquer ces cellules et les quantifier en cytométrie en flux. Nous nous sommes donc intéressés à l'expression des récepteurs BAFFR et TACI à la surface des cellules spécifiques dans notre modèle murin. Des résultats préliminaires (non montrés dans l'article) montrent une diminution de l'expression de TACI à la surface des cellules spécifiques des PS du pneumocoque.

Nos observations suggèrent que le schéma vaccinal anti-pneumococcique utilisé à l'heure actuelle semble discutable. En effet, les résultats de notre étude démontrent que la stratégie combinée induit une hyporéponse bien que la concentration des PS ne soit pas un facteur influençant la survenue de ce phénomène. Ces résultats obtenus chez des volontaires sains doivent maintenant être confirmés chez des patients à risques de développer des infections invasives à pneumocoque. Notre hypothèse est que chez ces patients, l'hyporéponse pourrait être diminuée par l'injection d'une dose retardée ou d'une seconde dose de PPV23, à distance de la stratégie combinée (par exemple, 12 mois après l'injection du PCV13). L'effet suppressif des PS sur l'expression de TACI pourrait être un des mécanismes de l'hyporéponse induite par la vaccination polysaccharidique.

27 **Abstract**

28 **Objectives:** Current recommendations for pneumococcal vaccine immunization are the
29 use of one dose of polysaccharide conjugated vaccine (PCV13) followed 8 weeks apart by
30 one dose of polysaccharide vaccine (PPV23). Unfortunately, in some cases, this strategy has
31 been shown to cause vaccine hyporesponsiveness. We assessed in humans and mouse the
32 effect of reduced or delayed doses of PPV23 administered after PCV13 to prevent
33 hyporesponsiveness against the pneumococcal vaccine.

34

35 **Method:** We immunized 60 healthy volunteers with four vaccination strategies, testing
36 plain or reduced (1/5th) doses of PPV23. All Participants received one dose of PCV13 at
37 baseline and PPV23 at plain or reduced dose, 8 weeks apart. A second dose of PPV23 (plain
38 or reduced) was given one year after PCV13 immunization. Concentrations of IgG specific for
39 10 serotypes common to both vaccines and 3 uncommon serotypes, included only in the
40 PPV23, were measured by ELISA at baseline and after 1, 3, 12, 13, 18 and 24 months post-
41 vaccine. The effect of the vaccine schedule modulation was also assessed in a mouse model
42 of hyporesponsiveness induced in BALB/c mice intraperitoneally (i.p) by immunization with
43 PCV13 and PPV23, given either simultaneously, 14 days or 60 days after PCV13.

44

45 **Results:** After PCV13 vaccination, the first vaccination with PPV23 decreased the levels
46 of polysaccharides antibodies in 78% of volunteers immunized with the reduced dose versus
47 60% in volunteers immunized with the plain dose. Even given one year later as second dose,
48 immunogenicity of reduced dose of PPV23 was not enough to reach antibody concentration
49 obtained before PPV23 vaccination. However, hyporesponsiveness wasn't observed in
50 volunteers receiving plain dose of PPV23 as second injection which induced immunogenicity
51 and long term persistence of antibodies with concentrations stable 2 years after PCV13
52 immunization. In line with those results, mice co-vaccinated with PCV13 and PPV23 in the
53 same time or 14 days apart showed hyporesponsiveness while increasing the delay between
54 the two vaccines at two months abrogate hyporesponsiveness.

55

56 **Conclusion:** Hyporesponsiveness is not polysaccharide-concentration dependant and
57 reduced doses of PPV23 did not overcome the hyporesponsiveness phenomenon. However,
58 a delay between the two vaccinations, with PPV23 administered at least one year after the
59 PCV13 immunization could improve immune response and bypass hyporesponsiveness.

60

61 Introduction

62 *Streptococcus pneumoniae* is a significant cause of mortality and morbidity in children and in
63 immunocompromised adults and elderly¹⁻³. For the prevention of invasive pneumococcal
64 diseases, two polysaccharides (PS) vaccines are currently available: a non-conjugate vaccine
65 Pneumovax® (PPV23) and a conjugate vaccine Prevenar13®(PCV13), inducing protection
66 against 23 and 13 pneumococcal serotypes, respectively. The PPV23 induces a large serotype
67 coverage but is considered weakly immunogenic, especially in infants, elderly and
68 immunocompromised patients, while PCV13, due to the conjugation to a carrier protein,
69 presents the advantage of inducing a strong T cell dependent (TD) immune response, not
70 observed with PPV23⁴.

71 Current recommendations are to use a combined strategy for patients at risk (ACIP
72 recommendations, Advisory Committee on Immunization Practices⁵), with administration of
73 a dose of PCV13 followed by one dose of PPV23, 8 weeks after and eventually a boost by
74 PPV23 five years later. This strategy combines the immunological properties of the conjugate
75 vaccine in inducing immune memory to those of the unconjugated vaccine in terms of
76 serotype coverage. Theoretically, PPV23 administration should not influence on the memory
77 response induced by the PCV13 vaccine because unconjugated PS are unable to activated
78 anti-PS memory B and T cells generated by the conjugated vaccine⁶⁻⁸. Indeed, PPV23 vaccine
79 induced a T-independent B cells response that produce anti-PS antibodies that add to those
80 generated after the T-dependant B cells response induced by the conjugated vaccine but
81 without inducing a boost in the memory B cell response induced by the conjugated vaccine.
82 However, independence of the two responses has been questioned in humans and mice as
83 hyporesponse has been observed when PPV23 is injected after PCV13⁹⁻¹¹. Hyporesponse is
84 defined when antibody (Ab) level after the second immunization is lower than the Ab level
85 obtain with the first vaccination. The main hypothesis to account for this phenomenon is the
86 toxicity of the unconjugated PS that have been shown to induce memory B cell apoptosis.
87 Therefore, the dose of PPV23 used for the serotypic enlargement after the PCV13 vaccine can
88 be questionable. Furthermore, the dose of each PS antigen contained in the PPV23 vaccine is
89 5 to 10 times higher than the one in the PCV13 vaccine (25µg versus 2-4 µg). Furthermore, PS
90 have been described for having a long half life as Felton et al observed the presence of PS 18
91 months after immunization in mice sera¹². It was then hypothesis that lower level of PS could
92 be enough to induce activation of the T independent B cell response against PS with few
93 impacts on the T dependent anti-PS B cell response because of the reduced risk of toxicity
94 against memory B cell.

95 This hypothesis is supported by studies on hyporesponsiveness related to polysaccharide
96 antigen concentration in the context of meningococcal vaccine. Indeed, since 1975, infants
97 immunized with repeated doses of meningococcal C polysaccharide unconjugated vaccine,
98 showed antibody concentration lower after the second than after the first vaccine
99 administration¹³. Gold et al. have shown that the hyporesponsiveness was observed only in

100 children revaccinated with doses of polysaccharide antigens of 25 or 100 µg while no
101 hyporesponsiveness was observed in patients who received 10 µg¹³. This dose effect was
102 reported by Felton as early as in 1942, in mice in which large doses of polysaccharides (100
103 µg) but not low doses (0.5-1 µg) resulted in hyporesponsiveness to a subsequent challenge
104 with the full-dose vaccine or bacteria¹⁴.

105 As pneumococcal PS also induced hyporesponsiveness, we assumed that these findings
106 could be transposed and reducing the Pneumococcal PS concentration during immunization
107 could bypass hyporesponsiveness.

108

109 Thus, we evaluated the impact of plain versus reduced dose (1/5th) of PPV23 in a vaccination
110 strategy combining PCV13 and PPV23 vaccines, in a clinical trials on healthy volunteers. To
111 evaluate the influence of the vaccine schedule on hyporesponsiveness, plain or reduced
112 dose of PPV23 was administered 10 months after the first dose of PPV23. The immunity of
113 pneumococcal vaccination was also confirmed in a mouse model of hyporesponsiveness that
114 allows us to better explore the molecular and cellular mechanisms of hyporesponsiveness.

115

116

117 Methods

118 ○ **Study Population**

119 Sixty healthy volunteers aged between 18 and 49 years were enrolled in a clinical trial
120 (HYPOPNEUMO, clinical trial NCT02279589). Volunteers were excluded if they met one of
121 the following criteria: HIV, HBV or HVC infection; medical history of allergy to any vaccine
122 component; previous pneumococcal vaccination; vaccination (any vaccine) in the previous
123 month; bleeding disorders with contraindication to intramuscular injections; active
124 malignancy; cirrhosis; acute infection in the previous month. Women of childbearing age
125 without contraception, with a positive urine beta-hCG test before vaccination or individuals
126 with personal or familial history of any illness that, in the opinion of the investigator, might
127 pose additional risk to the subjects due to participation in the study, history of an auto-
128 immune disorder, or any other known or suspected impairment /alteration of the immune
129 system or under immunosuppressive therapy, thrombocytopenia or coagulation disorder
130 contraindicating intramuscularly injections; coagulation disorder contra-indicating
131 intramuscularly injections; acute respiratory tract infection within the month before
132 enrolment.

133 Participants were recruited between December 2014 and May 2015 at the clinical
134 Investigation Center (CIC) of Cochin Hospital. Written informed consent was obtained from
135 the participants before enrollment. Ethical approval was obtained from the local ethical
136 committee.

137 ○ **Study Design**

138 Sixty healthy volunteers were randomized in four vaccination strategies, testing plain or
139 reduced (1/5th) doses of PPV23. All Participants received at baseline one dose of PCV13 and
140 Immunization with PPV23 at plain or reduced dose was done 2 months apart. A second dose
141 of PPV23 (plain or reduced) was given one year after PCV13 immunization. Blood was
142 sampled prior to and after vaccination (baseline (M0), 1 month, 2, 3, 12, 13, 18, 24 and 36
143 months after inclusion) (figure 1).

144 ○ **Mice**

145 Specific-pathogen free, 6 weeks old female BALB/c mice were purchased from Janvier Labs.
146 Mice were maintained with food and water ad libitum and housed in autoclaved cages. All
147 animals were kept in identical housing conditions and euthanized by cervical dislocation
148 preceded by isoflurane inhalation. Animals received humane care in compliance with French
149 Institutional Guidelines (INSERM and Université Paris Descartes – Ethics Committee CEEA
150 34).

151

152

153 ○ **Mouse model of pneumococcal vaccine hyporesponsiveness**

154 A mouse model was developed in the laboratory based on the protocol described by
155 Bjarnarson et al¹⁵ and modified as follow. Six weeks old BALB/c females (5 per groups) were
156 immunized with intraperitoneal (IP) injections of PCV13 at day 0 (D0), followed two weeks
157 later (D14) by one dose of PPV23. Controls groups received one or two doses of PCV13, one
158 dose of PPV23. Sera were collected by retro-orbital punctured before and after each
159 vaccines injection. Mice were euthanized 10 weeks later (D60) by cervical dislocation
160 preceded by isoflurane inhalation.

161 Different sets of experiments were performed in order to evaluate on the
162 hyporesponsiveness, the impact of time between the two vaccines (simultaneous
163 immunization of both vaccine at day 0 (D0) or PPV23 at D14 or D60).

164

165 ○ **Vaccines**

166 Either Pneumo 23® or Pneumovax® (Sanofi Pasteur MSD) (PPV23) were used as 23-valent
167 PPS vaccines targeting serotypes 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F,
168 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F and 33F of *Streptococcus pneumoniae*. The conjugated anti-
169 pneumococcal vaccine, Prevenar13® (PCV13)(Pfizer), is a 13-valent pneumococcal vaccine
170 targeting serotypes 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F of *Streptococcus*
171 *pneumoniae* in which antigens are conjugated to mutant diphtheria protein CRM197.
172 Vaccines were administered by intramuscular injections in the deltoid muscle in human
173 volunteers. Mice were immunized by intraperitoneal injection (200µl) with 2µg of PCV13 and
174 10µg of PPV23, concentrations considered as plain dose of PPV23.

175

176 ○ **Immunogenicity assessments**

177 We evaluated antibody concentrations for 13 serotypes (3, 4, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F,
178 23F, 10A, 12F and 15B) by ELISA. For the evaluation of the combined strategy, we selected
179 10 common serotypes (3, 4, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F) included in both vaccines. To
180 see the impact of the PPV23 vaccination only, we selected 3 uncommon serotypes included
181 only in the polysaccharide vaccine: 10A, 12F and 15B. Those three serotypes were also
182 known to be responsible of invasive pneumococcal infection in France¹⁶.

183 IgG antibody concentrations for those thirteen serotypes were determined using a modified
184 enzyme linked immunosorbent (ELISA)¹⁷ previously described^{18,19}. Patient's sera were pre-
185 absorbed with a solution containing 5mg/ml pneumococcal C-polysaccharide (Statens Serum
186 Institut) and 10 mg/ml serotype 22F capsular polysaccharide (American Type Culture
187 Collection). Anti-pneumococcal antibody levels were determined in each specimen by

188 analysis of linear regression plots compared with the reference serum (007sp) (National
189 Institute for Biological Standards and Control (NIBSC)).

190 Currently, there are no validated correlates of pneumococcal vaccine protection in adults.
191 Several studies have defined a response criteria for pneumococcal vaccine particularly
192 adapted for evaluation of long-term protection in immunocompromised patients²⁰. Based on
193 those criteria, a two-fold increase in antibody level was chosen as an indicator of positive
194 antibody responsive to the vaccine for each serotype (i.e., ratio of post-vaccination and pre-
195 vaccination antibody levels). Volunteers developing an immunological response (two-fold
196 increased) toward at least 70% of serotypes one month after vaccination were considered as
197 Responders. For the evaluation of the long-term protection, volunteers with an IgG-
198 concentration > 1 mg/ml for at least 70% of the serotypes were considered as Protected.

199 In order to evaluate the hyporesponsiveness (HR), ratios of geometric mean of antibody
200 concentrations (GMC) before and one month after vaccination were measured. A ratio < 1
201 represented a decrease in concentration after the vaccination and then defined HR for the
202 serotype considered.

203

204 ○ **Statistical analysis**

205 For each serotype, the geometric mean concentrations (GMC) and titers (GMT) and the
206 corresponding 95 % confidence intervals (CI) were calculated. We calculated the proportions
207 of volunteers with ratio of GMC < 1 (i.e decrease of concentration) for the different
208 vaccination strategies.

209 For visits M0, M1, M3 and M12, we pooled volunteers included in groups A and D (A+D) and
210 those included in groups B and C (B+C) as they received the same dose of first PPV23
211 injection; plain dose for A+D and reduced dose for B+C.

212 Characteristics were compared using Mann-Whitney's Ranksum test for quantitative variable
213 and Fisher's exact test for categorical variable. The percentages of responders are provided
214 together with their 95% confidence interval (95%CI). All tests were 2-sided at the level of
215 0.05. All analyses were performed using Graph Pad Prism 5.0 software (GraphPad Inc).

216

217

218 Results

219

220 *Dose effect of PPV23 on anti-PS Ab response*

221 *Immune response*

222 Volunteers were considered as responders when a two-fold increase in the IgG-
223 concentration from baseline toward at least 70% of serotypes was observed. In line with this
224 definition, 83 % of volunteers (44/53) were responders to the 10 common serotypes to both
225 vaccines, one month post-PCV13 immunization (M1) (figure 2A). By contrast, none of our
226 volunteers (0/53) were responders, one month after PPV23 injection (M3), at any
227 concentration of PPV23 vaccine. Similar results were found after the second injection of
228 PPV23, one year after the PCV13 injection for groups A (1 + 1/5) (0/11), B (1/5 + 1/5) (0/14)
229 and D (1 + 1) (0/15). However, 23% (3/13) of the volunteers in the group C (1/5 + 1) were
230 responders after the second injection of PPV23.

231 Considering the three uncommon serotypes included only in the PPV23 vaccine (10A, 12F
232 and 15B), a plain dose of PPV23 at M3 elicited a better response with all volunteers (26/26)
233 in groups A+D being responders compared to 73% of responders in volunteers immunized
234 with a reduced dose (groups B+C) (22/27) ($p < 0.0001$) (figure 2B). The second injection of
235 PPV23 at M12 elicited very low response rates with only one responder in group A (1 + 1/5)
236 (1/10) and one in group D (1 + 1) (1/14) one month after the second PPV23 vaccine (M13).
237 None of the volunteers in the groups B and C responded to the vaccine as none showed a
238 two-fold increase in their anti-PS Ab concentrations at M13.

239

240 *Protection*

241 For the evaluation of the protection, a second criterion was applied where an IgG-
242 concentration $> 1\mu\text{g/ml}$ in ELISA for at least 70% of the serotypes was required to be
243 protected.

244 At baseline (M0), 17% of volunteers were protected without any history of previous
245 pneumococcal vaccination (figure 3A). PCV13 immunization induced a high protection rate in
246 healthy adults with 96% of all of our volunteers protected one month after PCV13 vaccine.

247 *Protection against the 10 common serotypes.* Hundreds percent of volunteers immunized by
248 a plain dose of PPV23 (group A+D) and 88% of those immunized by a reduced dose (group
249 B+C) were protected (figure 3A) one month after the first dose of PPV23 (M3). Thus, a plain
250 dose of PPV23 given 8 weeks after PCV13 induced a significant better protection than a
251 reduced dose ($p = 0.0003$). One year after the PCV13 (M12), we observed a decrease in the
252 protection for both vaccine strategies. The drop was more intense for group B+C (reduced

253 dose) with 70% of volunteers protected compared to the group A+D (plain dose) with 92% of
254 protected ($p=0.0092$).

255 One month after the second dose of PPV23 (M13), the rate of volunteers protected were
256 higher in groups that received a plain dose of PPV23 as second booster (group C: 92%; group
257 D: 93%, than groups with reduced dose (group A: 82%, $p=0,0309$ vs group D, ns vs group C
258 and group B: 86%, ns vs groups A, C and D) (figure 3A). Protection stayed stable for group D
259 (1 + 1)(93%) with similar rates of protection 2 years after PCV13 vaccination (M24) than at
260 M13. A non-significant decrease was observed for group C (1/5 + 1) and group A (1 + 1/5)
261 with 85% and 73% of protected volunteers, respectively. For group B, however, a more
262 severe decrease occurred as we found 71% protected volunteers for group B (1/5 + 1/5)
263 ($p=0.00153$ vs M13).

264 At M24, differences between protection rates were significant for group D vs group B
265 ($p<0.0001$) and A ($p=0.0003$), and between group C and B ($p=0.0258$).

266 *Protection against the 3 uncommon serotypes.* At M3, a plain dose of PPV23 (group A+D)
267 elicited a better protection of volunteers than a reduced dose (group B+C) with 92% and
268 85% of protection, respectively but this difference did not reach significance (figure 3B). At
269 M12, we observed a decrease in protection rates only for group B+C (reduced dose) with
270 74% (vs 85% at M3, $p=0.079$) of volunteers protected, while the percentage of protection
271 remained stable from M3 to M12 for group A+D. At M13, one month after the second dose
272 of PPV23, a plain dose of PPV23 has no effect on protection as the percentages of volunteers
273 protected remained stable for group C (1/5 + 1) with 77% (vs 74% at M12) and group D (1 +
274 1) with 93% (vs 92% at M12), respectively. Depending on the dose of the previous PPV23
275 vaccination, a reduced dose of the second vaccine had different effect on the protection.
276 Indeed, we observed in volunteers immunized by a plain dose of PPV23 as a first dose (group
277 A, 1 + 1/5) a decrease of protection rates with 82% of protected at M13 (vs 92% at M12). By
278 contrast, when the first dose was also a reduced dose, we found an increase of percentage
279 of protected with 86% of protected volunteers at M13 (vs 74% at M12). However, none of
280 those differences reach statistical significances. At M24, two years after PCV13 immunization
281 (M24), the protection rates decreased for all groups except group D (1 + 1) for which,
282 protection remained stable with 87% of protection. We had no more differences between
283 the three others vaccination strategies with percentages of protected of 64% ($p=0.0002$ vs
284 D) for groups A (1 + 1/5) and B (1/5 + 1/5), and 69% ($p=0.0034$ vs D) for group C (1/5 + 1).

285

286 *Hyporesponsiveness (HR)*

287 *HR to the 10 common serotypes.* At M3, one month after PPV23 injection,
288 hyporesponsiveness was observed in 60% of volunteers immunized by a plain dose of PPV23
289 (group A+D) and 78% of volunteers immunized with reduced dose (group B+C) ($p=0.0091$)
290 (figure 4A). Three serotypes were more immunogenic as they induced an HR in less than 50%

291 of volunteers: serotype 3 (23%), serotype 4 (42%) and serotype 14 (49%) with a plain dose of
292 vaccine (group A+D) (figure 4B). With the 1/5th dose of PPV23 (group B+C), HR was induced
293 in more than 50% of volunteers for each serotype. However, serotypes 3 (55%) and 14 (55%)
294 were still the more immunogenic in this vaccine schedule. By contrast, the higher
295 percentages of HR were observed for serotypes 23F (83%), 7F (93%) and 19A (96%) in
296 volunteers immunized with a reduced dose of PPV23 (group B+C) (figure 4B).

297 Independently of the dose used, the second immunization with PPV23, one year after PCV13
298 injection, induced less HR than the first dose with 26% of HR at M13 (vs 60% at M3,
299 $p<0.0001$) for group D (1 + 1), 23% (vs 60% at M3, $p<0.0001$) for group A (1 + 1/5), with 28%
300 (vs 78% at M3, $p<0.0001$) for group B (1/5 + 1/5) and 10% at M13 (vs 78% at M3, $p<0.0001$)
301 for group C (1/5 + 1) (figure 5A). Interestingly, reduced dose given at M13 after a plain or a
302 reduced dose of PPV23 elicited similar percentage of HR with 26% for group A (1 + 1/5) and
303 28% for group B (1/5 + 1/5), respectively. However, we observed a different impact of a plain
304 dose of PPV23 given as a second PPV23 immunization. Indeed, a plain dose given after a
305 reduced dose of PPV23 elicited less HR than after a plain dose with HR observed in
306 respectively 10% of volunteers for group C (1/5 + 1) compared to 23% for group D (1 + 1)
307 ($p=0,0212$).

308 Thus, the schedule used for group C (1/5 + 1) is the one that elicited the less HR compared to
309 the others vaccine strategies. Taken serotype individually, group C elicited a significant lower
310 HR for 8 serotypes (8/10) compared to group B (1/5 + 1/5) and D (1 + 1) and for 6/10
311 compared to group A (1 + 1/5) (figure 5B).

312 *HR to the 3 uncommon serotypes.* When we compared percentages of HR induced by the
313 four vaccine schedule at M13, we observed that groups that were first immunized by a
314 reduced dose of PPV23 (groups B and C) had lower HR than those immunized by a plain dose
315 (groups A and D), with 20%, 34%, 42 and 51% of HR, respectively (figure 6).

316 Moreover, vaccine schedule using a reduced dose followed by a plain dose (group C) was the
317 strategy that elicited the lower HR ($p=0.0012$ for group A (1 + 1/5), $p=0.00378$ for group B
318 (1/5 + 1/5) and $p<0.0001$ for group D).

319

320 *Long-term efficacy*

321 *Long-term efficacy against the 10 common serotypes.* Independently of the dose, the first
322 PPV23 injection was not enough to induced GMC levels that remained stable in time, as we
323 observed at M12 a decrease of GMC, with GMC levels equal or lower than those found at
324 M3 (figure 7). The decrease was more severe for groups A+D (plain dose) with 8 serotypes
325 (8/10)(serotype 3 $p=0.0281$, serotype 4 $p=0.0001$, serotype 18C $p=0.0015$, serotype 19A
326 $p=0.0178$, serotype 19F $p=0.0227$, serotype 23F $p=0.0028$, serotype 7F $p=0.0211$ and
327 serotype 9V $p=0.0022$) that reached significant statistic, compared to only 3 serotypes (3/10)
328 (serotype4 $p=0.0039$, serotype 18C $p=0.0379$ and serotype 19F $p=0.0121$) for groups B+C.

329 However, at M24, the immune response induced by a second dose of PPV23 was more
330 stable, as GMC for all serotypes were still higher or equal to GMC found at M12 for groups B
331 (1/5 + 1/5), C (1/5 + 1) and D (1 + 1). A reduced dose after a plain dose (group A, 1 + 1/5) was
332 not able to induce sufficient antibody response that persisted in time (table 1). However, the
333 decrease of GMC was not significant for any serotypes tested.

334 *Long-term efficacy against the 3 uncommon serotypes.* Immune response induced by the
335 first or the second dose of PPV23 elicited Ab levels that persist and remained stable in time
336 for groups B (1/5 + 1/5) and C (1/5 + 1) with GMC at M12 higher or equal to the GMC level
337 from M3 and GMC at M24 higher or equal to GMC found at M12 (figure 8). For groups A (1 +
338 1/5) and D (1+1), anti-PS Ab concentrations decreased after the first dose of PPV23 but
339 remained stable after the second (table 2).

340

341 *Decreasing HR by modulation of PPV23 Vaccine schedule in mice*

342 In order to evaluate HR in mice, we developed in our laboratory a mouse model of HR. Mice
343 immunized by PCV13 followed 14 days later by one dose of PPV23 showed a decrease in
344 anti-PS antibody (Ab) levels compared to those immunized by one dose of PCV13. The
345 decrease was significant for all serotypes (5/7) except serotype 3 and serotype 1 (table 3).
346 Controls mice immunized by two doses of PCV13 (at D0 and at D14) showed no HR, with an
347 increase of anti-PS Ab levels for all serotypes tested (figure 9).

348 Reducing the delay between PCV13 and PPV23 with a co-administration of both vaccine in
349 the same time at day 0 (D0) did not modified the HR as the decrease of anti-PS Ab levels was
350 observed for all serotypes (5/7) except serotypes 1 and 3.

351 By contrast, increasing the delay between the two vaccines with PPV23 administered 60
352 days after the PCV13 had a positive effect on the immune response and HR was only
353 observed for 2 serotypes (2/7): serotype 6B and 19A, compared to mice immunized by
354 PCV13 alone. We showed an increase of anti-PS Ab levels for 5 serotypes on the 7 tested.

355 Discussion

356 Our results showed that injection of PCV13 induced a two-fold increase in antibody levels in
357 almost all patients immunized with the vaccine. By contrast, such response has never been
358 observed upon vaccination with the PPV vaccine two months after the PCV13 as no patients
359 displayed a two-fold increase in anti-PS antibody (Ab) response. Moreover, a
360 hyporesponsiveness (HR) characterized by a decrease in Ab levels after vaccination
361 compared to Ab levels before vaccination was observed. This phenomenon was even worse
362 when the reduced dose of PPV23 was used.

363 Ten months after the first PPV23 vaccine, re-immunization with plain or reduced dose still do
364 not induced a two-fold response to the vaccine but rather induced a HR in a much lower
365 percentage of patients than the first dose. Moreover, the lowest HR was observed when
366 reduced dose was followed by a plain dose.

367 Those results indicate that HR is a general phenomenon induced by PPV vaccine
368 independently of the dose of PPV used. However, increasing the time between two doses of
369 vaccine decreases the incidence of HR.

370

371 To our knowledge, this study is the first evaluating the modulation of pneumococcal
372 vaccination schedule in healthy volunteers and in mice. It is the first study that confirmed
373 hyporesponsiveness induced by combined pneumococcal vaccination strategy in healthy
374 adults. In a study in elderly, Jackson et al evaluated the impact of reduced dose (1/5th) of
375 PPV23 given one year after PCV13 or PPV23²¹. They found no benefits of immunization with
376 reduced dose of PPV23, as the booster vaccine did not elicited an increase in Ab
377 concentrations. Similar results were found in Fijian infants immunized by plain dose of
378 PPV23 at 12 months of age followed by a boost of a 1/5th dose of PPV23 five months later²².
379 These results are consistent with our results in healthy volunteers showing that a reduced
380 dose of PPV23 vaccine given 10 months after a plain dose did not elicited any increased of
381 GMC.

382 The mechanisms responsible of hyporesponsiveness have not been fully elucidated but it has
383 been demonstrated that PS induced apoptosis of memory B cells¹⁵. It was then hypothesis
384 that lower level of PS could reduce apoptotic effect on B cells. On the contrary, we found
385 that reduced dose did not prevent hyporesponsiveness when reduced dose was given 2
386 months after the PCV13 vaccine and even worsened it. A plain dose of PPV23 induced
387 hyporesponsiveness of the T dependent response but induced also a T independent B cell
388 immune response that lead to stimulation of plasma cells and subsequent secretion of
389 antibodies that minimizes hyporesponsiveness impact of PPV23. Our results clearly show
390 that immunization with reduced dose of PPV23 (1/5th) was not enough immunogenic to
391 mount this large production of anti-PS Ab by plasma cells as plain dose did. In this case, we
392 observed a more severe decrease in antibody concentration. Our results demonstrated that

393 hyporesponsiveness mechanisms are not dependent to the PS concentration contained in
394 the vaccine.

395

396 Studies have demonstrated that administration of a second dose of PPV23 administered 2 to
397 6 months after a dose of PCV7 elicited an apparent hyporesponse^{25,26}. The decrease of
398 immune response seen after re-vaccination with PPV23 in those studies is in contrast to
399 previously reported results. Indeed, two studies have evaluated in elderly the
400 immunogenicity of a delayed dose of PPV23 as a booster after PCV13 vaccination^{23,24}. They
401 also compared PPV23 and PCV13 as booster as patients received either PPV23 or PCV13 one
402 to four years after the first PCV13 vaccine. They found that given at least one year after
403 PCV13, PPV23 did not elicit HR in patients that received PPV23 as boost vaccine. Moreover,
404 the authors found no benefits of PCV13 booster compared to PPV23 booster. Those results
405 are in line with our results. We showed in our study that a second dose of PPV23 given one
406 year after the PCV13 did not elicit HR. Moreover, we found an increase of anti-PS Ab
407 concentrations one month after the PPV23 boost that persist at least 1 year.

408 Those observations were confirmed in our mouse model of hyporesponsiveness as we
409 described the benefit of a delayed dose of PPV23 compared to simultaneous or closer
410 injections. Bjarnasson et al¹⁵ demonstrated in mice that PS induced abrogation of conjugated
411 polysaccharides-induced germinal centers (GC) reaction and the depletion of PS-specific
412 antibody secreting cells, resulting in no homing of new long-lived plasma cells in the bone
413 marrow (BM). Them and others²⁷ observed a depletion of PS-specific memory B cells and
414 B1b cells and demonstrated that PS induced apoptosis of these B cells subsets. These
415 observations taken together with our findings lead us to hypothesize that vaccination with
416 PPV23 after PCV13 should be done once GC reaction disappears and after the complete
417 homing of long-lived plasma cells to the BM, probably 6 to 12 months post-PCV13
418 vaccination. We assumed that a longer interval between pneumococcal vaccines is required
419 to optimize immune responses to subsequent doses of polysaccharide vaccine after an initial
420 dose of conjugated vaccine.

421 In conclusion, the results presented in this study demonstrated that hyporesponsiveness is
422 not PS-concentration dependent. Based on our observations, current pneumococcal
423 vaccination schedule is questionable and studies are needed to evaluate in patients at risk of
424 invasive pneumococcal disease the impact of a delayed injection of polysaccharide vaccine
425 or the impact of a second dose of PPV23, in distance of the combined strategy (12 months
426 after PCV13 vaccine for example).

427

428 References

- 429 1. O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JP, Henkle E, Deloria-Knoll M, McCall N, Lee E, Mulholland
430 K, Levine OS, Cherian T. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in
431 children younger than 5 years: global estimates. *The Lancet* 2009; 374:893–902.
- 432 2. Doran MF, Crowson CS, Pond GR, O'Fallon WM, Gabriel SE. Frequency of infection in
433 patients with rheumatoid arthritis compared with controls: A population-based study.
434 *Arthritis & Rheumatism* 2002; 46:2287–93.
- 435 3. Bonten MJM, Huijts SM, Bolkenbaas M, Webber C, Patterson S, Gault S, van Werkhoven
436 CH, van Deursen AMM, Sanders EAM, Verheij TJM, et al. Polysaccharide Conjugate
437 Vaccine against Pneumococcal Pneumonia in Adults. *New England Journal of Medicine*
438 2015; 372:1114–25.
- 439 4. Robbins JB, Schneerson R, Szu SC. Hypothesis: how licensed vaccines confer protective
440 immunity. *Adv Exp Med Biol* 1996; 397:169–82.
- 441 5. Kobayashi M, Bennett NM, Gierke R, Almendares O, Moore MR, Whitney CG, Pilishvili T.
442 Intervals Between PCV13 and PPSV23 Vaccines: Recommendations of the Advisory
443 Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Morbidity and Mortality Weekly*
444 *Report* 2015; 64:944–7.
- 445 6. Feikin DR, Elie CM, Goetz MB, Lennox JL, Carlone GM, Romero-Steiner S, Holder PF,
446 O'Brien WA, Whitney CG, Butler JC, et al. Randomized trial of the quantitative and
447 functional antibody responses to a 7-valent pneumococcal conjugate vaccine and/or
448 23-valent polysaccharide vaccine among HIV-infected adults. *Vaccine* 2001; 20:545–53.
- 449 7. Chan CY, Molrine DC, George S, Tarbell NJ, Mauch P, Diller L, Shamberger RC, Phillips
450 NR, Goorin A, Ambrosino DM. Pneumococcal conjugate vaccine primes for antibody
451 responses to polysaccharide pneumococcal vaccine after treatment of Hodgkin's
452 disease. *J Infect Dis* 1996; 173:256–8.
- 453 8. de Roux A, Schmidt N, Rose M, Zielen S, Pletz M, Lode H. Immunogenicity of the
454 pneumococcal polysaccharide vaccine in COPD patients. The effect of systemic steroids.
455 *Respir Med* 2004; 98:1187–94.
- 456 9. Koskela M, Leinonen M, Häivä VM, Timonen M, Mäkelä PH. First and second dose
457 antibody responses to pneumococcal polysaccharide vaccine in infants. *Pediatr Infect*
458 *Dis* 1986; 5:45–50.
- 459 10. Blum MD, Dagan R, Mendelman PM, Pinsk V, Giordani M, Li S, Bohidar N, McNeely TB.
460 A comparison of multiple regimens of pneumococcal polysaccharide-meningococcal

- 461 outer membrane protein complex conjugate vaccine and pneumococcal polysaccharide
462 vaccine in toddlers. *Vaccine* 2000; 18:2359–67.
- 463 11. Musher DM, Groover JE, Rowland JM, Watson DA, Struewing JB, Baughn RE, Mufson
464 MA. Antibody to capsular polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae*: prevalence,
465 persistence, and response to revaccination. *Clin Infect Dis* 1993; 17:66–73.
- 466 12. Felton LD, Kauffmann G, Prescott B, Ottinger B. Studies on the mechanism of the
467 immunological paralysis induced in mice by pneumococcal polysaccharides. *J Immunol*
468 1955; 74:17–26.
- 469 13. Gold R, Lepow ML, Goldschneider I, Draper TL, Gotschlich EC. Clinical evaluation of
470 group A and group C meningococcal polysaccharide vaccines in infants. *Journal of*
471 *Clinical Investigation* 1975; 56:1536–47.
- 472 14. Morgan P, Watson DW, Cromartie WJ. Type-specificity of immunological paralysis
473 induced in mice with pneumococcal type II polysaccharide. *J Bacteriol* 1953; 65:224–5.
- 474 15. Bjarnarson SP, Benonisson H, Del Giudice G, Jonsdottir I. Pneumococcal Polysaccharide
475 Abrogates Conjugate-Induced Germinal Center Reaction and Depletes Antibody
476 Secreting Cell Pool, Causing Hyporesponsiveness. *PLoS ONE* 2013; 8:e72588.
- 477 16. Varon E, Janoir C. Rapport d'activité 2016 - Epidémiologie 2015 [Internet]. 2016;
478 Available from: <http://cnr-pneumo.com/docs/rapports/CNRP2016.pdf>
- 479 17. Wernette CM, Frasch CE, Madore D, Carlone G, Goldblatt D, Plikaytis B, Benjamin W,
480 Quataert SA, Hildreth S, Sikkema DJ, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for
481 quantitation of human antibodies to pneumococcal polysaccharides. *Clin Diagn Lab*
482 *Immunol* 2003; 10:514–9.
- 483 18. Bahuaud M, Bodilis H, Malphettes M, Maugard Landre A, Matondo C, Bouscary D,
484 Batteux F, Launay O, Femand J-P. Immunogenicity and persistence of the 13-valent
485 Pneumococcal Conjugate Vaccine (PCV13) in patients with untreated Smoldering
486 Multiple Myeloma (SMM): A pilot study. *Heliyon* 2017; 3:e00441.
- 487 19. Grabar S, Groh M, Bahuaud M, Le Guern V, Costedoat-Chalumeau N, Mathian A,
488 Hanslik T, Guillevin L, Batteux F, Launay O. Pneumococcal vaccination in patients with
489 systemic lupus erythematosus: A multicenter placebo-controlled randomized double-
490 blind study. *Vaccine* [Internet] 2017 [cited 2017 Aug 24]; Available from:
491 <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X17310204>
- 492 20. Bahuaud M, Beaudouin-Bazire C, Husson M, Molto A, Launay O, Batteux F, Dougados
493 M. Immunogenicity and persistence of a prime-boost re-vaccination strategy for

- 494 pneumococcal vaccines in patients with rheumatoid arthritis. *Human Vaccines &*
495 *Immunotherapeutics* 2018; :1–7.
- 496 21. Jackson LA, Neuzil KM, Nahm MH, Whitney CG, Yu O, Nelson JC, Starkovich PT, Dunstan
497 M, Carste B, Shay DK, et al. Immunogenicity of varying dosages of 7-valent
498 pneumococcal polysaccharide–protein conjugate vaccine in seniors previously
499 vaccinated with 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine. *Vaccine* 2007;
500 25:4029–37.
- 501 22. Russell FM, Carapetis JR, Balloch A, Licciardi PV, Jenney AWJ, Tikoduadua L,
502 Waqatakirewa L, Pryor J, Nelson J, Byrnes GB, et al. Hyporesponsiveness to re-challenge
503 dose following pneumococcal polysaccharide vaccine at 12 months of age, a
504 randomized controlled trial. *Vaccine* 2010; 28:3341–9.
- 505 23. Jackson LA, Gurtman A, van Cleeff M, Frenck RW, Treanor J, Jansen KU, Scott DA, Emini
506 EA, Gruber WC, Schmoele-Thoma B. Influence of initial vaccination with 13-valent
507 pneumococcal conjugate vaccine or 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine on
508 anti-pneumococcal responses following subsequent pneumococcal vaccination in
509 adults 50 years and older. *Vaccine* 2013; 31:3594–602.
- 510 24. Greenberg RN, Gurtman A, Frenck RW, Strout C, Jansen KU, Trammel J, Scott DA, Emini
511 EA, Gruber WC, Schmoele-Thoma B. Sequential administration of 13-valent
512 pneumococcal conjugate vaccine and 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine
513 in pneumococcal vaccine–naïve adults 60–64 years of age. *Vaccine* 2014; 32:2364–74.
- 514 25. Miernyk KM, Butler JC, Bulkow LR, Singleton RJ, Hennessy TW, Dentinger CM, Peters
515 HV, Knutsen B, Hickel J, Parkinson AJ. Immunogenicity and Reactogenicity of
516 Pneumococcal Polysaccharide and Conjugate Vaccines in Alaska Native Adults 55–70
517 Years of Age. *Clinical Infectious Diseases* 2009; 49:241–8.
- 518 26. Goldblatt D, Southern J, Andrews N, Ashton L, Burbidge P, Woodgate S, Pebody R,
519 Miller E. The Immunogenicity of 7-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine versus 23-
520 Valent Polysaccharide Vaccine in Adults Aged 50–80 Years. *Clinical Infectious Diseases*
521 2009; 49:1318–25.
- 522 27. Clutterbuck EA, Lazarus R, Yu L-M, Bowman J, Bateman EAL, Diggle L, Angus B, Peto TE,
523 Beverley PC, Mant D, et al. Pneumococcal Conjugate and Plain Polysaccharide Vaccines
524 Have Divergent Effects on Antigen-Specific B Cells. *Journal of Infectious Diseases* 2012;
525 205:1408–16.

526

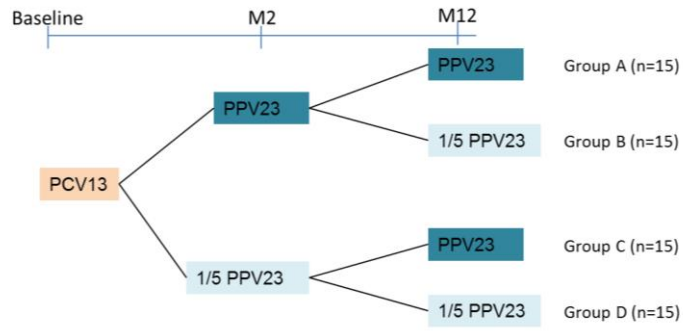


Figure1. Study design with the four different vaccine strategies of the clinical trial HYPOPNEUMO

RESULTS

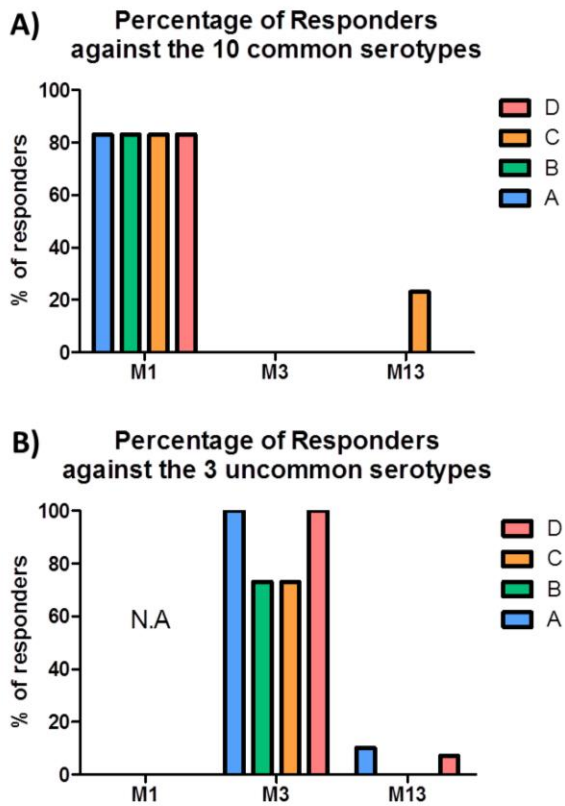


Figure 2. Percentages of responders for pneumococcal vaccine at 1, 3 and 13 months after PCV13 immunization in ELISA for the four different vaccine strategy: A (blue) plain dose of PPV23 followed by a reduced dose (1 + 1/5), B (green) 1/5 + 1/5, C (orange) 1/5 + 1 and D (pink) 1 + 1. A) Percentages of Responders against the 10 serotypes common to both vaccines (3, 4, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F) and B) Percentages of Responders against the 3 uncommon serotypes included only in PPV23 (10A, 12F and 15B). Note: Responders patients for each serotype at a specific time point were defined as a twofold increase of IgG anti-PS compared to baseline by ELISA. Patients were assigned as responders when more than 70% of serotypes tested fit with those criteria.

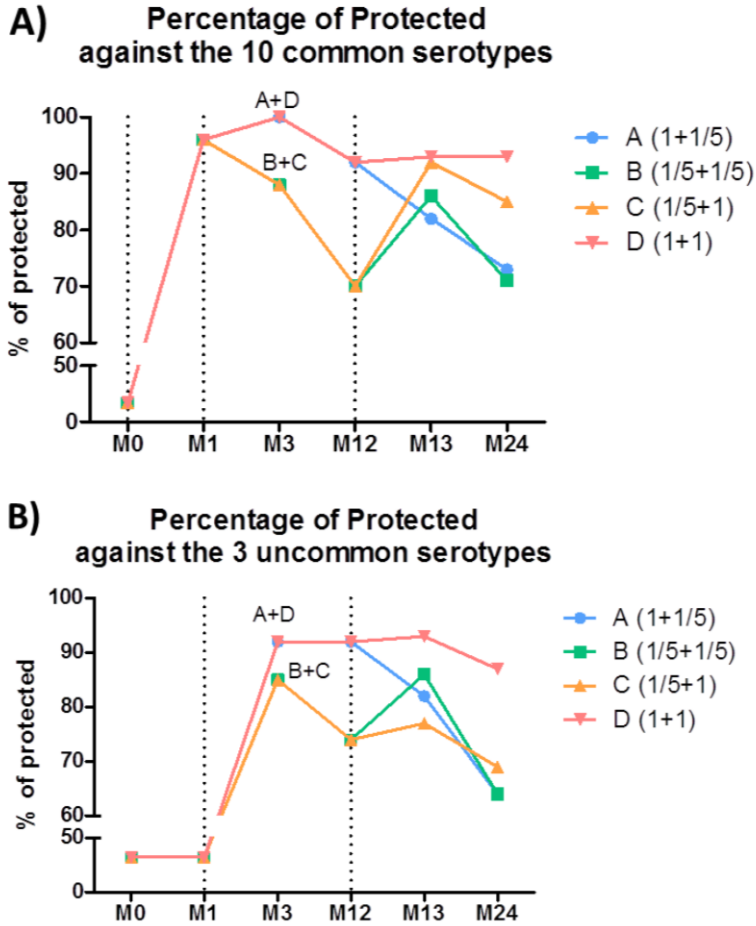


Figure3: Percentages of protected for pneumococcal vaccine at 1, 3, 12, 13 and 24 months after PCV13 immunization in ELISA for the four different vaccine strategy: A (blue), B (green), C (orange) and D (pink). The vertical lines represent each vaccine time point. A) Percentages of Protected against the 10 serotypes common to both vaccines (3, 4, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F) and B) Percentages of Protected against the 3 uncommon serotypes included only in PPV23 (10A, 12F and 15B). Note: Protected patients for each serotype at a specific time point were defined as an IgG anti-PS > 1ug/ml by ELISA. Patients were assigned as protected when more than 70% of serotypes tested fit with those criteria.

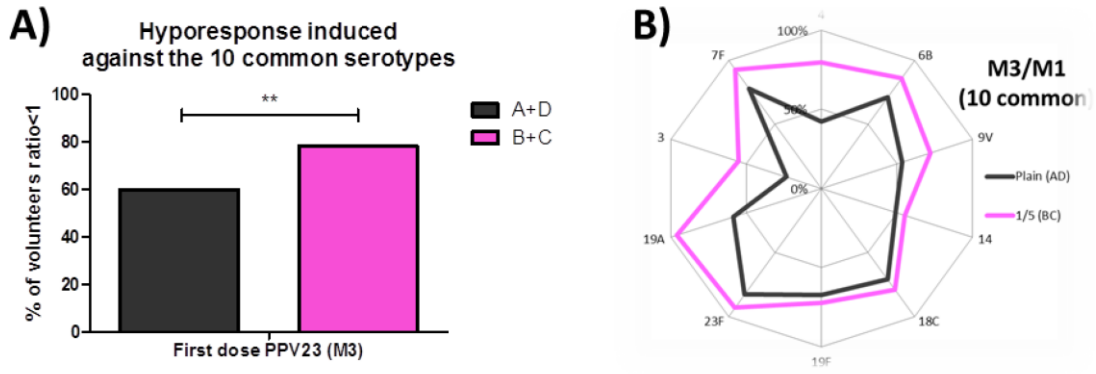


Figure4: Hyporesponse (HR) induced by the first dose of PPV23 for the 10 common serotypes for the two different vaccine strategies one month after the first dose of PPV23 (M3): plain dose (A+D) in black and reduced dose (B+C) in pink. A) HR in general for all serotypes and B) HR induced for each serotypes. Note: HR was defined as the percentages of volunteers with ratio of concentrations post/pre vaccination < 1.

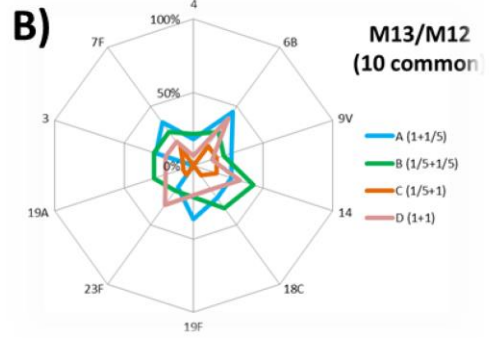
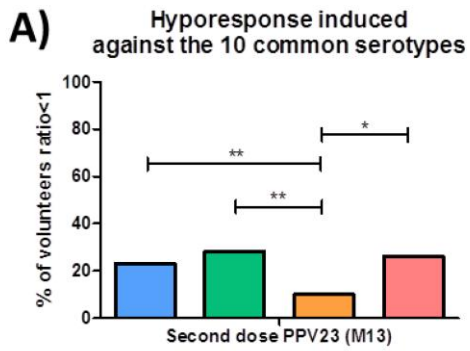
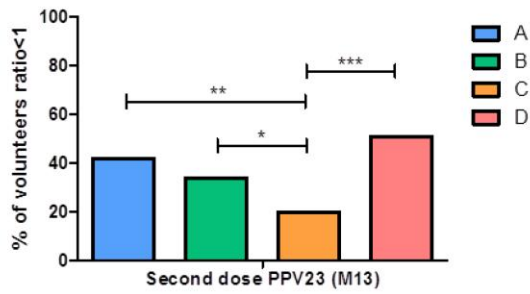


Figure 5: Hyporespense (HR) induced by the second dose of PPV23 for the 10 common serotypes for the four different vaccine strategies one month after the second dose of PPV23 (M13): A (blue) (1 + 1/5), B (green) 1/5 + 1/5, C (orange) 1/5 + 1 and D (pink) 1 + 1. A) HR in general for all serotypes and B) HR induced for each serotypes. Note: HR was defined as the percentages of volunteers with ratio of concentrations post/pre vaccination < 1.

A) Hyporespense induced against the 3 uncommon serotypes



B)

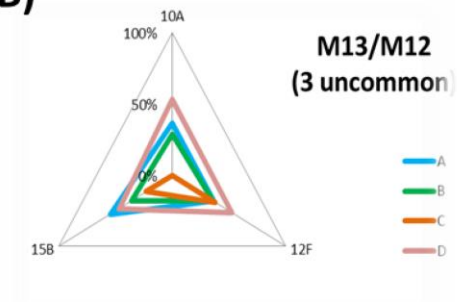


Figure6: Hyporespense (HR) induced by the second dose of PPV23 for the 3 uncommon serotypes for the four different vaccine strategies one month after the second dose of PPV23 (M13): A (blue) (1 + 1/5), B (green) 1/5 + 1/5, C (orange) 1/5 + 1 and D (pink) 1 + 1. A) HR in general for all serotypes and B) HR induced for each serotypes. Note: HR was defined as the percentages of volunteers with ratio of concentrations post/pre vaccination < 1.

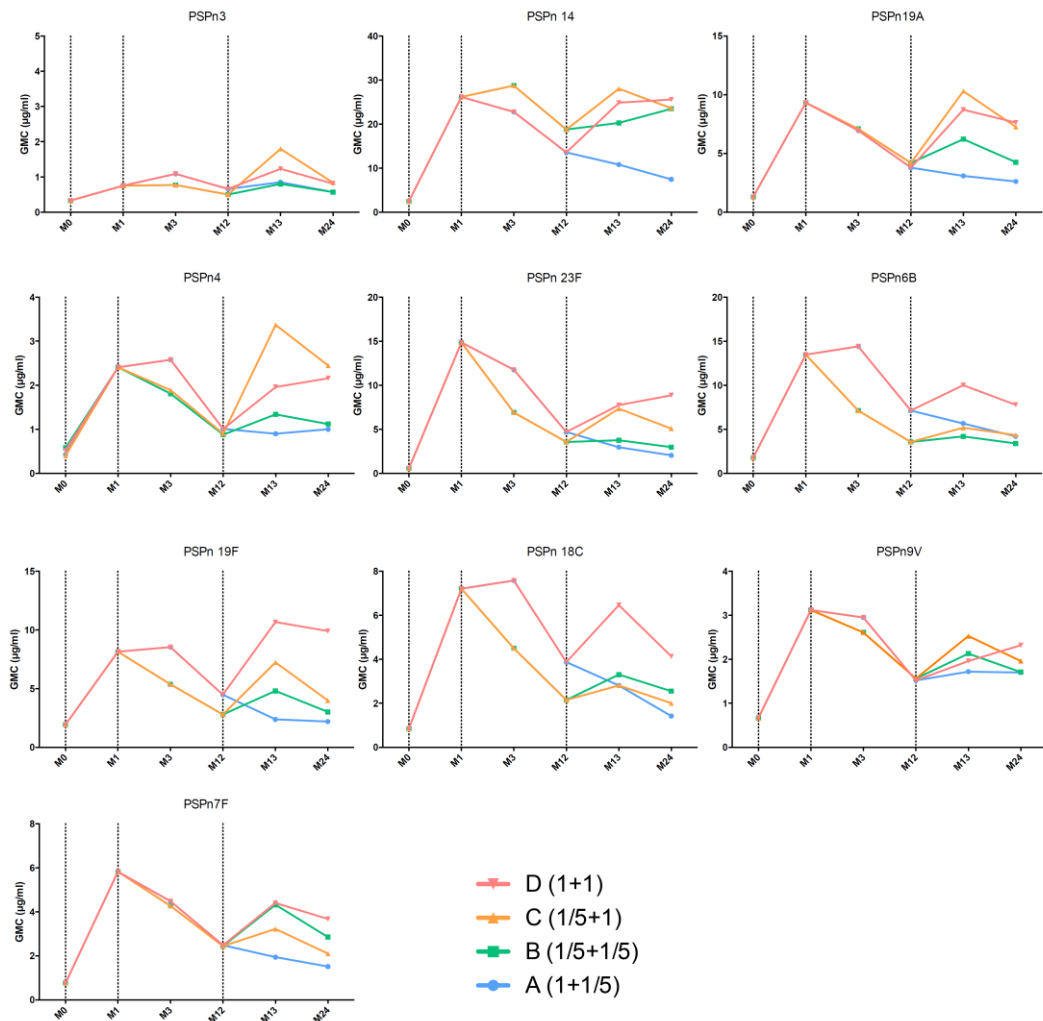


Figure7: Evolution of the Geometric Mean Concentration (GMC) of anti-PS antibody by study group for the 10 common serotypes: A (blue) (1 + 1/5), B (green) 1/5 + 1/5, C (orange) 1/5 + 1 and D (pink) 1 + 1. The three vertical lines represent each vaccine time point. Blood samples were obtained before enrollment and 1, 2, 3, 12, 13and 24 months after PCV13 immunization



Figure8: Evolution of the Geometric Mean Concentration (GMC) of anti-PS antibody by study group for the 3 uncommon serotypes: A (blue) (1 + 1/5), B (green) 1/5 + 1/5, C (orange) 1/5 + 1 and D (pink) 1 + 1. The three vertical lines represent each vaccine time point. Blood samples were obtained before enrollment and 1, 2, 3, 12, 13 and 24 months after PCV13 immunization

	3	4	14	18C	19A	19F	23F	6B	7F	9V
Pre-vaccination	0.33	0.48	2.47	0.85	1.30	1.93	0.55	1.78	0.76	0.67
Post-PCV13	0.75	2.41	26.19	7.21	9.32	8.15	14.87	13.48	5.82	3.12
First dose PPV23										
AD (plain dose)	1.09	2.58	22.79	7.58	6.95	8.54	11.77	14.44	4.48	2.95
BC (1/5 dose)	0.77	1.85	28.76	4.50	7.09	5.37	6.91	7.14	4.27	2.61
1 year post-PCV13										
AD (plain dose)	0.66	1.01	13.60	3.87	3.79	4.48	4.70	7.13	2.48	1.52
BC (1/5 dose)	0.50	0.89	18.78	2.15	4.19	2.80	3.57	3.57	2.44	1.56
Second dose PPV23										
A (1_PPV23 + 1/5_PPV23)	0.85	0.90	10.81	2.81	3.09	2.38	2.97	5.68	1.94	1.72
B (1/5_PPV23 + 1/5_PPV23)	0.80	1.34	20.29	3.30	6.22	4.80	3.77	4.20	4.32	2.13
C (1/5_PPV23 + 1_PPV23)	1.80	3.37	28.03	2.81	10.31	7.24	7.36	5.19	3.22	2.53
D (1_PPV23 + 1_PPV23)	1.23	1.96	24.87	6.46	8.73	10.67	9.77	10.03	4.40	1.96
1 year after 2nd dose of PPV23										
A (1_PPV23 + 1/5_PPV23)	0.57	1.00	7.46	1.42	2.61	2.19	2.05	4.20	1.51	1.70
B (1/5_PPV23 + 1/5_PPV23)	0.57	1.12	23.48	2.55	4.25	3.02	2.99	3.40	2.85	1.71
C (1/5_PPV23 + 1_PPV23)	0.84	2.45	23.63	2.00	7.26	3.99	5.09	4.35	2.10	1.96
D (1_PPV23 + 1_PPV23)	0.81	2.16	25.59	4.13	7.62	9.90	7.76	7.79	3.67	2.32

Table1: Evolution of the Geometric Mean Concentration (GMC) of anti-PS antibody by study group for the 10 common serotypes. Blood samples were obtained before enrollment, 1, 2, 3, 12, 13 and 24 months after.

	10A	12F	15B
Pre-vaccination	0.88	0.27	1.85
Post-PCV13	0.92	0.35	2.36
First dose PPV23 (M3)			
AD (plain dose)	9.13	2.92	14.5
BC (1/5 dose)	3.93	0.96	13.16
1 year post-PCV13 (M12)			
AD (plain dose)	6.24	2.27	12.43
BC (1/5 dose)	3.58	0.85	12.42
Second dose PPV23 (M13)			
A (1_PPV23 + 1/5_PPV23)	3.4	2.09	7.96
B (1/5_PPV23 + 1/5_PPV23)	4.88	0.94	14.06
C (1/5_PPV23 + 1_PPV23)	4.18	0.87	14.54
D (1_PPV23 + 1_PPV23)	10.85	2.32	17.87
1 year after 2nd dose of PPV23 (M24)			
A (1_PPV23 + 1/5_PPV23)	2.17	1.43	4.82
B (1/5_PPV23 + 1/5_PPV23)	5.04	0.75	14.48
C (1/5_PPV23 + 1_PPV23)	3.14	0.91	10.51
D (1_PPV23 + 1_PPV23)	10.59	2.28	15.58

Table2: Evolution of the Geometric Mean Concentration (GMC) of anti-PS antibody by study group for the 3 uncommon serotypes. Blood samples were obtained before enrollment, 1, 2, 3, 12, 13 and 24 months after.

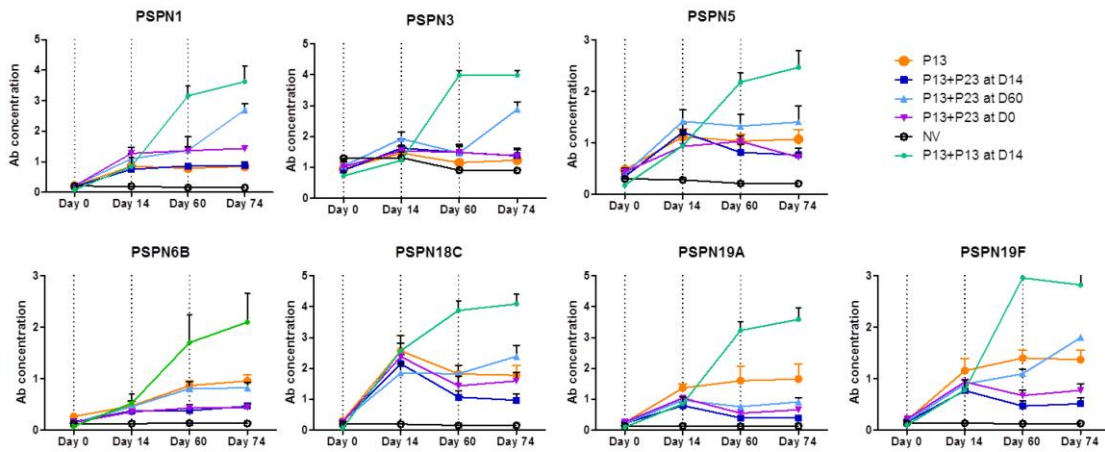


Figure9: Evolution in time of the anti-PS Ab levels of the different vaccination strategies for the seven serotypes tested in mice (by ELISA).The three vertical lines represent each vaccine time point.

	PCV13	PCV13+PCV13 at D14	PCV13+PPV23 at D14	PCV13+PPV23 at D60	PCV13+PPV23 at D0
PSPN1	0.8468 (± 0.05)	3.621 (± 0.23) [§]	0.8726 (± 0.057)	2.703 (± 0.092) [§]	1.43 (± 0.028)
PSPN3	1.231 (± 0.066)	3.985 (± 0.071) [§]	1.379 (± 0.083)	2.877 (± 0.11) [§]	1.352 (± 0.112)
PSPN5	1.072 (± 0.083)	2.469 (± 0.14) [§]	0.7646 (± 0.059) [§]	1.407 (± 0.14)	0.7209 (± 0.07) [§]
PSPN6B	0.9595 (± 0.053)	2.100 (± 0.27) [§]	0.4670 (± 0.028) [§]	0.8213 (± 0.055)	0.4413 (± 0.029) [§]
PSPN18C	1.775 (± 0.15)	4.088 (± 0.14) [§]	0.9693 (± 0.090) [§]	2.390 (± 0.15) [§]	1.593 (± 0.13)
PSPN19A	1.657 (± 0.24)	3.591 (± 0.19) [§]	0.3972 (± 0.044) [§]	0.9100 (± 0.065)	0.6612 (± 0.043) [§]
PSPN19F	1.370 (± 0.090)	2.823 (± 0.12) [§]	0.5113 (± 0.062) [§]	1.798 (± 0.026) [§]	0.7729 (± 0.059) [§]

Table3: Anti-PS Ab levels obtained at D74 for the 5 different groups for the 7 serotypes tested (by ELISA). Values are Ab levels (± SEM). § represents value significantly different from group PCV13.

La vaccination représente à l'heure actuelle, le seul moyen de prévention contre les infections invasives à pneumocoque (IIP) et de nombreuses questions sur l'efficacité des stratégies vaccinales utilisant le vaccin conjugué (PCV13) et le vaccin polysaccharidique (PPV23) restent en suspens.

Dans notre travail, nous avons donc évalué l'impact des stratégies vaccinales utilisant le PCV13 et le PPV23 sur différentes populations de patients à risque.

Nous avons ainsi évalué l'immunogénicité d'une dose de PCV13 chez des patients atteints de myélome indolent (SMM). Notre hypothèse était que le vaccin conjugué Prevenar serait plus efficace chez les patients immunodéprimés ou à risque d'IIP, répondant peu ou mal à la vaccination par le Pneumo23. Nos résultats ont montré une immunogénicité limitée d'une dose de PCV13 puisqu'un mois après la vaccination, seulement 60% des patients étaient répondeurs en ELISA et 40% en OPA (Opsonophagocytic Assay). De plus, l'immunité induite est de faible persistance puisqu'un an après la vaccination, les taux d'anticorps sont similaires aux taux pré-vaccinaux. A notre connaissance, notre étude est la première à évaluer l'immunogénicité d'une dose de Prevenar13 chez des patients SMM. En revanche, plusieurs études ont évalué le PPV23 chez ces patients ou des patients atteints de myélome multiple (MM)¹⁶⁴⁻¹⁶⁶. Ces études ont démontré une faible immunogénicité du vaccin polysaccharidique avec des taux de répondeurs allant de 33% à 43%. Ainsi, si l'on prend en compte les résultats obtenus lors de ces études sur le PPV et les nôtres sur le PCV, l'immunogénicité induite par les deux vaccinations semblent être assez semblable chez les patients atteints de myélome multiple ou indolent. La faible immunogénicité d'une dose de PCV a également été démontrée chez d'autres populations de patients. En effet, Sinisalo et al¹⁶⁷. ont observé des taux de répondeurs de seulement 40% chez des patients atteints de leucémie lymphoïde chronique, immunisés par une dose de PCV7. L'étude CAPITA, randomisée et contrôlée, réalisée aux Pays-Bas chez des adultes sains de plus de 65 ans^{168,169}, a suivi plus de 42 000 adultes sains vaccinés par une dose de PCV13. Au sein de ce

protocole clinique, une étude d'immunogénicité a été réalisée et a démontré une immunogénicité modérée avec 55% des adultes répondeurs à la vaccination. Ces résultats confirment ceux retrouvés chez nos patients SMM. En revanche, les résultats de persistance des anticorps retrouvés dans l'étude CAPITA diffèrent de ceux de notre étude chez les patients SMM. En effet, bien que la vaccination par une dose de vaccin conjugué n'induit une réponse que chez 55% des adultes sains > 65 ans, celle-ci persiste encore 24 mois après l'immunisation avec des concentrations en anticorps significativement plus élevées par rapport à l'inclusion¹⁶⁹. Or dans notre étude, chez les patients atteints de myélome indolent, les taux d'anticorps étaient revenus au niveau des taux pré-vaccinaux, 12 mois après la vaccination. Cette différence de durabilité de la réponse vaccinale peut s'expliquer par la nature même des sujets vaccinés.

Une injection unique de PCV ne semble pas induire une protection à long terme des patients à risque d'IIP. Plusieurs auteurs suggèrent que des doses successives de vaccins conjugués (comme chez l'enfant) pourraient augmenter l'immunogénicité vaccinale chez ces patients. Une double dose de PCV a montré chez des personnes âgées (> 70 ans) une meilleure réponse qu'une simple dose¹⁷⁰. Une telle stratégie pourrait être utile afin d'obtenir une bonne protection contre les infections invasives à pneumocoque avec le vaccin PCV chez les patients immunodéprimés ou à risque d'IIP.

Depuis notre étude chez les patients SMM, les recommandations vaccinales ont changé et la vaccination combinée PCV13 puis PPV23 est dorénavant la stratégie recommandée chez les patients immunodéprimés ou à risque d'IIP. Les vaccins conjugués et non conjugués activent respectivement les réponses anti-pneumococciques T-dépendantes et T-indépendantes. La vaccination par le PPV23 permet un élargissement de la couverture sérotypique à 23 sérotypes. Une telle stratégie pourrait aider à accroître l'immunogénicité du vaccin et la durabilité de la réponse.

Cependant, nos résultats n'ont pas mis en évidence de supériorité de la stratégie combinée versus le PPV23 seul chez des patients atteints de lupus érythémateux systémique (SLE) et des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (PR). En effet, quatre mois après la vaccination, les taux de répondeurs chez les patients SLE étaient de 72% pour le bras PPV23

seul versus 76% pour la stratégie combinée. Des taux plus faibles ont été trouvés en OPA avec 28% et 35%, respectivement bras PPV23 et stratégie combinée. Après un an, ces taux diminuaient pour atteindre 52% pour le PPV23 seul et 59% pour la stratégie combinée. Des résultats contrastés ont été décrits dans la littérature. Certaines études montrent une supériorité de la stratégie combinée par rapport aux vaccins seuls¹⁷¹⁻¹⁷³ (que ce soit le conjugué ou le polysaccharidique) et d'autres, comme nous, observent une immunogénicité assez similaire pour les deux stratégies^{139,174}. Les différences de méthodologies entre les études peuvent expliquer les résultats contradictoires obtenus. En effet, la définition du critère de jugement, les tests utilisés et le nombre de sérotypes testés sont des facteurs fluctuants d'une étude à l'autre. Il est ainsi indispensable de définir des critères universels pour l'évaluation de l'immunogénicité des vaccins anti-pneumococciques.

Par ailleurs, la plupart des études sur la vaccination combinée sont assez unanimes sur l'effet délétère du vaccin polysaccharidique sur la réponse immune induite par le vaccin conjugué¹⁷⁵⁻¹⁷⁷. Ce phénomène, appelé hyporéponse (HR) est caractérisé par une diminution des taux d'anticorps après la vaccination par le vaccin polysaccharidique. On le retrouve par exemple dans notre étude chez les patients PR, avec des taux d'anticorps post-vaccinaux inférieurs aux taux lors de l'inclusion.

Les résultats de notre étude clinique portant sur la modulation des concentrations de PPV23, ont montré que le PCV13 induisait une bonne réponse immunitaire chez les sujets sains, avec 94% des volontaires répondeurs un mois après la vaccination. En revanche, une telle réponse n'a jamais été observée avec le PPV23. En effet, aucun patient n'était répondeur à la vaccination par le vaccin polysaccharidique deux mois après le PCV13. Une hyporéponse a été observée avec cette stratégie combinée. L'utilisation d'une dose réduite de PPV23 aggrave ce phénomène d'HR. Dix mois après le premier vaccin PPV23, la ré-immunisation avec une dose simple ou réduite de PPV23, n'induit toujours pas de réponse suffisante à la vaccination bien que l'HR induite soit beaucoup plus faible que la première dose. La stratégie utilisant une dose réduite suivie d'une dose pleine est celle induisant le moins d'HR.

Les mécanismes impliqués dans l'apparition de l'hyporéponse ne sont pas encore bien compris. Il a en revanche été démontré que les polysaccharides (PS) du vaccin PPV23 induisaient l'abrogation des centres germinatifs induits par le vaccin PCV et entraînaient

l'apoptose des lymphocytes B mémoires et des plasmocytes¹⁴⁸. Nous avons donc émis l'hypothèse que si l'on diminuait la concentration en PS, on diminuerait de fait l'effet délétère des PS sur les B mémoires tout en restant suffisamment immunogène pour induire une réponse immunitaire. De façon surprenante, nous avons observé qu'une dose réduite de PPV23 donnée après une dose de PCV13, ne diminuait pas l'hyporéponse mais au contraire la renforçait. Une dose pleine, bien qu'induisant une hyporéponse, est suffisamment immunogène pour induire une réponse immunitaire aboutissant à la production d'anticorps par les plasmocytes. Cette nouvelle réponse immune minimise le phénomène d'hyporéponse en compensant la diminution d'anticorps et de B mémoires. Nos résultats démontrent qu'une dose réduite de PPV23 (1/5^{ème}) n'est plus assez immunogène pour induire une réponse immune comme peut le faire une dose pleine. Dans ce cas, nous observons une diminution plus sévère du nombre d'anticorps. Ainsi, nos résultats démontrent que l'hyporéponse induite par le vaccin polysaccharidique n'est pas dépendante de la concentration en PS.

A notre connaissance, notre étude est la première à évaluer la modulation du schéma vaccinal chez des volontaires sains ainsi que dans un modèle murin. Nous sommes les premiers à avoir confirmé l'hyporéponse induite par la vaccination combinée dans un protocole clinique chez des volontaires sains. Dans une étude chez les personnes âgées, Jackson et al ont évalué l'impact d'une vaccination par une dose réduite (1/5^{ème}) de PPV23 un an après une dose de PCV13 ou de PPV23¹⁷⁸. Ils n'ont pas démontré d'efficacité de la dose réduite. De plus, des résultats similaires ont été décrits chez des enfants immunisés à 12 mois par une dose de PPV23 suivie 5 mois plus tard par une dose réduite¹³⁶. Ces résultats sont cohérents avec ceux que nous avons obtenus chez les volontaires sains. Nous avons en effet observé que la dose réduite de PPV23 donnée 10 mois après la dose pleine n'induisait pas d'augmentation de la concentration.

En revanche, une dose pleine de PPV23 donnée 10 mois après une dose pleine ou réduite entraîne une augmentation de la concentration en anticorps qui persiste 24 mois après la vaccination par le PCV13. Ces observations sont confirmées par les résultats observés dans notre modèle murin d'hyporéponse. Nous avons démontré l'effet bénéfique d'une dose de PPV23 plus tardive comparée à une dose concomitante ou plus rapprochée, sur la survenue de l'hyporéponse. Chez l'Homme, deux études ont démontré l'efficacité d'une dose tardive

de PPV23 après vaccination par le PCV13 chez des adultes sains^{179,180}. En outre, il n'a pas été démontré de supériorité du PCV13 par rapport au PPV23 lorsque les deux vaccins étaient donnés après une première immunisation par du PCV13. L'effet bénéfique de la vaccination par le PPV23 est contradictoire avec des résultats précédents, montrant qu'une injection de PPV23 trois à six mois après une dose de PCV7 entraînait une hyporéponse^{176,181}.

Des résultats identiques, montrant un effet bénéfique d'une dose retardée ont été observés dans notre modèle murin d'hyporéponse. Bjarnasson et al ont démontré chez la souris que l'hyporéponse semblait résulter de l'abrogation par les PS des centres germinatifs induits par le PCV. De plus, ils ont observé la déplétion des plasmocytes spécifiques des PS, limitant le homing des plasmocytes à longue durée de vie dans la moelle¹⁴⁸. Ils ont également démontré que les PS induisaient l'apoptose des cellules B mémoires et des lymphocytes B1b¹³⁸. Ces observations, combinées avec nos résultats nous amènent à émettre l'hypothèse que la vaccination par le PPV23, après le vaccin PCV13, devrait être effectuée une fois la réaction des centres germinatifs terminée et après la migration complète des plasmocytes à longue durée de vie dans la moelle. C'est-à-dire environ 6 à 12 mois après la vaccination par le PCV13. Ce qui suggère qu'un intervalle plus long est nécessaire entre les vaccins anti-pneumococques afin d'optimiser la réponse immunitaire au vaccin polysaccharidique après une première dose avec le vaccin conjugué.

Une équipe du laboratoire des PS bactériens de la Food and Drug Administration (FDA) aux Etats-Unis a mis en évidence un effet suppresseur des PS du méningocoque (MCPS) sur le système BAFF (B cell Activator Factor of the TNF Family)¹⁴⁹. En effet, Kanswal et al ont démontré que les MCPS provoquaient une diminution d'expression des récepteurs TACI (transmembrane activator and calcium-modulator and cyclophilin ligand interactor) et de BAFFR (BAFF receptor) à la surface des lymphocytes B. Cette diminution d'expression entraîne ainsi une moins bonne réponse à la stimulation de BAFF et APRIL (a proliferation-inducing ligand) des lymphocytes B. Le système BAFF joue un rôle essentiel dans la survie des lymphocytes B naïfs et des lymphocytes B1¹⁵². Il régule la génération des plasmocytes et la sécrétion d'immunoglobulines lors des réponses thymo-indépendantes. L'effet suppressif des MCPS sur l'expression des récepteurs BAFFR et TACI pourraient ainsi être l'un des mécanismes impliqués dans l'hyporéponse. Un phénomène d'hyporéponse a été observé également avec le vaccin polysaccharidique anti-méningococcique. Nous avons voulu

regarder si l'hyporéponse induite par les PS du pneumocoque pouvait résulter du même effet supprimeur dans notre modèle murin d'hyporéponse. Des résultats préliminaires semblent montrer une diminution de l'expression de TACI dans le groupe de souris vaccinées par la stratégie combinée. Des analyses mécanistiques sont à poursuivre dans notre modèle murin d'hyporéponse afin de confirmer dans un premier temps ces résultats et également afin de pouvoir mieux caractériser les lymphocytes B spécifiques des PS, notamment grâce à notre PS-biotinylé.

Chapitre 5

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Notre travail a permis de mettre en évidence l'hyporéponse (HR) vaccinale induite par le vaccin polysaccharidique chez des volontaires sains. Nous avons montré que l'administration d'une dose diminuée de PPV23 n'améliorait pas la stratégie vaccinale, en induisant également de l'HR. En revanche, une deuxième dose plus tardive de PPV23 dix mois après la stratégie combinée entraînait certes une HR, mais de bien moindre intensité que la première injection de PPV23. De plus, malgré l'HR, cette stratégie vaccinale « combinée + 1 » induisait une très bonne protection des volontaires sains deux ans après la vaccination PCV13. Les travaux dans notre modèle murin ainsi que ceux de la littérature ont montré les bénéfices d'une dose tardive de PPV23, cette fois-ci après le PCV13, et non plus à une stratégie « combinée + 1 ».

Des études cliniques sont nécessaires afin de tester les deux stratégies vaccinales chez des patients à risques d'infection à pneumocoque. Les avantages et inconvénients de ces stratégies sont résumés dans la figure 19.

Stratégie vaccinale	« Combinée + 1 » (PCV13+ PPv23+PPV23)	« Tardive » (PCV13 + 0 + PPV23)
Avantages	Induit une protection à long terme chez les volontaires sains	Pas d'hyporéponse observée
Inconvénients	Présence d'une hyporéponse après la première dose de PPV23	Délai dans l'élargissement de la couverture sérotypique avec les PS du PPV23
Questionnements	Réponse immune suffisante pour pallier l'HR chez les patients à risque d'IIP ?	Patients à risques d'IIP protégés plus tardivement contre les sérotypes de remplacement

Figure19. Avantages et inconvénients des deux stratégies vaccinales proposées

Grâce à notre PS couplé à une biotine, développé au sein de notre laboratoire, nous pourrions réaliser un immunophénotypage complet des cellules spécifiques du PS chez l'homme et chez la souris afin d'observer l'effet des PS contenus dans le PPV23 sur ces cellules. Nous pourrions également mesurer l'expression de BAFFR et TACI chez les volontaires sains inclus dans le PHRC Hypopneumo, afin de confirmer les résultats obtenus chez la souris.

Nos résultats nous amènent à émettre l'hypothèse que la vaccination par le PPV23, après le vaccin PCV13, devait être effectuée une fois la réaction des centres germinatifs terminée et après la migration complète des plasmocytes à longue durée de vie dans la moelle. En observant sur des coupes de rates en immunohistochimie, la disparition des cellules spécifiques de nos PS grâce au PS-biotinylé, nous pourrions suivre l'évolution des centres germinatifs et tester la réponse vaccinale de nos souris une fois la réaction des centres germinatifs terminée.

Dans notre modèle murin, nos résultats ont montré un effet des PS sur l'expression de TACI à la surface des cellules spécifiques des PS. Nous évaluerons plus en détails l'impact des PS sur le système BAFF. Des splénocytes seront incubés en présence de PS puis stimulés par BAFF et APRIL. Nous mesurerons :

- la capacité des L_B de se différencier en plasmocytes après stimulation par BAFF et APRIL,
- la réponse au signal de prolifération induit par BAFF grâce à un marqueur de prolifération cellulaire (BrdU),
- l'apoptose des splénocytes par cytométrie en flux grâce à l'utilisation de l'annexin V.

Il serait également intéressant d'évaluer l'impact des PS sur l'expression ou la production des molécules du système BAFF sur les cellules de l'immunité innée comme les cellules dendritiques et les macrophages.

Nous présentons dans ce chapitre, nos autres travaux réalisés sur la vaccination anti-pneumococcique.

Ces travaux comprennent trois articles : le premier a évalué l'immunogénicité et la durabilité de la vaccination combinée chez des patients atteints de lupus érythémateux systémique. Le deuxième article décrit 11 cas cliniques de déficit immunitaire spécifique en anticorps anti-pneumococcique (SPAD) chez des adultes, confirmés grâce à la technique ELISA selon le protocole de l'OMS, que nous avons développée au sein du laboratoire. Enfin, le troisième article a comparé deux tests ELISA pour le dosage des anticorps anti-pneumococcique : la technique ELISA OMS versus le test ELISA de chez The Binding Site.

Impaired long-term immune protection following pneumococcal 13-valent/23-valent polysaccharide vaccine in systemic lupus erythematosus (SLE)

Although patients with systemic lupus erythematosus (SLE) are at increased risk for *Streptococcus pneumoniae* infection,^{1,2} vaccination coverage remains dramatically low in SLE,³ and efficacy of the now recommended prime-and-boost strategy using 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV13) and 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine (PPSV23) is not known.

Consecutive patients with SLE admitted in our daycare hospital unit were prospectively enrolled to receive PCV13 followed by PPSV23 8 weeks later. Immune protection, defined by an antigen-specific IgG concentration $\geq 1.3 \mu\text{g/mL}$ for at least 70% of seven pneumococcal serotypes (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F and 23F), was assessed at baseline, 2 and 12 months. Patients were defined as 'long-term protected (LTP)' when seroconversion was observed 2 months and 12 months after PCV13 shot. Patients were considered 'short-term protected (STP)' when seroconversion was observed 2 months but no more at 12 months after PCV13 shot. Patients were 'not protected (NP)' when seroconversion occurred neither 2 months nor 12 months after PCV13 shot. Laboratory tests included the analysis of blood B lymphocyte subsets (online Supplementary figure S1) and immunoglobulin levels (online Supplementary data).

Table 1 Clinical and immunological characteristic of patients with SLE

	LTP (n=12)	STP (n=5)	NP (n=4)	P
Age, years	37.5 (25–75)	50 (31–67)	42 (38–45)	ns
Female, n (%)	10 (83.3)	5 (100)	3 (75)	ns
History of PI, n (%)	1 (8.3)	0 (0)	2 (50)	ns
Duration of SLE disease, years	9.5 (1–32)	7 (1–23)	13.5 (2–19)	ns
Lupus nephritis, n (%)	8 (66.7)	2 (40)	2 (50)	ns
Steroid at study time, n (%)	6 (50)	2 (40)	4 (100)	ns
Steroid dose at study time, mg/d	10 (7–15)	10.5 (7–14)	9 (7–10)	ns
Cumulative years of steroid	6.5 (0.5–26)	2 (0–7)	7.5 (2–17)	ns
IS drugs at any time, n (%)	9 (75)	2 (40)	4 (100)	ns
IS drugs at study time, n (%)	4 (33.3)	1 (20)	4 (100)	<0.05*
Cumulative years of IS drugs	2.5 (0–14)	0 (0–3)	4 (2–6)	<0.05*
SELENA-SLEDAI score	2 (0–4)	0 (0–0)	1 (0–4)	ns
Anti-dsDNA antibodies titres, UI/mL	36 (0–258)	0 (0–108)	21 (0–148)	ns
High levels of anti-dsDNA titres, n (%)	6 (50)	1 (20)	1 (25)	ns
Lymphocytes <1000/mm ³	2 (16.7)	0 (0)	4 (100)	<0.01*
B cells/mm ³	166 (17–634)	243 (184–424)	16 (0–46)	<0.05†*
Naive B cells/mm ³	64 (2–500)	148 (90–317)	14 (1–25)	<0.01*
Transitional B cells/mm ³	3 (0–67)	13 (3–65)	0 (0–0)	<0.05*
Unswitched B cells/mm ³	7 (2–44)	11 (3–38)	6 (0–16)	ns
Germinal centre B cells/mm ³	0.1 (0–2.4)	0.2 (0–1.7)	0 (0–0.1)	ns
Postgerminal centre B cells/mm ³	27 (9–77)	18 (13–57)	5 (4–13)	<0.05†
Plasma cells/mm ³	0.5 (0–4.8)	0.3 (0–1.2)	0.1 (0–1.3)	ns
Gammaglobulin level <5 g/L, n (%)	3 (25)	0	4 (100)	<0.01†*
IgG, g/L	12.1 (1.3–23.8)	9.7 (9–15.7)	4 (1.8–6.2)	<0.05†
IgG1, g/L	6.4 (4.1–18.6)	7.9 (6.6–10.5)	3.7 (2.2–7.2)	ns
IgG2, g/L	3.1 (1.3–7.3)	1.3 (1.3–3.4)	1.7 (0.8–1.9)	<0.05†
IgG3, g/L	0.5 (0.1–1)	0.7 (0.2–1.6)	0.2 (0.1–0.5)	ns
IgG4, g/L	0.2 (0.1–1.3)	0.2 (0.2–0.4)	0.1 (0–0.3)	ns
IgA, g/L	2.6 (1.4–6.4)	2.5 (1.5–3.5)	1.1 (0–1.9)	ns
IgM, g/L	0.9 (0.6–1.1)	0.8 (0.4–1.4)	0.8 (0–1.6)	ns
Low levels of complement, n (%)	1 (8.3)	1 (20)	1 (25)	ns

Naive B cells, CD19+CD27–IgD+CD10CD38–/low cells; transitional B cells, CD19+CD27–IgD+CD10+CD38high; unswitched B cells, CD19+CD27+IgD+ cells; germinal centre B cells, CD19+CD27+IgD–CD10+CD38+; postgerminal centre B cells, CD19+CD27+IgD–CD10–CD38low/+; plasma cells, CD19+CD27+IgD–CD10–CD38high.

High levels of anti-dsDNA titres referred to a twofold change threshold.

Low levels of complement referred to a low level of both C3 and C4.

Lupus nephritis was class III or class IV.

Significance determined using Kruskal-Wallis one-way analysis of variance on ranks test for continuous variables and X² test (or Fisher) for categorical variables.

*Significant difference: P<0.05 between STP and NP.

†Significant difference: P<0.05 between LTP and NP.

‡Significant difference: P<0.05 between LTP and STP.

dsDNA, double stranded DNA; IS, immunosuppressive drugs (including mycophenolate mofetil, cyclophosphamide, methotrexate and azathioprine); LTP, long-term protected; NP, not protected; ns, no significant difference; PI, pneumococcal infection; SELENA, Safety of Estrogens in Lupus Erythematosus National Assessment; SLEDAI, Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index; SLE, systemic lupus erythematosus; STP, short-term protected.

Thirty-seven patients with SLE were screened for pneumococcal vaccination. Among them, eight patients refused to be vaccinated, seven patients accepted the vaccination but refused to complete the 12 months immune response follow-up and one patient had already been vaccinated against pneumococcal infection. Eventually, 21 (40 (25–75) years; 85.7% female) patients were included in the study (table 1 and online Supplementary data).

No patient with SLE had a protective immune status against pneumococcal infection at baseline. Overall, only 12 patients (57.1%) showed a sustained immune protection against pneumococcal infection 12 months after PCV13 (LTP). Nine patients had no immune protection following pneumococcal vaccination with seroconversion that never (n=4, NP) or only transiently (n=5, STP) occurred (online Supplementary figure S2). No SLE flare was observed during the 12 months following pneumococcal vaccination.

As compared with patients with transient (STP) or sustained (LTP) immune protection, patients with SLE who totally failed to reach seroconversion (NP) had received immunosuppressive drugs for a longer period of time. Accordingly, deep B cell defects and hypogammaglobulinaemia were associated with the NP status (table 1). On the other hand, STP patients had a lower serum level of IgG2, a higher frequency of pregerminal centre B cells and a lower frequency of postgerminal centre B cells than LTP (table 1 and online Supplementary figure S3).

To help identifying patients with SLE actually protected against pneumococcal infection after vaccination, we next determined whether pneumococcal antigen-specific IgG measured 2 months after the PCV13 could be predictive of long-term protection. Accordingly, the receiver operating characteristic curves calculated for each of the seven tested serotypes showed that the IgG responses against serotype 19F had the best ability to discriminate between short-term and long-term protection (online Supplementary figure S2). Serotype 19F IgG titres of 4.35 µg/mL or more at M2 had a sensitivity of 100% (95% CI 47.8 to 100) and a specificity of 91.7% (95% CI 61.5 to 99.8) for long-term protection.

We show, in this 12-month prospective monocentric study, that more than 40% of patients with SLE fail to reach immune protection against pneumococcal infection despite a prime-and-boost PCV13/PPSV23 vaccine strategy. This finding is consistent with recent published data analysing the rate of SLE immune responders following a sequential administration of PCV7/PPSV23.⁴ Importantly, we identify two distinct populations of patients with SLE who clearly do not benefit from pneumococcal vaccination. First, immune protection never occurs in patients with severe B cell defect. Because such a B cell defect was associated with the duration of immunosuppressive treatment, pneumococcal vaccination should be recommended early in the course of SLE disease. Second, immune protection occurs but is not maintained overtime in patients with SLE who shared a 'common variable immunodeficiency-like' immune phenotype.^{5,6} In such cases, we further show that serotypes IgGs titres (more particularly serotype 19F IgGs titre) measured 2 months after PCV13 reliably discriminate between LTP and STP patients.

In conclusion, our data demonstrate the poor immune protection conferred by the recommended sequential PCV13/PPSV23 vaccines in SLE and identify several key factors associated with long-term protection that may help to design new pneumococcal vaccination strategy.

Karim Sacre,^{1,2,3} Tiphaine Goulenok,¹ Mathilde Bahuaud,⁴ Chrystel Francois,¹ Marie Claude Van der Haegen,¹ Jean-François Alexandra,¹ Pierre Aucouturier,⁵ Maria Hurtado-Nedelec,^{1,6} Helene Moins-Teisserenc,⁷ Frédéric Batteux,⁴ Thomas Papo^{1,2,3}

¹Département de Médecine Interne, Université Paris Diderot, PRES Sorbonne Paris Cité, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Paris, France

²Centre de Recherche sur l'Inflammation, INSERM U1149, Paris, France

³Département Hospitalo-Universitaire FIRE (Fibrosis, Inflammation and Remodelling in Renal and Respiratory Diseases), Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Paris, France

⁴Plateforme d'Immunomonitoring Vaccinal, Laboratoire d'Immunologie, Groupe hospitalier Cochin-Broca-Hotel Dieu, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Paris, France

⁵Centre de Recherche Saint-Antoine, INSERM/UMR S938, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France

⁶Département d'Hématologie et d'Immunologie, Hôpital Bichat, Université Paris Diderot, PRES Sorbonne Paris Cité, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Paris, France

⁷Laboratoire d'Immunologie-Histocompatibilité et, INSERM UMR-1160, Institut Universitaire d'Hématologie, Hôpital Saint-Louis, Université Paris Diderot, PRES Sorbonne Paris Cité, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Paris, France

Correspondence to Professor Karim Sacre, Department of Internal Medicine, Bichat Hospital, APHP, Paris 75018, France; karim.sacre@bch.aphp.fr

Handling editor Josef S Smolen

Contributors KS had full access to all of the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis. KS and TG were responsible for the study design. MB, CF, MCVdH, JFA, PA, MHN, HMT, FB and TP contributed to the acquisition of data. KS, TG, MB, CF, MCVdH, JFA, PA, MHN, HMT, FB and TP did the analysis and interpretation of data. KS was responsible for the statistical analysis. KS, TG, MB, HMT and TP were involved in the manuscript preparation. All the authors reviewed and approved the manuscript.

Competing interests None declared.

Ethics approval IRB 00006477 of HUPNVS, Paris 7 University, AP-HP.

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

© Article author(s) (or their employer(s) unless otherwise stated in the text of the article) 2018. All rights reserved. No commercial use is permitted unless otherwise expressly granted.

► Additional material is published online only. To view please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2017-212789>).



To cite Sacre K, Goulenok T, Bahuaud M, et al. *Ann Rheum Dis* Epub ahead of print: [please include Day Month Year]. doi:10.1136/annrheumdis-2017-212789

Received 4 December 2017

Revised 5 February 2018

Accepted 5 February 2018

Ann Rheum Dis 2018;0:1. doi:10.1136/annrheumdis-2017-212789

REFERENCES

- Schurder J, Goulenok T, Jouenne R, et al. Pneumococcal infection in patients with systemic lupus erythematosus. *Joint Bone Spine* 2017.
- Luijten RK, Cuppen BV, Bijlsma JW, et al. Serious infections in systemic lupus erythematosus with a focus on pneumococcal infections. *Lupus* 2014;23:1512–6.
- Serre J, François C, der Haegen MCV, et al. Nurse-led vaccination program dramatically improves pneumococcal vaccination coverage among patients with autoimmune inflammatory disorders. *Eur J Intern Med* 2017;43:e43–e45.
- Grabar S, Groh M, Bahuaud M, et al. Pneumococcal vaccination in patients with systemic lupus erythematosus: A multicenter placebo-controlled randomized double-blind study. *Vaccine* 2017;35:4877–85.
- Brouet JC, Chedeville A, Ferman J, et al. Study of the B cell memory compartment in common variable immunodeficiency. *Eur J Immunol* 2000;30:2516–20.
- Ameratunga R, Woon ST, Gillis D, et al. New diagnostic criteria for common variable immune deficiency (CVID), which may assist with decisions to treat with intravenous or subcutaneous immunoglobulin. *Clin Exp Immunol* 2013;174:203–11.

Specific Polysaccharide Antibody Deficiency Revealed by Severe Bacterial Infections in Adulthood: A Report on 11 Cases

Benjamin Lopez,^{1,2} Anne Boucher,³ Mathilde Bahuaud,⁴
 Geoffrey Mortuaire,⁵ Hugues Melliez,⁶ David Launay,^{2,3}
 Louis Terriou,⁷ Lidwine Wemeau-Stervinou,⁷ Benoit Wallaert,⁷
 Karine Faure,⁸ Frédéric Wallet,⁹ Eric Hachulla,^{2,3}
 Pierre-Yves Hatron,³ Sylvain Dubucquoi,^{1,2} Frédéric Batteux,⁴
 Myriam Labalette,^{1,2} and Guillaume Lefèvre^{1,2,3}

¹CHU Lille, Institut d'Immunologie, ²University of Lille, Inflammation Research International Center, and ³CHU Lille, Département de Médecine Interne et Immunologie Clinique, Centre National de Référence Maladies Systémiques et Auto-immunes Rares, ⁴CHU Hôpital Cochin, Laboratoire d'Immunologie biologique, Plateforme d'Immuno-monitoring Vaccinal, Paris, ⁵CHU Lille, Service Oto-Rhino-Laryngologie et Chirurgie cervico-faciale, ⁶Service Universitaire Régional de Maladies Infectieuses et du Voyageur, Centre Hospitalier Gustave Dron, Tourcoing, ⁷CHU Lille, Service de Pneumologie et Immuno-Allergologie, Centre de compétence Maladies Pulmonaires Rares, and ⁸CHU Lille, Unité des Maladies Infectieuses, and ⁹CHU Lille, Institut de Microbiologie, France

We report on 11 cases of specific polysaccharide antibody deficiency (SPAD) revealed in adulthood by severe infections with encapsulated bacteria. Given that immunoglobulin replacement therapy can effectively prevent the recurrence of bacterial infections in this context, SPAD should be considered once other antibody deficiencies have been ruled out.

Keywords. specific polysaccharide antibody deficiency; primary immunodeficiency; *Streptococcus pneumoniae*; Group A *Streptococcus*; *Haemophilus influenzae* type b.

Antibody deficiencies are the most frequent primary immunodeficiencies (PIDs). The majority of patients with antibody deficiencies are diagnosed in early adulthood. Common variable immunodeficiency, selective immunoglobulin (Ig) A deficiency, and IgG subclass deficiency are characterized by a quantitative Ig deficiency and variably impaired responses to vaccines in general and to polysaccharide antigens in particular [1]. These PIDs are generally revealed by recurrent and/or severe bacterial infections (most of which are upper respiratory tract infections [URTIs]), pneumonia, and systemic infections by encapsulated bacteria such as *Streptococcus pneumoniae*, group A *Streptococcus*, and *Haemophilus influenzae* type b [1].

Received 2 November 2016; editorial decision 12 March 2017; accepted 28 March 2017; published online April 1, 2017.

Correspondence: G. Lefèvre, Institut d'Immunologie, Centre de Biologie-Pathologie-Génétique, CHRU de Lille, F-59037 Lille cedex, France (guillaume.lefevre@chru-lille.fr).

Clinical Infectious Diseases® 2017;65(2):328–31

© The Author 2017. Published by Oxford University Press for the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved. For permissions, e-mail: journals.permissions@oup.com. DOI: 10.1093/cid/cix284

Specific polysaccharide antibody deficiency (SPAD) is defined by an isolated, impaired antibody response to polysaccharide antigens in the presence of normal serum IgG, IgA, and IgM levels, normal IgG subclass levels, and normal T-cell subpopulations [1, 2]. An impaired antibody response to polysaccharide antigens is usually assessed after immunization with the 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine (PPV23). Antibody responses to protein vaccines (tetanus or diphtheria toxins) and conjugate vaccines are normal in patients with SPAD [1–3]. SPAD is most frequently reported in children with recurrent URTIs and/or pneumonia. Here, we report on 11 cases of SPAD diagnosed in adulthood following the occurrence of severe bacterial infections.

METHODS

The study was performed in the Department of Clinical Immunology at Lille University Medical Center, France, between January 2013 and January 2016. Patients diagnosed with SPAD after severe bacterial infections were identified in the active case file. Demographic characteristics, medical histories, clinical characteristics, the results of immunologic assessments, and the final diagnosis were recorded. Severe bacterial infection was defined as the occurrence of at least 1 acute severe infection that required hospitalization and/or a chronic bacterial infection that led to chronic lung disease.

The response to pneumococcal capsular polysaccharide (PnPS) was tested in the immunomonitoring facility at Cochin University Medical Center (Paris, France) using the third-generation World Health Organization enzyme-linked immunosorbent assay (the reference serotype-specific assay), as previously described [4]. Titers of antibody against 7 capsular serotypes (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, and 23F) were assessed before and 4 to 8 weeks after the administration of PPV23. The results were interpreted according to the guidelines issued in 2012 by the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology (AAAAI) Working Group [3]. Briefly, a participant was considered to have an impaired response for a single serotype if the post-immunization antibody titer was below 1.3 µg/mL (considered to be protective) and/or did not achieve a 4-fold increase (relative to the pre-immunization value). A 2-fold increase was acceptable if the initial titer was already above 1.3 µg/mL. All immunological tests and immunizations were performed at least 3 months after the last infectious event. None of the participants had undergone recent or concomitant treatment with steroids, immunosuppressants, or other medications capable of altering vaccine responses. SPAD was diagnosed if an impaired antibody response was observed for 3 or more of the 7 tested serotypes and if complement deficiencies, serum IgG, IgA, and

IgM deficiencies, and IgG subclass deficiencies had been ruled out. Patients were classified as having a severe, moderate, or mild SPAD phenotype, as previously described. "Memory SPAD" (ie, loss of response within 6 months) was not considered in the presents study [1, 2].

RESULTS

Eleven adult SPAD patients were included in the study (3 males and 8 females, median [range] age, 33 years [17;64]). The patients' demographic, clinical, and immunological characteristics are summarized in (Table 1) and Supplementary Tables 1 and 2.

SPAD was revealed by an isolated, invasive infection with encapsulated bacteria in 6 patients (patients 1–6). Four of the 6 patients presented with meningococcal infections: bacteremia

in 1 case (serotype C for patient 1), meningitis in 2 cases (serotype Y for patient 2 and serotype B for patient 3), and purpura fulminans in the remaining case (serotype C for patient 4). Patient 5 presented with septic shock due to *H. influenzae* type b, with a pericardial effusion and acute cardiac tamponade. Patient 6 presented with pneumococcal meningitis and partial seizures related to encephalitis. All patients were admitted to an intensive care unit (ICU). None had any significant comorbidities (except for trisomy 21 in patient 5).

The first severe infections in patient 7 (prompting referral to our department) were meningitis (due to *H. influenzae* type b) and bilateral pneumococcal pneumonia. The patient also experienced recurrent bacterial sinusitis (requiring antibiotic treatment about twice a year).

In patients 8 to 10, SPAD was revealed by recurrent severe pneumonia with bacteremia, hypoxemia, pleurisy, and/or

Table 1. Demographic, Clinical, and Biological Characteristics of the Patients

Patient No.	Age (y)/ Gender	Severe Bacterial Infections Before Diagnosis				Other Bacterial Infections Before Diagnosis	Specific Polysaccharide Antibody Deficiency Phenotype	Treatment	Follow-up After Diagnosis (mo)	Bacterial Infections After Diagnosis
		Clinical	Bacteria ^a	Frequency	Complication					
1	60/F	Bacteremia	NM serotype C	Isolated			Mild	Conjugate vaccines	17	None
2	17/F	Meningitis	NM serotype Y	Isolated			Severe	Conjugate vaccines	6	None
3	26/M	Meningitis	NM serotype B	Isolated			Moderate	Conjugate vaccines	35	None
4	64/F	Meningitis, purpura fulminans	NM serotype C	Isolated	Labyrinthitis		Severe	Conjugate vaccines	34	None
5	18/M	Bacteremia, septic shock	Hib	Isolated	Pericardial tamponade		Moderate	Conjugate vaccines	17	None
6	33/F	Meningitis	SP	Isolated	Seizures		Severe	Conjugate vaccines	27	None
7	25/F	Meningitis, pneumonia	Hib, SP	2 hosp. in the previous 5 y		Recurrent sinusitis	Moderate	Ig replacement	7	None
8	35/F	Pneumonia		4 hosp. in the previous 5 y	Pleurisy (n = 1)	Recurrent bronchitis and upper respiratory tract infections	Mild	Ig replacement	16	None
9	34/F	Pneumonia	SP, <i>Klebsiella pneumoniae</i>	5 hosp. in the previous 4 y	Pleurisy (n = 1), multilobar (n = 1), septic shock (n = 1), hypoxemia (n = 5)	Chronic rhinosinusitis	Severe	Ig replacement	14	None
10	64/F	Pneumonia	SP, Hib	8 hosp. in the previous 4 y	Hypoxemia (n = 8), pleurisy (n = 2), multilobar (n = 3)		Severe	Ig replacement	7	None
11	22/M	Pneumonia		Isolated		Recurrent bronchitis, bronchiectasis	Moderate	Ig replacement	24	None

Abbreviations: F, female; Hib, *Haemophilus influenzae* type b; hosp., hospitalizations; Ig, immunoglobulin; M, male; NM, *Neisseria meningitidis*; SP, *Streptococcus pneumoniae*.

^aIf at least 1 pathogen had been identified.

severe sepsis. This condition required repeated hospitalizations, sometimes in the ICU. Patients 9 and 10 had Sjögren's syndrome. Patient 9 also had severe rheumatoid arthritis (RA) but was not treated with immunosuppressants or corticosteroids because of the recurrent severe infections. Only patient 9 was a smoker. Last, patient 11 developed lobar pneumonia, bronchiectasis, and functional lung impairment in a context of recurrent URTIs and bronchopulmonary infections since childhood.

By reference to the classic definition of SPAD, all other immunological parameters (complement levels, IgG, IgA, IgM, and IgG subclass levels, and antibody responses to protein antigens and/or conjugate vaccines) were normal, except in patient 9 who displayed hypergammaglobulinemia related to RA and Sjögren's syndrome. However, a low B-cell count was found in 2 patients, and a small proportion of switched memory B-cells was found in 6 patients (Supplementary Table 2).

After diagnosis, all SPAD patients received comprehensive information on warning signs (such as fever, cough, headaches, and dyspnea) that should prompt them to consult their primary care physician and/or attend hospital in possible cases of severe infection or when antibiotic treatment fails to resolve symptoms.

Patients 1–6 (who presented with isolate invasive bacterial infections) received conjugate vaccines against *S. pneumoniae* (1–2 years after PPV23 to avoid hyporesponsiveness), *H. influenzae* type b, and meningococcal serotypes B, A, C, Y, and W135.

Patients 7–11 (with recurrent severe infections) received intravenous or subcutaneous Ig replacement therapy. The infections resolved fully and had not recurred in any of these patients after a median (range) follow-up period of 17 months (6;35).

DISCUSSION

Here, we describe 11 cases of SPAD diagnosed in adulthood following a severe infection with encapsulated bacteria. SPAD (for which effective prophylactic treatments are available) is rarely reported in adulthood and/or in patients with recurrent, benign infections (Supplementary Table 3).

Antibody primary disorders are usually revealed by recurrent and/or severe infections with encapsulated bacteria. The current guidelines recommend that adults be screened for PIDs if they experience 2 or more severe bacterial infections [5]. In a previous work, we found that PIDs are surprisingly prevalent (19%) in young adults who present with a first invasive infection with encapsulated bacteria [6].

The lack of an antibody response following immunization with a polysaccharide antigen has been described in various PIDs in which patients are exposed to recurrent and/or severe URTIs and lung infections and, more generally, to encapsulated bacterial infections [3]. The antipolysaccharide response is usually assessed by immunization with a pneumococcal

polysaccharide vaccine. All of our patients were diagnosed in accordance with the 2012 AAAAI guidelines on the use and interpretation of diagnostic vaccination [3]. All previous series of SPAD cases diagnosed according to the AAAAI guidelines were related to children and/or in adults presenting with recurrent URTIs (Supplementary Table 3). Our series differs in that the cases of SPAD were revealed in adulthood by severe bacterial infections (including meningococcal infections). Humoral immunity is involved in the control of *Neisseria meningitidis* infections [7], as suggested by the effectiveness of vaccination. Last, meningococcal infections have been reported in other antibody deficiencies [6, 8].

It is noteworthy that children aged <2 years, splenectomized patients, and asplenic patients are unable to respond to PnPS immunization and are susceptible to infection by encapsulated bacteria. The lack of anti-PnPS immunization is thought to be due to the immaturity and/or absence of marginal zone B cells [9, 10]. Although the exact mechanism of SPAD has yet to be determined, a small proportion of switched memory B cells observed in 6 of our 11 patients is a further indication of impaired humoral immunity [11].

As SPAD patients are particularly susceptible to encapsulated bacteria, long-term antibiotic treatment, the administration of conjugate vaccines, and Ig replacement therapy must all be considered as prophylactic measures for preventing the recurrence of infection [1, 2]. In our case series (and despite differences in the length of follow-up), Ig replacement in patients 7–11 seemed to effectively prevent the recurrence of infection. This is noteworthy because prior to Ig replacement therapy, the patients' bacterial infections were severe and required frequent hospitalization (sometimes in the ICU). Second, recurrent infections may be responsible for the acquisition of antibiotic resistance or impaired lung function, as observed in patient 11.

SPAD patients not on Ig replacement therapy received conjugated polysaccharide vaccines. The risk of infection by these encapsulated bacteria is explained to the patient and his/her primary care physician, so that an appropriate antibiotic course will be prescribed for any bacterial infections (eg, URTIs, respiratory symptoms, unexplained fever) and the patient will be referred to the hospital if he/she fails to improve after 24 to 48 hours of treatment.

Larger series and longer follow-up periods are warranted in order to better understand the consequences of mild/moderate/severe phenotypes, B-cell subset abnormalities, and not receiving Ig replacement therapy after a single, severe infection.

In conclusion, SPAD is a primary antibody deficiency that should be immediately considered in adults who develop unexplained, severe bacterial infections (ie, without waiting for recurrence). All physicians who deal with this type of infection should be aware of SPAD. Patient education, the administration

of conjugate vaccines, and Ig replacement therapy may all contribute to prophylaxis in SPAD patients.

Supplementary Data

Supplementary materials are available at *Clinical Infectious Diseases* online. Consisting of data provided by the authors to benefit the reader, the posted materials are not copyedited and are the sole responsibility of the authors, so questions or comments should be addressed to the corresponding author.

Notes

Author contributions. G. M., H. M., D. L., L. T., L. W.-S., B. W., K. E., F. W., E. H., P.-Y. H., and G. L. participated in patient care. M. B. and F. B. performed and analyzed data from reference serotype-specific assays. B. L., S. D., M. L., and G. L. analyzed all the immunologic data. B. L., A. B., and G. L. collected clinical and biological data. B. L., A. B., and G. L. wrote the article. All authors read and approved the final manuscript. G. L. had full access to all of the data in the study and had final responsibility for the decision to submit for publication.

Acknowledgments. We thank Dr David Fraser (Biotech Communication, Ploudalmézeau, France) for copy editing assistance. The regional reference center at Lille University Medical Center is part of the CEREDIH network of French National Reference Centers for PIDs.

Potential conflicts of interests. All authors: No reported conflicts of interest. All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

References

1. Bonilla FA, Khan DA, Ballas ZK, et al; Joint Task Force on Practice Parameters, representing the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology; the American College of Allergy, Asthma & Immunology; and the Joint Council of Allergy, Asthma & Immunology. Practice parameter for the diagnosis and management of primary immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* **2015**; 136:1186–205.e1–78.
2. Wall LA, Dimitriades VR, Sorensen RU. Specific antibody deficiencies. *Immunol Allergy Clin North Am* **2015**; 35:659–70.
3. Orange JS, Ballou M, Stiehm ER, et al. Use and interpretation of diagnostic vaccination in primary immunodeficiency: a working group report of the Basic and Clinical Immunology Interest Section of the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology. *J Allergy Clin Immunol* **2012**; 130(3 Suppl):S1–24.
4. Wernette CM, Frasch CE, Madore D, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of human antibodies to pneumococcal polysaccharides. *Clin Diagn Lab Immunol* **2003**; 10:514–9.
5. Arslan S, Ucar R, Caliskaner AZ, et al. How effective are the 6 European Society of Immunodeficiency warning signs for primary immunodeficiency disease? *Ann Allergy Asthma Immunol* **2016**; 116:151–155.e1.
6. Sanges S, Wallez F, Blondiaux N, et al. Diagnosis of primary antibody and complement deficiencies in young adults after a first invasive bacterial infection. *Clin Microbiol Infect*. **2017**. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28192236>.
7. Goldschneider I, Gotschlich EC, Artenstein MS. Human immunity to the meningococcus. I. The role of humoral antibodies. *J Exp Med* **1969**; 129:1307–26.
8. Oksenhendler E, Gérard L, Fieschi C, et al; DEFI Study Group. Infections in 252 patients with common variable immunodeficiency. *Clin Infect Dis* **2008**; 46:1547–54.
9. Weill JC, Weller S, Reynaud CA. Human marginal zone B cells. *Annu Rev Immunol* **2009**; 27:267–85.
10. Krutzmann S, Rosado MM, Weber H, et al. Human immunoglobulin M memory B cells controlling *Streptococcus pneumoniae* infections are generated in the spleen. *J Exp Med* **2003**; 197:939–45.
11. Leiva LE, Monjure H, Sorensen RU. Recurrent respiratory infections, specific antibody deficiencies, and memory B cells. *J Clin Immunol* **2013**; 33 (Suppl 1):S57–61.



Value of the Overall Pneumococcal Polysaccharide Response in the Diagnosis of Primary Humoral Immunodeficiencies

Benjamin Lopez^{1,2*}, Mathilde Bahuaud³, Claire Fieschi⁴, Souad Mehlaï³, Mohamed Jeljel³, Stéphanie Rogeau^{1,2}, Séverine Brabant¹, Anne-Sophie Deleplancque¹, Sylvain Dubucquoi^{1,2}, Sandrine Poizot¹, Louis Terriou^{2,5}, David Launay⁵, Frédéric Batteux³, Myriam Labalette^{1,2} and Guillaume Lefèvre^{1,2,5}

¹CHU Lille, Institut d'Immunologie, Lille, France, ²Univ. Lille, U995 – LIRIC – Lille Inflammation Research International Center, Lille, France, ³CHU Hôpital Cochin, Laboratoire d'Immunologie Biologique, Plateforme d'Immuno-monitoring Vaccinal, AP-HR, Paris, France, ⁴Sorbonne Paris Cité, Université Paris Diderot, Hôpital Saint-Louis, Service d'Immunopathologie Clinique, Paris, France, ⁵CHU Lille, Département de Médecine Interne et Immunologie Clinique, Centre National de Référence Maladies Systémiques et Auto-immunes Rares, Lille, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Guzide Aksu,
Ege University, Turkey

Reviewed by:

Ricardo U. Sorensen,
LSU Health Sciences Center New
Orleans, United States
Ross Sadler,
Oxford University Hospitals NHS
Trust, United Kingdom

*Correspondence:

Benjamin Lopez
benjamin.lopez@chru-lille.fr

Specialty section:

This article was submitted
to Primary Immunodeficiencies,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 28 September 2017

Accepted: 07 December 2017

Published: 20 December 2017

Citation:

Lopez B, Bahuaud M, Fieschi C,
Mehlaï S, Jeljel M, Rogeau S,
Brabant S, Deleplancque A-S,
Dubucquoi S, Poizot S, Terriou L,
Launay D, Batteux F, Labalette M and
Lefèvre G (2017) Value of the Overall
Pneumococcal Polysaccharide
Response in the Diagnosis of Primary
Humoral Immunodeficiencies.
Front. Immunol. 8:1862.
doi: 10.3389/fimmu.2017.01862

Background: An overall response assay [OVA, based on a 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine (PPV23)] is widely used to screen for anti-pneumococcal antibodies. Given the heterogeneity of response from one polysaccharide (PS) to another, a World Health Organization-standardized serotype-specific enzyme-linked immunosorbent assay (SSA) is considered to be the only reliable method for testing anti-PS antibody responses in individuals with suspected primary immunodeficiencies (PIDs).

Objective: To evaluate the OVA relative to the reference SSA.

Methods: Serum samples of adult patients referred for a suspected PID were collected before and then 4–8 weeks after immunization with PPV23. The anti-pneumococcal response was systematically assessed with an SSA (7–16 serotypes) and interpreted according to the American Academy of Asthma, Allergy and Immunology's current guidelines. We used receiver operating characteristic curves and agreement indices to assess the OVA's diagnostic value in a first cohort. In order to validate these findings, a second (validation) cohort was then prospectively included.

Results: Sixty-two adult patients were included, and 42 (67.7%) were defined as poor responders according to the SSA. Only the post-immunization titer in the OVA was able to correctly identify poor responders; a titer below 110 mg/L gave a positive predictive value of 100% [identifying 24 (57.1%) of the 42 poor responders], and similar levels of diagnostic performance were observed in the validation cohort. The pre-vaccination antibody titer, the post/pre-vaccination antibody titer ratio and a post-vaccination titer above 110 mg/L in the OVA were not predictive of the response in the SSA.

Conclusion: A post-vaccination antibody titer below 110 mg/L in the OVA was constantly associated with a poor PPV23 response using the SSA. In all other cases, SSA is the only reliable method for assessing diagnostic vaccination with PPV23.

Keywords: primary immunodeficiency, humoral immunodeficiency, pneumococcal polysaccharide response, serotype-specific assay, polysaccharide response, overall assay

INTRODUCTION

An altered immunoglobulin G (IgG) antibody response to vaccines is an important criterion in the diagnosis of primary immunodeficiencies (PIDs), such as common variable immunodeficiency (CVID), transient hypogammaglobulinemia of infancy, selective IgA deficiency, IgG subclass deficiencies, or selective anti-polysaccharide antibody deficiency (SPAD) (1, 2). Although responses to protein or protein-conjugated antigens may be conserved, responses to polysaccharides (PSs) are usually impaired. This is particularly true for SPAD, which is characterized by an isolated defect in the specific anti-polysaccharide IgG response, normal total IgG, IgA/M, and IgG subclass titers, and the absence of a T-cell deficiency (1, 2). The response to PS antigens is usually tested by challenging the patient with the pneumococcal capsular polysaccharides (PnPSs) in the 23-valent pneumococcal vaccine (PPV23); in 2012, the American Academy of Asthma, Allergy and Immunology (AAAAI) proposed consensus criteria for an impaired response to PnPSs (1, 2). The currently accepted gold-standard test for specific anti-PnPS IgG responses is the serotype-specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) validated by the World Health Organization (WHO) (3). Given that each serotype requires a single ELISA, the serotype-specific assay (SSA) is too expensive and time-consuming to be used in routine practice; as a result, it has not been widely disseminated and is available in only a few highly qualified laboratories. Several alternative in-house multiplexed approaches have also been suggested but they are of limited access (4–7).

By contrast, the overall anti-PnPS response assay (OVA, which measures the antibody response to all 23 of the PPV23's antigens) is widely available in hospital central laboratories and private diagnostic laboratories as in-house assays or easy-to-use commercial kits (8). In view of its design, the OVA only characterizes the overall response to all serotypes and does not take account of the well-known inter-serotype heterogeneity in antibody titers (9, 10). The published normative values were calculated for healthy, non-vaccinated control groups. Although several pathological values have also been reported, they were calculated from groups of patients with greatly differing diagnostic criteria (8, 11–13). The clinical relevance of OVA with regard to SSA has not previously been assessed, and OVA is not currently recommended for the assessment of anti-PnPS responses.

In this context, the present study was designed to assess the value of the OVA (the index test) in the diagnosis of a defective PS vaccine response in adults, relative to the gold-standard SSA.

Abbreviations: AAAAI, American academy of asthma, allergy and immunology; AUC, area under the curve; CVID, common variable immunodeficiency; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; OVA, overall response assay; PID, primary immunodeficiency; PPV23, 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine; PnPS, pneumococcal capsular polysaccharide; ROC, receiver operating characteristic; Se, sensitivity; Sp, specificity; SPAD, selective anti-polysaccharide antibody deficiency; SSA, serotype-specific assay; WHO, World Health Organization.

MATERIALS AND METHODS

Study Design

We first performed a retrospective study in patients being tested with the WHO-validated reference SSA for the diagnosis of suspected PIDs. In order to validate the threshold determined in the retrospective cohort, a second, separate cohort of patients with suspected PID was then prospectively evaluated.

Participants

In the retrospective study, the population was composed of adult patients having undergone a PS vaccine response assay for a suspected PID in the Department of Clinical Immunology at Lille University Medical Center (Lille, France), Saint Louis University Medical Center (Paris, France) and/or patients included in an ongoing trial which aims to evaluate a screening strategy of PIDs in adults (ClinicalTrials ref: NCT02972281).

In the prospective validation study, a second cohort of consecutive adult patients referred for possible PID from the above-mentioned ongoing NCT02972281 trial was included on a blind basis.

In both studies, stored serum samples were retrieved from the Immunomonitoring Facility at Cochin University Medical Center (Paris, France). The inclusion criteria were unexplained recurrent and/or severe bacterial infections with encapsulated bacteria (i.e., upper and/or lower respiratory tract infections, invasive infections). The main exclusion criteria were as follows: evidence of secondary immunodeficiency, immunoglobulin replacement therapy, non-compliance with the post-immunization period, and pneumococcal immunization in the previous 5 years. All identified PIDs were classified according to current guidelines (1, 14).

Ethics

Both studies were conducted in accordance with the recommendations of the Helsinki Declaration and complied with the requirements of the French Commission Nationale Informatique et Libertés.

Patients included through the ongoing adult PIDs screening study (ClinicalTrials ref: NCT02972281) gave written informed consent according to the current legislation and the study protocol.

Patients included through routine consultations of French university hospitals received information, and the ability to refuse, that their clinical data and/or remaining biological samples after routine testing completion could be used for research purposes. All samples were retrieved from a human biological collection declared to and authorized by the French Ministry in charge of Research (No. DC-2008-642). Hence, no written informed consent was collected from this population.

Test methods

The Clinical Reference Standard

The PnPS response was tested in the Immunomonitoring Facility at Cochin University Medical Center (Paris, France), using a WHO-validated SSA. Titers of antibody against seven capsular

serotypes (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, and 23F) were assessed before and then 4–8 weeks after the administration of PPV23 (3). The results were interpreted according to the 2012 AAAAI guidelines, which were recently reviewed by a panel of experts (2, 15). Briefly, an insufficient response for a given serotype was considered to correspond to post-immunization antibody titers below 1.3 mg/L or failing to show a fourfold increase. A twofold increase was deemed acceptable if the initial value was already greater than 1.3 mg/L. A poor response to PnPSs was defined by an insufficient response to at least 70% (i.e., 5 or more) of the 7 tested serotypes, and patients were, therefore, classified as “good responders” or “poor responders.” To validate the relevance of the 7-serotype PS response, serum samples with sufficient pre- or post-immunization (PPV23) volumes were tested for antibodies against nine additional serotypes (1, 3, 5, 6A, 7F, 19A, 10A, 12F, and 15B) (data not shown).

The Index Test

An OVA was used to measure the total titer of antibodies to all 23 serotypes in the serum samples studied with the reference standard at the time of the initial diagnosis and subsequently stored in a dedicated -80°C serum bank. The assay was performed in the Immunology Institute at Lille University Medical Center (Lille, France), using the VaccZyme™ anti-PCP IgG Enzyme Immunoassay Kit (The Binding Site®, Birmingham, United Kingdom) on an ETI-Max 3000™ analyzer (DiaSorin®, Vercelli, Italy). The serum samples were analyzed at a first-intention dilution of 1:100. A further 1:10 dilution was performed when antibody titers fell outside the assay’s linearity range. The OVA results were initially interpreted blindly, i.e., without regard to the SSA results. According to the study protocol, indeterminate results and missing data were to be excluded before the analysis.

Analyses

Analyses were performed using SAS® software (version 9.4; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Continuous variables are quoted as the median (range) and categorical variables are quoted as the number (percentage). The good responders and poor responders were compared with regard to their clinical and biological characteristics by using a Mann–Whitney test for continuous variables, and the chi-squared test or Fisher’s exact test for categorical variables, as appropriate.

In the retrospective study, linear regression and Pearson’s correlation coefficient were used to assess the putative relationship between OVA antibody titers and the sum of serotype-specific antibody titers before and after vaccination (13, 16). Receiver operating characteristic (ROC) curves were plotted and the area under the curve (AUC) was calculated for pre- and post-immunization antibody titers, the post-immunization increase and the post-/pre-immunization titer ratio. The best cut-off values were then chosen (i) according to the Youden index calculation [which defines the maximum potential effectiveness of a biomarker when equal weight is given to sensitivity (Se) and specificity (Sp)], and (ii) in order to maximize the assay’s Sp value. Positive and negative predictive values were calculated on the basis of the prevalence of the target condition in the included population. For each

identified cut-off value, the OVA’s performance and agreement levels were measured using McNemar’s test and Cohen’s kappa.

In the prospective validation study, the best cut-off value determined in the retrospective study was used to classify patients against the gold-standard diagnosis and, thus, validate our methodology. All tests were two-tailed, and the threshold for statistical significance was set to $p < 0.05$.

RESULTS

The Retrospective Study

Participants

Sixty-two patients were included, 33 (53.2%) were females, and the median (range) age at inclusion was 37.5 (18–75) years. No indeterminate results were observed with either assay. According to the SSA, 42 (67.7%) of the patients showed a poor response to PnPSs. The identified PIDs were CVID ($n = 5$, 8.1%), unclassified isolated IgG deficiency ($n = 7$, 11.3%), IgG subclass deficiency ($n = 8$, 12.9%, including IgG1/3 deficiency, $n = 3$; IgG2 deficiency, $n = 2$; IgG2/IgA deficiency, $n = 3$), isolated IgA deficiency ($n = 2$, 3.2%), isolated IgM deficiency ($n = 1$, 1.6%) and SPAD ($n = 24$, 38.7%). Some of the patients with SPAD have been described elsewhere (17). The patients’ clinical characteristics are presented as a function of the vaccine response in **Table 1**.

Test Results

There was no significant difference between the good responders’ and poor responders’ median (range) sampling periods (respectively, 6.0 (4.0–7.8) and 6.4 (4.1–7.9) weeks after immunization, $p = 0.465$). The median (range) number of responsive serotypes was 3 (0–7) for the study population as a whole, 2 (0–4) for poor responders and 6 (5–7) for good responders ($p < 0.001$). In the SSAs, the response varied markedly from one serotype to another for both good responders and poor responders. An example of the complexity of comparing SSA and OVA responses due to SSA heterogeneity is illustrated for two patients with high OVA values in Figure S1 in Supplementary Material. Nevertheless, a linear regression of the sum of seven individual antibody responses and the overall antibody titers yielded acceptable Pearson correlation coefficients of $r = 0.47$ and $r = 0.56$ for pre- and post-immunization antibody titers, respectively ($p < 0.001$ for both).

A significant intergroup difference was observed for all the OVA criteria: the pre- and post-immunization titers ($p = 0.004$ and $p < 0.001$, respectively), the post-immunization increase and the post-/pre-immunization titer ratio ($p < 0.001$ for both) (**Table 1; Figure 1**). It is noteworthy that despite the presence of a significant difference in the median post-immunization titer between good responders and poor responders [480 (114–1360) and 100 (9–1010) mg/L, respectively; $p < 0.001$], several poor responders ($n = 4$, 9.5%) achieved high (>270 mg/L) post-immunization titers (**Table 1; Figure 1**).

The results of ROC curve analyses of the OVA’s performance vs. the SSA are summarized in **Figure 2**. In multiple AUC comparisons (data not shown), the post-immunization titer and the post-immunization increase discriminated between poor and good responders [AUCs, 95% confidence interval (CI) of

TABLE 1 | Clinical and biological characteristics of the retrospective study population as a whole and according to the vaccine response status.

	Whole population	Normal ^a polysaccharide (PS) response (good responders)	Impaired ^a PS response (poor responders)	<i>p</i>
	<i>n</i> = 62	<i>n</i> = 20 (32.3%)	<i>n</i> = 42 (67.7%)	
Demographics				
Age (years)	37.5 (18–75)	30 (18–75)	41 (18–70)	0.065
Gender (women) <i>n</i> = (%)	33 (53.2%)	9 (45.0%)	24 (57.1%)	0.370
Diagnosis <i>n</i> = (%)				
Common variable immunodeficiency	5 (8.1%)	0 (0.0%)	5 (11.9%)	0.165
Unclassified, isolated immunoglobulin G (IgG) deficiency	7 (11.3%)	2 (10.0%)	5 (11.9%)	1.000
IgG sub-class deficiency	8 (12.9%)	2 (10.0%)	6 (14.3%)	1.000
IgG1/3 deficiency	3 (4.8%)	1 (5.0%)	2 (4.8%)	1.000
IgG2 deficiency	2 (3.2%)	1 (5.0%)	1 (2.4%)	0.545
IgG2/A deficiency	3 (4.8%)	0 (0.0%)	3 (7.2%)	0.445
Isolated IgA deficiency	2 (3.2%)	1 (5.0%)	1 (2.4%)	0.480
Isolated IgM deficiency	1 (1.6%)	0 (0.0%)	1 (2.4%)	1.000
Specific PS antibody deficiency	24 (38.7%)	0 (0.0%)	24 (57.1%)	<0.001
Noimmunodeficiency diagnosed	15 (24.2%)	15 (75.0%)	0 (0.0%)	<0.001
PS response				
Time interval between immunization and sample collection (weeks)	6.3 (4.0–7.9)	6.0 (4.0–7.8)	6.4 (4.1–7.9)	0.465
Serotype-specific assay (SSA)				
Number of good responses	3 (0–7)	6 (5–7)	2 (0–4)	<0.001
Overall assay (OVA) (mg/L)				
Pre-immunization OVA antibody titer	26 (4–196)	47.5 (12–196)	22.5 (4–166)	0.004
Post-immunization OVA antibody titer	151 (9–1360)	480 (114–1360)	100 (9–1010)	<0.001
Post-immunization increase in titer	121 (0–1325)	412.5 (85–1325)	69 (0–846)	<0.001
Post-/pre-immunization titer ratio	4.8 (0.8–38.9)	9.3 (2.9–38.9)	3.9 (0.8–16.5)	<0.001

^aNormal and impaired PS responses as assessed by the serotype-specific assay and using the American Academy of Asthma, Allergy and Immunology criteria (2).

The data are quoted as the median (range) or the number (percentage).

p-Values were obtained using a Mann-Whitney test for quantitative variables and a chi-square or Fisher's exact test for qualitative variables.

Significant *p*-values are highlighted in bold font.

0.910 (95% CI, 0.810–0.968) and 0.921 (95% CI, 0.824–0.974), respectively] better than the pre-immunization titer and the post-/pre-ratio did.

Indicators of the OVA's performance are presented in **Table 2**. In summary, an analysis of all four potential determinants showed that the Se increased and the Sp decreased as the magnitude of the response increased. Following calculation of the Youden index, the two best criteria were found to be a post-immunization antibody titer ≤ 230 mg/L and a post-immunization increase of ≤ 139 mg/L although neither of them achieved estimates of Se and Sp greater than 90%. As expected, the overall agreement was poor for most of the potentially determinant variables. McNemar's test evidenced significant differences for a post-immunization titer of 230 mg/L ($p = 0.008$), and an increase of at least 139 mg/L ($p = 0.049$). Cohen's kappa was never better than moderate (<0.60) for any of the criteria (**Table 2**).

Given that our objective was to determine the value of first-intention use of the OVA, we searched for an easy-to-use criterion that maximized Sp (regardless of Se) than thus provided a reliable diagnosis. We found that a post-immunization threshold of 110 mg/L yielded the greatest Sp and correctly identified a high proportion of the poor responders [Se 57.8% (95% CI, 38.7–70.2); Sp 100.0% (95% CI, 83.2–100.0)].

When analyzing a broader set of 16 anti-serotype titers, only 1 of the 20 tested patients (5.0%) was reclassified (from a good responder to a poor responder). This 18-year-old woman

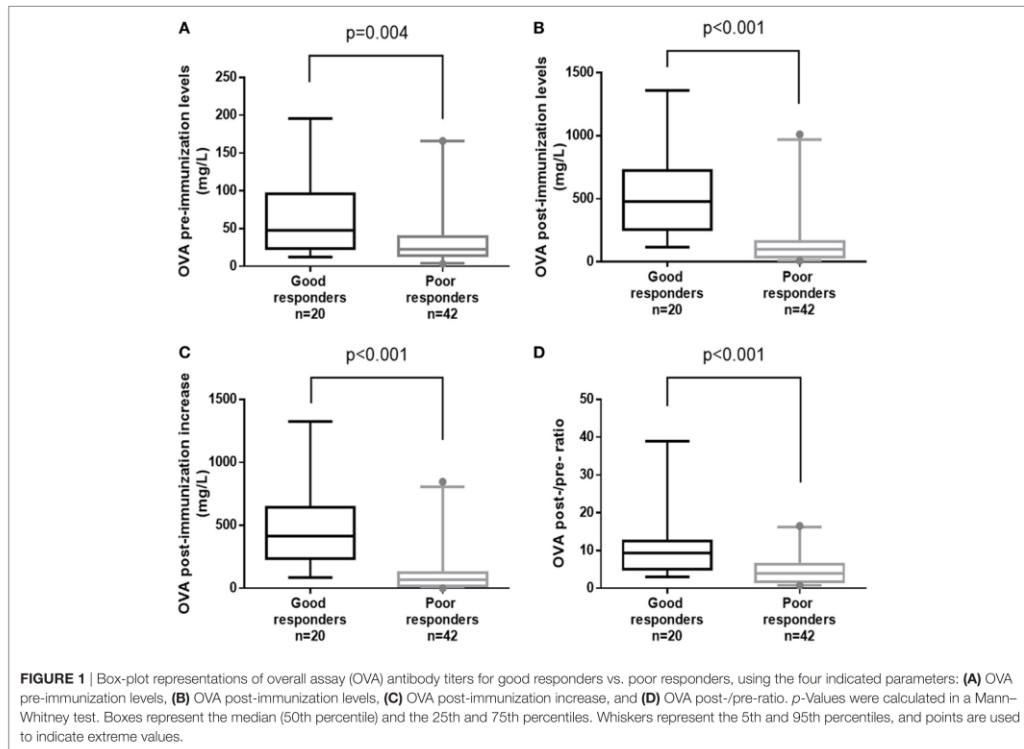
presented with hypogammaglobulinemia and recurrent respiratory tract infections. She showed a good response for 5 of the first 7 serotypes tested in SSA but for only 11 of the 16 serotypes in total. In the OVA, the pre- and post-immunization titers were 17 and 182 mg/L, respectively. Consequently, only a slight decrease in Se was noted [Se 56.1% (95% CI, 42.1–70.1), Sp 100% (95% CI, 81.4–100)] when re-calculating the selected performance values for a threshold of 110 mg/L.

The Prospective Validation Study Participants

Twenty patients were included in the validation study [17 females (85%); median (range) age at inclusion: 45.5 (28–63) years].

Diagnostic Performance of the OVA

Using the OVA assay, seven patients presented post-vaccination titers below the 110 mg/L threshold; of these, two patients with very low post-vaccination OVA titers (48 and 76 mg/L) were first categorized as good responders by the SSA performed on seven serotypes. Consequently, the OVA-estimated performances were as follows: Se: 62.5% [24.5–91.5]; Sp 83.3% [51.6–97.9]. It is noteworthy that the two patients with very low post-vaccination OVA titers presented a good response for five of the first seven serotypes tested. As for the case described above, analysis of the 16 serotypes with an SSA for these two patients resulted in



reclassification, with good responses to, respectively, eight serotypes (50.0%) and 7 serotypes (43.8%). After the re-assignment of both patients to the PID group (both SPAD), the OVA assay gave satisfactory values for diagnostic performance (Se: 70.0% [34.8–93.3]; Sp: 100.0% [69.2–100.0]; positive predictive value: 100.0% [65.3–100.0]). The flow chart for the prospective validation study is available in Figure S2 in Supplementary Material, along with the OVA's diagnostic performance.

DISCUSSION

The present study is the first to have investigated the diagnostic value of a widely available OVA commercial kit in patients with a suspected PID by using the reference SSA to identify good responders and poor responders. Given that we wanted to establish whether use of the OVA alone could reliably identify a poor responder in routine clinical practice, we favored a high Sp. The most value parameter was a post-immunization titer below or equal to 110 mg/L [Sp 100% (95% CI, 83.2–100)]. However, the application of this cut-off value detected only around half of the poor responders [Se 57.8% (95% CI, 38.7–70.2)]—confirming that the SSA is required in a two-step procedure for patients with a post-immunization titer above 110 mg/L.

In a context of suspected PID, an anti-PnPS response assessment is of great clinical value. However, the gold-standard assay may prove both difficult to access and expensive to implement. The great inter-serotype heterogeneity of the anti-PnPS response in a given patient and the large inter-patient heterogeneity for a given serotype (as illustrated in Figure S1 in Supplementary Material) have long been recognized as important issues in assessment of anti-PnPS responses (9, 10). An isolated, elevated response to a single serotype may indeed be responsible for a high OVA value (18) (Figure S1 in Supplementary Material).

To overcome the heterogeneity problem, a number of multiplexed tests have been developed and evaluated for the diagnosis of impaired anti-PS responses. Many studies have evaluated the performance of Luminex[®]-based assays based on either in-house protocols or the 14-valent kit sold by Luminex Corporation (Austin, TX, USA) (6, 19), and several researchers have proposed specific cut-off values and/or qualitative criteria for the interpretation of Luminex[®] results—thus enabling the use of this time- and cost-saving method (6, 7, 20–24).

Other types of assays have been proposed for the assessment of anti-PS immunization in suspected cases of PID. The results for measurement of allohemagglutinins did not support the use of this approach for assessment of the response to PSs (25). More

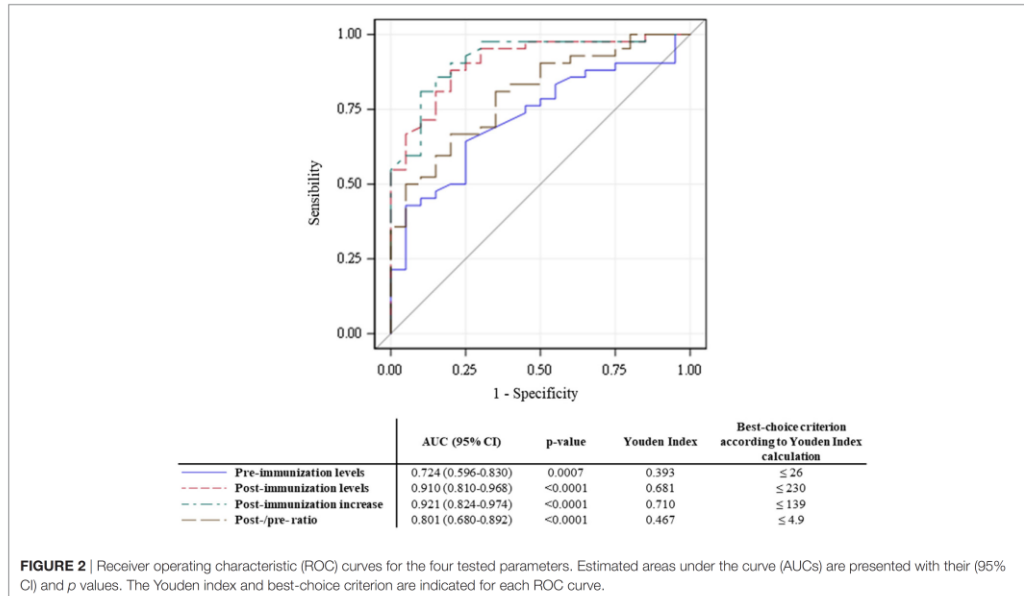


TABLE 2 | Performance indicators and levels of agreement for the overall assay (OVA)'s results.^a

Criterion	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Positive predictive value (%)	Negative predictive value (%)	McNemar's test <i>p</i> -value	Cohen's kappa value (%)
Pre-immunization titer (mg/L)						
≤26 ^b	64.3 (48.0–78.4)	75.0 (50.9–91.3)	84.4 (67.2–94.7)	50.0 (31.3–68.7)	0.154	0.31 (0.08–0.53)
Post-immunization titer (mg/L)						
≤110	57.8 (38.7–70.2)	100.0 (83.2–100.0)	100.0 (85.2–100.0)	51.3 (34.8–67.6)	0.761	0.53 (0.39–0.66)
≤230 ^b	88.1 (74.4–96.0)	80.0 (56.3–94.3)	90.2 (76.9–97.3)	76.2 (52.8–91.8)	0.008	0.52 (0.29–0.75)
Post-immunization increase in titer (mg/L)						
≤139 ^b	81.0 (65.9–91.4)	90 (68.3–98.8)	94.4 (81.3–99.3)	69.2 (48.2–85.7)	0.049	0.57 (0.36–0.79)
Post-/pre-ratio						
≤4.9 ^b	66.7 (50.5–80.4)	80 (56.3–94.3)	87.5 (71.0–96.5)	53.3 (34.3–71.7)	0.126	0.39 (0.17–0.60)

^aComparatively to the vaccine response status as assessed by the serotype-specific assay and using the American Academy of Asthma, Allergy and Immunology criteria (2).

^bSelected using the Youden index. The selected threshold's performances are highlighted in bold font.

All statistics are presented with the corresponding (95% confidence interval).

recently, *Salmonella Typhi* Vi vaccination was investigated as an alternative tool for PS response assessment (26). Primary results were promising but patients and physicians might be reluctant to use the Typhim Vi vaccine systemically and the assay appeared to be less performant in case of previous immunization/infection. Although cut-off values for an *S. typhi* Vi vaccine response were recently proposed (7), pneumococcal vaccination is still the reference for assessment of the response to PSs (15). In this context, we sought to determine the diagnostic value of one of the assays most frequently used in routine practice.

Linear regression of the sum of seven individual SSA values yielded a low correlation coefficient for the pre-immunization titer ($r = 0.47$), and a slightly higher coefficient

for the post-immunization titer ($r = 0.56$). In the subset of patients in whom the antibody responses to 16 serotypes had been measured, the pre-immunization titer again had a low correlation coefficient ($r = 0.47$). By contrast, the coefficient for the post-immunization titer was much higher ($r = 0.92$). Our present results are consistent with the literature data (13, 16). The increase in the correlation coefficient was expected, since anti-pneumococcal antibodies are known to bind more specifically to their antigens after immunization (27).

To assess the relevance of the OVA's values, we tested four different parameters: the pre-immunization titer, the post-immunization titer, the total post-immunization increase, and the post-/pre-immunization ratio. On the population level,

comparisons of the raw OVA data identified significant differences between good responders and poor responders for all four parameters (Table 1; Figure 1). In another study of the OVA, Sánchez-Ramón et al. reported significant differences in the pre- and post-immunization titers between COVID patients and healthy controls [$p = 0.02$ and $p = 0.006$, respectively (26)]. We expected the pre-immunization titer to discriminate less well between good responders and poor responders, since basal pneumococcal antibody titers mainly depend on previous infections and immunizations (2). On the individual level, our ROC curve analyses revealed significantly greater AUCs for the post-immunization titer and the post-immunization increase. Although we investigated the best values according to the Youden index, a satisfactory threshold was not found. Given that several criteria yielded non-significant differences in McNemar's test, Cohen's agreement statistic was consistently low—ruling out the reliable use of the OVA alone.

Since our aim was to integrate the OVA into a combined diagnosis approach (rather than replace the SSA), we nevertheless investigated the relevance of a two-step process in which the OVA assay could be used as a screening test for impaired PS responses. Intuitively (and despite the problem of response heterogeneity), patients who fail to increase their antibody titers and/or have rather low overall titers could possibly be bad responders. Accordingly, we determined that a post-immunization titer ≤ 110 mg/L had diagnostic value as the highest OVA value that would always identify poor responders [accounting for around half of the positive cases: Se 57.8% (95% CI, 38.7–70.2), Sp 100% (95% CI, 83.2–100.0)].

To validate our results, we measured nine additional anti-serotype antibody titers in 20 patients for whom sufficient volumes of serum had been collected before and after administration of PPV23. Only one patient (5.0%) was reclassified as a poor responder rather than a good responder, despite a relatively similar proportion of good serotype responses [from $n = 5$ out of 7 (71.4%) to $n = 11$ out of 16 (68.8%)]. These data emphasize that a seven-SSA analysis is reliable. After recalculation, the Se and Sp for a ≤ 110 mg/L threshold were, respectively, 56.1% (95% CI, 42.1–70.1) and 100% (95% CI, 81.4–100).

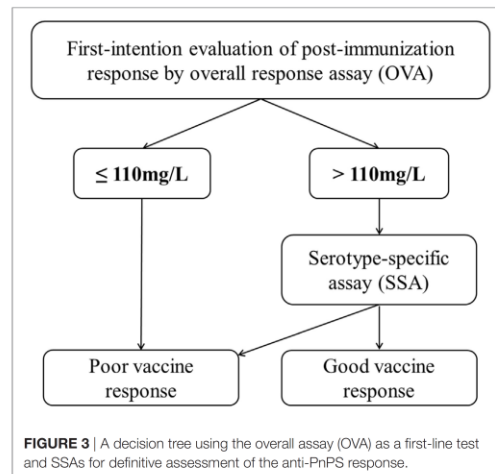
Lastly, we evaluated the threshold of 110 mg/L on 20 additional patients. Given that reclassification (from good responders to bad responders) had been required for the 16-serotypes SSA, we checked the two patients with very low post-immunization OVA levels and who had initially been classified as good responders. Using the 16-serotypes SSA, both were reclassified as poor responders, and so the OVA's diagnostic performance with the 110 mg/L threshold was similar to that observed in the retrospective study [Se: 70.0% (34.8–93.3); Sp: 100.0% (69.2–100.0); positive predictive value: 100.0% (65.3–100.0)] (Figure S2 in Supplementary Material).

Our study has several limitations. The study participants were all adults and had been referred for a suspected PID. Only 42 (67.7%) received a final diagnosis of PID—thanks to an analysis of their PPV23 response, in many cases. It has been reported that the likelihood of identifying a PID is surprisingly high when adult patients are referred to specialist centers (28). This high diagnosis

rate may also be related to our selection procedure, which was based on referral for SSAs: in our establishments, only highly probable cases are tested with SSAs in order to obtain a diagnosis and confirm an indication for immunoglobulin replacement therapy. Nevertheless, we also included some good responders, and we used the most recent, widely accepted interpretation criteria to evaluate our results.

Concerns about the specificity of the gold-standard SSA method were recently raised, since one study found that about 11.2 to 20.4% of healthy adults (depending on the criteria applied) with no history of infection had PS antibody deficiencies (29). Given that the latter study was based on a bead-based serotype-specific assay, it may suffer from a lack of specificity. This was suggested in previous studies in which the absolute antibody concentrations obtained by both methods remained different, despite a good overall correlation (11, 21, 30, 31). In a recent study, the authors advanced that AAAAAI criteria could not be applied to SSA and to an in-house Luminex® bead-based assay (7). However, the use of a 3-serotypes SSA and a shorter (3–4 weeks) time interval between immunization and sample collection could also explain some weak responses and that 11 to 34% of the healthy subjects were classified as SPAD with the SSA or with the bead-based assay, respectively. To conclude, the authors suggested some interesting fifth percentile cut-off values for the interpretation of the PPV response measured by their in-house bead-based assay, as a way to overcome this possible lack of specificity (7).

Despite the clear need for further studies of the clinical relevance of an impaired antibody response to PS in subjects without any medical history suggestive of PID, and considering that all our patients had recurrent and/or severe unexplained bacterial infections consistent with a possible antibody deficiency, we believe that this potential source of bias was limited in the present study (7, 15, 29).



It should also be noted that our approach cannot distinguish between the four SPAD phenotypes (namely mild, moderate, severe, and memory) (2, 32). Nevertheless, the SPAD phenotype has never been linked to clinical presentations and/or complications—although very recent data suggest that it might be of value in guiding treatment decisions (15).

No patient with a post-immunization overall antibody titer ≤ 110 mg/L exhibited a good response using the 16-serotypes SSA. Indeed, a post-immunization overall antibody titer ≤ 110 mg/L yielded maximum specificity [100% (95% CI, 83.2–100.0)] and a high positive predictive value [100% (95% CI, 85.2–100.0)], although the high prevalence of poor responders in our population means that these predictive values should be confirmed in a larger cohort. Consequently, an impaired response can be diagnosed if the post-immunization overall antibody titer is ≤ 110 mg/L. However, the observation of higher antibody titers would require the application of SSAs for a definitive diagnosis. Accordingly, we propose a two-step diagnostic approach based on OVA screening and the use of SSAs when the post-immunization titer is > 110 mg/L (Figure 3).

Finally, we evaluated only one commercial overall anti-pneumococcal response assay, and a similar comparison method should be applied to other commercial and in-house overall assays.

CONCLUSION

We evaluated the diagnostic performance of an OVA for the assessment of impaired anti-PS responses. If the gold standard, WHO-validated SSA is not available, a commercial OVA may be of value in screening for PIDs. Our results suggest that a post-vaccination antibody titer below 110 mg/L in the OVA is associated with a poor PPV23 response. In all other cases, SSA is the only reliable method for assessing the response to PPV23.

ETHICS STATEMENT

Concerning the patients ($n = 33/82$) included through the above-mentioned ongoing adult PIDs screening (ClinicalTrials ref: NCT02972281), this study was carried out in accordance with the recommendations of the Helsinki Declaration and complied with the requirements of the French Commission Nationale Informatique et Libertés, with written informed consent from all subjects. The reference code of the Agence

Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM) is 140857B-61. Concerning the other patients ($n = 49/82$), the used samples came from a collection declared to the French Ministry in charge of Research (No. DC-2008-642). In accordance with French regulations, the process for declaring human biological collections for research purposes involves an independent ethics committee (i.e., the committee for the protection of individuals) and the opinion of this committee is decision-making. Consequently, it is recognized that the authorization issued by the Ministry in charge of Research takes the place of advice from the ethics committee.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

BL and GL designed the study, analyzed and interpreted the data, and drafted the manuscript. CF, LT, DL, and GL have contributed to patients' recruitment and data acquisition, and provided critical revision of the manuscript. MB, SM, MJ, and SP were responsible for parts of the data acquisition and contributed to critically revise the manuscript. SR, SB, A-SD, SD, FB, and ML supplied help to data interpretation and revision of the manuscript. All authors gave final approval of the version to be published.

FUNDING

The Lille University Hospital, the Imagine Institute/CEREDIH (Centre de Référence des Déficiences Immunitaires Héritées), Octapharma, CSL Behring, Laboratoire Français de Fractionnement et de Biotechnologies (LFB) S.A., and Air Liquide S.A provided supportive grants for patients' inclusion in an ongoing PIDs screening study (ClinicalTrials ref: NCT02972281).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at <http://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2017.01862/full#supplementary-material>.

FIGURE S1 | Examples of discrepancies between SSA and overall assay (OVA) results for two representative patients. Antibody titers are displayed as histograms (blue: pre-immunization, red: post-immunization). The dotted line corresponds to the 1.3 mg/L cutoff for a good individual serotype response.

FIGURE S2 | Flow chart for the prospective validation study. The numbers of patients are given with the overall assay (OVA) performances for the previously determined 110 mg/L threshold. Sp, specificity; PPV, positive predictive value.

REFERENCES

- Bonilla FA, Khan DA, Ballas ZK, Chinen J, Frank MM, Hsu JT, et al. Practice parameter for the diagnosis and management of primary immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* (2015) 136:e1–78. doi:10.1016/j.jaci.2015.04.049
- Orange JS, Ballou M, Stiehm ER, Ballas ZK, Chinen J, De La Morena M, et al. Use and interpretation of diagnostic vaccination in primary immunodeficiency: a working group report of the basic and clinical immunology interest section of the American academy of allergy, asthma & immunology. *J Allergy Clin Immunol* (2012) 130:S1–24. doi:10.1016/j.jaci.2012.07.002
- Wernette CM, Frasch CE, Madore D, Carlone G, Goldblatt D, Plikaytis B, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of human antibodies to pneumococcal polysaccharides. *Clin Vaccine Immunol* (2003) 10:514–9. doi:10.1128/CDLI.10.4.514-519.2003
- Pickering J, Hoopes J, Groll M, Romero H, Wall D, Sant H, et al. 22-plex chemiluminescent microarray for pneumococcal antibodies. *Am J Clin Pathol* (2007) 128:23–31. doi:10.1309/781K5W6QH7JH2TMA
- Goldblatt D, Ashton L, Zhang Y, Antonello J, Marchese RD. Comparison of a new multiplex binding assay versus the enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of serotype-specific pneumococcal capsular polysaccharide IgG. *Clin Vaccine Immunol* (2011) 18:1744–51. doi:10.1128/CDLI.18.11.1744-1751.2011
- Hill HR, Pickering JW. Reference laboratory agreement on multianalyte pneumococcal antibody results: an absolute must! *Clin Vaccine Immunol* (2013) 20:955–6. doi:10.1128/CDLI.20.6.955-960.2013

7. Schaballie H, Bosch B, Schrijvers R, Proesmans M, De Boeck K, Boon MN, et al. Fifth percentile cutoff values for antipneumococcal polysaccharide and anti-*Salmonella typhi* Vi IgG describe a normal polysaccharide response. *Front Immunol* (2017) 8:546. doi:10.3389/fimmu.2017.00546
8. Schauer U, Stemberg F, Rieger CHL, Buttner W, Borte M, Schubert S, et al. Levels of antibodies specific to tetanus toxoid, *Haemophilus influenzae* type B, and pneumococcal capsular polysaccharide in healthy children and adults. *Clin Vaccine Immunol* (2003) 10:202–7. doi:10.1128/CDLI.10.2.202-207.2003
9. Go ES, Ballas ZK. Anti-pneumococcal antibody response in normal subjects: a meta-analysis. *J Allergy Clin Immunol* (1996) 98:205–15. doi:10.1016/S0091-6749(96)70244-0
10. Sorensen RU, Leiva LE, Javier FC III, Sacerdote DM, Bradford N, Butler B, et al. Influence of age on the response to *Streptococcus pneumoniae* vaccine in patients with recurrent infections and normal immunoglobulin concentrations. *J Allergy Clin Immunol* (1998) 102:215–21. doi:10.1016/S0091-6749(98)70089-2
11. Borgers H, Moens L, Picard C, Jeurissen A, Raes M, Sauer K, et al. Laboratory diagnosis of specific antibody deficiency to pneumococcal capsular polysaccharide antigens by multiplexed bead assay. *Clin Immunol* (2010) 134:198–205. doi:10.1016/j.clim.2009.10.006
12. Schütz K, Hughes RG, Parker A, Quinti I, Thon V, Cavaliere M, et al. Kinetics of IgM and IgA antibody response to 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccination in healthy subjects. *J Clin Immunol* (2013) 33:288–96. doi:10.1007/s10875-012-9792-y
13. Rose MA, Buess J, Ventur Y, Zielen S, Herrmann E, Schulze J, et al. Reference ranges and cutoff levels of pneumococcal antibody global serum assays (IgG and IgG2) and specific antibodies in healthy children and adults. *Med Microbiol Immunol* (2013) 202:285–94. doi:10.1007/s00430-013-0292-3
14. Picard C, Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova J-L, Chatila T, Conley ME, et al. Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for primary immunodeficiency 2015. *J Clin Immunol* (2015) 35:696–726. doi:10.1007/s10875-015-0201-1
15. Perez E, Bonilla FA, Orange JS, Ballou M. Specific antibody deficiency: controversies in diagnosis and management. *Front Immunol* (2017) 8:586. doi:10.3389/fimmu.2017.00586
16. Rubins JB, Alter M, Loch J, Janoff EN. Determination of antibody responses of elderly adults to all 23 capsular polysaccharides after pneumococcal vaccination. *Infect Immun* (1999) 67:5979–84.
17. Lopez B, Boucher A, Bahuauud M, Mortuaire G, Melliez H, Launay D, et al. Specific polysaccharide antibody deficiency revealed by severe bacterial infections in adulthood: a report on 11 cases. *Clin Infect Dis* (2017) 65(2):328–31. doi:10.1093/cid/cix284
18. Janssen WJM, Bloem AC, Vellekoop P, Driessen GJ, Boes M, van Montfrans JM. Measurement of pneumococcal polysaccharide vaccine responses for immunodeficiency diagnostics: combined IgG responses compared to serotype specific IgG responses. *J Clin Immunol* (2014) 34:3–6. doi:10.1007/s10875-013-9925-y
19. Pickering JW, Martins TB, Greer RW, Schroder MC, Astill ME, Litwin CM, et al. A multiplexed fluorescent microsphere immunoassay for antibodies to pneumococcal capsular polysaccharides. *Am J Clin Pathol* (2002) 117:589–96. doi:10.1309/LMCH-C4Q2-VFL9-3T1A
20. Borgers H, Jeurissen A, Flamaing J, Peetermans WE, Moens L, Verhaegen J, et al. Elderly subjects do not show impaired pneumococcal capsular polysaccharide serotype-specific antibody responses as assessed by a multiplexed bead assay. *Clin Immunol* (2010) 135:501–2. doi:10.1016/j.clim.2010.01.017
21. Balloch A, Licciardi PV, Tang MLK. Serotype-specific anti-pneumococcal IgG and immune competence: critical differences in interpretation criteria when different methods are used. *J Clin Immunol* (2013) 33:335–41. doi:10.1007/s10875-012-9806-9
22. Zhang X, Simmerman K, Yen-Lieberman B, Daly TM. Impact of analytical variability on clinical interpretation of multiplex pneumococcal serology assays. *Clin Vaccine Immunol* (2013) 20:957–61. doi:10.1128/CDLI.00223-13
23. Daly TM, Pickering JW, Zhang X, Prince HE, Hill HR. Multilaboratory assessment of threshold versus fold-change algorithms for minimizing analytical variability in multiplexed pneumococcal IgG measurements. *Clin Vaccine Immunol* (2014) 21:982–8. doi:10.1128/CDLI.00235-14
24. Daly TM, Hill HR. Use and clinical interpretation of pneumococcal antibody measurements in the evaluation of humoral immune function. *Clin Vaccine Immunol* (2015) 22:148–52. doi:10.1128/CDLI.00735-14
25. Schaballie H, Vermeulen F, Verbinnen B, Frans G, Vermeulen E, Proesmans M, et al. Value of allohemagglutinins in the diagnosis of a polysaccharide antibody deficiency: allohemagglutinins for polysaccharide antibody deficiency diagnosis. *Clin Exp Immunol* (2014) 180(2):271–9. doi:10.1111/cei.12571
26. Sánchez-Ramón S, de Gracia J, García-Alonso A, Rodríguez Molina JJ, Melero J, de Andrés A, et al. Multicenter study for the evaluation of the antibody response against *Salmonella typhi* Vi vaccination (EMPATHY) for the diagnosis of anti-polysaccharide antibody production deficiency in patients with primary immunodeficiency. *Clin Immunol* (2016) 169:80–4. doi:10.1016/j.clim.2016.05.006
27. Concepcion NF, Frasch CE. Pneumococcal type 22F polysaccharide adsorption improves the specificity of a pneumococcal-polysaccharide enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Vaccine Immunol* (2001) 8:266–72. doi:10.1128/CDLI.8.2.266-272.2001
28. Rosenberg E, Dent PB, Denburg JA. Primary immune deficiencies in the adult: a previously underrecognized common condition. *J Allergy Clin Immunol Pract* (2016) 4:1101–7. doi:10.1016/j.jaip.2016.09.004
29. Keswani A, Dunn NM, Manzur A, Kashani S, Bossuyt X, Grammer LC, et al. The clinical significance of specific antibody deficiency (SAD) severity in chronic rhinosinusitis (CRS). *J Allergy Clin Immunol Pract* (2017) 5:1105–11. doi:10.1016/j.jaip.2016.11.033
30. Whaley MJ, Rose C, Martinez J, Laher G, Sammons DL, Smith JP, et al. Interlaboratory comparison of three multiplexed bead-based immunoassays for measuring serum antibodies to pneumococcal polysaccharides. *Clin Vaccine Immunol* (2010) 17:862–9. doi:10.1128/CDLI.00022-10
31. Lal G, Balmer P, Stanford E, Martin S, Warrington R, Borrow R. Development and validation of a nonplex assay for the simultaneous quantitation of antibodies to nine *Streptococcus pneumoniae* serotypes. *J Immunol Methods* (2005) 296:135–47. doi:10.1016/j.jim.2004.11.006
32. Sorensen RU, Harvey T, Lily L. Selective antibody deficiency with normal immunoglobulins. In: Metodieva K, editor. *Immunodeficiency*. New York: InTech (2012).

Conflict of Interest Statement: VaccZyme™ Anti-PCP human IgG ELISA kits were donated by the Binding Site Group Ltd., Birmingham, UK. Binding Site Group Ltd. had no role in experimental design or analysis. BL received travel and accommodation support from the Binding Site Group Ltd. for a congress. There are no other financial or commercial relationships to declare.

Copyright © 2017 Lopez, Bahuauud, Fieschi, Mehlah, Jeljeli, Rogeau, Brabant, Deleplanque, Dubucquoi, Poizot, Terriou, Launay, Batteux, Labalette and Lefèvre. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

BIBLIOGRAPHIE

1. Pasteur, L. Note sur la maladie nouvelle provoquée par la salive d'un enfant mort de la rage. *Bulletin de l'Académie de Médecine (Paris) [series 2]*. 94–103 (1881).
2. Prescott, B. *Microbiologie*. (de Boeck, 2010).
3. Austrian, R. Pneumococcus: the first one hundred years. *Rev. Infect. Dis.* **3**, 183–189 (1981).
4. Kadioglu, A., Weiser, J. N., Paton, J. C. & Andrew, P. W. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 288–301 (2008).
5. Jauneikaite, E. *et al.* Current methods for capsular typing of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Microbiol. Methods* **113**, 41–49 (2015).
6. Sorensen, U. B. ., Blom, J., Birch-Andersen, A. & Henrichsen, J. Ultrastructural localization of capsules, cell wall polysaccharide, cell wall proteins, and F antigen in pneumococci. *Infect. Immun.* **56**, 1890–1896 (1988).
7. Sorensen, U. B. ., Henrichsen, J., Chen, H. C. & Szu, S. C. Covalent linkage between the capsular polysaccharide and the cell wall peptidoglycan of *Streptococcus pneumoniae* revealed by immunochemical methods. *Microb. Pathog.* **8**, 325–334 (1990).
8. Jin, P. *et al.* First Report of Putative *Streptococcus pneumoniae* Serotype 6D among Nasopharyngeal Isolates from Fijian Children. *J. Infect. Dis.* **200**, 1375–1380 (2009).
9. Oliver, M. B., van der Linden, M. P. G., Kuntzel, S. A., Saad, J. S. & Nahm, M. H. Discovery of *Streptococcus pneumoniae* Serotype 6 Variants with Glycosyltransferases Synthesizing Two Differing Repeating Units. *J. Biol. Chem.* **288**, 25976–25985 (2013).
10. Calix, J. J. & Nahm, M. H. A New Pneumococcal Serotype, 11E, Has a Variably Inactivated *wcjE* Gene. *J. Infect. Dis.* **202**, 29–38 (2010).
11. Calix, J. J. *et al.* Biochemical, Genetic, and Serological Characterization of Two Capsule Subtypes among *Streptococcus pneumoniae* Serotype 20 Strains: DISCOVERY OF A NEW PNEUMOCOCCAL SEROTYPE. *J. Biol. Chem.* **287**, 27885–27894 (2012).
12. Austrian, R. Some observations on the pneumococcus and on the current status of pneumococcal disease and its prevention. *Rev. Infect. Dis.* **3 Suppl**, S1-17 (1981).
13. Martin, M. *et al.* An Outbreak of Conjunctivitis Due to Atypical *Streptococcus pneumoniae*. *N. Engl. J. Med.* **348**, 1112–1121 (2003).
14. Crum, N. F., Barrozo, C. P., Chapman, F. A., Ryan, M. A. K. & Russell, K. L. An Outbreak of Conjunctivitis Due to a Novel Unencapsulated *Streptococcus pneumoniae* among Military Trainees. *Clin. Infect. Dis.* **39**, 1148–1154 (2004).
15. Lee, C.-J., Banks, S. D. & Li, J. P. Virulence, Immunity, and Vaccine Related to *Streptococcus pneumoniae*. *Crit. Rev. Microbiol.* **18**, 89–114 (1991).
16. Abeyta, M., Hardy, G. G. & Yother, J. Genetic alteration of capsule type but not PspA type affects accessibility of surface-bound complement and surface antigens of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **71**, 218–225 (2003).
17. Macleod, C. M. & Kraus, M. R. Relation of virulence of pneumococcal strains for mice to the quantity of capsular polysaccharide formed in vitro. *J. Exp. Med.* **92**, 1–9 (1950).

18. Hostetter, M. K. Serotypic variations among virulent pneumococci in deposition and degradation of covalently bound C3b: implications for phagocytosis and antibody production. *J. Infect. Dis.* **153**, 682–693 (1986).
19. Tilley, S. J., Orlova, E. V., Gilbert, R. J. C., Andrew, P. W. & Saibil, H. R. Structural Basis of Pore Formation by the Bacterial Toxin Pneumolysin. *Cell* **121**, 247–256 (2005).
20. Hirst, R. A., Kadioglu, A., O’Callaghan, C. & Andrew, P. W. The role of pneumolysin in pneumococcal pneumonia and meningitis. *Clin. Exp. Immunol.* **138**, 195–201 (2004).
21. Kadioglu, A., Coward, W., Colston, M. J., Hewitt, C. R. A. & Andrew, P. W. CD4-T-lymphocyte interactions with pneumolysin and pneumococci suggest a crucial protective role in the host response to pneumococcal infection. *Infect. Immun.* **72**, 2689–2697 (2004).
22. Mitchell, T. J., Andrew, P. W., Saunders, F. K., Smith, A. N. & Boulnois, G. J. Complement activation and antibody binding by pneumolysin via a region of the toxin homologous to a human acute-phase protein. *Mol. Microbiol.* **5**, 1883–1888 (1991).
23. Bentley, S. D. *et al.* Genetic Analysis of the Capsular Biosynthetic Locus from All 90 Pneumococcal Serotypes. *PLoS Genet.* **2**, e31 (2006).
24. Bergmann, S. & Hammerschmidt, S. Versatility of pneumococcal surface proteins. *Microbiol. Read. Engl.* **152**, 295–303 (2006).
25. Overweg, K. *et al.* The putative proteinase maturation protein A of *Streptococcus pneumoniae* is a conserved surface protein with potential to elicit protective immune responses. *Infect. Immun.* **68**, 4180–4188 (2000).
26. Manco, S. *et al.* Pneumococcal Neuraminidases A and B Both Have Essential Roles during Infection of the Respiratory Tract and Sepsis. *Infect. Immun.* **74**, 4014–4020 (2006).
27. Varon, E. & Janoir, C. Rapport d’activité 2016 - Epidémiologie 2015. (2016).
28. Gray, B. M. & Dillon, H. C. Epidemiological studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants: antibody to types 3, 6, 14, and 23 in the first two years of life. *J. Infect. Dis.* **158**, 948–955 (1988).
29. Chavanet, P. *et al.* Portage nasopharyngé, sensibilités et sérotypes de *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae* chez les enfants de crèches. *Médecine Mal. Infect.* **41**, 307–317 (2011).
30. Brundage, J. F. Interactions between influenza and bacterial respiratory pathogens: implications for pandemic preparedness. *Lancet Infect. Dis.* **6**, 303–312 (2006).
31. Bogaert, D. *et al.* Pneumococcal carriage in children in The Netherlands: a molecular epidemiological study. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 3316–3320 (2001).
32. Mook-Kanamori, B. B., Geldhoff, M., van der Poll, T. & van de Beek, D. Pathogenesis and Pathophysiology of Pneumococcal Meningitis. *Clin. Microbiol. Rev.* **24**, 557–591 (2011).
33. Dunais, B., Laurans, C., Bruno, P., Carsenti-Dellamonica, H. & Roussel-Delvallez, M. Portage de pneumocoques dans les établissements d’accueil du jeune enfant des Alpes-Maritimes et du Nord : 1999 - 2006. *Médecine Mal. Infect.* **38**, S30–S34 (2008).
34. Nelson, A. L. *et al.* Capsule enhances pneumococcal colonization by limiting mucus-mediated clearance. *Infect. Immun.* **75**, 83–90 (2007).
35. Burnaugh, A. M., Frantz, L. J. & King, S. J. Growth of *Streptococcus pneumoniae* on Human Glycoconjugates Is Dependent upon the Sequential Activity of Bacterial Exoglycosidases. *J. Bacteriol.* **190**, 221–230 (2008).
36. King, S. J., Hippe, K. R. & Weiser, J. N. Deglycosylation of human glycoconjugates by the sequential activities of exoglycosidases expressed by *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **59**, 961–974 (2006).
37. Davis, K. M., Akinbi, H. T., Standish, A. J. & Weiser, J. N. Resistance to Mucosal Lysozyme Compensates for the Fitness Deficit of Peptidoglycan Modifications by *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS Pathog.* **4**, e1000241 (2008).

38. Crisostomo, M. I. *et al.* Attenuation of penicillin resistance in a peptidoglycan O-acetyl transferase mutant of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **61**, 1497–1509 (2006).
39. Vollmer, W. & Tomasz, A. Peptidoglycan N-acetylglucosamine deacetylase, a putative virulence factor in *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **70**, 7176–7178 (2002).
40. Shaper, M., Hollingshead, S. K., Benjamin, W. H. & Briles, D. E. PspA Protects *Streptococcus pneumoniae* from Killing by Apolactoferrin, and Antibody to PspA Enhances Killing of Pneumococci by Apolactoferrin. *Infect. Immun.* **72**, 5031–5040 (2004).
41. Bogaert, D., Thompson, C. M., Trzcinski, K., Malley, R. & Lipsitch, M. The role of complement in innate and adaptive immunity to pneumococcal colonization and sepsis in a murine model. *Vaccine* **28**, 681–685 (2010).
42. Picard, C., Puel, A., Bustamante, J., Ku, C.-L. & Casanova, J.-L. Primary immunodeficiencies associated with pneumococcal disease. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **3**, 451–459 (2003).
43. Kaetzel, C. S. Polymeric Ig receptor: defender of the fort or Trojan horse? *Curr. Biol. CB* **11**, R35-38 (2001).
44. Kurono, Y., Shigemi, H., Shimamura, K. & Mogi, G. Inhibition of Bacterial Adherence by Nasopharyngeal Secretions. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* **100**, 455–458 (1991).
45. Janoff, E. N. *et al.* Killing of *Streptococcus pneumoniae* by capsular polysaccharide-specific polymeric IgA, complement, and phagocytes. *J. Clin. Invest.* **104**, 1139–1147 (1999).
46. Fasching, C. E. *et al.* Impact of the Molecular Form of Immunoglobulin A on Functional Activity in Defense against *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **75**, 1801–1810 (2007).
47. Weiser, J. N. *et al.* Antibody-enhanced pneumococcal adherence requires IgA1 protease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 4215–4220 (2003).
48. Raphael, G. D. *et al.* Pathophysiology of rhinitis. Lactoferrin and lysozyme in nasal secretions. *J. Clin. Invest.* **84**, 1528–1535 (1989).
49. Senkovich, O. *et al.* Structure of a Complex of Human Lactoferrin N-lobe with Pneumococcal Surface Protein A Provides Insight into Microbial Defense Mechanism. *J. Mol. Biol.* **370**, 701–713 (2007).
50. Esposito, A. L., Clark, C. A. & Poirier, W. J. An assessment of the factors contributing to the killing of type 3 *Streptococcus pneumoniae* by human polymorphonuclear leukocytes in vitro. *APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* **98**, 111–121 (1990).
51. Janeway. Immunobiology: the immune system in health and disease., in (Garland).
52. Picard, C. *et al.* Clinical Features and Outcome of Patients With IRAK-4 and MyD88 Deficiency: *Medicine (Baltimore)* **89**, 403–425 (2010).
53. Tuomanen, E., Hengstler, B., Zak, O. & Tomasz, A. The role of complement in inflammation during experimental pneumococcal meningitis. *Microb. Pathog.* **1**, 15–32 (1986).
54. Polfliet, M. M. *et al.* Meningeal and perivascular macrophages of the central nervous system play a protective role during bacterial meningitis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **167**, 4644–4650 (2001).
55. Jarva, H., Jokiranta, T. S., Würzner, R. & Meri, S. Complement resistance mechanisms of streptococci. *Mol. Immunol.* **40**, 95–107 (2003).
56. Li, J., Glover, D. T., Szalai, A. J., Hollingshead, S. K. & Briles, D. E. PspA and PspC Minimize Immune Adherence and Transfer of Pneumococci from Erythrocytes to Macrophages through Their Effects on Complement Activation. *Infect. Immun.* **75**, 5877–5885 (2007).

57. Neeleman, C. *et al.* Resistance to both complement activation and phagocytosis in type 3 pneumococci is mediated by the binding of complement regulatory protein factor H. *Infect. Immun.* **67**, 4517–4524 (1999).
58. Hament, J.-M. *et al.* Pneumococcal immune adherence to human erythrocytes. *Eur. J. Clin. Invest.* **33**, 169–175 (2003).
59. Alcantara, R. B., Preheim, L. C. & Gentry-Nielsen, M. J. Pneumolysin-Induced Complement Depletion during Experimental Pneumococcal Bacteremia. *Infect. Immun.* **69**, 3569–3575 (2001).
60. Aas, J. A., Paster, B. J., Stokes, L. N., Olsen, I. & Dewhirst, F. E. Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 5721–5732 (2005).
61. Brugger, S. D., Hathaway, L. J. & Muhlemann, K. Detection of Streptococcus pneumoniae Strain Cocolonization in the Nasopharynx. *J. Clin. Microbiol.* **47**, 1750–1756 (2009).
62. Park, B., Nizet, V. & Liu, G. Y. Role of Staphylococcus aureus Catalase in Niche Competition against Streptococcus pneumoniae. *J. Bacteriol.* **190**, 2275–2278 (2008).
63. Dawid, S., Roche, A. M. & Weiser, J. N. The blp Bacteriocins of Streptococcus pneumoniae Mediate Intraspecies Competition both In Vitro and In Vivo. *Infect. Immun.* **75**, 443–451 (2007).
64. McCullers, J. A. Insights into the Interaction between Influenza Virus and Pneumococcus. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**, 571–582 (2006).
65. Morens, D. M., Taubenberger, J. K. & Fauci, A. S. Predominant Role of Bacterial Pneumonia as a Cause of Death in Pandemic Influenza: Implications for Pandemic Influenza Preparedness. *J. Infect. Dis.* **198**, 962–970 (2008).
66. Chien, Y.-W., Klugman, K. P. & Morens, D. M. Bacterial Pathogens and Death during the 1918 Influenza Pandemic. *N. Engl. J. Med.* **361**, 2582–2583 (2009).
67. Geddes, A. M. Influenza and bacterial pneumonia. *Int. J. Antimicrob. Agents* **34**, 293–294 (2009).
68. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Bacterial coinfections in lung tissue specimens from fatal cases of 2009 pandemic influenza A (H1N1) - United States, May-August 2009. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **58**, 1071–1074 (2009).
69. Regev-Yochay, G. Association Between Carriage of Streptococcus pneumoniae and Staphylococcus aureus in Children. *JAMA* **292**, 716 (2004).
70. Bogaert, D. *et al.* Colonisation by Streptococcus pneumoniae and Staphylococcus aureus in healthy children. *The Lancet* **363**, 1871–1872 (2004).
71. Lysenko, E. S., Ratner, A. J., Nelson, A. L. & Weiser, J. N. The Role of Innate Immune Responses in the Outcome of Interspecies Competition for Colonization of Mucosal Surfaces. *PLoS Pathog.* **1**, e1 (2005).
72. Lux, T., Nuhn, M., Hakenbeck, R. & Reichmann, P. Diversity of Bacteriocins and Activity Spectrum in Streptococcus pneumoniae. *J. Bacteriol.* **189**, 7741–7751 (2007).
73. Preston, J. A. & Dockrell, D. H. Virulence factors in pneumococcal respiratory pathogenesis. *Future Microbiol.* **3**, 205–221 (2008).
74. Li-Korotky, H.-S. *et al.* Interaction of pneumococcal phase variation and middle ear pressure/gas composition: An in vitro model of simulated otitis media. *Microb. Pathog.* **45**, 201–206 (2008).
75. Cundell, D. R., Weiser, J. N., Shen, J., Young, A. & Tuomanen, E. I. Relationship between colonial morphology and adherence of Streptococcus pneumoniae. *Infect. Immun.* **63**, 757–761 (1995).
76. Weiser, J. N., Austrian, R., Sreenivasan, P. K. & Masure, H. R. Phase variation in pneumococcal opacity: relationship between colonial morphology and nasopharyngeal colonization. *Infect. Immun.* **62**, 2582–2589 (1994).

77. Kim, J. O. *et al.* Relationship between cell surface carbohydrates and intrastrain variation on opsonophagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **67**, 2327–2333 (1999).
78. Hyams, C. *et al.* *Streptococcus pneumoniae* resistance to complement-mediated immunity is dependent on the capsular serotype. *Infect. Immun.* **78**, 716–725 (2010).
79. Cundell, D. R., Pearce, B. J., Sandros, J., Naughton, A. M. & Masure, H. R. Peptide permeases from *Streptococcus pneumoniae* affect adherence to eucaryotic cells. *Infect. Immun.* **63**, 2493–2498 (1995).
80. Wizemann, T. M. *et al.* Peptide methionine sulfoxide reductase contributes to the maintenance of adhesins in three major pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 7985–7990 (1996).
81. Cundell, D. R., Gerard, N. P., Gerard, C., Idanpaan-Heikkila, I. & Tuomanen, E. I. *Streptococcus pneumoniae* anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. *Nature* **377**, 435–438 (1995).
82. Zhang, J. R. *et al.* The polymeric immunoglobulin receptor translocates pneumococci across human nasopharyngeal epithelial cells. *Cell* **102**, 827–837 (2000).
83. Janoir, C. & Varon, E. Infections à pneumocoques. *EMC - Mal. Infect.* **11**, 1–17 [Article 8–012–A–10]. (2014).
84. Henriques-Normark, B. & Tuomanen, E. I. The Pneumococcus: Epidemiology, Microbiology, and Pathogenesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **3**, a010215–a010215 (2013).
85. Réseau ATB-Raisins. Rapport de l'enquête sur la surveillance de la consommation d'antibiotiques. résultats 2015. (2017).
86. Cooper, N. R. & Nemerow, G. R. The role of antibody and complement in the control of viral infections. *J. Invest. Dermatol.* **83**, 121s–127s (1984).
87. Murphy, K. & weaver, C. *Janeway's Immunobiology, 9th edition.* (Garland Science, 2016).
88. Martin, F. & Kearney, J. F. B1 cells: similarities and differences with other B cell subsets. *Curr. Opin. Immunol.* **13**, 195–201 (2001).
89. Alugupalli, K. R. A distinct role for B1b lymphocytes in T cell-independent immunity. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **319**, 105–130 (2008).
90. Geginat, J. *et al.* Plasticity of Human CD4 T Cell Subsets. *Front. Immunol.* **5**, (2014).
91. Lin, Y., Slight, S. R. & Khader, S. A. Th17 cytokines and vaccine-induced immunity. *Semin. Immunopathol.* **32**, 79–90 (2010).
92. Kumar, P., Chen, K. & Kolls, J. K. Th17 cell based vaccines in mucosal immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **25**, 373–380 (2013).
93. Crotty, S. A brief history of T cell help to B cells. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 185–189 (2015).
94. Bentebibel, S.-E. *et al.* Induction of ICOS+CXCR3+CXCR5+ TH Cells Correlates with Antibody Responses to Influenza Vaccination. *Sci. Transl. Med.* **5**, 176ra32-176ra32 (2013).
95. Tarlinton, D. & Good-Jacobson, K. Diversity Among Memory B Cells: Origin, Consequences, and Utility. *Science* **341**, 1205–1211 (2013).
96. Goodnow, C. C., Vinuesa, C. G., Randall, K. L., Mackay, F. & Brink, R. Control systems and decision making for antibody production. *Nat. Immunol.* **11**, 681–688 (2010).
97. Reif, K. *et al.* Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position. *Nature* **416**, 94–99 (2002).
98. MacLennan, I. C. M. *et al.* Extrafollicular antibody responses. *Immunol. Rev.* **194**, 8–18 (2003).

99. De Silva, N. S. & Klein, U. Dynamics of B cells in germinal centres. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 137–148 (2015).
100. Linterman, M. A. & Vinuesa, C. G. T Follicular Helper Cells During Immunity and Tolerance. in *Progress in Molecular Biology and Translational Science* **92**, 207–248 (Elsevier, 2010).
101. Crotty, S. Follicular Helper CD4 T Cells (T(FH)). *Annu. Rev. Immunol.* **29**, 621–663 (2011).
102. Kurosaki, T., Kometani, K. & Ise, W. Memory B cells. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 149–159 (2015).
103. Good-Jacobson, K. L. & Shlomchik, M. J. Plasticity and Heterogeneity in the Generation of Memory B Cells and Long-Lived Plasma Cells: The Influence of Germinal Center Interactions and Dynamics. *J. Immunol.* **185**, 3117–3125 (2010).
104. Hao, Z. & Rajewsky, K. Homeostasis of peripheral B cells in the absence of B cell influx from the bone marrow. *J. Exp. Med.* **194**, 1151–1164 (2001).
105. Carvalho, T. L., Mota-Santos, T., Cumano, A., Demengeot, J. & Vieira, P. Arrested B lymphopoiesis and persistence of activated B cells in adult interleukin 7(-/-) mice. *J. Exp. Med.* **194**, 1141–1150 (2001).
106. Plotkin, S., Orenstein, W. & Offit, P. *Vaccines*. (Elsevier, 2008).
107. Merluzzi, S. *et al.* Mast cells enhance proliferation of B lymphocytes and drive their differentiation toward IgA-secreting plasma cells. *Blood* **115**, 2810–2817 (2010).
108. Chen, K. *et al.* Immunoglobulin D enhances immune surveillance by activating antimicrobial, proinflammatory and B cell-stimulating programs in basophils. *Nat. Immunol.* **10**, 889–898 (2009).
109. Gauchat, J.-F. *et al.* Induction of human IgE synthesis in B cells by mast cells and basophils. *Nature* **365**, 340–343 (1993).
110. Siegrist, C.-A. & Aspinall, R. B-cell responses to vaccination at the extremes of age. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 185 (2009).
111. van Deursen, A. M. M. *et al.* The impact of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine on pneumococcal carriage in the Community Acquired Pneumonia Immunization Trial in Adults (CAPiTA) Study. *Clin. Infect. Dis.* (2018). doi:10.1093/cid/ciy009
112. Haut Conseil de la Santé Publique. HCSP. Avis relatif à la vaccination contre le pneumocoque par le vaccin Pneumo 23® chez l'adulte et l'enfant âgé de 5 ans et plus infectés par le VIH. (2009).
113. Haut Conseil de la Santé Publique. HCSP. Avis relatif au schéma vaccinal de la vaccination par le vaccin anti-pneumococcique conjugué heptavalent. (2008).
114. Haut Conseil de la Santé Publique. HCSP. Avis relatif à la vaccination par le vaccin pneumococcique conjugué 13-valent. (2009).
115. Haut Conseil de la Santé Publique. HCSP. Avis relatif aux recommandations de la vaccination pour les adultes et les enfants âgés de plus de 2 ans à risque d'infection invasive à pneumocoque. (2013).
116. Haut Conseil de la Santé Publique. HCSP. Avis relatif aux recommandations vaccinales contre les infections à pneumocoque pour les adultes. (2017).
117. Barrett, C. D. *et al.* Multiple antigen for immunization against poliomyelitis, diphtheria, pertussis, and tetanus. II. Response of infants and young children to primary immunization and eighteen-month booster. *Am. J. Public Health Nations Health* **49**, 644–655 (1959).
118. Halasa, N. B., O'Shea, A., Shi, J. R., LaFleur, B. J. & Edwards, K. M. Poor Immune Responses to a Birth Dose of Diphtheria, Tetanus, and Acellular Pertussis Vaccine. *J. Pediatr.* **153**, 327–332.e1 (2008).

119. Provenzano, R. W., Wetterlow, L. H. & Sullivan, C. L. Immunization and Antibody Response in the Newborn Infant: Pertussis Inoculation within Twenty-Four Hours of Birth. *N. Engl. J. Med.* **273**, 959–965 (1965).
120. Felton, L. D., Kauffmann, G., Prescott, B. & Ottinger, B. Studies on the mechanism of the immunological paralysis induced in mice by pneumococcal polysaccharides. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **74**, 17–26 (1955).
121. Käyhty, H., Karanko, V., Peltola, H. & Mäkelä, P. H. Serum antibodies after vaccination with Haemophilus influenzae type b capsular polysaccharide and responses to reimmunization: no evidence of immunologic tolerance or memory. *Pediatrics* **74**, 857–865 (1984).
122. Granoff, D. M., Chacko, A., Lottenbach, K. R. & Sheetz, K. E. Immunogenicity of Haemophilus influenzae type b polysaccharide-outer membrane protein conjugate vaccine in patients who acquired Haemophilus disease despite previous vaccination with type b polysaccharide vaccine. *J. Pediatr.* **114**, 925–933 (1989).
123. Holmes, S. J. & Granoff, D. M. The biology of Haemophilus influenzae type b vaccination failure. *J. Infect. Dis.* **165 Suppl 1**, S121–128 (1992).
124. Granoff, D. M., Gupta, R. K., Belshe, R. B. & Anderson, E. L. Induction of immunologic refractoriness in adults by meningococcal C polysaccharide vaccination. *J. Infect. Dis.* **178**, 870–874 (1998).
125. Jokhdar, H. *et al.* Immunologic hyporesponsiveness to serogroup C but not serogroup A following repeated meningococcal A/C polysaccharide vaccination in Saudi Arabia. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **11**, 83–88 (2004).
126. MacDonald, N. E. *et al.* Induction of immunologic memory by conjugated vs plain meningococcal C polysaccharide vaccine in toddlers: a randomized controlled trial. *JAMA* **280**, 1685–1689 (1998).
127. Leach, A. *et al.* Induction of immunologic memory in Gambian children by vaccination in infancy with a group A plus group C meningococcal polysaccharide-protein conjugate vaccine. *J. Infect. Dis.* **175**, 200–204 (1997).
128. MacLennan, J. *et al.* Immunologic Memory 5 Years after Meningococcal A/C Conjugate Vaccination in Infancy. *J. Infect. Dis.* **183**, 97–104 (2001).
129. Borrow, R. *et al.* Comparison of antibody kinetics following meningococcal serogroup C conjugate vaccine between healthy adults previously vaccinated with meningococcal A/C polysaccharide vaccine and vaccine-naïve controls. *Vaccine* **19**, 3043–3050 (2001).
130. Vu, D. M. *et al.* Priming for Immunologic Memory in Adults by Meningococcal Group C Conjugate Vaccination. *Clin. Vaccine Immunol.* **13**, 605–610 (2006).
131. Keyserling, H. *et al.* Safety, Immunogenicity, and Immune Memory of a Novel Meningococcal (Groups A, C, Y, and W-135) Polysaccharide Diphtheria Toxoid Conjugate Vaccine (MCV-4) in Healthy Adolescents. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* **159**, 907 (2005).
132. MacDonald, N. E., Halperin, S. A., Law, B. J., Danzig, L. E. & Granoff, D. M. Can meningococcal C conjugate vaccine overcome immune hyporesponsiveness induced by previous administration of plain polysaccharide vaccine? *JAMA* **283**, 1826–1827 (2000).
133. Al-Mazrou, Y. *et al.* Serologic Responses to ACYW135 Polysaccharide Meningococcal Vaccine in Saudi Children under 5 Years of Age. *Infect. Immun.* **73**, 2932–2939 (2005).
134. Käyhty, H., Karanko, V., Peltola, H., Sarna, S. & Mäkelä, P. H. Serum antibodies to capsular polysaccharide vaccine of group A Neisseria meningitidis followed for three years in infants and children. *J. Infect. Dis.* **142**, 861–868 (1980).
135. Borrow, R. *et al.* Reduced antibody response to revaccination with meningococcal serogroup A polysaccharide vaccine in adults. *Vaccine* **19**, 1129–1132 (2000).

136. Russell, F. M. *et al.* Hyporesponsiveness to re-challenge dose following pneumococcal polysaccharide vaccine at 12 months of age, a randomized controlled trial. *Vaccine* **28**, 3341–3349 (2010).
137. Sigurdardottir, S. T. *et al.* Decreased immune response to pneumococcal conjugate vaccine after 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine in children. *Vaccine* **32**, 417–424 (2014).
138. Clutterbuck, E. A. *et al.* Pneumococcal Conjugate and Plain Polysaccharide Vaccines Have Divergent Effects on Antigen-Specific B Cells. *J. Infect. Dis.* **205**, 1408–1416 (2012).
139. Musher, D. M., Rueda, A. M., Nahm, M. H., Graviss, E. A. & Rodriguez-Barradas, M. C. Initial and Subsequent Response to Pneumococcal Polysaccharide and Protein-Conjugate Vaccines Administered Sequentially to Adults Who Have Recovered from Pneumococcal Pneumonia. *J. Infect. Dis.* **198**, 1019–1027 (2008).
140. de Roux, A. *et al.* Comparison of Pneumococcal Conjugate Polysaccharide and Free Polysaccharide Vaccines in Elderly Adults: Conjugate Vaccine Elicits Improved Antibacterial Immune Responses and Immunological Memory. *Clin. Infect. Dis.* **46**, 1015–1023 (2008).
141. Orthopoulos, G. V., Theodoridou, M. C., Ladis, V. A., Tsousis, D. K. & Spoulou, V. I. The effect of 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine on immunological priming induced by 7-valent conjugate vaccine in asplenic subjects with β -thalassemia. *Vaccine* **27**, 350–354 (2009).
142. Dransfield, M. T. *et al.* Superior Immune Response to Protein-Conjugate versus Free Pneumococcal Polysaccharide Vaccine in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **180**, 499–505 (2009).
143. Papadatou, I. *et al.* Antigen-Specific B-Cell Response to 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine in Asplenic Individuals With β -Thalassemia Previously Immunized With 23-Valent Pneumococcal Polysaccharide Vaccine. *Clin. Infect. Dis.* **59**, 862–865 (2014).
144. Lazarus, R. *et al.* A Randomized Study Comparing Combined Pneumococcal Conjugate and Polysaccharide Vaccination Schedules in Adults. *Clin. Infect. Dis.* **52**, 736–742 (2011).
145. Papadatou, I. & Spoulou, V. Pneumococcal Vaccination in High-Risk Individuals: Are We Doing It Right? *Clin. Vaccine Immunol.* **23**, 388–395 (2016).
146. Borrow, R. *et al.* Serotype-Specific Immune Unresponsiveness to Pneumococcal Conjugate Vaccine following Invasive Pneumococcal Disease. *Infect. Immun.* **76**, 5305–5309 (2008).
147. Dagan, R., Givon-Lavi, N., Greenberg, D., Fritzell, B. & Siegrist, C. Nasopharyngeal Carriage of *Streptococcus pneumoniae* Shortly before Vaccination with a Pneumococcal Conjugate Vaccine Causes Serotype-Specific Hyporesponsiveness in Early Infancy. *J. Infect. Dis.* **201**, 1570–1579 (2010).
148. Bjarnarson, S. P., Benonisson, H., Del Giudice, G. & Jonsdottir, I. Pneumococcal Polysaccharide Abrogates Conjugate-Induced Germinal Center Reaction and Depletes Antibody Secreting Cell Pool, Causing Hyporesponsiveness. *PLoS ONE* **8**, e72588 (2013).
149. Kanswal, S. *et al.* Suppressive Effect of Bacterial Polysaccharides on BAFF System Is Responsible for Their Poor Immunogenicity. *J. Immunol.* **186**, 2430–2443 (2011).
150. Brynjolfsson, S. F. *et al.* Hyporesponsiveness Following Booster Immunization With Bacterial Polysaccharides Is Caused by Apoptosis of Memory B Cells. *J. Infect. Dis.* **205**, 422–430 (2012).
151. Richmond, P. *et al.* Meningococcal C Polysaccharide Vaccine Induces Immunologic Hyporesponsiveness in Adults That Is Overcome by Meningococcal C Conjugate Vaccine. *J. Infect. Dis.* **181**, 761–764 (2000).
152. Sakai, J. & Akkoyunlu, M. The Role of BAFF System Molecules in Host Response to Pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.* **30**, 991–1014 (2017).

153. Ng, L. G. *et al.* BAFF costimulation of Toll-like receptor-activated B-1 cells. *Eur. J. Immunol.* **36**, 1837–1846 (2006).
154. Elgueta, R., De Vries, V. C. & Noelle, R. J. The immortality of humoral immunity: Long-lived humoral immunity. *Immunol. Rev.* **236**, 139–150 (2010).
155. Khan, W. N. B Cell Receptor and BAFF Receptor Signaling Regulation of B Cell Homeostasis. *J. Immunol.* **183**, 3561–3567 (2009).
156. Mackay, F. & Schneider, P. Cracking the BAFF code. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 491–502 (2009).
157. Dickinson, G. S., Akkoyunlu, M., Bram, R. J. & Alugupalli, K. R. BAFF receptor and TACI in B-1b cell maintenance and antibacterial responses: BAFFR and TACI in B-1b cell function. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1362**, 57–67 (2015).
158. Sasaki, Y., Casola, S., Kutok, J. L., Rajewsky, K. & Schmidt-Supprian, M. TNF family member B cell-activating factor (BAFF) receptor-dependent and -independent roles for BAFF in B cell physiology. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **173**, 2245–2252 (2004).
159. Shulga-Morskaya, S. *et al.* B cell-activating factor belonging to the TNF family acts through separate receptors to support B cell survival and T cell-independent antibody formation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **173**, 2331–2341 (2004).
160. Haas, K. M., Poe, J. C., Steeber, D. A. & Tedder, T. F. B-1a and B-1b Cells Exhibit Distinct Developmental Requirements and Have Unique Functional Roles in Innate and Adaptive Immunity to *S. pneumoniae*. *Immunity* **23**, 7–18 (2005).
161. Foote, J. B. & Kearney, J. F. Generation of B Cell Memory to the Bacterial Polysaccharide -1,3 Dextran. *J. Immunol.* **183**, 6359–6368 (2009).
162. Musher, D. M., Sampath, R. & Rodriguez-Barradas, M. C. The Potential Role for Protein-Conjugate Pneumococcal Vaccine in Adults: What Is the Supporting Evidence? *Clin. Infect. Dis.* **52**, 633–640 (2011).
163. Gold, R., Lepow, M. L., Goldschneider, I., Draper, T. L. & Gotschlich, E. C. Clinical evaluation of group A and group C meningococcal polysaccharide vaccines in infants. *J. Clin. Invest.* **56**, 1536–1547 (1975).
164. Hinge, M., Ingels, H. A. S., Slotved, H.-C. & Mølle, I. Serologic response to a 23-valent pneumococcal vaccine administered prior to autologous stem cell transplantation in patients with multiple myeloma. *APMIS* **120**, 935–940 (2012).
165. Robertson, J. D. *et al.* Immunogenicity of vaccination against influenza, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* type B in patients with multiple myeloma. *Br. J. Cancer* **82**, 1261–1265 (2000).
166. Schmid, G. P., Smith, R. P., Baltch, A. L., Hall, C. A. & Schiffman, G. Antibody response to pneumococcal vaccine in patients with multiple myeloma. *J. Infect. Dis.* **143**, 590–597 (1981).
167. Sinisalo, M. *et al.* Antibody response to 7-valent conjugated pneumococcal vaccine in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Vaccine* **26**, 82–87 (2007).
168. Bonten, M. J. M. *et al.* Polysaccharide Conjugate Vaccine against Pneumococcal Pneumonia in Adults. *N. Engl. J. Med.* **372**, 1114–1125 (2015).
169. van Deursen, A. M. M. *et al.* Immunogenicity of the 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine in Older Adults With and Without Comorbidities in the Community-Acquired Pneumonia Immunization Trial in Adults (CAPiTA). *Clin. Infect. Dis.* **65**, 787–795 (2017).
170. Lode, H. *et al.* Dose-ranging study of a single injection of pneumococcal conjugate vaccine (1×, 2×, or 4×) in healthy subjects aged 70 years or older. *Vaccine* **29**, 4940–4946 (2011).

171. Chan, C. Y. *et al.* Pneumococcal conjugate vaccine primes for antibody responses to polysaccharide pneumococcal vaccine after treatment of Hodgkin's disease. *J. Infect. Dis.* **173**, 256–258 (1996).
172. Sadlier, C. *et al.* Immunological efficacy of pneumococcal vaccine strategies in HIV-infected adults: a randomized clinical trial. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
173. Lesprit, P. *et al.* Immunological efficacy of a prime-boost pneumococcal vaccination in HIV-infected adults: *AIDS* **21**, 2425–2434 (2007).
174. Peñaranda, M., Payeras, A., Cambra, A., Mila, J. & Riera, M. Conjugate and polysaccharide pneumococcal vaccines do not improve initial response of the polysaccharide vaccine in HIV-infected adults: *AIDS* **24**, 1226–1228 (2010).
175. Ridda, I. *et al.* Immunological responses to pneumococcal vaccine in frail older people. *Vaccine* **27**, 1628–1636 (2009).
176. Goldblatt, D. *et al.* The Immunogenicity of 7-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine versus 23-Valent Polysaccharide Vaccine in Adults Aged 50–80 Years. *Clin. Infect. Dis.* **49**, 1318–1325 (2009).
177. Poolman, J. & Borrow, R. Hyporesponsiveness and its clinical implications after vaccination with polysaccharide or glycoconjugate vaccines. *Expert Rev. Vaccines* **10**, 307–322 (2011).
178. Jackson, L. A. *et al.* Immunogenicity of varying dosages of 7-valent pneumococcal polysaccharide–protein conjugate vaccine in seniors previously vaccinated with 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine. *Vaccine* **25**, 4029–4037 (2007).
179. Jackson, L. A. *et al.* Influence of initial vaccination with 13-valent pneumococcal conjugate vaccine or 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine on anti-pneumococcal responses following subsequent pneumococcal vaccination in adults 50 years and older. *Vaccine* **31**, 3594–3602 (2013).
180. Greenberg, R. N. *et al.* Sequential administration of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine and 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine in pneumococcal vaccine-naïve adults 60–64 years of age. *Vaccine* **32**, 2364–2374 (2014).
181. Miernyk, K. M. *et al.* Immunogenicity and Reactogenicity of Pneumococcal Polysaccharide and Conjugate Vaccines in Alaska Native Adults 55–70 Years of Age. *Clin. Infect. Dis.* **49**, 241–248 (2009).