

**UNIVERSITE DE LIMOGES
FACULTE DE PHARMACIE**



ANNEE 2003

THESE N° 315/1

**LA DENGUE AURA-T-ELLE BIENTOT SON
VACCIN ?
Enjeux et difficultés de la recherche face à une
maladie émergente.**

**THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

Présentée et soutenue publiquement le : 12 mai 2003

PAR

**Vincent MOURIER
Né le 28 avril 1978 à Limoges (Haute-Vienne)**

EXAMINATEURS DE LA THESE

Madame BOSGIRAUD C., Professeur.....Président
Madame DELEBASSEE S., Maître de conférences.....Juge
Madame ROGEZ S., Pharmacien Biologiste, Praticien hospitalier.....Juge

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

DOYEN DE LA FACULTE

Monsieur le Professeur **HABRIOUX** Gérard

ASSESEURS

Madame le Professeur **CHULIA** Dominique

Monsieur **COMBY** Francis, Maître de Conférences

PROFESSEURS

BENEYTOUX Jean-Louis

BIOCHIMIE- BIOLOGIE MOLECULAIRE

BOSGIRAUD Claudine

BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE-PARASITOLOGIE

BOTINEAU Michel

BOTANIQUE- CRYPTOLOGAMIE

BROSSARD Claude

PHARMACIE GALENIQUE

BUXERAUD Jacques

CHIMIE ORGANIQUE- CHIMIE THERAPEUTIQUE

CARDOT Philippe

CHIMIE ANALYTIQUE

CHULIA Albert

PHARMACOGNOSIE

CHULIA Dominique

PHARMACIE GALENIQUE

DELAGE Christiane

CHIMIE GENERALE- CHIMIE MINERALE

DREYFUSS Gilles

PARASITOLOGIE

DUROUX Jean-Luc

PHYSIQUE- BIOPHYSIQUE

GHESTEM Axel

BOTANIQUE- CRYPTOLOGAMIE

HABRIOUX Gérard

BIOCHIMIE FONDAMENTALE

LACHATRE Gérard

TOXICOLOGIE

MOESCH Christian

HYGIENE- HYDROLOGIE- ENVIRONNEMENT

LOUDART Nicole

PHARMACODYNAMIE

**SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE- CHEF DES SERVICES
ADMINISTRATIFS**

Madame ROCHE Doriane

MAITRES DE CONFERENCE

ALLAIS Daovy	PHARMACOGNOSIE
BASLY Jean-Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE
BATTU Serge	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
CALLISTE Claude	BIOPHYSIQUE
CARDI Patrice	PHYSIOLOGIE
CLEDAT Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE
COMBY Francis	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DELEBASSEE Sylvie	BACTERIOLOGIE- VIROLOGIE
DREYFUSS Marie-Françoise	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
EA KIM Leng	PHARMACODYNAMIE
FAGNERE Catherine	CHIMIE ORGANIQUE
FROISSARD Didier	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
FOURNIER Françoise	BIOCHIMIE
JAMBUT Anne Catherine	CHIMIE THERAPEUTIQUE
LAGORCE Jean-François	CHIMIE ORGANIQUE
LARTIGUE Martine	PHARMACODYNAMIE
LIAGRE Bertrand	SCIENCES BIOLOGIQUES
LOTFI Hayat	TOXICOLOGIE
MOREAU Jeanne	IMMUNOLOGIE
PARTOUCHE Christian	PHYSIOLOGIE
ROUSSEAU Annick	BIOMATHEMATIQUE
SIMON Alain	CHIMIE PHYSIQUE ET CHIMIE MINERALE
TROUILLAS Patrick	BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
VIANA Marylène	PHARMACIE GALENIQUE
VIGNOLES Philippe	INFORMATIQUE

ASSISTANT

FAURE Monique

PHARMACIE GALENIQUE

PROFESSEUR CERTIFIE

MARBOUTY Jean-Michel

ANGLAIS

ATER

POUGET Christelle

CHIMIE THERAPEUTIQUE

RIAHY DEHKORDI Homayoun

PHYSIOLOGIE- PARASITOLOGIE

TALLET Dominique

PHARMACOLOGIE

REMERCIEMENTS

Madame BOSGIRAUD, Professeur de Bactériologie-Virologie

Je vous remercie de présider ce jury et d'avoir suivi l'élaboration de cette thèse. Veuillez accepter tous mes remerciements et ma reconnaissance.

Madame DELEBASSEE, Maître de conférences

Je vous suis très reconnaissant de participer au jury de cette thèse. Veuillez accepter tous mes remerciements.

Madame ROGEZ, Pharmacien Biologiste, Praticien Hospitalier

Je vous remercie d'avoir accepté de siéger dans ce jury et suis très honoré de votre participation.

PLAN

INTRODUCTION

I- LA DENGUE : UN ENJEU MONDIAL POUR UNE MALADIE EMERGENTE

A- Une maladie potentiellement létale

1°) Forme asymptomatique

2°) La fièvre dengue classique (DF)

- a) Tableau clinique
- b) Tableau biologique
- c) Influence du terrain sur l'évolution de la maladie
- d) Diagnostics différentiels

3°) La fièvre dengue hémorragique (DHF)

- a) Tableau clinique
- b) Diagnostic différentiel
- c) Evolution vers le syndrome de choc (DSS)

B- Epidémiologie

1°) La dengue : une arbovirose

- a) Définition
- b) *Aedes aegypti* : principal vecteur de la dengue

c) Conséquences épidémiologiques

- Présence des vecteurs
- Répartition
- Conditions de contamination
- Relation entre les vecteurs et la virulence du virus

2°) Situation passée, présente et prévisible de la dengue dans le monde

a) Situation mondiale générale

b) Etudes continentales

- Asie
- Amérique
- Océanie
- Afrique
- Europe

c) Etude transcontinentale

d) Prévision de l'extension mondiale de la dengue

II- UNE MALADIE ENCORE IMPARFAITEMENT COMPRISE

A- Nature des agents infectieux

1°) Les virus de la dengue : des *Flavivirus*

a) Acide nucléique

- **Protéines structurales**
- **Protéines non structurales**

b) Capside

c) Enveloppe

2°) Cycle de réplication

3°) Sérotypes et génotypes

B- La pathogenèse

1°) Propagation du virus après piqûre contaminante

2°) Pathogenèse de la fièvre dengue hémorragique (DHF)

a) Etude de la pathogenèse

b) Réponse immunitaire des individus atteints

c) Les facteurs de risque : l'hypothèse mixte de la virulence et de la surinfection

- **L'hypothèse immunologique**
- **L'hypothèse de la virulence**

III- LA STRATEGIE D'UN VACCIN

A- Problèmes généraux liés à l'utilisation d'un vaccin contre la dengue

1°) Problèmes scientifiques

2°) Problèmes économiques

B- Vaccins de première génération : bientôt sur le marché ?

1°) Vaccins vivants atténués

- a) Atténuation des souches
- b) Absence de transmissions contaminantes
- c) Tolérance et immunogénicité
- d) Rôle de l'état immunitaire au moment de la vaccination

2°) Vaccins entiers inactivés

C- Vaccins de deuxième génération : encore à l'étude

1°) Vaccins à sous-unités recombinées

- Expression protéique par *Escherichia coli*
- Expression protéique par le *Baculovirus*

- Expression protéique de particules sub-virales (Eps) par une lignée cellulaire
- Synthèse des protéines prM et M en phase solide

2°) Vaccins vivants chimériques

- a) Utilisation d'un clone DEN atténué
- b) Utilisation du Chimerivax™

D- Vaccins de troisième génération : rêve scientifique ?

1°) Méthode

2°) Difficultés rencontrées

3°) Résultats actuels

4°) Evolution de la recherche actuelle

<u>CONCLUSION</u>

INTRODUCTION

La dengue fait partie de ces maladies dont le nom n'évoque le plus souvent qu'une pathologie exotique rare et bénigne. Maladie méconnue, le nombre de cas ne cesse pourtant d'augmenter depuis le milieu du 19^{ème} siècle, ainsi que le nombre de décès . Il s'agit en effet d'une maladie dont la gravité ne doit pas être sous-estimée car elle est potentiellement létale. Son incidence croissante en fait une maladie émergente qui constitue aujourd'hui un enjeu mondial de santé publique.

En l'absence de traitement spécifique, la recherche vaccinale constitue la pierre angulaire de la lutte contre la dengue. Celle-ci se heurte cependant à de nombreuses difficultés et notamment une mauvaise compréhension de la pathogenèse qui est pourtant indispensable à l'élaboration d'une stratégie vaccinale raisonnée et efficace.

Le futur vaccin est attendu par toute la communauté scientifique. Il constitue un sujet constant de préoccupation de l'O.M.S.

I- LA DENGUE : UN ENJEU
MONDIAL POUR UNE MALADIE
EMERGENTE

A- Une maladie potentiellement létale [1] [2] [3] [4] [5] [6] [7] [8] [9] [51] [70]

La dengue peut présenter différentes formes : dans la majorité des cas, elle est asymptomatique mais elle peut parfois prendre l'aspect d'une fièvre dengue classique (Dengue Fever ou DF) voire d'une fièvre dengue hémorragique (Dengue Haemorrhagic Fever ou DHF) (Figure 1). C'est cette dernière forme de la maladie qui présente un risque létal pour le patient.

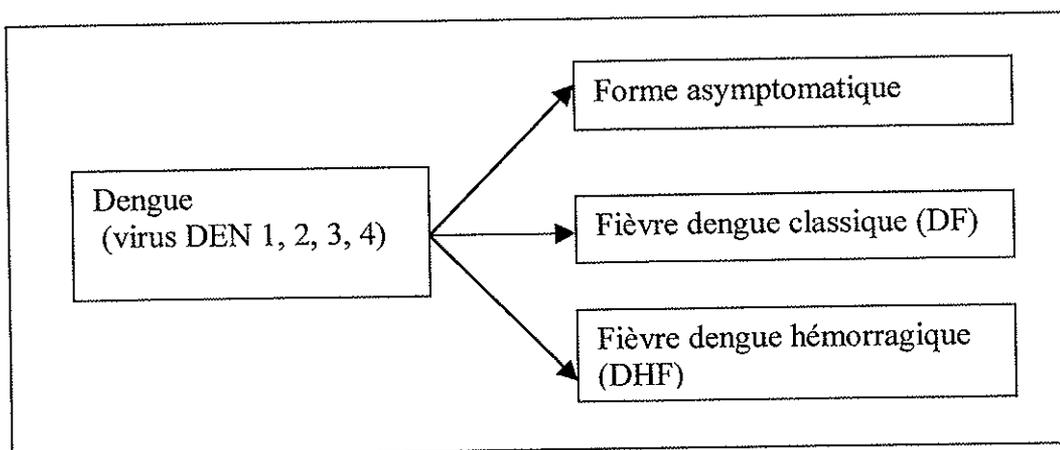


Figure 1 : La dengue est une maladie polymorphe

Ce risque, associé au caractère émergent de la maladie, en fait un enjeu mondial de santé publique.

Les quatre virus de la dengue peuvent être à l'origine de l'une ou de l'autre de ces formes. Une infection ne protège pas le patient d'une ré-infection ultérieure par un autre virus de la dengue. Une ré-infection est d'ailleurs souvent de plus grande gravité. L'incubation dure, dans tous les cas, de 4 à 7 jours après piqûre contaminante d'un moustique porteur de l'un des virus de la dengue.

1°) Forme asymptomatique

La forme asymptomatique semble être la forme la plus courante de la dengue, notamment chez les enfants. Une étude prospective menée à Bangkok (Thaïlande) a montré [1] que la proportion de cette forme totalement ou faiblement symptomatique (fièvre seule), concernait 87% des écoliers infectés âgés de 4 à 16 ans.

2°) La fièvre dengue classique (DF)

Sa proportion parmi l'ensemble de la population infectée par un des virus n'est pas clairement établie.

a) Tableau clinique

Il est peu spécifique : après le délai d'incubation apparaît de façon brutale une hyperthermie rapidement suivie de céphalées frontales, de douleurs rétro-orbitales, osseuses, musculo-tendineuses ainsi que de nausées, de vomissements et de rashes cutanés [2 ;3 ;4]. Les éruptions cutanées sont présentes dans 50% des cas confirmés par examens de laboratoire (investigations menées à Puerto-Rico [4]) et semblent plus fréquentes lors d'une primo-infection : elles se manifestent, parfois précocément (1^{er} ou 2^{ème} jour), par un flush au niveau du visage, du cou, du thorax et/ou une éruption maculo-papuleuse se propageant de façon centrifuge au 3^{ème} ou 4^{ème} jour de la maladie, parfois plus tardivement encore avec un rash confluent épargnant certaines surfaces cutanées telles que la plante des pieds et la paume des mains.

Des hémorragies peuvent se manifester: pétéchies, saignements gingivaux, hématurie microscopique, saignements intestinaux ou hyperménorrhée. Le « test du garrot » (Encadré 1) est parfois positif chez plus d'un tiers des patients atteints de fièvre dengue.

Test du garrot ou « Tourniquet Test » :

A l'aide d'un garrot, une pression comprise entre la systolique et la diastolique du patient est exercée sur une surface corporelle pendant 5 minutes. Les pétéchies apparues lors de ce test sont alors dénombrées. Le test est dit positif en présence d'un nombre de pétéchies supérieur ou égal à 20 pour une surface cutanée de 1 inch² (soit 6.25 cm²). [51 ; 1]

Encadré 1 : Le test du garrot

Un syndrome neurologique avec encéphalopathie et/ou polynévrite est possible. Des modifications de la perception du goût sont également rapportées, de même que des symptômes respiratoires (toux, rhinite...), une lymphadénopathie généralisée ou une hyperesthésie cutanée.

Cet épisode symptomatique dure en général 5 à 7 jours (Figure 2). Le malade en sort très affaibli. La disparition des symptômes coïncide avec la disparition de la virémie. La convalescence peut être prolongée et inclure faiblesse générale, dépression, bradycardie voire extrasystoles ventriculaires.

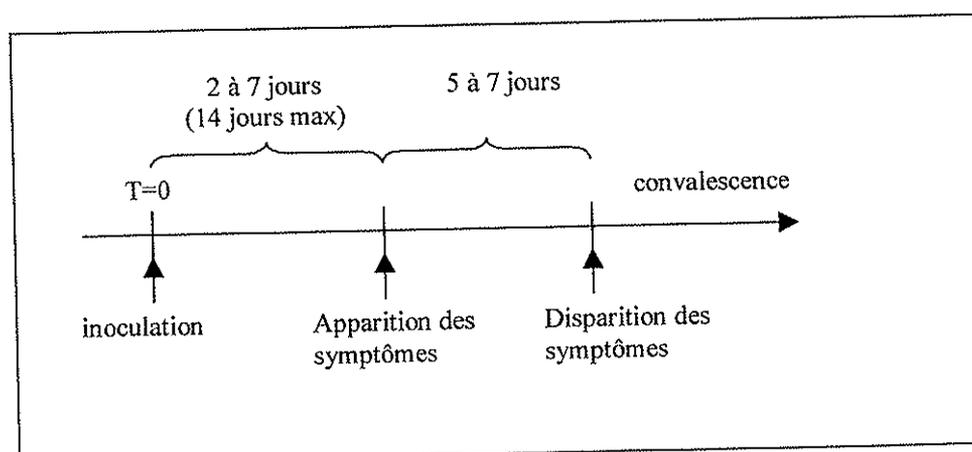


Figure 2 : Evolution chronologique de la fièvre dengue classique

b) Tableau biologique

La biologie montre fréquemment une leuco- et une thrombopénie de correction rapide. Une lymphocytose hyperbasophile est souvent observée entre les 3^{ème} et 5^{ème} jour. De même, les enzymes hépatiques (ASAT et ALAT) ainsi que les CPK sont régulièrement augmentées [2].

Aucune anémie ni modification de l'hématocrite n'est observée, la VS et la protéine C réactive restent dans des valeurs normales [70].

c) Influence du terrain sur l'évolution de la maladie

La sévérité de la fièvre dengue a tendance à augmenter avec l'âge et la répétition des infections. La guérison est toutefois de règle au bout de 10 jours.

d) Diagnostics différentiels

Les signes cliniques de la fièvre dengue classique sont très variés et peu spécifiques. Ils ne permettent généralement pas de distinguer cette maladie d'autres pathologies telles qu'une fièvre à Chikungunya, une rougeole, une leptospirose, la thyphoïde ou même un paludisme. Toutefois, une symptomatologie débutant plus de deux semaines après le retour d'une zone d'endémie permet d'exclure le diagnostic de fièvre dengue. Il en est de même en cas de fièvre prolongée de plus de deux semaines.

La fièvre dengue est donc une maladie bénigne mais fortement incapacitante.

3°)La fièvre dengue hémorragique (DHF)

Cette forme de la maladie menace le pronostic vital du patient. Elle peut apparaître lors d'une première infestation mais est plus fréquente lors de réinfections par un autre sérotype viral. Elle concerne environ 0,25 à 1% du nombre total des cas de dengue symptomatique [5].

Elle touche surtout les enfants mais il existe des différences épidémiologiques entre les formes rencontrées en Asie et en Amérique du Sud. Ainsi, contrairement à la situation observée en Asie où la DHF touche essentiellement les enfants, des études menées à Cuba et au Vénézuéla [6] ont montré que la DHF dans ces pays touchait indifféremment toutes les tranches de la population, même si les deux tiers des décès constatés concernaient les enfants.

Les cas de DHF ont par ailleurs tendance à augmenter depuis les années 80 et 90.

a)Tableau clinique

Après la période d'incubation, la DHF débute comme la fièvre dengue classique mais l'état du patient se détériore : après 2 à 7 jours d'évolution, une crise survient. Elle se manifeste par un refroidissement des extrémités , un flush facial, une agitation ou une prostration, des douleurs gastriques, un pouls filant, une tachypnée ou des perturbations de la pression artérielle. Des hémorragies spontanées sont observées dans 10 à 15% des cas et la mort peut survenir par hémorragie digestive ou intracérébrale [2].

La survenue de troubles neurologiques est possible et semble plus fréquente en cas de DHF qu'en cas de DF. Une étude menée en Indonésie [8] montre que 70% des cas mortels de DHF ont présenté au moins un signe d'atteinte neurologique. Ces troubles sont essentiellement liés à des encéphalopathies à LCR normal.

L'existence de ces troubles neurologiques explique qu'en zone d'endémie, les patients atteints de signes neurologiques doivent être systématiquement soumis à un dépistage de la dengue, qu'ils aient ou non d'autres signes cliniques associés [7]. Une enquête menée au Vietnam [8] a en effet montré que 4% des patients atteints de syndromes neurologiques étaient infectés par un virus de la dengue et que ceux-ci représentaient 1% de toutes les admissions pour dengue. Une autre enquête [8] menée en Thaïlande faisait état de 18% d'infection par un virus de la dengue chez des enfants atteints d'encéphalite.

La crise dure 24 à 36 heures pour aboutir en général à la guérison (Figure 3).

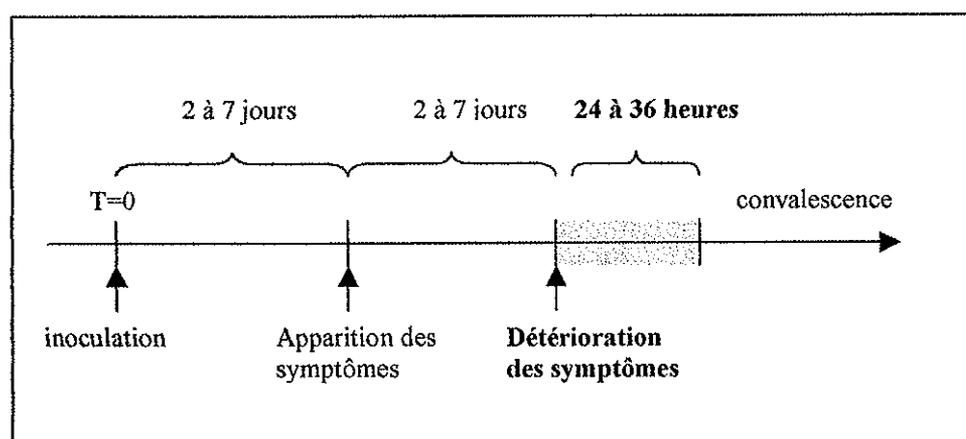


Figure 3 : Evolution chronologique de la fièvre dengue hémorragique

b- Diagnostic différentiel

Les principaux critères de distinction entre DF et DHF sont l'intensité de la fièvre, de la thrombocytopénie ($<100\ 000/\mu\text{L}$) et de l'hémoconcentration (augmentation de plus de 20% de l'hématocrite). Le fragment C3 du complément et le fibrinogène sont diminués en cas de DHF, les D-Dimères de fibrine augmentés [2].

La DHF est en fait caractérisée par une fuite plasmatique importante avec ascite et hypoprotidémie, sans nécrose ni inflammation de l'endothélium capillaire [4]. Des saignements de gravité variable peuvent survenir. Le test du garrot est positif chez plus de 50% des patients, une effusion pleurale est observée chez plus de 80% des patients (Tableau 1).

La gravité de cette forme tient à la possibilité d'une évolution très rapide vers un syndrome de choc (Dengue Shock Syndrome DSS).

	DF	DHF
Incubation	2 à 7 jours	2 à 7 jours
Tableau clinique	Signes variés et aspécifiques	Idem + Crise : fièvre élevée, thrombocytopénie, augmentation de l'hématocrite, hémorragie++, effusion pleurale
Evolution	Guérison	Décès rare (1 à 4%)[5] Plus fréquent si évolution vers le syndrome de choc lié à la dengue (DSS)

Tableau 1 : Comparaison des formes fièvre dengue classique et fièvre dengue hémorragique

c- Evolution vers le syndrome de choc (DSS)

L'OMS subdivise la fièvre dengue hémorragique (DHF) en 4 classes ou grades de gravité croissante du grade I au grade IV [3 ;2]. Les grades III et IV correspondent au "syndrome de choc lié à la dengue" ou DSS (Tableau 2).

L'évolution vers le syndrome de choc est annoncée par la diminution progressive des plaquettes et l'augmentation de

l'hématocrite. Quatre signes cliniques sont alarmants [4] : des douleurs abdominales intenses, des vomissements persistants, une nervosité ou une léthargie, un changement brutal de température. L'apparition de l'un de ces signes cliniques chez un patient atteint de DHF justifie une hospitalisation en urgence.

Le DSS est caractérisé par une hypotension importante avec refroidissement des extrémités et/ou un syndrome de choc (Tableau 2). La progression est rapide avec un taux de mortalité proche de 50% en dehors de tout traitement [2].

Grade	Hémoconcentration ¹	Hémorragies spontanées	Hypotension ²	Choc
I	+	0	0	0
II	+	+	0	0
III	+	+/-	+	0
IV	+	+/-	+	+

Tableau 2 : Grades d'évolution des fièvres dengue hémorragiques selon l'OMS [2]

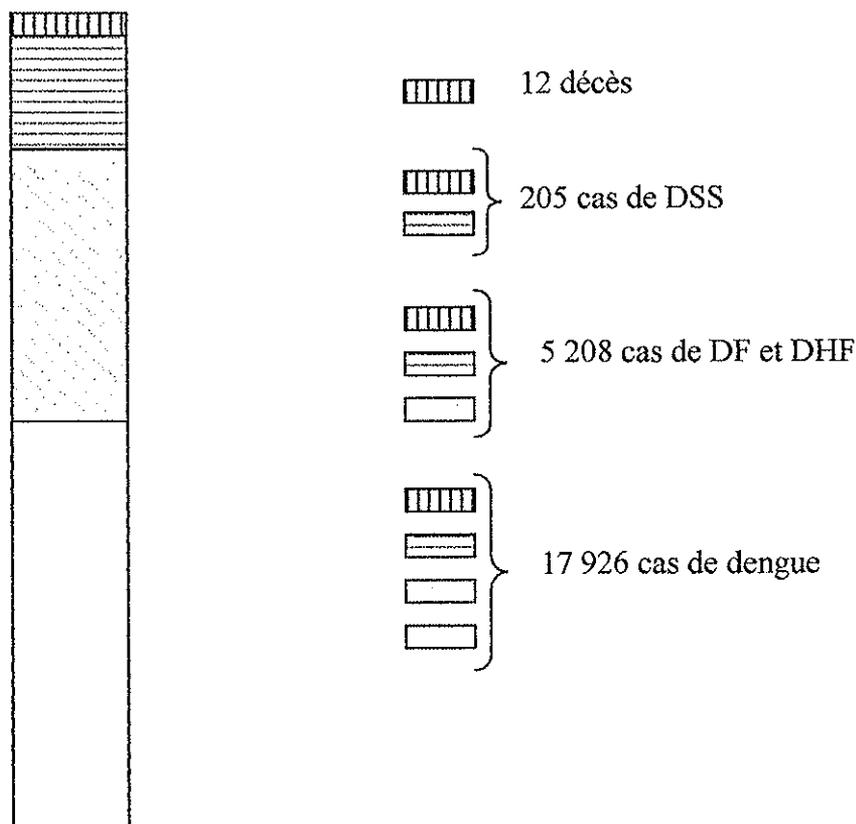
¹ : augmentation de 20% et plus

² : avec signes de circulation sanguine altérée

Si un traitement symptomatique adapté est mis en place, la mortalité peut descendre en dessous de 0.5% et la guérison est alors rapide [4 ;2 ;9]. Le pronostic dépendra donc essentiellement de la rapidité du diagnostic (difficile à établir) et du délai d'instauration du traitement.

Prenons l'exemple des épidémies de Cuba de 1981 et 1997 : elles illustrent parfaitement les différents aspects de la maladie.

Lors de l'épidémie cubaine de DHF liée au virus DEN-2 en 1997, les formes cliniques de dengue et leurs proportions respectives ont été les suivantes [6] :



Les formes asymptomatiques ou peu symptomatiques ont été la forme la plus fréquente de la maladie et le taux de mortalité s'est officiellement élevé à 0.23% parmi l'ensemble des personnes infectées lors de cette épidémie liée au virus DEN-2. L'ensemble des symptômes cliniques observés en 1997 regroupe parfaitement les données précédemment citées (Tableau 3). Cet exemple cubain n'est donné qu'à titre indicatif: les proportions peuvent en effet varier selon le lieu géographique, l'année et la souche virale car de nombreux paramètres entrent en jeu dans la virulence de l'infection.

Manifestations cliniques	1981	1997
Fièvre	88	100
Vomissements	81	100
Hépatomégalie	35	66.6
Douleurs abdominales	58	83.3
Ascites	8	91.6
Effusion pleurale	8	58.3
Choc	100	100
Manifestations hémorragiques	65	100
Pétéchies	38	41.6
Hématémèse	35	58.3
Mélaena	4	25
Saignement vaginal	44	42.8
Hémoconcentration	92	91.6
Thrombocytopénie	71.8	83.3

Tableau 3 : Principaux symptômes observés dans les cas de DHF mortels à Cuba chez les adultes en 1981 et 1997 [6]. Les différences observées entre les deux années étudiées peuvent s'expliquer entre autre par la nature de la souche infectante (espèces virales différentes) et par l'existence de ré-infection pour l'année 1997.

La dengue peut apparaître comme une maladie dont la gravité est limitée : en effet, seules certaines formes menacent le pronostic vital du patient et, bien traitée, cette maladie, même dans ses formes les plus graves, n'est que faiblement létale.

Cependant, la méconnaissance de la maladie au sein des populations concernées, la difficulté du diagnostic, l'absence de traitement spécifique, le difficile accès aux soins dans les pays touchés et l'étendue de la population concernée, sans oublier le coût engendré pour des pays souvent démunis, représentent autant d'éléments favorables à son expression.

L'épidémiologie participe donc de façon importante à la gravité de la maladie.

B-Epidémiologie

Ces dernières années ont vu l'extension géographique de la maladie (extension liée à la nature du vecteur) ainsi qu'une augmentation de la morbi-mortalité. On comprendra donc aisément les enjeux d'un éventuel contrôle de la maladie.

1°) La dengue : une arbovirose [1] [2] [3] [4] [5] [7] [9] [10] [11] [51] [58]

a) Définition

Une arbovirose est une maladie transmise par des Arthropodes vecteurs contaminés. Le virus est transmis à un vertébré lors d'un repas sanguin. Les arboviroses affectent essentiellement les zones tropicales dont le climat est favorable au développement des vecteurs. Certaines peuvent cependant être actuellement rencontrées en France (Virus West-Nile, Encéphalite à Tique, Tahyna).

Une classification des arbovirus (Arthropod Borne Virus) a été établie (Tableau 4). Ils appartiennent à des familles virales différentes dont les représentants ne sont pas tous des arbovirus (cas du virus de la dengue qui appartient à la même famille que le virus de l'hépatite C (*Flaviviridae*)).

La dengue est l'arbovirose la plus fréquente de l'homme dans le monde [7 ;58]. L'arthropode vecteur est un moustique : *Aedes aegypti*.

Famille virale (genre)	Arbovirus
<i>Togaviridae</i> (<i>Alphavirus</i>)	Chikungunya, WEE, EEE, O'Nyong Nyong
<i>Flaviviridae</i> (<i>Flavivirus</i>)	Fièvre jaune, Dengue , West Nile, Encéphalite de Saint Louis, Encéphalite Japonaise, Encéphalite à Tiques...
<i>Bunyaviridae</i>	Bunyavirus, California, Phlébovirus, Fièvre à Phlébotomes, Tahyna...
<i>Rhabdoviridae</i> (<i>Vésiculovirus</i>)	Stomatite vésiculeuse
<i>Réoviridae</i> (<i>Orbivirus</i>)	Blue Tongue

Tableau 4 : Familles virales des Arbovirus (d'après [10]).

b- *Aedes aegypti* : principal vecteur de la dengue

Le principal vecteur de la dengue est l'*Aedes aegypti* femelle, particulièrement anthropophile [5 ;51].

Les moustiques s'infestent lors d'une piqûre d'un homme contaminé et virémique. Ils sont alors contaminés à vie et présentent une multiplication virale très importante au niveau des glandes salivaires, du système nerveux central, des tissus adipeux, de l'épithélium du mésogastre [2]...

Le virus se multiplie aussi de façon très active au niveau de l'utérus, permettant une transmission aisée à la descendance de la femelle. Des contaminations sexuelles permettraient également une bonne dissémination de la maladie parmi les vecteurs.

Aedes aegypti n'est pas la seule espèce vectrice des virus de la dengue : d'autres espèces du genre *Aedes* peuvent aussi être impliquées de manière plus ponctuelle . C'est le cas d'*Aedes*

albopictus, plus adapté aux climats tempérés [5]. Le virus a pu être isolé dans d'autres *Aedes* (*polynesiensis*, *scutellaris*, *niveus*, *furcifer*, *taylori*, *luteocephalus*, *opok* et *africanus*), sans qu'une preuve formelle de leur implication dans la transmission de la maladie à l'homme [2 ;3] ait été apportée.

D'autres vertébrés que l'homme pourraient être contaminés par le virus de la dengue *via* les *Aedes*, permettant ainsi l'existence de nombreux cycles de maintien et d'amplification de la maladie, selon le modèle de la Fièvre Jaune. Cependant, à l'heure actuelle, aucun élément ne confirme cette hypothèse.

c- Conséquences épidémiologiques

➤ Présence des vecteurs :

La répartition de la dengue est conditionnée par la présence des moustiques vecteurs car ceux-ci s'avèrent indispensables à l'infestation d'une population. Des campagnes d'éradication du vecteur ont donc constitué le premier moyen de lutte contre la maladie (Encadré 2). *A contrario*, le moustique peut parfois être présent sans qu'aucun cas de dengue n'ait été recensé.

➤ Répartition :

Aedes aegypti a besoin de points d'eau stagnante pour pouvoir se développer, d'où leur présence à proximité des zones d'habitation. Les larves d'*Aedes* sont largement retrouvées au niveau de gouttières, de pots de fleurs, de pneus mais aussi de cavités naturelles comme des trous d'arbres, des noix de coco [2 ;4]...

Des campagnes d'éradication ont été entreprises mais sans succès véritable. Au Brésil, 1,6% du budget annuel du ministère de la santé est dévolu à cette lutte et en Thaïlande, malgré un investissement annuel de 11 millions de dollars le pays ne cesse de subir d'importantes épidémies. Seuls Singapour et Cuba ont réussi à limiter la présence du vecteur.

Encadré 2 : Coût et efficacité des campagnes d'éradication des vecteurs [11].

➤ Conditions de contamination :

L'*Aedes aegypti* adulte privilégie les endroits sombres de l'habitation pour piquer l'homme tôt le matin ou tard le soir, mais toujours en période diurne. On a pu dénombrer 10 à 20 femelles dont 5 à 10% d'infectées dans une seule pièce d'habitation en région endémique [2]. Si l'*Aedes* a été contaminé et que la période d'incubation du virus chez le vecteur de 10 à 12 jours s'est écoulée, il peut, lors d'une piqûre, transmettre à l'homme le virus de la dengue.

La densité du vecteur modifie le taux de transmission de la dengue à l'homme mais la température joue également un rôle déterminant en favorisant par son élévation la vitesse de la réplication virale et donc la capacité infectante du vecteur. Les épidémies présentent en conséquence des variations saisonnières liées aux périodes de mousson ou aux saisons humides, lorsque la température est élevée (Figure 4).

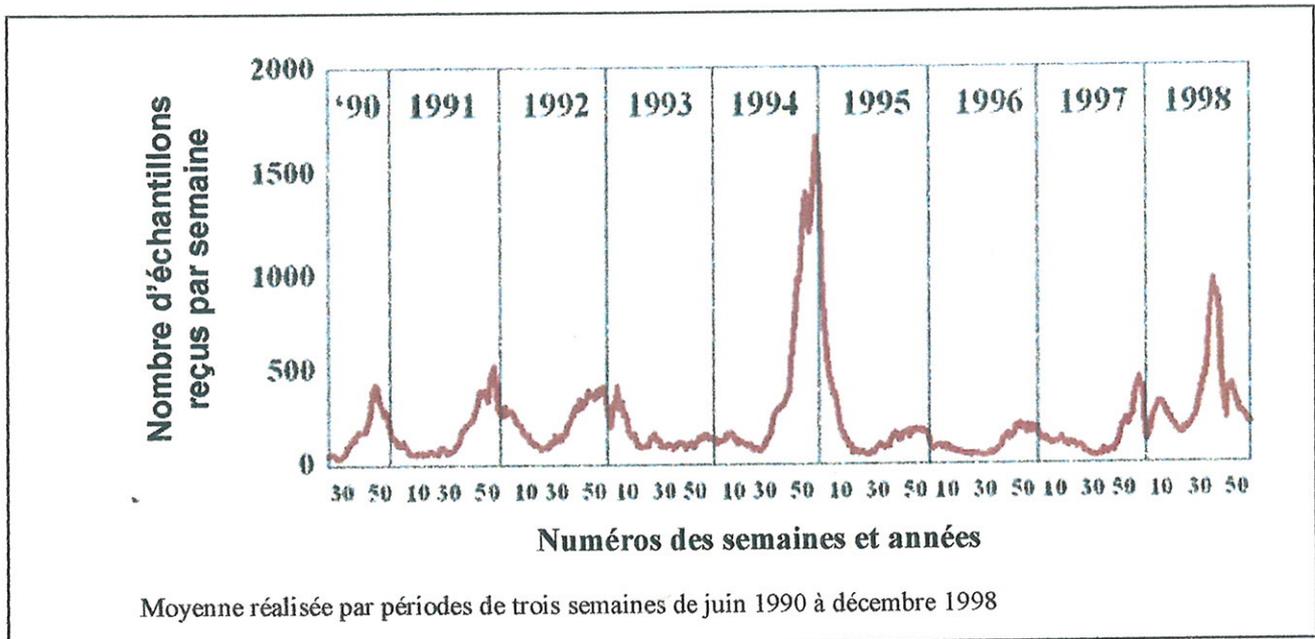


Figure 4 : Echantillons positifs pour la dengue en fonction des saisons de 1990 à 1998 à Puerto-Rico (USA) [1] Les cas de dengue sont régulièrement plus fréquents de juillet à janvier, ce qui correspond aux périodes les plus chaudes et humides à Puerto-Rico. L'incidence de la dengue suit une courbe saisonnière qui varie selon les pays.

➤ Relation entre les vecteurs et la virulence des virus :

La capacité de transmission de la dengue varie avec les souches de moustique. Un taux élevé de virus est nécessaire chez l'homme pour contaminer le vecteur. Seuls les virus virulents sont transmis aux moustiques les moins adaptés: les vecteurs permettent de façon indirecte une exacerbation de la virulence virale.

2°) Situation passée, présente et prévisible de la dengue dans le monde [1] [2] [3] [4] [5] [6] [7] [9] [12] [13] [14] [15] [16] [17] [59]

a) Situation mondiale générale

La première épidémie de fièvre dengue a été officiellement décrite vers 1780 à Philadelphie. Au cours des 18^{ème} et 19^{ème} siècle, ces épidémies ponctuelles étaient courantes en Amérique du nord, aux Caraïbes, en Asie et en Australie. En 1906, le rôle vecteur d'*Aedes aegypti* est établi par Bancroft et le virus découvert dans le sang humain. En 1944, Sabin et Schlessinger isolent le virus dans une souris et découvrent l'existence de plusieurs sérotypes [2].

A la fin de la seconde guerre mondiale, avec l'urbanisation croissante, la déforestation et le développement des transports intercontinentaux, la dengue connaît un développement important suivant un mode endémique. La première épidémie de DHF survient aux Philippines en 1954 avant de s'étendre au continent asiatique. Sur le continent américain, la première épidémie majeure de DHF ne survient qu'en 1981 à Cuba. C'est la plus importante épidémie de l'histoire avec 10 000 cas de DHF sur un total de 350 000 cas de dengue symptomatique.

Depuis les années 1980, la dengue est considérée comme la plus fréquente des arboviroses humaines avec chaque année 50 à 100 millions de cas [6] et 250 000 à 1 000 000 de cas de fièvre dengue hémorragique pour environ 40 000 décès, soit une mortalité de 1 à 5% parmi les cas de DHF.

Plus de 2 milliards d'individus vivent aujourd'hui dans des zones à risque qui s'étendent sur plus de cent pays (zones tropicales et équatoriales, à forte densité de population humaine et vectorielle (Figure 5)).

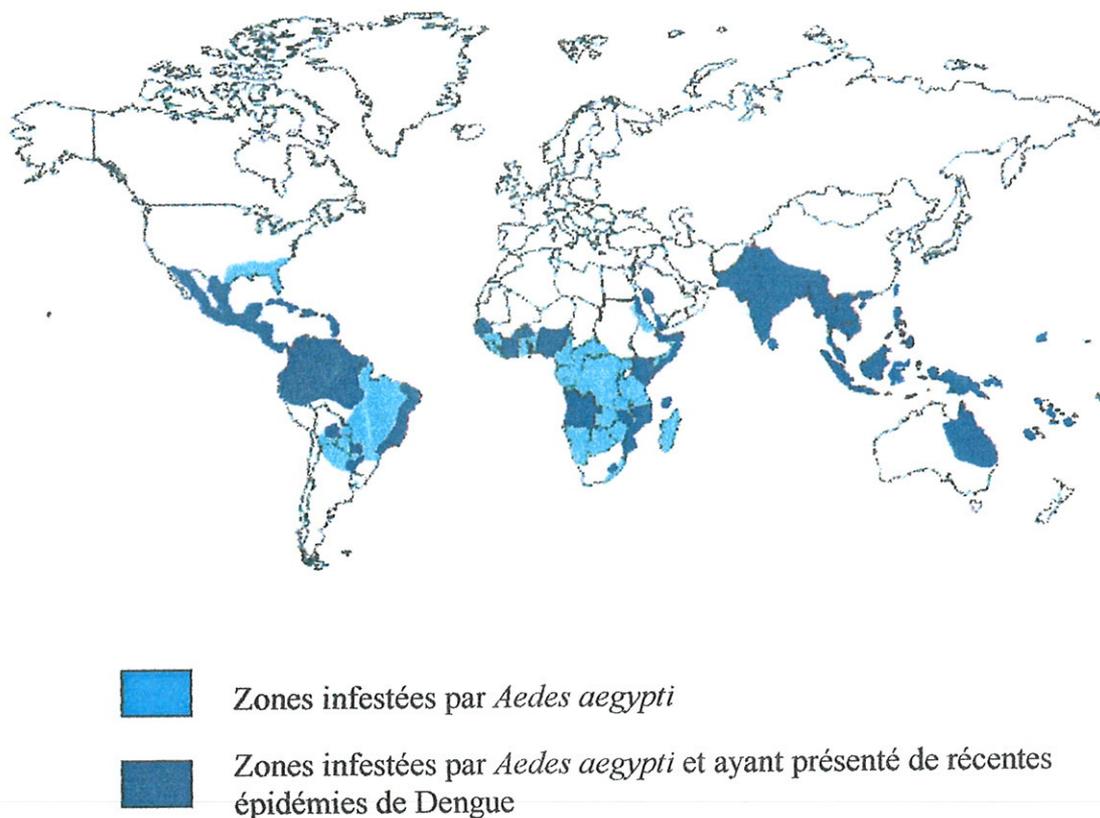


Figure 5 : Répartition du vecteur et des épidémies de dengue dans le monde en 1998 (d'après [1]).

En 1980, les formes sévères de dengue restaient rares, mais depuis 1997, on observe une émergence des cas de DHF dans les pays tropicaux, la DHF adoptant désormais une évolution de mode endémo-épidémique en Asie et épidémique en Amérique du sud.

En 1998, 1,2 millions de cas de DHF/DSS ont été déclarés à l'OMS pour 3 442 décès. Aujourd'hui, la DHF/DSS représente une cause majeure d'hospitalisation et de mortalité chez les enfants en Asie.

Les principales causes d'augmentation de l'incidence de la dengue reposent sur la croissance des populations, l'urbanisation incontrôlée, la croissance du trafic aérien, un échec du contrôle de la population vectorielle et une détérioration des infrastructures de santé.

La dengue est donc un problème mondial de Santé publique mais il est encore sous-estimé car certains pays ne peuvent ou ne veulent procéder au dépistage systématique des cas : ainsi, au Guyana, 48 cas de DF/DHF seulement ont été déclarés de 1990 à 1998 alors que le Surinam, pays voisin, avec une population moitié moindre rapporte 2 500 cas pendant cette même période. Une enquête menée dans ce pays sur seulement 112 patients présentant des symptômes évoquant la diagnostic de dengue a montré l'existence de 50 cas [12] ; soit plus que tous les cas déclarés en l'espace de 8 ans...

Après le pic de 1998, le nombre de cas de dengue a considérablement diminué mais le mouvement est redevenu ascendant en 2001. La propagation de la maladie semble suivre une évolution cyclique dans le temps.

b- Etudes continentales

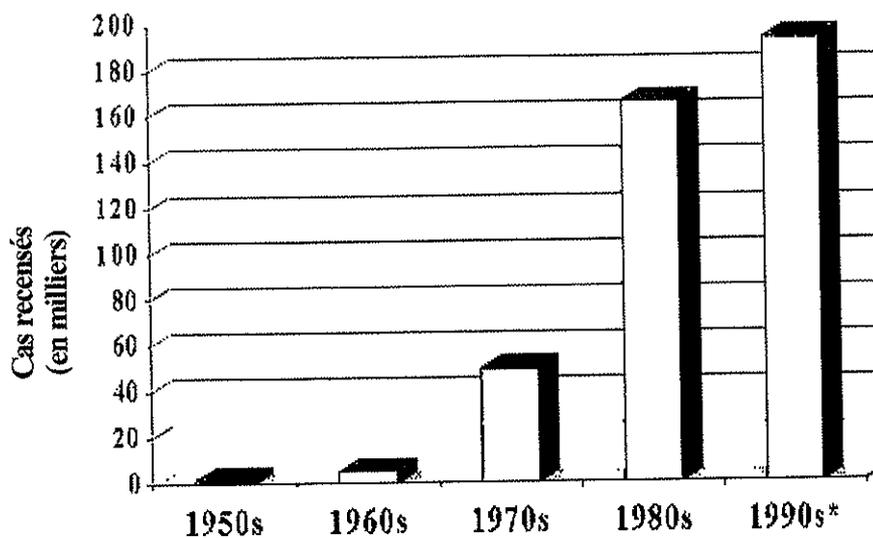
La dengue affecte principalement, dans sa forme grave, l'Asie du sud-est, et dans une moindre mesure l'Amérique du sud où le nombre total de cas est toutefois plus élevé. Seul le continent européen n'est pas touché.

➤ Asie

C'est le continent le plus touché. Officiellement, seule l'Asie du sud-est est réellement concernée.

La première épidémie de DHF survient aux Philippines en 1954. Elle s'est rapidement étendue à la Thaïlande, à l'Indonésie et au Vietnam. Ainsi, le nombre de cas de DHF n'a cessé d'augmenter

au cours du 19^{ème} siècle : de 50 000 cas par an en 1970, il est passé à 200 000 cas par an dans les années 90 (Figure 6).



* :données provisoires arrêtées en 1998

Figure 6 : Evolution du nombre moyen de cas annuels de DHF classés par décennies en Asie du sud-est (Thaïlande, Indonésie et Vietnam) [1].

En Thaïlande ont été répertoriés 874 207 cas de DHF entre 1985 et 1990 pour un taux de mortalité de 1.57% , soit plus de 13 500 décès sur 5 ans [2]. La progression globale sur le continent asiatique est encore plus rapide depuis 1996 : de 232 832 cas répertoriés en 1996, on est passé à 445 186 cas en 1998 [3] (Tableau 5).

Pays	1996	1997	1998
Cambodge	1 433	4 224	16 216
Chine	13	647	15
Inde	16 517	1 177	707
Indonésie	44 650	30 730	71 087
Laos	8 197	1 536	3 755
Malaisie	14 255	19 544	27 370
Maldives	0	0	2000
Myanmar	1 655	3 993	8 978
Philippines	13 614	12 811	31 829
Singapour	3 128	4 300	5 183
Sri Lanka	1298	980	800
Thaïlande	38 109	99 150	126 348
Vietnam	89 963	108 000	150 898
Total	232 832	287 092	445 186

Tableau 5 : Cas de DF et DHF recensés en Asie par l'OMS de 1996 à 1998 [3]

En 1998, l'épidémie atteint son paroxysme. A l'image de la situation mondiale, le nombre de cas de DF/DHF diminue considérablement en 1999 pour reprendre à nouveau une voie ascendante en 2001 (Tableau 6).

	1998	1999	2000	2001*
Cas de DF/DHF	218 859	55 405	57 997	119 707
Décès	2 075	491	542	452

Données arrêtées en septembre

Tableau 6 : Evolution du nombre de cas de dengue symptomatique de 1998 à 2001 en Asie du sud-est (d'après [14]).

A l'heure actuelle, en Asie, la DHF est surtout une maladie de l'enfance. Dans des zones hyperendémiques, plus de 50% des enfants âgés de 7 ans ont connu une ou plusieurs infections [2].

La DHF et le DSS sont désormais une cause majeure d'hospitalisation dans les services de pédiatrie en Asie [13]. Dans de bonnes conditions, le taux de mortalité y est inférieur à 2%.

Sur le continent asiatique, la dengue évolue essentiellement selon un mode endémo-épidémique. Cependant, quelques épidémies de DF ont eu lieu: à Delhi en 1996 ont été relevés 8 900 cas pour un taux de mortalité de 4,2% [13].

➤ Amérique

Du 18^{ème} siècle jusqu'au milieu du 20^{ème} siècle, la dengue évolue sur le continent américain de façon très sporadique.

Dans les années 1950 et 1960, la PAHO (Pan American Health Organisation) mène à bien l'éradication d' *Aedes aegypti* jusqu'en 1970. En 1970, l'éradication du vecteur est pratiquement réalisé. Le relâchement de cette politique à la fin des années 1970 a ensuite permis une recolonisation du continent par *Aedes aegypti* (Figure 7). La dengue devient alors une maladie endémique dans certaines régions. Des cas sporadiques de DHF surviennent à Cuba, au Venezuela et au Brésil [2]. En 1980, onze pays d'Amérique du sud ont présenté des cas de DHF et en 1981 survient la première épidémie majeure de DHF sur ce continent (Cuba).

Depuis 1994, un nouveau sérotype de la dengue (DEN-3) , apparaît sur le continent américain où il avait disparu depuis 20 ans. Ce nouveau sérotype s'accompagne de cas de plus en plus nombreux qui touchent successivement [4] le Panama, le Nicaragua et le Costa-Rica en 1994 ; le Mexique, le Guatemala, le Salvador et le Honduras en 1995 ; le Belize et le Guyana en 1997; Puerto-Rico, la Jamaïque, la République Dominicaine, les

Barbades en 1998; la Guyane française en 1999; le Brésil et Cuba en 2000.

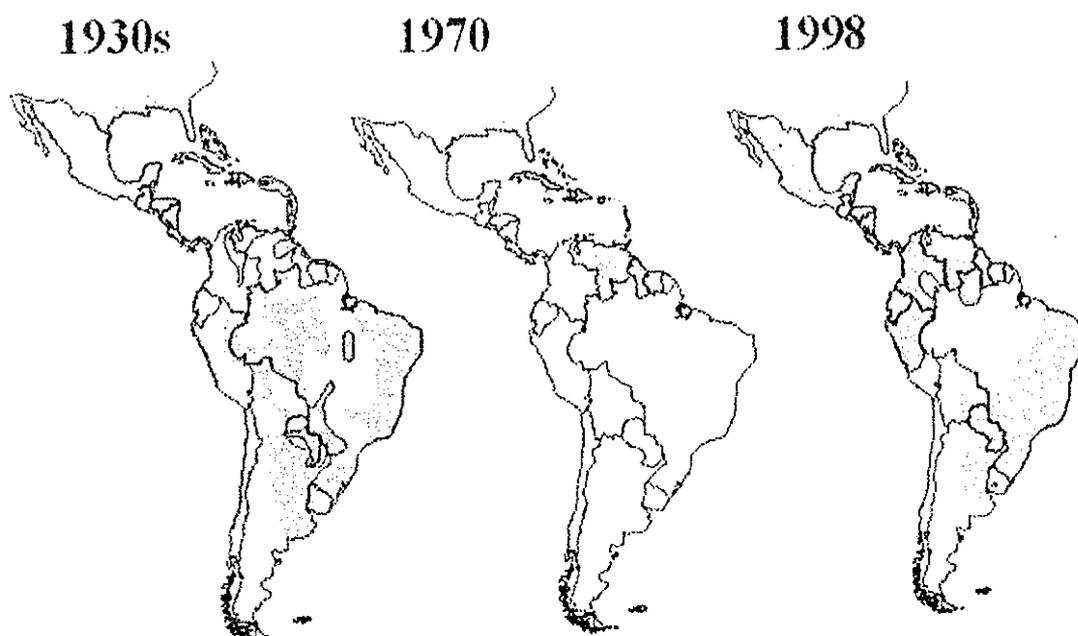


Figure 7 : Répartition du vecteur sur le continent américain de 1930 à 1998. [1]

Ainsi, depuis 1980, la maladie progresse sur le continent américain (Figure 8) et le vecteur est actuellement présent dans tous les pays d'Amérique à l'exception du Chili et du Canada [59].

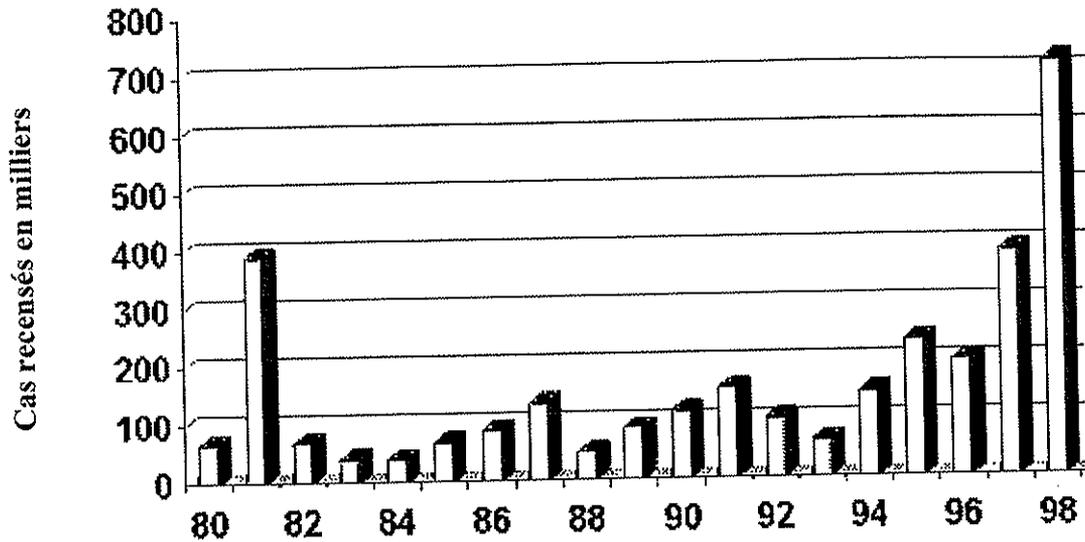


Figure 8 : Cas de dengue symptomatique (DF et DHF) recensés sur le continent américain de 1980 à 1998. [1] Les cas de dengue (DF et DHF) sont de plus en plus nombreux sur le continent américain. Réinfestation du continent par *Aedes aegypti* et co-circulation de sérotypes différents sont les principales raisons de cette évolution.

Le pic observé en 1981 correspond à l'épidémie observée à Cuba cette même année.

La progression est encore plus importante entre 1996 et 1998: de 276 691 cas en 1996, on est passé à 708 146 cas de dengue symptomatique en 1998 (Tableau 7).

	1996	1997	1998
Antigua	12	9	4
Bahamas	0	0	126
Barbades	130	199	610
Bélize	0	210	17
Bolivie	52	223	49
Brésil	175 751	254 942	530 578
Colombie	33 155	14 958	43 855
Costa-Rica	2 307	14 267	2 290
Cuba		3 012	
République dominicaine	89	64	3 049
Equateur	5 189	284	4 219
Salvador	790	348	1 354
Guyane	364	851	534
Grenades	6	22	
Guadeloupe	186	0	
Guatemala	3 679	5 379	1 593
Honduras	5 047	11 730	22 218
Jamaïque	46	16	68
Martinique	430	235	44
Mexique	20 687	35 108	23 639
Nicaragua	2 792	3 126	13 592
Panama	811	1 710	2 770
Puerto-Rico	4 655	6 955	14 828
Pérou	6 395	1 151	988
Ste Lucie	65	14	3
St Vincent	190	3	112
Surinam	677	90	1 230
Trinidad et Tobago	3 983	1 357	2 792
Vénézuela	9 180	33 654	37 586
Total	276 691	389 917	708 146

Tableau 7 : Cas de DF/DHF recensés par l'OMS de 1996 à 1998 sur le continent américain [3]

Le nombre total de cas de dengue symptomatique est plus important sur le continent américain que sur le continent asiatique. Cependant, le nombre de cas graves (DHF/DSS) y est très inférieur (seulement 12 426 cas pour 1998) (Tableau 8) malgré une évolution croissante depuis les années 1970 (Figure 9).

	1996	1997	1998
Brésil	2	35	89
Colombie	1 757	330	5 276
Cuba		205	
République Dominicaine	17	3	176
Salvador	1		2
Guyane	6	3	1
Guatemala	19	6	1
Honduras	0		18
Martinique		15	
Mexique	884	239	372
Nicaragua	49	68	432
Puerto-Rico	24	62	133
Surinam			11
Trinidad et Tobago		39	189
Vénézuela	1 680	6 300	5 723
Total	4 439	10 309	12 426

Tableau 8 : Cas de DHF recensés par l'OMS de 1996 à 1998 sur le continent américain. [3]

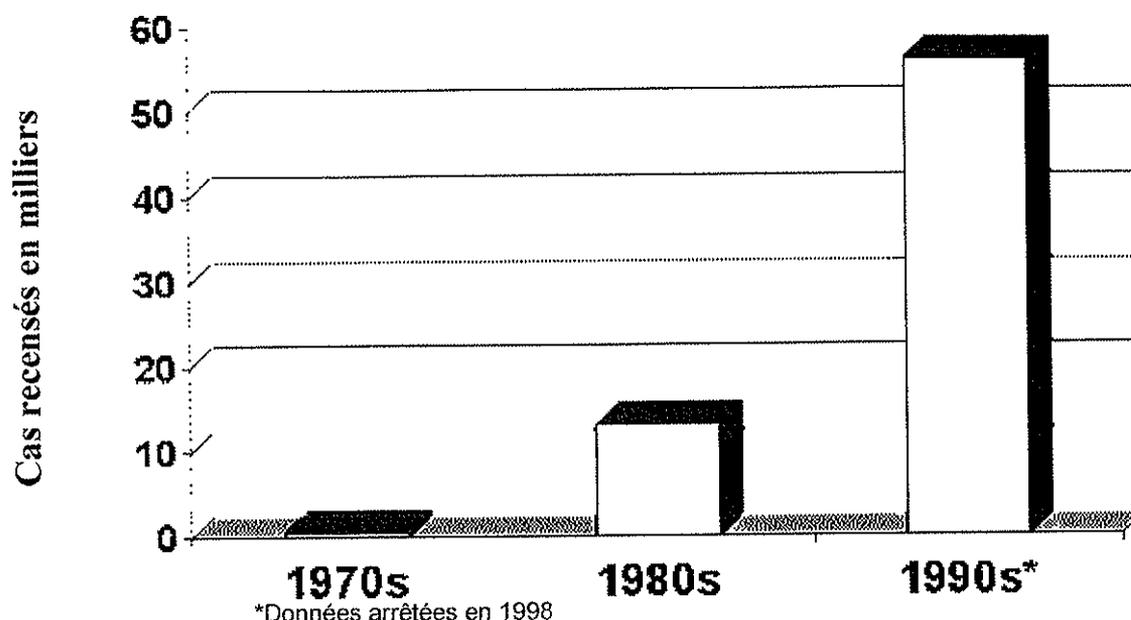


Figure 9 : Nombre de cas de DHF recensés par décennies sur le continent américain [1] : l'évolution du nombre de cas de DHF sur le continent américain est très importante jusqu'en 1998, particulièrement les dix dernières années. Cependant, elle reste beaucoup moins importante que celle observée en Asie à cette même période.

En 1998, l'épidémie atteint son paroxysme. A l'image de la situation mondiale, le nombre de cas de DF/DHF diminue considérablement en 1999 pour reprendre une voie ascendante en 2001.

	1998	1999	2000	2001*
Cas de DF/DHF	720 572	322 256	400 514	406 206
Décès	83	98	92	44

Données arrêtées en septembre

Tableau 9 : Evolution du nombre de cas de DF/DHF de 1998 à 2001 sur le continent américain (d'après [14]).

Aux USA, les cas de dengue sont essentiellement des cas d'importation quoique trois épidémies aient éclaté au Texas en

1980 (23 cas) , 1986 (9 cas) et 1999 (18 cas) [1]. En dehors de ces épidémies, 500 cas d'importation ont été diagnostiqués de 1977 à 1994 .

La présence de vecteurs aux USA laisse penser qu'une épidémie d'importance est toujours possible. Toutefois, les conditions d'hygiène (air conditionné, absence de conservation de l'eau de pluie...) limitent les possibilités de contamination.

➤ Océanie

A l'exception d'une épidémie liée au virus DEN-3 à Tahiti en 1965, la dengue a été absente du Pacifique sud pendant 25 ans.

Puis en 1971, l'arrivée du virus DEN-2 a provoqué des épidémies majeures sur de nombreuses îles. De 1996 à 1998, l'évolution du nombre de cas de dengue suit une évolution exponentielle (Tableau 10).

	1996	1997	1998
Australie	43	205	500
Cook islands	2	1 075	
Fiji			24 780
Guam		1	2
Micronésie			275
Nouvelle Calédonie		154	2 618
Nouvelle Zeland	11		
Samoa (USA)	49		
Samoa	1 013	163	49
Tonga	3		460
Vanuatu			131
Wallis et Foutuna			395
Total	1 121	1 598	29 210

Tableau 10: Cas de DF / DHF recensés par l'OMS de 1996 à 1998 en Océanie [3]

La même évolution que sur les autres continents est constatée depuis 1999 :

	1998	1999	2000	2001
Cas de DF/DHF	356 554	64 066	45 603	NC
Décès	1 470	112	167	NC

NC : Non communiqué

Tableau 11 : Evolution du nombre de cas de DF/DHF de 1998 à 2001 dans la région ouest du Pacifique (Océanie et une partie de l'Asie, autre que l'Asie du sud-est) (d'après [14]).

➤ Afrique

Seules les côtes Est et Ouest de l'Afrique sont touchées. Les souches épidémiques de l'Afrique de l'ouest sont génétiquement reliées à celles d'Indonésie, des Seychelles et de Somalie, ce qui laisse penser à une importation *via* l'Océan Indien.

Peu de données sont disponibles sur le nombre de cas de DF et DHF. Bien que les vecteurs soient abondants, aucun cas n'y a été recensé par l'OMS depuis 1998. L'hypothèse d'une résistance naturelle des Africains à l'infection a été émise [5]. Il faut bien sûr évoquer par ailleurs l'absence de moyens de recensement de la maladie sur ce continent.

➤ Europe

L'Europe est actuellement épargnée. Les seuls cas recensés sont des cas d'importation.

Une étude [15] a été menée au sein des Centres Hospitaliers Universitaires du sud de la France de 1994 à 1999 regroupant 10 services de Maladies Infectieuses et Tropicales (Groupe Infectio-

Sud). Elle a recensé 82 cas de dengue importée (confirmés ou probables) (Tableau 12).

Années	Nombre de cas recensés
1994	6
1995	12
1996	7
1997	18
1998	29
1999	10
Total	82

Tableau 12 : Nombre de cas de dengue recensés en France dans 10 CHU de 1994 à 1999 (d'après [15]).
 Cette étude regroupe au total 26 cas confirmés de dengue et 56 cas probables.

Les départements d'outre-mer (Polynésie, Antilles, Guyane, Nouvelle-Calédonie), la Réunion exceptée, sont largement concernés (Tableau 13).

Le risque moyen pour un voyageur de contracter la dengue en région d'endémie est de 1 pour mille lorsque les conditions de séjour sont favorables (climatisation, hygiène) mais pourraient être très élevé [5] dans des conditions plus précaires, les cas de fièvre dengue hémorragique demeurant rares en l'absence de tout contact préalable avec un virus de la dengue.

Pays d'origine	Cas confirmés	Cas probables	Total
Océanie			
Polynésie	1	3	4
Nouvelle calédonie		1	1
Amérique			
Haïti		1	1
République Dominicaine		1	1
St Martin		1	1
Guadeloupe	4	4	8
Martinique	5	4	9
Honduras	1		1
Vénézuela		1	1
Guyane		7	7
Asie			
Sri Lanka	2		2
Inde	2	4	6
Myanmar		1	1
Thaïlande	1	7	8
Cambodge	1	1	2
Vietnam	1	2	3
Indonésie	3	2	5
Malaisie	1	1	2
Afrique			
Arabie Saoudite	1	1	2
Sénégal		2	2
Côte d'Ivoire	2	7	9
Angola		2	2
Cameroun		1	1
Somalie	1		1
Comores		2	2
Total			82

Tableau 13 : Origine géographique des 82 cas recensés de dengue importée en France de 1994 à 1999. (d'après [15])

Une augmentation des cas importés est actuellement constatée, liée à une augmentation de l'épidémie mondiale et aux voyages de plus en plus fréquents en pays d'endémie.

Aujourd'hui, la Dengue est la deuxième cause d'état fébrile au retour des pays tropicaux après le paludisme [15].

c-Etude transcontinentale

Les études de biologie moléculaire permettent de comprendre la répartition et la dissémination des souches de virus. Le principe repose sur l'étude du gène d'enveloppe viral : la présence d'un génotype identique dans deux zones géographiques différentes implique son introduction par des humains virémiques ou par des moustiques infectés. Il a ainsi été possible d'affirmer [2] qu'un génotype isolé en Nouvelle-guinée en 1944 a été introduit en Amérique en 1981 et a causé cette même année la première épidémie majeure de DHF à Cuba.

Elle permet de comprendre le rôle majeur des échanges mondiaux dans la dissémination de la maladie.

d- Prévion de l'extension mondiale de la dengue

Plusieurs facteurs sont susceptibles d'influencer la répartition de la maladie : l'évolution démographique, l'évolution des conditions d'hygiène dans les pays en voie de développement, l'augmentation du trafic aérien mais aussi les changements climatiques.

Une étude [16] a été menée afin d'étudier l'influence du changement climatique sur l'évolution de la maladie. En effet, le climat est un élément clef de la dissémination : il conditionne la présence d'eau et la température régule la nutrition, la mortalité et le développement larvaire du vecteur de même que la réplication virale. Les basses températures ne permettent pas la réplication virale au

sein des vecteurs et les moustiques meurent avant d'être contaminants.

Le degré d'humidité, les précipitations et la température relevés entre 1961 et 1990 ont été analysés et recoupés avec les épidémies survenues de 1975 à 1996.

Le scénario privilégié par les instigateurs de cette étude est une augmentation de 1% du taux actuel de dioxyde de carbone par an, ce qui correspond aux prévisions établies par les scientifiques.

Alors qu'en 1990, 30% de la population mondiale (soit 1,5 milliards d'individus) vivait dans des zones où le risque de transmission est supérieur ou égal à 50%, les résultats de l'étude montrent qu'en 2025, 50 à 60% de la population mondiale (soit 5 à 6 milliards d'individus) seront concernés dans les mêmes termes en 2025. En l'absence de changement climatique, les prévisions pour 2025 font état de 35% de la population mondiale touchée soit 3,5 milliards d'individus (Tableau 14).

Bien entendu, l'étude ne prend pas en compte l'évolution du contexte socio-économique qui peut jouer un rôle majeur dans l'évolution de la maladie.

	1990	2085	
		Sans changement climatique	Augmentation du taux de CO ₂ de 1% par an
Population mondiale touchée* en %	30%	35%	50-60%
Population touchée* en valeur absolue	1,5 milliards	3,5 milliards	5 à 6 milliards

Tableau 14 : Prévision de l'extension de la dengue en fonction de l'évolution du climat (d'après [16]).

*population touchée : population vivant dans des zones où le risque de transmission est > 50%.

D'un point de vue géographique, cette étude fait craindre une propagation de la dengue à l'Europe, aux USA et à l'Australie mais surtout un renforcement de l'intensité des épidémies dans les régions déjà fortement touchées .

On comprend donc aisément l'importance de la recherche d'un vaccin tant par le potentiel léthal de la maladie que par l'extension des populations touchées.

La recherche d'un vaccin s'avère indispensable. Elle repose d'abord sur une bonne connaissance des agents infectieux ainsi que sur une bonne compréhension des mécanismes de la maladie.

**II- UNE MALADIE ENCORE
IMPARFAITEMENT COMPRISE**

A- Nature des agents infectieux [2] [3] [6] [10] [13] [15] [18] [19] [20] [21] [50] [61]

Les virus de la dengue sont au nombre de quatre. Ils sont dénommés DEN-1, DEN-2, DEN-3 et DEN-4 et appartiennent tous à la famille des *Flaviviridae* du genre *Flavivirus* qui rassemble plus de 70 espèces connues. Ils sont sphériques, enveloppés et d'un diamètre de 40 à 60 nm.

L'étude de l'ensemble des virus de la famille des *Flaviviridae* a permis d'améliorer la connaissance des virus de la dengue et de leur pathogénèse ; la recherche d'un vaccin contre la dengue passe en effet par une meilleure connaissance de cette famille virale.

1) Les virus de la dengue : des *Flavivirus*

Ils sont constitués de 6 % d'ARN, 9 % de sucres, 17% de lipides et 66% de protéines pour une vitesse de sédimentation de 170 à 210 S et une densité de flottation comprise entre 1.19 et 1.23 g/mL [2].

a)Acide nucléique

Ce sont des virus à ARN monobrin de 11Kb [3]. Il est de polarité positive, sa vitesse de sédimentation est comprise entre 120 et 140 S pour une densité de flottation de 1.30 à 1.31g/mL [2].

L'ARN présente un cadre de lecture ouvert de plus de 10 000 bases qui code pour des protéines structurales et non structurales (Figure 10). L'extrémité 5' du génome est coiffée ; l'extrémité 3' est polyadénylée [50].

➤ Protéines structurales :

- Protéine C : elle correspond à la capside
- Protéine M et prM : prM (18.1 à 19.1 kDa) [18] est un précurseur glycosylé de la protéine M (7 à 9 kDa) qui correspond à la protéine de la membrane.
- Protéine E : c'est la protéine majeure d'enveloppe. C'est sur la nature de cette protéine qu'est basée la classification des sérotypes des virus de la dengue.

Ces protéines sont toutes glycosylées [19] dans le cas des virus DEN.

➤ Protéines non structurales :

Leurs rôles exacts sont encore mal connus.

- Protéine NS1 : son rôle exact est inconnu (virulence, réplication) mais elle est à l'origine de la production d'anticorps anti-NS1 et est un activateur du complément. Elle joue un rôle dans l'activation de l'immunité protectrice [2].
- Protéine NS3 : elle intervient dans la réplication de l'ARN et semblerait présenter trois fonctions de type protéase, hélicase et ARN triphosphatase [2].
- Protéine NS5 : elle semble jouer le rôle d'ARN polymérase ARN dépendante [2].

- Protéines NS2A, NS2B, NS4A et NS4B : leur rôle est à ce jour inconnu [2].

Protéines structurales	Protéines non structurales
C PrM M E	NS1 NS2a, NS2b NS3 NS4a, NS4b NS5

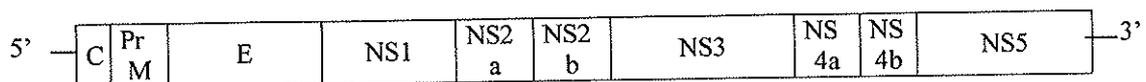


Figure 10 : Structure de l'ARN + des *Flaviviridae*

b) Capside

Elle est isocaédrique, d'un diamètre proche de 30 nm et entourée d'une bicouche lipidique. Elle est constituée de la protéine C.

c) Enveloppe

Elle est constituée des protéines E et M ancrées dans la bicouche lipidique par leur partie C-terminale. Elle confère au virus une grande sensibilité aux solvants organiques et aux détergents.

- La protéine M est présente sous la forme de précurseur prM dans les virions avant leur libération. On trouve donc la protéine prM dans les virus intracellulaires mais parfois aussi dans les virus extra-cellulaires. Les anticorps anti-prM pourraient être protecteurs.

- La protéine E semble jouer un rôle dans l'assemblage, la liaison aux récepteurs cellulaires et la fusion membranaire des virus aux cellules. Les récepteurs cellulaires seraient des héparanes sulfates de type glycosaminoglycane. La protéine E constitue la principale cible des anticorps neutralisants. Une mutation importante de cette protéine peut avoir des conséquences majeures sur la pathogenèse du virus et donc sur sa virulence.

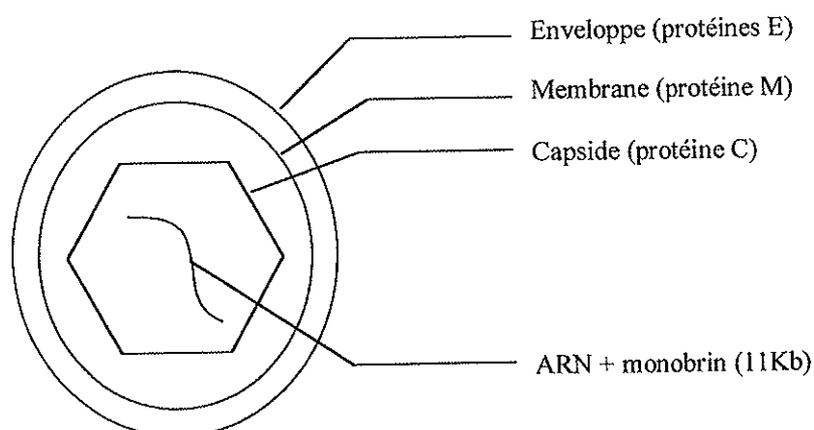


Figure 11 : Représentation schématique des virus de la dengue (*Flaviviridae*)

L'utilisation des méthodes RT-PCR (*Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*) a permis la reconnaissance de trois marqueurs génomiques dans la région codant pour la protéine E. Ils permettraient de différencier le virus TBE (*Tick Borne Encephalitis*) d'autres sérogroupes comme ceux de l'Encéphalite Japonaise ou de la dengue. L'étude des protéines E des *Flavivirus* pourrait donc servir de base à la classification de cette famille.

Par ailleurs, cette approche moléculaire a permis de comprendre les relations phylogénétiques entre les membres de la famille des *Flaviviridae*. L'ancêtre de cette famille serait le CFA (*Cell Fusion Agent*) qui passait pour être un virus rudimentaire des Insectes et pour lequel on ne connaît pas de réaction sérologique croisée avec aucun autre membre des *Flavivirus*. Ce virus a probablement émergé en Afrique Centrale il y a 7 000 à 8 000 années de cela. L'espèce s'est ensuite scindée en permettant l'expansion des virus de la famille de l'Encéphalite Japonaise vers l'Asie du sud-est et, parallèlement, l'essor de virus plus évolués tels que le virus de la Fièvre Jaune et de la dengue vers l'ouest depuis 400 à 500 ans. A l'heure actuelle, le plus évolué des *Flavivirus* semblerait avoir émergé au Royaume-Uni (virus Louping ill) il y a 200 à 300 ans [21].

Cette étude moléculaire basée sur la protéine E va permettre de surveiller l'évolution de ces virus, ainsi que leur épidémiologie au cours de leurs phases successives d'émergence et de résurgence.

L'étude du site antigénique de la protéine E présentée par F. Heinz en 1997 a permis une meilleure compréhension du virus TBE et de son interaction avec la réponse humorale. Par extension à l'ensemble des *Flavivirus*, la protéine E serait de forme allongée et recourbée, disposée parallèlement à la surface du virus [21]. Elle serait composée d'un dimère dont les sous-unités seraient organisées en 3 domaines : un domaine central N-terminal (I), un domaine de dimérisation (II) et un domaine (III) C-terminal support de la zone de liaison au domaine constant des immunoglobines.

Des études [21] menées à l'aide de tests de neutralisation ont montré que les épitopes participant à la liaison avec les anticorps sont situés sur la partie externe des protéines E au niveau de chacun des trois domaines. Ces anticorps seraient responsables de la neutralisation, de l'inhibition de l'hémagglutination et seraient sérospécifiques. Des études cristallographiques ont révélé que les épitopes étaient des structures complexes incluant des acides aminés

issus de parties différentes de la protéine E, de différents monomères voire de différents dimères : la conformation tridimensionnelle des protéines E et leur assemblage joueraient donc un rôle majeur.

La maturation de la protéine prM en protéine M serait essentielle au maintien de la conformation de la protéine E indispensable à son activité [19].

2°)Cycle de réplication

La réplication est intra-cellulaire , elle a lieu dans le cytoplasme des cellules mononucléées. L'ARN étant de polarité positive, il peut être traduit directement en protéines structurales et non structurales. Il sert également de matrice à la synthèse d'ARN de polarité négative qui servira lui-même de modèle à la synthèse de nouveaux ARN + qui pourront alors être encapsidés sous forme de virions (Figure 12).

La protéine C et l'ARN viral s'assemblent dans le cytoplasme pour former la nucléocapside tandis que les protéines E et prM sont synthétisées. La protéine prM est ensuite clivée en protéine M juste avant le relargage des virions dans le milieu extracellulaire.

La membrane d'enveloppe des virions est issue des membranes intracellulaires bourgeonnantes.

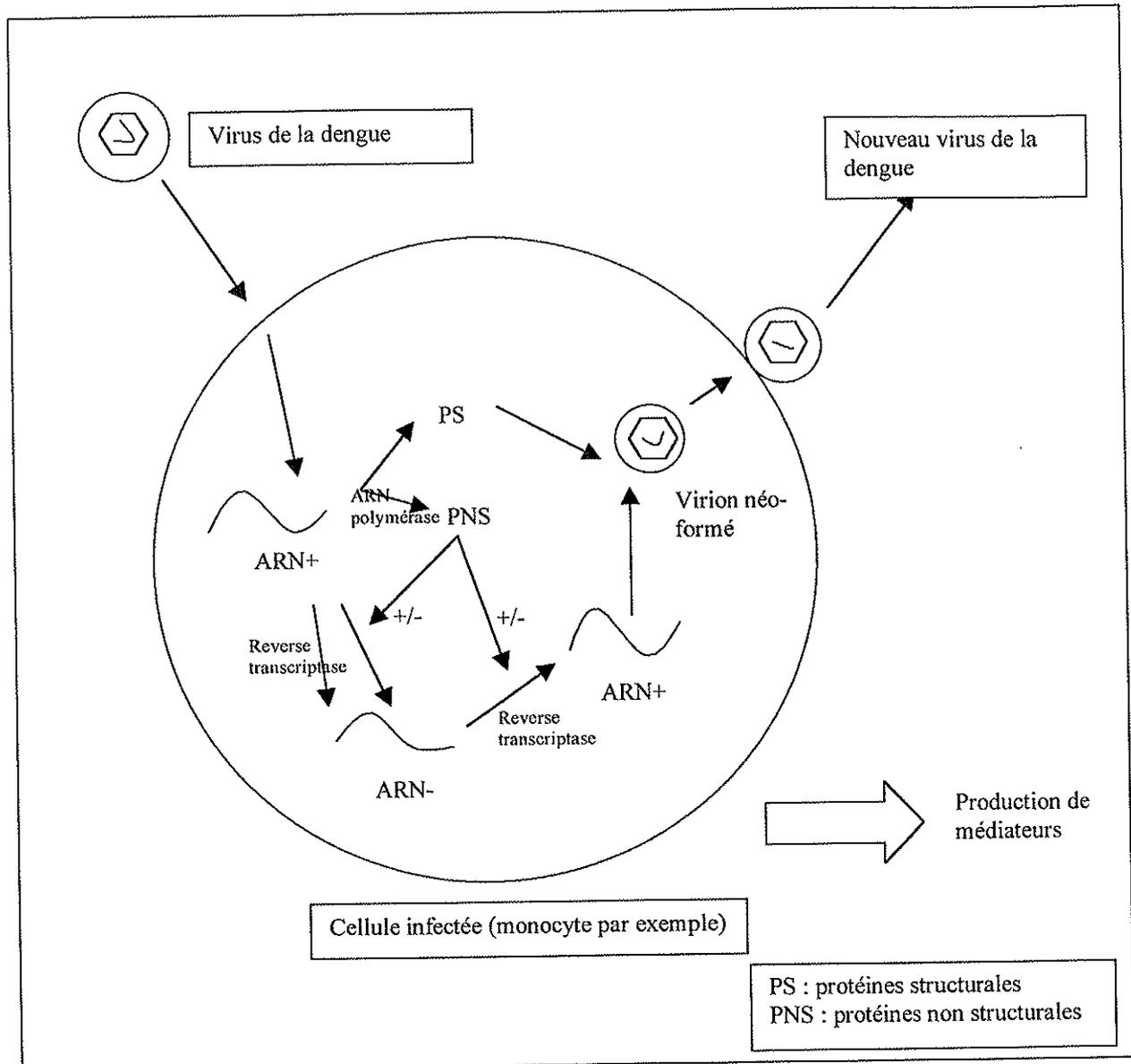


Figure 12 : Représentation schématique du cycle de réplication des virus de la dengue

3°) Sérotypes et génotypes

L'existence de quatre sérotypes différents des virus de la dengue est basée sur la nature de la protéine E. Toutefois, des relations étroites sont apparues entre les virus DEN-1 et DEN-3 d'un côté et DEN-2 et DEN-4 de l'autre.

On observe une grande homogénéité au sein des différents sérotypes mais il existe des groupes génotypiques présentant des virulences différentes. Il existe par ailleurs des souches au sein de chaque type ainsi que des variants géographiques.

Le virus DEN-2 de Thaïlande a été classé en trois sous-types [6] selon leur degré de virulence, leur génotype et leur réaction sérologique : le sous-type I est responsable de DSS en cas d'infection secondaire ; le sous-type II est responsable de DHF en cas d'infection secondaire et de DF en cas d'infection primaire ; le sous-type III est seulement responsable de DF (Tableau 15).

Sous-types	Infection primaire	Ré-infection
I	DF	DSS
II	DF	DHF
III	DF	DF

Tableau 15 : Classification des sous-types du virus DEN-2 en Thaïlande suivant leur pathogénicité.

Les virus de la dengue semblent particulièrement aptes à la micro-évolution et aux mutations, ce qui en fait un groupe assez hétérogène.

Le séquençage du génome des virus de la dengue a fait apparaître 63 à 68 % d'homologie entre les virus de la dengue mais aussi 44 à 51% entre les virus de la dengue et les virus West-Nile et de la Fièvre Jaune. De même, des relations sont apparues entre les virus de la dengue et le virus de l'Encéphalite Japonaise.

En conclusion, les virus de la dengue sont des virus semblables regroupés dans une même espèce proche des autres membres de la famille des *Flaviviridae* [2].

Encadré 2

Il existe une classification [20] au sein des différents sérotypes, basée sur la comparaison par méthode PCR d'une séquence nucléotidique d'un fragment du gène codant pour la glycoprotéine d'enveloppe E. Les divergences maximales observées ont été les suivantes : 7% pour les virus DEN-1, 20% pour DEN-2, 12% pour DEN-3 et 4,5% pour DEN-4, le seuil de significativité étant placé à 6%.

Les regroupements suivants ont alors été établis :

- DEN-1 : trois groupes génotypiques
- DEN-2 : cinq groupes génotypiques
- DEN-3 : quatre groupes génotypiques
- DEN-4 : un groupe génotypique

Actuellement, on envisage la possibilité de recombinaisons entre virus en raison des co-circulations importantes de souches virulentes et de leur aptitude à la micro-évolution [13]. Ceci pourrait donc aboutir à une augmentation du nombre de types antigéniques dans un futur proche.

B- Etude de la pathogénèse [1] [2] [3] [4] [6] [13] [18] [20] [21] [22] [23] [60]

La pathogénèse du virus de la Dengue est toujours incomplètement comprise et de nombreuses zones d'ombre persistent. Une meilleure compréhension serait pourtant indispensable à l'élaboration de thérapeutiques préventives efficaces dont la vaccination pourrait faire partie, mais aussi de thérapeutiques curatives.

L'absence de modèle animal pour reproduire la maladie constitue le principal obstacle auquel se heurte la recherche actuelle.

L'étude d'autres *Flavivirus* et notamment celle du virus TBE et de l'hépatite C pourrait permettre de mieux comprendre cette pathogénèse.

1°) Propagation du virus après la piqûre infestante

L'adhésion et la fusion du virus à la cellule impliquerait la protéine E et notamment le domaine III porteur d'un site de fusion ainsi que des récepteurs cellulaires héparane-sulfate de type glycosaminoglycane.

Les cellules infectées seraient principalement les monocytes-macrophages et les cellules réticulo-endothéliales mais aussi les cellules de Langerhans particulièrement permissives au virus, les cellules dendritiques dermiques et interstitielles [2 ;3]. L'infection *in vitro* de ces cellules a pu être réalisée [2]. Certaines cellules telles que les fibroblastes, les hépatocytes et les lymphocytes B pourraient également constituer des cibles virales. *In vitro*, des cellules vasculaires endothéliales ont pu être infectées [3].

Le foie serait un organe clef dans la propagation du virus dans l'organisme. Les antigènes viraux sont en effet détectables par immunofluorescence dans les cellules réticulo-endothéliales du foie mais également des ganglions et de la rate [2]. De plus, lors d'une DHF, on observe une nécrose des zones T spléniques ainsi qu'une nécrose hépatique centrolobulaire ou para centro-lobulaire et une hypertrophie des cellules de Küpfer, ce qui confirme l'atteinte immunitaire et hépatique.

2°) Pathogenèse de la DHF

A l'heure actuelle, aucun lien direct n'est établi entre l'intensité de la virémie et l'intensité des symptômes observés. Des méthodes de PCR quantitative devraient permettre de préciser l'existence d'un lien éventuel.

a) Etude de la pathogenèse

La DHF correspond à une fuite capillaire et à l'existence d'hémorragies spontanées liée à une thrombopénie. L'origine du tableau clinique serait liée à une augmentation de la perméabilité capillaire conduisant à une hémococoncentration, une hypovolémie, une hypoxie tissulaire, une acidose lactique et à l'éventuel choc (DSS) [2 ;3]. Un arrêt de maturation des mégacaryocytes est également observé.

Aucune action virale cytopathogène directe n'a été démontrée jusqu'à présent ; ces phénomènes sont actuellement reliés à l'action de médiateurs de type cytokines, aux propriétés vasoactives et pro-coagulantes qui seraient à l'origine de la fuite capillaire et des troubles de l'hémostase observés. Les lymphocytes T et les monocytes en seraient les principaux producteurs lors d'une DHF (Figure 13). En effet, la présence de taux élevés de récepteurs solubles CD4⁺ , CD8⁺, à l'IL2 et au TNF α chez les patients atteints de DHF montre une activation importante des lymphocytes T [22 ; 23].

Les monocytes-macrophages et les lymphocytes T joueraient un rôle primordial dans l'apparition des symptômes de la DHF [2] : les LT4 cytotoxiques, dont les réactions sont dites limitées par les HLA de type II, seraient activés par des cellules présentatrices d'antigène CPA (essentiellement des monocytes) présentant des fragments antigéniques des protéines virales, lors de la virémie. Les fragments antigéniques viraux les plus importants dans l'instauration de ces phénomènes seraient des peptides issus des protéines NS3, NS1 et E.

Les lymphocytes T4 prolifèreraient et produiraient alors des médiateurs tels que l'interféron γ , l'interleukine 2 ou le GM-CSF. Les lymphocytes T8 seraient également activés par l'intermédiaires des HLA de type I.

Lors d'une DHF, les taux de $\text{TNF}\alpha$, $\text{INF}\beta$, $\text{INF}\gamma$, IL-6, IL-2, IL-10, IL-12, C3a, C5a, MCP-1 et histamine sont augmentés et le jour du choc, le $\text{TNF}\alpha$, l'IL-6, les fragments du complément C3a et C5a atteignent des taux très élevés conduisant à la fuite capillaire. L'augmentation des taux de fragment du complément semblerait montrer une activation du système du complément par les cytokines elles-mêmes ou par l'action directe des monocytes et des cellules endothéliales sur le système du complément par les voies classiques ou alternes.

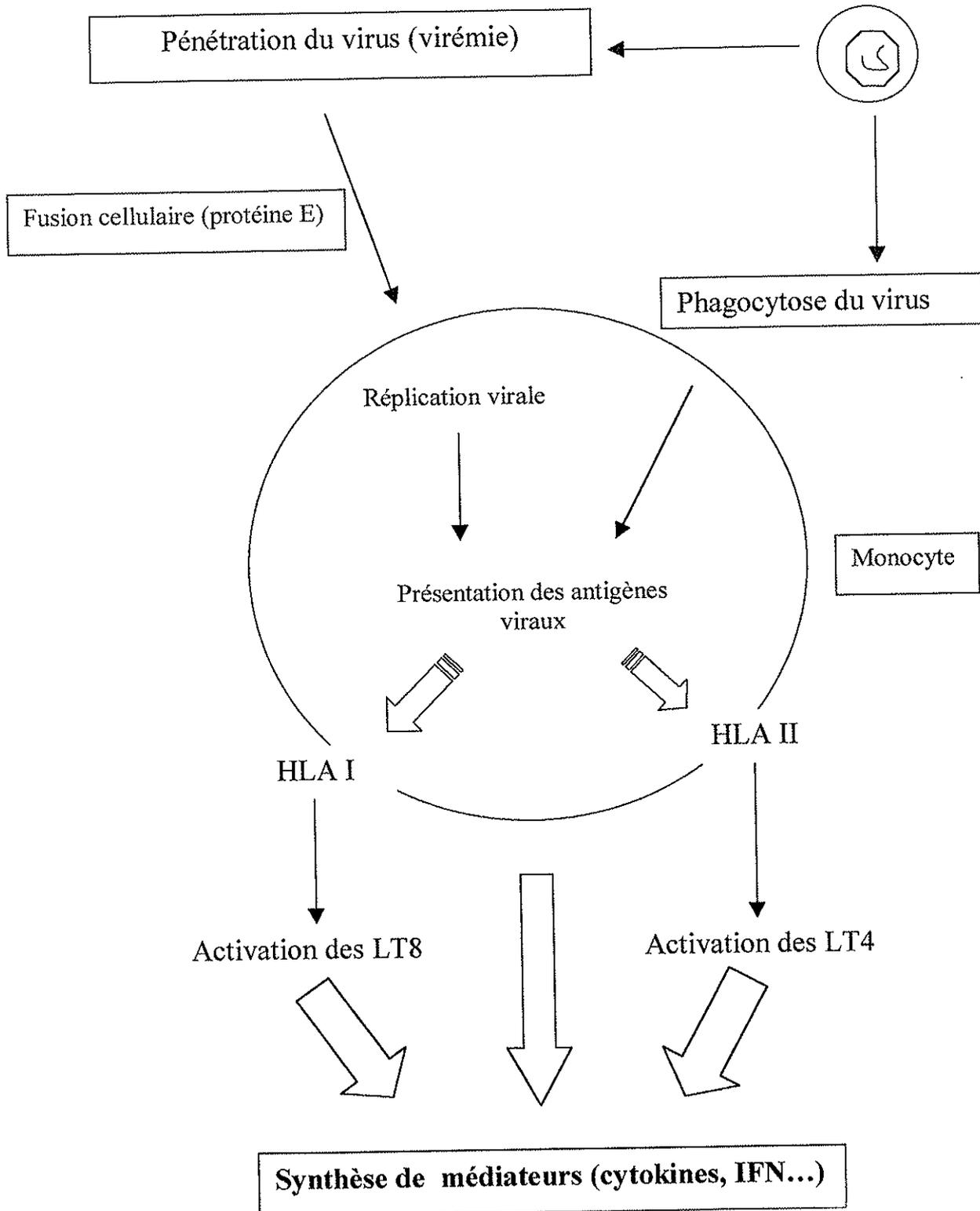


Figure 13 : Schéma simplifié de la pathogenèse du virus de la dengue

Une cytokine particulière pourrait être plus directement impliquée dans la DHF [21] : il s'agit d'un facteur cytotoxique produit par les lymphocytes T spléniques . Cette cytokine a d'abord été découverte chez des souris infectées par des virus de la dengue et appelée mCF (Mouse Cytotoxic Factor). C'est une protéine de 43 kDa produite par des lymphocytes de souris Thy1.2+ et L3T4+. Elle diffère des autres cytokines par sa séquence amino-terminale de 19 acides aminés. Du mCF recombinant a été produit. Il s'est révélé capable d'agir sur les cellules riches en histamine mais aussi de tuer certaines cellules T, des macrophages et des mégacaryocytes par l'intermédiaire de la production de nitrite et d'oxygène selon un mécanisme dépendant du calcium. Cette cytokine entraînerait l'apoptose de cellules spléniques et la libération d'histamine à l'origine des symptômes observés chez les patients atteints de DHF.

Une protéine analogue a été isolée *in vivo* chez des patients atteints de DHF ainsi que *in vitro* après mise en contact de cellules sanguines mononucléées périphériques avec le virus. Des analogies antigéniques et nucléotidiques, révélées par Western et Northern Blot, ont été établies entre le mCF et le hCF (human Cytotoxic Factor). Le hCF, administré à des souris, augmente la perméabilité capillaire et celle de la barrière hémato-encéphalique [21]. La perméabilité et l'oedème cérébral ainsi créés sont dose-dépendants. Une étude en double-aveugle menée sur 220 patients atteints de DF et DHF a montré l'existence de hCF non retrouvée chez les patients contrôles atteints d'autres pathologies. Des études complémentaires seraient nécessaires pour pouvoir attribuer à cette cytokine un intérêt dans le diagnostic ou le pronostic de la maladie.

La symptomatologie semblerait toutefois due à une action synergique de ces cytokines et non pas à une cytokine particulière. C'est l'augmentation rapide de ces médiateurs qui serait à l'origine de l'altération des fonctions capillaires et hémostatiques.

Les phénomènes hémorragiques observés seraient d'étiologie complexe ; plusieurs éléments sont à considérer [2; 6; 20]:

- Une atteinte hépatique avec modification de la synthèse des facteurs de la coagulation.
- Un relargage de procoagulants par les monocytes infectés et les cellules endothéliales activés par l'IL-2.
- Un relargage de substances inhibitrices de l'activateur du plasminogène par les monocytes ainsi que de PAF.
- Une homologie entre une séquence protéique du plasminogène et un résidu de 20 acides aminés de la protéine E des virus de la dengue pourrait également être à l'origine de la synthèse d'anticorps d'action croisée.
- Des complexes anticorps-virus ont été retrouvés à la surface des plaquettes pouvant expliquer une réaction auto-immune.
- Un effet sur l'hématopoïèse serait également envisagé avec une diminution de l'activité des progéniteurs hématopoïétiques par augmentation de MIP-1 α et mCF, conduisant à une insuffisance médullaire et donc à une thrombopénie.

Le syndrome neurologique quant à lui reste mystérieux dans son explication . Deux hypothèse sont envisagées :

- Il serait lié à une pénétration directe du virus à travers la barrière hémato-encéphalique
- Il serait secondaire à l'atteinte hépatique (œdème, hyponatrémie...)

Ce syndrome neurologique semble plus fréquent avec le sérotype DEN-2 qu'avec le sérotype DEN-3.

b) Réponse immunitaire des individus atteints

Lors d'une infection primaire, des IgM apparaissent 5 à 6 jours après l'inoculation pour disparaître en 2 à 3 mois. Ils sont suivis par l'apparition d'IgG 7 à 10 jours après contagé [6].

Lors d'une ré-infection, le taux des IgG augmente de façon très importante tandis que les IgM sont quasi-absentes.

Le diagnostic s'effectue par la détection des anticorps par méthode ELISA mais aussi par méthode de RT-PCR et culture sur cellules de moustiques. Le rapport entre les taux d'IgM et IgG permet de différencier une infection primaire d'une infection secondaire : un rapport IgM / IgG supérieur à 1.8 [60] permet d'envisager une infection primaire (Tableau 16). Toutefois, de fausses réactions de positivité sont courantes en raison d'un phénomène d'immunité croisée entre les *Flavivirus* d'une part et entre les virus de la dengue d'autre part pour lesquels il existe une immunité croisée partielle. Cette immunité croisée pourrait expliquer la rareté des

triples infections par les virus de la dengue et l'absence de quadruple infection constatée.

	Infection primaire	Infection secondaire
Rapport IgM/ IgG	>1.8	<1.8

Tableau 16 : Rapport des taux d'anticorps mesurés lors d'une infection par le virus de la dengue.

On considère un cas comme certain si les méthodes directes (cultures cellulaires ou RT/PCR) ou indirectes (multiplication du taux d'anticorps IgG par 4 entre deux prélèvements) sont positives. Un cas est considéré comme probable lorsque seul le test IgM est positif [60 ; 4].

Encadré 3

L'étude des anticorps par Western-Blot a permis de détecter leur spécificité: ils semblent essentiellement dirigés contre les protéines E, NS3 et NS5, les anticorps anti-E étant apparemment les plus neutralisants.

Deux hypothèses existent pour expliquer l'action neutralisante des anticorps : la première envisage une action sur les domaines I et II de la protéine E, empêchant ainsi la dissociation et la réorganisation en trimères des protéines E observée en pH acide et aboutissant à l'exposition du peptide activateur de la fusion cellulaire ; La deuxième envisage une interaction avec le domaine III porteur d'un site impliqué dans l'adhésion et la pénétration cellulaire.

Cependant, la réponse immunitaire lors d'une infection par l'un des virus de la dengue est encore très mal comprise.

c) Les facteurs de risque : l'hypothèse mixte de la virulence et de la surinfection

La principale interrogation concernant la dengue est venue de l'étude épidémiologique . On constate en effet que la DHF est un aspect de la maladie plus rare lors d'une primo-infection que lors de ré-infection. Ainsi, dans 90% des cas de DHF, l'existence d'une infection préalable par un sérotype différent a été mise en évidence: l'infection préalable semble donc être un facteur de risque à l'apparition d'une DHF. De même, en Thaïlande, chez les jeunes de 1 à 14 ans, on observe un taux de DHF de 31 ‰ et de DSS de 11 ‰ dans des cas d'infections secondaires alors que ces mêmes taux sont de 1,9 et 0,07 ‰ en cas d'infection primaire. (Tableau 17) [2].

De plus, la DHF est une maladie de l'enfance en Asie touchant principalement les enfants de moins de 1 an et ceux âgés de 3 à 5 ans.

Par ailleurs, on note des divergences géographiques, la fréquence de survenue de DHF n'étant pas identique en Amérique et en Asie.

C'est pour tenter de répondre à ces observations et aux questions qu'elles soulèvent que plusieurs hypothèses ont été émises.

	DHF	DSS
Primo-infections	1.9‰	0.07‰
Ré-infections	31‰	11‰

Tableau 17 : Comparaison du pourcentage de cas de DHF et DSS en fonction du statut immunitaire des patients parmi l'ensemble des cas de dengue (symptomatique ou non) en Thaïlande (d'après [2]).

➤ L'hypothèse immunologique

Cette hypothèse a été envisagée dans les années soixante par Halstead, Kurane et Ennis [2 ;20]. Elle a abouti au concept de l'ADE (Antibody Dependent Enhancement ou « facilitation de l'infection dépendante des anticorps »). La présence d'anticorps de spécificité croisée et non neutralisants liée à une infection antérieure (DF ou dengue asymptomatique) à sérotype différent faciliterait la réplication du nouveau sérotype viral au sein des monocytes. Les complexes immuns infectieux formés seraient d'une part à l'origine de l'activation du complément, et d'autre part se fixeraient plus facilement sur les monocytes par l'intermédiaire des récepteurs Fc γ R présents sur leur surface. L'internalisation des virus se verrait ainsi grandement facilitée. Le nombre de cellules infectées serait donc plus important et le nombre de cellules productrices de cytokines également. Les LT4 à mémoire contribueraient également à ce phénomène en produisant l'IFN γ responsable de l'augmentation de l'expression des Fc γ R et des molécules HLA.

L'augmentation très importante du taux des cytokines qui en résulterait serait alors responsable de l'apparition de la DHF (Figure 18).

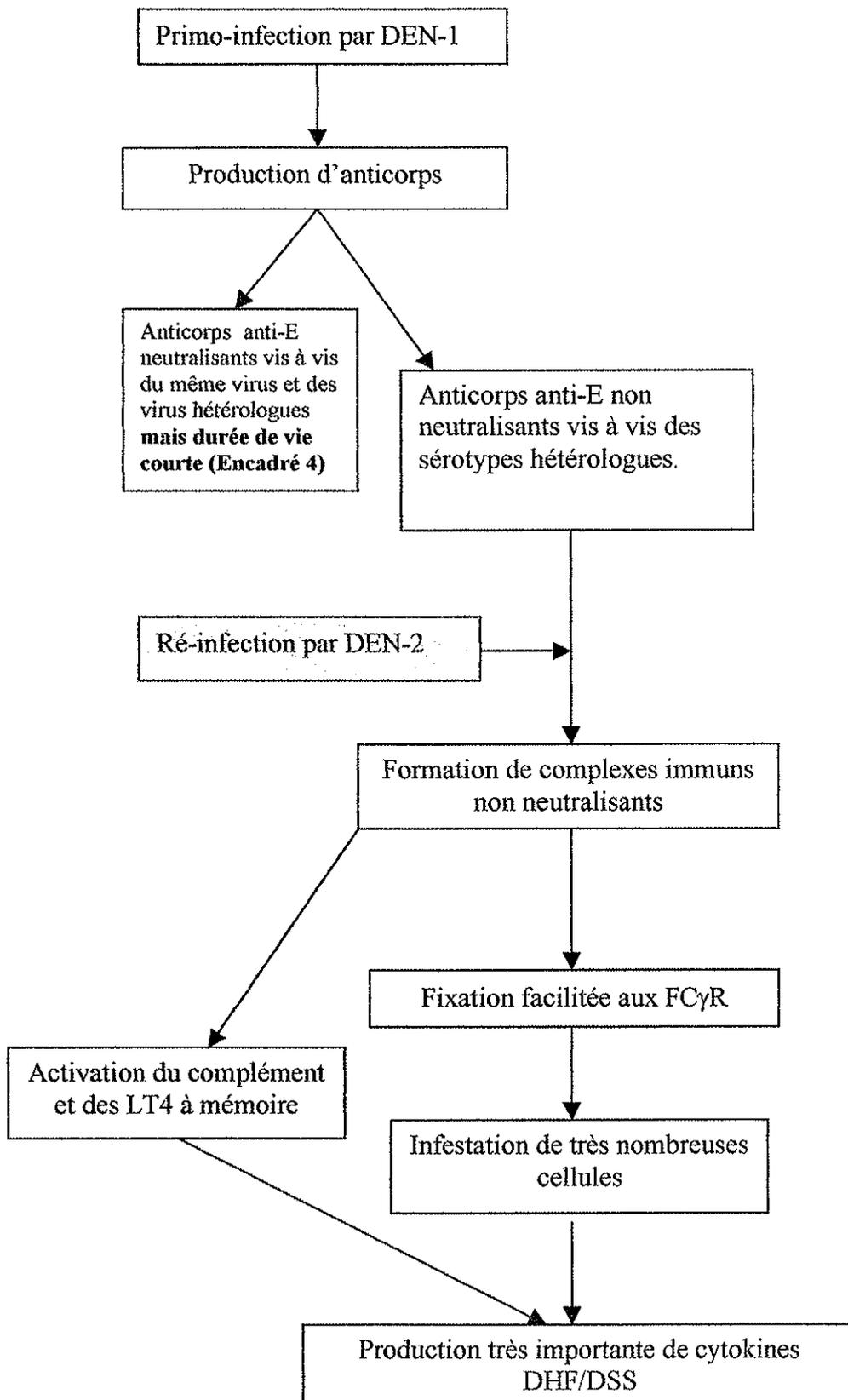


Figure 18 : Présentation schématique de l'ADE (Antibody Dependent Enhancement) dans le cas d'une ré-infection par DEN-2 sur un terrain de DEN-1

Certains anticorps anti-E apparus au cours de la primo-infection seraient neutralisants vis à vis de tous les sérotypes des virus de la dengue. Ils ont cependant une durée de vie très courte ne conférant qu'une immunité fugace ne pouvant que rarement protéger de réinfections.

Encadré 4

La réplication plus intense des virus lors d'une réinfection à sérotype différent a été démontrée *in vivo* sur des primates: le titre de protéine NS1 dans les sérums d'animaux est beaucoup plus élevé en cas de surinfection que lors d'une primo-infection [2]. L'hypothèse de l'Antibody Dependant Enhancement (ADE) permettrait de comprendre ce phénomène mais il n'a encore jamais été démontré *in vivo*.

De même, l'existence de DHF chez des enfants de moins de un an s'expliquerait par la présence d'anticorps maternels à l'origine d'un phénomène d'ADE sans primo-infection. Enfin, on remarque que les cas de DHF observés à Cuba en 1981 sont survenus essentiellement chez des personnes précédemment infectées par le virus DEN-1. En Thaïlande, une étude a montré que 90% des personnes présentant une DHF possédaient des anticorps hétérologues [2].

➤ L'hypothèse de la virulence

Cette hypothèse est défendue par Léon Rosen depuis les années 1970 et tend à être confortée par l'étude moléculaire [20]: elle est basée sur l'observation d'une augmentation de l'incidence des DHF au cours d'une même épidémie. Cette virulence impliquerait des facteurs intrinsèques au virus mais aussi des facteurs liés à l'hôte.

Certains virus n'entraîneraient que rarement des DHF tandis que d'autres seraient particulièrement virulents. Selon Rico-Hesse, la

virulence résiderait dans l'acide aminé 390 de la protéine E [3]. De même, il existerait des substitutions d'acides aminés au sein des protéines prM, NS1, NS2a, NS3 et NS5.

L'acide aminé 126 de la protéine E pourrait aussi jouer un rôle dans la neurovirulence des virus de la dengue: ainsi, un clone du virus DEN-2 a été développé par P. Wright (Australie) à partir de la souche C de Nouvelle-Guinée et de la souche PUO-218 issue d'un patient asymptomatique de Bangkok en 1980. L'inoculation de la souche C de Nouvelle-Guinée entraîne une mortalité importante lors de test de neurovirulence chez la souris tandis que le clone est étonnamment atténué, ressemblant en cela à la souche PUO-218 [21]. La seule substitution de l'acide aminé 126 (Glu) de la protéine E par de la Lysine serait responsable de la virulence du virus C de Nouvelle-Guinée. Cet acide aminé est situé dans le domaine de dimérisation à l'interface des domaines I et II et à proximité des acides aminés responsables du changement conformationnel dépendant du pH. Les virus asiatiques seraient ainsi très virulents: en effet, l'épidémie de DHF à Cuba en 1981 coïncide avec l'introduction d'une souche de DEN-2 issue d'Asie du sud-est, génotypiquement différente du virus DEN-2 américain présent antérieurement. Son introduction a conduit à l'émergence de DHF dans plusieurs pays d'Amérique du Sud tandis que le virus DEN-2 américain n'avait jamais provoqué que des DF [3] (Encadré 5).

Outre les facteurs viraux de virulence, les facteurs liés à l'hôte pourraient également expliquer en partie les observations (Tableau 19) : le DSS serait plus fréquent chez les individus de sexe féminin que masculin ; les individus de race blanche ont été moins touchés que les individus de race noire lors de l'épidémie cubaine de 1981 [2].

De plus, la malnutrition jouerait un rôle protecteur : en affaiblissant le système immunitaire, elle empêcherait le

développement d'une réponse immunitaire vigoureuse nécessaire à l'apparition d'une DHF.

Une étude prospective de D Watts menée en 1990 sur le peuple Inquitos du Pérou a montré une différence significative de sévérité entre les ré-infections liées aux souches américaines et asiatiques [13]. Il a comparé son étude à une autre étude prospective de Rayong (Thaïlande) menée en 1980 qui montrait que un écolier sur 5 subissait une DHF par ré-infection liée au virus DEN-2 sur un terrain de DEN-1. Chez les Inquitos, 1965 coïncide avec l'arrivée du sérotype DEN-1 et en 1990 survient une épidémie de DEN-2 ; aucun cas sévère de dengue sur 50 000 écoliers infectés n'est cependant constaté. La souche DEN-2 américaine serait donc moins virulente que la souche asiatique.

Encadré 5

Les groupes HLA pourraient avoir un rôle majeur dans le développement ou non de DHF : certains groupes HLA seraient plus touchés que d'autres (cas des HLA de classe I : HLA-B, A1, Cw1 particulièrement touchés à Cuba ; HLA-A2 et B en Thaïlande). Le groupe HLA-DRB1*04 (HLA de type II) serait quant à lui protecteur : une étude [22] semble montrer que les personnes homozygotes pour DRB1*04 sont moins susceptibles de développer une DHF que les sujets DRB1*04 négatifs. Les groupes HLA pourraient, selon leur spécificité de présentation des antigènes, être plus ou moins inducteurs de fortes réactions immunitaires, celles-ci étant délétères dans le cas de la dengue.

Facteurs de virulence liés à l'hôte (facteurs génétiques)
Sexe
Age
Groupe HLA
« Race »
Etat général
Nutrition

Tableau 19 : Facteurs de virulence liés à l'hôte

En fait, les deux facteurs, virulence du virus et terrain constitué par l'hôte, sont vraisemblablement imbriqués dans l'apparition des cas de DHF/DSS et seraient favorisés par les phénomènes d'hyperendémicité (Figure 19) :

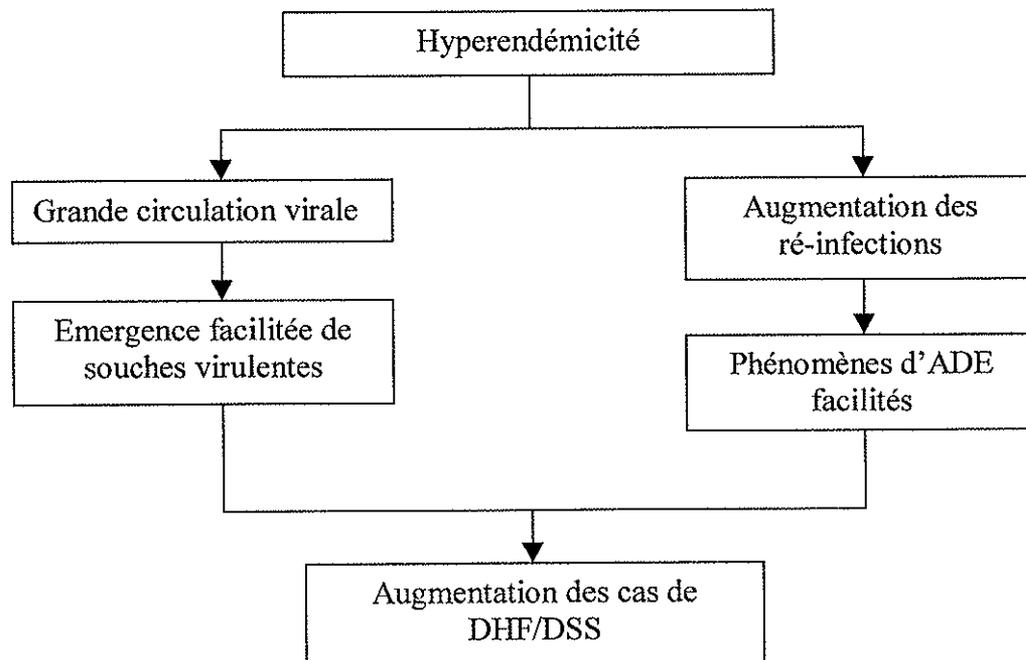


Figure 19 : L'hyperendémicité est, avec la résurgence du vecteur et l'urbanisation croissante, une des causes de l'augmentation de l'incidence des cas de DHF/DSS depuis les dix dernières années. [1]

Cette divergence d'hypothèse relative à la pathogénicité pourrait sembler superflue si elle n'entraînait pas de conséquences sur la stratégie vaccinale à adopter: en effet, l'hypothèse immunologique imposerait l'obtention d'un vaccin tétravalent pour protéger de toute ré-infection; tandis que l'hypothèse de la virulence autoriserait l'utilisation de vaccins monovalents.

Malgré les progrès réalisés ces dernières années, de nombreuses questions concernant la pathogénèse de la dengue restent aujourd'hui encore sans réponse:

- Comment le virus se propage-t-il après la piqûre?
- Quel est le rôle exact des cellules immunitaires dans la propagation virale?
- Les cellules endothéliales sont-elles infectées *in vivo*?
- Quels sont les récepteurs cellulaires nécessaires à la pénétration des virus?
- Quels sont les rôles exacts des protéines non structurales du virus?
- Quels sont les anticorps neutralisants? Comment agissent-ils?
- Quel est le rôle des lymphocytes dans l'immunité protectrice?
- Quelles sont les mutations responsables de la virulence virale?

Autant de questions auxquelles les chercheurs sont confrontés et dont les réponses pourraient influencer la recherche vaccinale actuelle.

III- LA STRATEGIE D'UN VACCIN

En l'absence de traitement spécifique, la recherche vaccinale a été une priorité dès la fin de la seconde guerre mondiale.

Il ne s'agit pas ici d'effectuer un inventaire exhaustif de toutes les publications relatives à ce sujet. L'objet de cette dernière partie est de donner une vision globale des différentes pistes de recherche exploitées à l'heure actuelle et ayant fait l'objet de publications.

Au delà des nombreuses difficultés posées par l'existence d'un vaccin aussi bien en termes scientifiques qu'économiques, de nombreux problèmes sont apparus lors des recherches de vaccins efficaces et bien tolérés. De nombreuses stratégies vaccinales sont actuellement à l'étude.

Rappelons que deux vaccins déjà sont mis sur le marché pour lutter contre des *Flavivirus* : le vaccin contre la Fièvre Jaune ou vaccin amaril (YF 17D) et le vaccin contre l'Encéphalite Japonaise (JE SA-14-14-2). Ils laissent un espoir non négligeable de développer prochainement des vaccins contre la dengue.

A- Problèmes généraux liés à l'utilisation d'un vaccin contre la Dengue. [11] [14] [25]

1-Problèmes scientifiques

De nombreuses questions restent aujourd'hui sans réponse et l'absence de modèle animal fiable reste l'obstacle majeur au développement vaccinal. Actuellement, la souris âgée de moins de 6 semaines (plus sensible au virus) et les singes *Rhésus* et *Aotus* sont les modèles les plus utilisés. Il ne présentent pas de forme clinique de la maladie mais présentent une virémie suite à l'inoculation du virus.

D'autre part, les marqueurs de l'immunisation ne sont pas tous bien cernés aujourd'hui et la pathogenèse reste incomplètement comprise. De

nombreuses stratégies vaccinales sont envisagées possédant chacune leurs propres avantages et inconvénients.

A l'heure actuelle, la recherche est basée sur les vaccins de première génération comme les vaccins vivants atténués, les plus aboutis, actuellement en phase 2 et 3 de mise sur le marché, et les vaccins inactivés. Les vaccins de deuxième génération (à sous-unités et vivants chimériques), et les vaccins de troisième génération (vaccin à ADN nu) sont prometteurs mais encore mal connus.

Quoiqu'il en soit, le consensus actuel veut que la base vaccinale soit tétravalente afin d'assurer une immunité croisée et d'éviter ainsi tout phénomène d'Antibody Dependant Enhancement (ADE) à l'origine des formes graves de la maladie (DHF/DSS). Une vaccination monovalente aurait pu protéger contre les autres sérotypes par l'intermédiaire de l'immunité cellulaire mais une étude menée (Encadré 4) sur un volontaire après une vaccination par un vaccin vivant atténué contre le virus DEN-1 a rapidement montré que les lymphocytes T CD4 stimulés étaient eux aussi essentiellement sérospécifiques. En l'absence de toute immunité croisée, l'élaboration d'un vaccin multivalent semble donc réellement indispensable.

Les résultats de l'étude [25] montraient la présence, après vaccination contre le virus DEN-1, de :

- une cellule sur 1686 cellules sanguines périphériques mononucléées (CSPMN) spécifiques à DEN-1
 - une cellule sur 9870 CSPMN spécifiques à DEN-3
 - une cellule sur 14053 CSPMN spécifiques à DEN-2
 - une cellule sur 17690 CSPMN spécifiques à DEN-4
- et sur 17 lymphocytes CD4 spécifiques à DEN-1, 13 étaient strictement spécifiques et 4 étaient croisés avec DEN-1 et DEN-3

En conclusion, même au delà du phénomène d'ADE, un vaccin multivalent a donc semblé nécessaire à l'établissement d'une immunité croisée.

Encadré 6

2-Problèmes économiques

Ces problèmes sont d'une grande actualité : les projets de recherche sont généralement soutenus par l'OMS et des investisseurs privés tels que Aventis Pasteur, Acambis, GlaxoSmithKline, Novartis, Bavarian Biotech, Maxy Gen et Pan Bio [14]. Ceux-ci investissent dans le secteur Recherche et Développement et plus particulièrement dans la recherche vaccinale, à la hauteur de 2 à 4 millions de dollars par an (chiffres de l'an 2000).

Des projections économiques [11] ont été réalisées montrant un intérêt partagé (investisseur-patient-état) du vaccin chez les enfants pour un coût de 5 \$ par dose soit une économie globale de 389\$ par année et par tête pour un revenu de 123 millions de dollars par an pour les investisseurs privés.

B- Vaccins de première génération : bientôt sur le marché ? [11] [21] [25] [26] [27] [28] [29] [30] [31] [32] [33] [34] [35] [37] [60]

Les vaccins de première génération comprennent les vaccins vivants atténués et les vaccins inactivés.

1-Vaccins vivants atténués

Deux vaccins sont actuellement à l'étude :

- le vaccin Aventis Pasteur (AvP) développé à l'Université de Mahidol (Bangkok, Thaïlande), en phase III de mise sur le marché ;
- et le vaccin GlaxoSmithKline (GSK) développé par le Walter Reed Army Institute of Research, des essais de phase I et II étant prévus pour 2002-2003.

L'utilisation de ces vaccins vivants atténués présente théoriquement de nombreux avantages, non spécifiques aux virus de la dengue : la multiplication des virus dans l'organisme de l'hôte stimule à la fois l'immunité humorale et cellulaire, la stimulation se fait contre de nombreux antigènes, pour un coût peu élevé, une injection pouvant suffire à établir une immunité.

Cependant, leur utilisation n'est pas sans danger et nécessite des précautions importantes.

a) Atténuation des souches

Les virus vivants doivent être atténués de sorte qu'ils ne soient pas pathogènes tout en restant immunogènes.

Les premiers essais d'atténuation par passages répétés dans des cerveaux de souris ou dans des embryons de poulet ont été abandonnés suite à l'observation d'une neurovirulence accrue et de la crainte de contamination lié au tissu cérébral utilisé.

Le principe adopté actuellement [21] repose sur le passage successif des virus de la dengue sur des cellules diploïdes de rein de chiens exempts de toute contamination humaine ou canine. Selon l'hypothèse de Sabin et Schlessinger établie en 1945, le nombre de virions pathogènes diminue tandis que le nombre de virions atténués non pathogènes augmente, leurs propriétés immunogènes étant conservées [32].

Les premiers vaccins monovalents ont été développés dès 1981. Ces souches atténuées ont été produites dans des conditions strictes basées sur les exigences de la US FDA Safety Requirements de 1981 et incluant le test de neurovirulence chez les *Macaca mulatta* et *Macaca fascicularis* ainsi que l'absence de phénomène de réversion après passage chez l'homme et le moustique. Toutefois, la prudence est encore de mise [26] car les marqueurs d'atténuation restent

essentiellement empiriques et les critères retenus (existence de petites colonies lors de la mise en culture sur cellule Véro, sensibilité à la chaleur et virémie réduite lors de l'inoculation aux Singes) ne semblent pas toujours être des témoins formels d'innocuité .

Pour le vaccin AvP, des souches des quatre virus sont testées depuis 1985 à l'Université de Mahidol (Thaïlande). Les virus DEN 1, 2 et 4 sont atténués par passages successifs (respectivement 13, 53 et 48 passages) sur des cellules primaires rénales de chien (cellules PDK ou Primary Dog Kidney cells) tandis que le virus DEN-3 est atténué par 30 passages successifs dans des cellules rénales primaires de singe vert africain (cellules PGMK) puis 3 passages dans des cellules foetales pulmonaires de singes Rhésus .

Les premiers vaccins monovalents développés à partir de ces souches atténuées ont été testés dès les années 1985-1990. Ils ont montré une bonne tolérance et une bonne immunogénicité dans les diverses populations étudiées [27]. Le vaccin monovalent le plus étudié a été le vaccin DEN-2 PDK 53 (Encadré 7), bien toléré et à l'origine d'une immunité durable supérieure à deux ans et spécifique, rarement croisée, dans des populations variées.

Le vaccin tétravalent AvP obtenu est issu du mélange des quatre souches atténuées monovalentes suivantes [54]:

- DEN-1 PDK 13 (souche 16 007)
- DEN-2 PDK 53 (souche 16 681)
- DEN-3 PGMK 30/ F3 (souche 16 562)
- DEN-4 PDK 48 (souche 1 036)

Isolée à Bangkok en 1964 chez un patient atteint de DHF, la souche 16 681 du virus DEN-2 est incluse dans les vaccins vivants atténués actuellement en développement. Le virus a été passé sur des cellules BSC-1 puis 6 fois sur des cellules LLC-MK2, dans un Singe macaque Rhésus puis deux fois dans un moustique *Toxorhynchites amboinensis*. La souche atténuée du vaccin AvP a ensuite été passée 53 fois consécutives sur des cellules PDK. Le vaccin a été produit en 1983 et congelé à -20°C . Autorisé par l'US Army Medical Research and Materials Command, les tests ont d'abord été débutés aux USA.

Encadré 7 : A propos de la souche DEN-2 inclus dans le vaccin vivant atténué AvP [27].

Le vaccin du Walter Reed Institute possède une formulation différente. Il diffère du précédent par la méthode d'atténuation de la souche DEN-3 (passage sur cellules rénales de chien) et le nombre de passages effectués pour les différents sérotypes. Sa formule est la suivante :

-DEN-1 PDK 20
-DEN-2 PDK 50
-DEN-3 PDK 20
-DEN-4 PDK 20

En 1997, le génome du virus vaccinal DEN-2 PDK 53 a été comparé [28] à celui du virus d'origine DEN-2 16 681. Neuf nucléotides diffèrent entre ces deux virus. Ils pourraient expliquer la virulence atténuée théorique de la souche vaccinale. Une mutation du nucléotide 57 dans la partie 5' non codante de l'ARN, trois mutations silencieuses et cinq mutations au niveau des nucléotides prM-29, NS1-53, NS2a-181, NS3-250 et NS4a-75 ont été recensées (Tableau 20).

Au cours de la recherche d'autres critères d'atténuation de la souche virale, une corrélation a été établie entre les délétions situées dans la partie 3' de la région non transcrite et une atténuation virale. Cette corrélation est prometteuse, sachant qu'une délétion importante du génome viral diminuerait de façon encore plus importante les risques de virulence des souches vaccinales atténuées.

	Souche sauvage (16 681)	Souche atténuée (PDK-53)
PrM-29	Asp	Val
NS1-53	Gly	Asp
NS2a-181	Leu	Phe
NS3-250	Glu	Val
NS4a-75S	Gly	Ala

Tableau 20: Mutations observées au niveau des nucléotides de l'ARN+ entre la souche vaccinale sauvage et son homologue atténué DEN-2 PDK53 (d'après [28]).

L'inocuité de ces vaccins vivants atténués a pu être montrée au cours d'essais menés chez des adultes volontaires puisqu'aucun cas de dengue n'est apparu suite à une vaccination. Cependant, le nombre de personnes soumises aux tests ne permet peut-être pas d'affirmer une véritable atténuation du vaccin puisque la proportion de formes cliniquement significatives (DF/DHF) serait également faible en cas d'utilisation de souches non atténuées. Un vaccin de ce type, appliqué à une population plus vaste, pourrait être à l'origine de cas de DF et DHF. Seule l'utilisation de ces vaccins à grande échelle pourrait permettre d'évoquer une véritable innocuité.

b- Absence de transmissions contaminantes

La vaccination par un virus vivant atténué rend possible une contamination virale des vecteurs et par conséquent des humains. Le virus doit donc être atténué mais également d'une grande stabilité, afin d'éviter la transmission de souches mutantes virulentes réversées.

Une étude [29] a été menée sur la capacité d'infection, de dissémination et de réplication des virus DEN-1 PDK 13, DEN-1 Ib1 et DEN-1 Ib10 (ses homologues issus de personnes vaccinées), DEN-3 PGMK 30/ F3 et DEN-4 PDK 48 chez *Aedes aegypti* par voie orale.

Le taux d'infection et de dissémination s'est avéré plus faible pour les souches vaccinales que pour les virus sauvages. La transmissibilité est plus faible pour DEN-1 Ib1, Ib10 et DEN-3 PGMK 30/ F3 que pour les autres virus sauvages et inconnue pour DEN-4 PDK 48 en l'absence de toute dissémination. Le taux de réplication est également inférieur. Cette étude tend à prouver que les souches virales sont sûres et peu transmissibles. De plus, les marqueurs d'atténuation sont restés stables après passage par les moustiques et après un passage successif homme-moustique.

Une autre étude [30] a été menée sur le risque de transmission des virus du vaccin développé par GlaxoSmithKline : 21 volontaires ont reçu une injection de l'un des quatre vaccins monovalents. Plusieurs centaines d'*Aedes aegypti* et d'*Aedes albopictus* ont pu effectuer un repas sanguin sur ces individus. Des techniques d'immunofluorescence directe ont ensuite été utilisées pour détecter la présence d'antigènes viraux dans les têtes des moustiques. Les résultats positifs ont ensuite été confirmés par culture sur cellules Véro. Au final, seuls quatre moustiques sur 247 ont été infectés chez les personnes vaccinées par le vaccin monovalent contre DEN-1 et deux sur 528 chez les personnes

vaccinées par le vaccin monovalent contre DEN-2. Aucun des 1 252 moustiques mis en présence des personnes vaccinées contre DEN-3 et aucun des 969 autres mis en contact avec les personnes vaccinées contre DEN-4 n'a été infecté.

Les taux de dissémination se sont élevés à 0.5% pour DEN-1 et 0.3% pour DEN-2. Les risques de transmission de ces souches atténuées en milieu naturel semblent donc très limités.

c- Tolérance et immunogénicité

Les vaccins vivants contre la dengue provoquent une immunité humorale et cellulaire comparable à celle d'une infection naturelle.

On détaillera ici l'étude menée aux USA [31] relative aux vaccins AvP publiée en 2001. Cette étude randomisée et en double aveugle a permis d'étudier l'impact d'une vaccination mono- ou tétravalente chez 40 volontaires âgés de 18 à 50 ans sur une période de 6 mois.

Les 40 volontaires ont été répartis comme précisé dans le tableau 21 :

Vaccins utilisés	Effectifs
DEN-1 PDK 13	5
DEN-2 PDK 53	5
DEN-3 GMK 30/ F3	5
DEN-4 PDK 48	5
DEN-1,-2,-3,-4 (mélange des vaccin monovalents)	10
Placebo	10

Tableau 21 : Répartition des volontaires de l'étude [31].

Les maladies (chroniques ou aiguës), la pré-existence d'anticorps anti-*Flavivirus*, les examens biologiques anormaux et les femmes enceintes constituaient des facteurs d'exclusion.

Ces vaccins ou placebo ont été administrés en sous-cutané à raison de 3.6 à 4.4 log₁₀ unités formant colonie (UFC).

Les résultats ont montré que les vaccins monovalents sont globalement bien tolérés (fièvre, maux de tête peu sévères), contrairement au vaccin tétravalent plus réactogène. En effet, les sujets vaccinés par le vaccin tétravalent ont présenté un taux significativement plus élevé *versus* placebo de malaise, céphalées (100% des patients), douleurs oculaires, prurit (90% des patients), rash (100% des patients) et leucopénie. Aucun cas de DF tel que défini dans le protocole de l'étude (à savoir : céphalées et myalgie plus un symptôme parmi : douleurs rétro-orbitales, arthralgies, frissons, malaise, fatigue, anorexie, nausées, douleurs abdominales, rash pendant plus de 5 à 6 jours et l'un des signes biologiques suivants : leuco- ou thrombopénie ou augmentation des enzymes hépatiques (ALAT ou ASAT)) n'est apparu. Toutefois, un cas parmi les personnes vaccinées à l'aide du vaccin tétravalent s'en est sensiblement rapproché.

Du point de vue immunologique, tous les patients vaccinés à l'aide des vaccins DEN-3, -4 et tétravalent ont présenté une virémie, contrairement aux patients vaccinés à l'aide des vaccins DEN-1 ou DEN-2 où elle a été rare.

Tous les patients vaccinés contre DEN-2, ou -3, ou -4 et 60% des vaccinés contre DEN-1 ont développé des anticorps neutralisants et/ ou des IgM.

Tous les sujets vaccinés par le vaccin tétravalent ont présenté une virémie à DEN-3 et ont développé des anticorps anti-DEN-3 (Tableau 22).

Les résultats sont rassemblés dans le tableau suivant :

	Vaccin DEN-1	Vaccin DEN-2	Vaccin DEN-3	Vaccin DEN-4	Vaccin tétravalent
Tolérance	+	++	+	+	-
Virémie (détection par RT/PCR)	rare	rare	+	+	+(DEN-3)
Taux de séroconversion	Ac anti-1	60%			70%
	Ac anti-2		100%		20%
	Ac anti-3			100%	100%
	Ac anti-4			100%	10%

Tableau 22 : Tableau récapitulatif des résultats de l'étude.

L'étude permet d'affirmer que les vaccins monovalents sont les mieux tolérés et permettent une persistance des anticorps neutralisants pendant au moins 6 mois chez 89% des répondeurs. Le vaccin tétravalent AvP protège contre le virus DEN-3 avec une virémie constante. L'absence d'autre virémie chez les patients vaccinés par le vaccin tétravalent pourrait s'expliquer par un phénomène de compétition entre les virus vis à vis de leur cible cellulaire à priori identique, le virus DEN-3 étant alors le plus actif. Ce phénomène n'a toutefois pas pu être démontré *in vitro*.

Le taux de séroconversion est faible envers les virus DEN-2 et DEN-4 mais supérieur pour DEN-1 comparé au vaccin monovalent correspondant.

Ces résultats pourraient être liés aux doses utilisées car une étude menée en Thaïlande et publiée en l'an 2000 [32] montrait quant à elle une séroconversion totale tant pour les vaccins monovalents que bivalents et trivalents avec un maintien des anticorps neutralisants

pendant 2 ans. Dans cette étude, le vaccin tétravalent avait été administré à 6 sujets indemnes. Quatre avaient développé des anticorps contre tous les sérotypes, deux contre les sérotypes 1, 2 et 3, les anticorps anti-2 n'ayant plus été détectés après 60 et 180 jours. Cette étude montrait la moindre efficacité du vaccin tétravalent par rapport aux formes monovalentes, mais les résultats étaient toutefois meilleurs que ceux de l'étude précédemment décrite. Cependant, dans cette étude, les doses de DEN-2 PDK 53 étaient 79 fois moindre et les doses de DEN-4 PDK 48 16 fois moindre.

Par ailleurs, l'étude de la stimulation de l'immunité cellulaire par le vaccin AvP a montré [33] l'induction d'une réponse des cellules LTCD4+ et CD8+ chez de nombreux patients. La réponse des LTCD4+ semble être majoritairement de type 1 au vu des cytokines produites lors des expériences *in vitro*. La production d'anticorps neutralisants s'est avérée très significativement liée à l'intensité de la réponse cellulaire. La capacité du vaccin à induire une réponse mixte des cellules LT4 et LT8 permet de penser qu'une immunité à long terme peut être envisagée avec ce vaccin. Cependant, la réponse cellulaire ne semble pas là non plus être dirigée de façon équivalente envers les différents sérotypes vaccinaux, ceci pouvant être lié aux proportions virales du vaccin AvP.

Les souches semblant stables et immunogènes, la recherche doit donc désormais se diriger vers l'obtention de proportions optimales des souches vaccinales. Une étude de 2002 [34] fait mention d'essais de sept formulations différentes versus placebo chez 59 Thaïlandais séronégatifs envers les *Flavivirus*. Après une injection, 58% des patients ont présenté une séroconversion contre 3 ou 4 sérotypes, 35% contre les quatre sérotypes; après la dose de rappel, ces mêmes proportions ont été respectivement de 76 et 71%. Les rappels vaccinaux sembleraient constituer une stratégie à envisager.

d- Rôle de l'état immunitaire au moment de la vaccination.

Des réponses immunitaires croisées entre *Flavivirus* permettent d'envisager l'existence d'interférences entre les vaccins et l'état immunitaire du sujet, notamment au regard de la Fièvre Jaune mais aussi de l'Encéphalite Japonaise [27].

En effet, les personnes immunisées contre le virus de la Fièvre Jaune produisent des anticorps anti-DEN-2 à des taux plus élevés et de façon plus durable que les sujets naïfs lors de vaccination par la souche PR-159/S-1 issue du virus DEN-2 (souche abandonnée aujourd'hui). Testée chez 98 soldats [35] en 1984, le taux de séroconversion approchait les 90% chez les 70 soldats immunisés contre la fièvre jaune et seulement 61% chez les 28 soldats non immunisés et avec des taux beaucoup plus importants.

Aussi une primo-vaccination contre la Fièvre Jaune a-t-elle d'abord été envisagée dans les années 1985 afin d'optimiser les taux de séroconversion observés avec les vaccins contre la dengue. Cette idée semble aujourd'hui presque abandonnée mais la présence d'une immunisation préalable contre la Fièvre Jaune est prise en compte dans les protocoles d'études car elle contribuerait à obtenir des résultats biaisés.

Les vaccins vivants atténués sont donc prometteurs mais ils réclament encore toujours plus d'études d'efficacité et de sécurité : les effets secondaires semblent nombreux, les taux de séroconversions sont certes élevés mais toujours insuffisants, les protocoles de vaccination sont à optimiser et l'atténuation devra être bien maîtrisée et certifiée avant de lancer ces vaccins sur le marché mondial.

Les difficultés liées à l'obtention de vaccins vivants atténués en l'absence de modèle animal fiable ont fait très vite envisager le développement de nouvelles techniques de vaccination.

2- Vaccins entiers inactivés [11]

Peu d'informations [11] sont actuellement disponibles sur ce type de vaccin. Certains sont déjà développés contre d'autres Flavivirus tels que le virus de l'Encéphalite à Tique et celui de l'Encéphalite Japonaise.

Ils présentent l'avantage d'une grande sécurité puisqu' aucun phénomène de réversion n'est possible. Cependant, le taux de multiplication des virus DEN en culture est très faible. Cela constitue un obstacle majeur à l'obtention de ce vaccin puisque l'injection de grandes quantités d'antigènes est généralement nécessaire pour entraîner une immunité protectrice.

A l'heure actuelle, un vaccin entier inactivé a été développé contre le virus DEN-2. La multiplication des virus a été obtenue par culture sur cellules Véro. Cette culture a ensuite été suivie d'une inactivation virale au formol. Les antigènes viraux obtenus ont été conjugués à des molécules d'hydroxyde d'aluminium. Les résultats ont montré des taux élevés d'anticorps neutralisants chez des souris Balb/c ainsi vaccinées. Cette immunité a été acquise après deux injections de vaccin adjuvé. De même, cette vaccination, effectuées à trois reprises chez des singes Rhésus, a permis de réduire la durée de la virémie après qu'une contamination ait été provoquée deux mois après le dernier rappel.

Ce type de vaccination représente à l'heure actuelle un aspect mineur de la recherche vaccinale : le nombre de rappels, l'évolution à long terme du statut immunitaire et le coût du traitement sont les principaux obstacles au développement de ces vaccins.

L'élaboration de nouveaux vaccins entiers inactivés dirigés contre les autres sérotypes (DEN-1, DEN-3 et DEN-4) des virus de la dengue semble envisagée. L'efficacité du vaccin tétravalent alors obtenu devra ensuite être déterminée de façon plus précise.

C- Vaccins de deuxième génération : encore à l'étude.

1- Vaccins à sous-unités recombinées. [18] [19] [21] [36] [37] [38] [39] [52] [56] [58] [59]

Le principal problème posé par ce type de vaccin repose sur le choix des protéines virales immunogènes, celles-ci devant éviter toute stimulation excessive des cellules T immunitaires à l'origine d'une éventuelle DF (sachant que les symptômes de la DF ne semblent pas liée à une action virale directe) tout en stimulant à la fois les cellules LB et les cellules LT helpers nécessaires à l'obtention d'une réponse immunitaire efficace. Le deuxième problème posé par les vaccins à sous-unités recombinées est l'obtention de protéines identiques (immunogéniquement et antigéniquement) aux protéines virales initiales aussi bien dans leur conformation primaire, que secondaire et tertiaire.

Les protéines les plus intéressantes ont rapidement été identifiées : protéines E, M (prM et M), NS1 et NS3 [55] puisque des souris immunisées passivement par l'injection d'anticorps correspondants sont protégées d'une infection [36] provoquée ultérieurement.

Les recherches ont d'abord été dirigées vers l'obtention des protéines E et NS1 par recombinaison génétique *via* des microorganismes avant de se diriger plus récemment [18] vers les protéines prM et M à fort potentiel immunogénique [56]. L'utilisation de ces dernières permettrait d'éviter la formation d'anticorps anti-E à l'origine d'un éventuel phénomène d'ADE.

En 1995, la réponse immunitaire murine obtenue en présence de la protéine E s'est révélée inférieure à celle observée avec un vaccin vivant atténué, avec un taux d'anticorps anti-E inférieur, excepté pour la classe IgG1. Le taux d'anticorps neutralisants était corrélé positivement avec le taux d'IgG2a [37].

La réponse IgG2a prédominante obtenue après vaccination par le virus vivant atténué fait évoquer une réponse cellulaire de type Th1 tandis que la réponse majoritaire IgG1 obtenue après vaccination par la protéine E évoque une réponse de type Th2 [38 ;39] (Tableau 23).

Vaccin vivant atténué	IgG2a> IgG1>IgG2b>IgG3
Protéine E	IgG1> IgG2a>IgG2b>IgG3

Tableau 23 : Taux relatifs des anticorps anti-E murins après injection de virus atténués ou de la protéine E.

Malgré une plus faible immunogénicité, ce type de vaccination présenterait de nombreux avantages : le potentiel de production de protéines virales est important *via* l'utilisation de vecteurs producteurs tels que des bactéries (*Escherichia coli*), des virus (*Baculovirus*) ou des levures ; l'utilisation de sous-unités autres que la protéine E pourrait permettre d'éviter tout phénomène d'ADE ; enfin, les protéines seules se sont révélées faiblement activatrices des cellules T d'où une faible production de cytokines et un faible potentiel pathogène [21].

Plusieurs protéines ou complexes de protéines ont été obtenus par des méthodes diverses basées sur la transfection plasmidiques de micro-organismes ainsi reconvertis en « usine à protéines » ou sur la synthèse protéique en phase solide:

- Expression protéique par *Escherichia coli* [21]:

Une protéine contenant le tiers terminal de la protéine E et la région N-terminale de la protéine NS1 du virus DEN-2 (souche PR-159/S1) a été produite. Cette protéine a été adjuvée à des molécules

d'hydroxyde d'aluminium. Injectée à des souris Balb/c et Swiss-ICR selon un schéma à un seul rappel, de forts taux d'anticorps neutralisants anti- DEN-2 ont été obtenus, conférant une protection totale contre une infection intra-cérébrale provoquée. Chez les singes, trois doses ont toutefois été nécessaires afin d'observer de forts taux d'anticorps neutralisants. La réponse a cependant été transitoire et ni l'intensité ni la durée de la virémie n'ont été réduites. Un autre mécanisme de défense que les seuls anticorps a alors été évoqué.

- Expression protéique par le *Baculovirus* :

Le *Baculovirus* est cultivé dans des cellules d'insectes au sein d'un système dit « *Baculovirus-Spodoptera frugiperda* » [53].

Une séquence signal intégrée au plasmide transfectant permet aujourd'hui l'exportation directe des protéines recombinées hors de ce virus non pathogène pour l'Homme.

- Des formes solubles des protéines E (protéine E tronquée) identiques aux protéines E naturelles ont été obtenues. La protéine E tronquée ou non a pu être produite sous forme dimérique ou monomérique tout en conservant son antigénicité. L'immunisation de souris Balb/c avec la forme dimérique adjuvée par de l'hydroxyde d'aluminium a entraîné la production d'anticorps neutralisants contre le virus DEN-2 de façon identique au vaccin vivant atténué [19] ainsi que l'apparition d'une immunité croisée. L'apparition d'anticorps neutralisants apparaît, ici encore, soumise à la présence d'adjuvant. La surface cationique de l'adjuvant (alun) pourrait favoriser la présentation de ces protéines recombinées sous forme d'agrégats multimériques, expliquant ainsi leur plus grande immunogénicité par conservation des conformations primaires, secondaires et tertiaires.

Malheureusement, les essais d'inoculation intra-cérébrale des virus de la dengue à des souris adultes vaccinées [19] par ces protéines E recombinées n'a pas montré la même efficacité que celle du vaccin vivant atténué. Ceci pourrait mettre en évidence l'un des inconvénients de ce type de vaccination, à savoir la faible stimulation de l'immunité cellulaire cytotoxique par absence de présentation des antigènes par les molécules CMH de type I au profit des molécules CMH de type II. La seule présence d'anticorps neutralisants ne peut alors éliminer les cellules infectées. Des études utilisant des adjuvants stimulants la présentation des antigènes par les CMH de type I (liposomes, ISCOMS) devraient être effectuées. De même, l'utilisation de protéines non structurales telles que NS3 ou NS1 pourrait être nécessaire à l'activité du vaccin. Toutefois, ce type de vaccination pourrait suffire à limiter l'extension de la maladie au sein de l'organisme et donc conférer une certaine protection. Des essais complémentaires chez des primates s'avèrent donc nécessaires [53].

- Des protéines prM-E et NS1 de chacun des sérotypes ont été produites par l'intermédiaire de *Baculovirus*. Leur efficacité a été évaluée chez la souris [21]. L'hétérodimère prM-E obtenu est considéré comme une protéine sub-virale (EPs). La protéine M serait nécessaire à l'expression antigénique et immunogénique de la protéine E. La protéine NS1 est quant à elle obtenue sous forme dimérique. Toutes ces protéines ont induit des réponses immunitaires restreintes par l'haplotype murin. Les résultats de cette étude font penser que le taux d'anticorps chez des souris immunisées ne reflète pas de façon exacte le degré de protection croisée et évoque donc l'existence d'autres mécanismes immunitaires de défense.

- Expression protéique de particules sub-virales (Eps) par une lignée cellulaire [36]

Le principe repose sur la synthèse de particules sub-virales par des cellules transfectées par un plasmide recombinant. Les protéines subvirales ainsi produites sont injectées dans l'organisme pour effectuer une vaccination.

Le plasmide transfectant créé (pcD2EP) [36] exprime la protéine E et une partie de la protéine prM du virus DEN-2 souche Nouvelle-Guinée C. La synthèse protéique et le relargage est identique à ceux observés lors d'une infection naturelle par les virus DEN. Seule la nucléocapside n'est pas synthétisée.

La culture cellulaire pose un problème majeur : l'action toxique de la protéine E sur les cellules, puisqu'il s'agit d'un agent de fusion cellulaire. Le problème a été résolu en faisant subir une mutation au gène prM afin d'éviter l'apparition de la capacité de fusion de la protéine E. Le second problème était celui d'une action pro-apoptotique du virus DEN sur les cellules. L'adjonction d'un gène bcl-2 anti-apoptotique a permis de protéger les cellules d'une éventuelle action pro-apoptotique.

Le plasmide a été introduit dans des cellules mammaires qui se sont révélées fortement productrices de particules Eps extracellulaires. Ces particules sub-virales ont été injectées à des souris qui ont réagi par la production d'anticorps neutralisants.

- Synthèse des protéines prM et M en phase solide

Tout récemment, la publication de nouvelles études [18] (2002) a montré l'importance des protéines prM et M dans le développement d'une immunité à la fois humorale et cellulaire largement protectrice, notamment lors d'une conjugaison avec de l'albumine bovine.

La synthèse de cinq peptides issus de la protéine prM de DEN-2 a été réalisée en phase solide sur résine de 4-méthylbenzhydrolamine suivie d'une extraction par de l'acide acétique en HPLC phase inverse. Ces peptides représentent des fragments de la protéine prM de localisation diverse. Ils ont été choisis en tenant compte de leur potentiel immunogénique (structure secondaire, accessibilité, sites de glycosylation connues par l'intermédiaire de l'étude du virus TBE). Les peptides obtenus ont été couplés à de l'albumine bovine par l'intermédiaire d'une cystéine.

Les cinq peptides, dont deux linéaires, ont, après inoculation à la souris Balb/c, induit une réponse humorale. Les protéines M sont donc des protéines au potentiel immunogène et protecteur important. Les anticorps produits pourraient, les protéines E et prM étant accolées, bloquer l'épitope de la protéine E impliqué dans la fusion cellulaire. Ces protéines ont également entraîné l'activation de cellules LT (test de lymphoprolifération positif) non stimulables lors d'une infection par virus vivant atténué.

En conclusion, les protéines prM et M sont donc immunogéniques et peuvent entraîner la production d'anticorps neutralisants. Ceci pourrait donc constituer une nouvelle piste de recherche et participe en tout cas à une meilleure compréhension de la maladie.

Les vaccins à sous-unités sont très séduisants par leur sécurité d'action et leur facilité d'obtention. Cependant, de nombreuses études sont encore nécessaires pour obtenir des vaccins de ce type efficaces et sûrs, d'autant que la durée de protection acquise est encore problématique. Une amélioration de la compréhension de la pathogenèse et de la réponse immunitaire s'avèrent indispensable au développement de ces vaccins.

2- Vaccins vivants chimériques [11] [21] [40] [41] [42] [43] [55]

Le principe général repose sur l'utilisation d'un squelette viral fortement atténué, dans le génome duquel sont insérés des gènes des virus pathogènes. Les gènes utilisés sont à l'origine de la production de protéines fortement immunogènes.

L'avantage principal de cette technique réside dans la diminution du risque de mutation incontrôlée lors de passages répétés sur des cultures cellulaires.

Deux tactiques principales sont actuellement envisagées :

a) Utilisation d'un clone DEN atténué

Les premières tentatives ont été réalisées par insertion des gènes C, prM et E du virus DEN-1 ou des gènes prM et E du virus DEN-2 aux lieu et place de ces gènes sur le c-DNA du virus DEN-4. Ce c-DNA a été obtenu par des méthodes de transcription inverse à partir de l'ARN viral. Les chimères DEN-1/4 et DEN-2/4 obtenues sont à l'origine de la synthèse de protéines structurales des virus insérés et de protéines non structurales du virus DEN-4 (Tableau 24).

	Protéines produites par la chimères
Chimère DEN-1/4	NS (DEN-4), C, prM, E (DEN-1)
Chimère DEN-2/4	NS (DEN-4), prM, E (DEN-2)

Tableau 24 : Chimères obtenues et production protéique correspondante.

Les vaccins chimériques ont été injectés à des singes Rhésus en présence de singes témoins vaccinés contre DEN-1 et 2 (vaccins vivants atténués) ainsi que par du c-DNA de DEN-4 [40 ;41].

Les résultats montrent que 3 des 4 singes immunisés par le vaccin DEN-1/4 ont développé des anticorps neutralisants contre DEN-1 et ont été protégé d'une infection ultérieure provoquée par le virus DEN-1. La totalité des 4 singes vaccinés par la chimère DEN-2/4 ont développé des anticorps neutralisants contre DEN-2 et ont été protégés d'une infection ultérieure provoquée par le virus DEN-2. Quant aux témoins, ils ont été immunisés contre les virus homologues (DEN-1 ou 2). Les singes vaccinés par le c-DNA du virus DEN-4 dépourvus de ses gènes structuraux ont développé une virémie suite à une infection ultérieure provoquée par le virus DEN-4.

Des expériences ont ensuite été menées en utilisant des mélanges égaux des chimères DEN-1/4 et DEN-2/4. Tous les singes ainsi vaccinés ont développé des anticorps contre les sérotypes 1 et 2 et ont été protégés d'une contamination ultérieure par les sérotypes correspondants.

A l'heure actuelle, trois vaccins tétravalents [21] de ce type sont en développement . Les techniques ont évolués et le virus DEN-4 n'est le plus seul a être utilisé comme squelette.

Un vaccin développé par le Division of Vector-Borne Diseases, CDC, Ft.Collins, CO, USA est basé sur l'insertion des gènes prM et E des sérotypes 1 à 4 des virus DEN dans la partie NS du génome du virus DEN-2 atténué (souche 16 681, PDK 53).

Un autre vaccin élaboré par le Centre for Biologies Evaluation Research, USAFDA, Rockville, MD, USA est actuellement en phase I de développement : il est basé sur l'insertion des gènes prM et E des sérotypes 2 à 4 des virus DEN dans le génome d'un virus DEN-1 atténué par remplacement de trois nucléotides dans la partie 3' terminale du génome. Ce vaccin s'est révélé hautement immunogène chez le singe Rhésus.

Enfin, un vaccin chimérique obtenu par insertion des gènes prM et E des sérotypes 1 à 3 des virus DEN dans le génome d'un virus DEN-4 atténué par délétion de 30 nucléotides dans la partie 5' non transcrite a été injecté chez 20 volontaires adultes. Les effets secondaires observés ont été mineurs et le taux de séroconversion de 100%. C'est un vaccin très prometteur développé par le Laboratory of Infectious Diseases, NIH, Bethesda, MA, USA.

b) Utilisation du Chimeri-Vax®

Le Chimeri-Vax® est un vaccin atténué recombinant issu du vaccin contre la Fièvre Jaune (virus atténué YF 17 D) (Encadré 8) dans lequel les gènes de protéine E et prM sont remplacés par les gènes correspondants d'un autre *Flavivirus*. C'est un procédé détenu par Aventis Pasteur, Lyon, France.

Le vaccin contre la fièvre jaune YF17D a été développé en 1936 et utilisé chez plus de 400 millions de personnes avec une grande tolérance et efficacité à l'origine d'un taux de séroconversion proche de 100%. La séroconversion est de longue durée mais un rappel est recommandé tous les 10 ans [43].

Encadré 8 : A propos du vaccin contre la Fièvre Jaune

L' avantage majeur de cette technique est de conserver toutes les qualités des vaccins vivants atténués, en évitant leurs inconvénients (impossibilité de réversion), tout en s'appuyant sur un vaccin dont la sécurité d'emploi est déjà fortement éprouvée.

Les gènes prM et E des virus DEN-1 à 4 sauvages ont été insérés dans la région des gènes NS du virus atténué YF 17 D; Ce vaccin est actuellement en phase I de développement chez Acambis, Cambridge, MA, USA.

Les gènes E et prM sont inclus dans le c-DNA du virus YF17D. Le c-DNA chimérique obtenu est transcrit en ARN utilisé pour transfecter des cellules Véro. Celles-ci produisent alors des particules virales contenant les protéines E et prM des virus DEN. Les autres protéines sont celles du virus YF17D. Le virus chimérique inclus dans le vaccin se réplique alors *in vivo* et induit une immunité. Cette technique nécessite des précautions, notamment une méthode RT/PCR fiable afin d'éviter toute inclusion d'erreurs de transcription. Des études [42] ont montré la stabilité des chimères obtenues après répllication sur culture cellulaire.

Les vaccins monovalents obtenus (CV-DEN-1, CV-DEN-2 , CV-DEN-3, CV-DEN-4) ont été inoculés à des Singes sous forme mono- ou tétravalente (mélange égal des quatre préparations monovalentes). Les virémies observées ont été similaires à celles obtenues avec le vaccin YF 17 D mais significativement inférieures à celle provoquée lors d'une infection par un virus DEN sauvage. D'autre part, la neurovirulence a été inférieure à celle du vaccin YF 17 D et tous les singes ont développé des anticorps neutralisants homologues (dirigés contre les chimères vaccinales) et hétérologues (actifs sur des souches DEN sauvages d'origine géographiques très différentes) après une seule injection de vaccin mono- ou tétravalent. Suite au rappel effectué 2 mois après, les taux d'anticorps ont été multipliés par 2 à 4 sans qu'aucune virémie n'ait été constatée.

La vaccination par la forme tétravalente a montré un défaut de formulation puisque la plus grande partie de la réponse immunitaire était dirigée contre la chimère CV-DEN-2. L'ajustement de cette proportion a pu rétablir une réponse équilibrée contre les sérotypes 1, 2 et 3 mais, cette fois, trop importante contre le sérotype DEN-4 [42].

L'utilisation de vaccins chimériques possède de nombreux avantages et semble très prometteuse chez les modèles animaux. Par ailleurs, l'utilisation du squelette vaccinal YF 17 D pourrait apporter une solution aux problèmes de tolérance . La co-vaccination par le virus de la Fièvre Jaune pourrait expliquer la stimulation de l'immunité observée. Cependant, des études complémentaires sont aujourd'hui nécessaires (population étudiée plus large et suivi de l'évolution du statut immunitaire à long terme).

L'utilisation d'adénovirus chimériques a été envisagée en 1998 [52] en raison de leurs nombreux avantages (inocuité, forte production protéique, culture aisée, stabilité génomique...). Cette technique n'a pas fait l'objet de publication depuis 1998.

D-Vaccins de troisième génération [38] [39] [44] [45] [46] [47] [48] [49]

Ces vaccins sont basés sur l'utilisation de c-DNA nu. Leur utilisation par l'intermédiaire de vecteurs plasmidiques permettrait d'observer une expression endocellulaire et une sécrétion extra-cellulaire de particules sub-virales (Eps) immunogènes (protéines prM, M et E) [48].

Leur avantage serait d'induire une immunité humorale et cellulaire de longue durée en mobilisant les cellules LT4 H1 et H2 ainsi que les cellules T cytotoxiques. Cette vision d'une immunité à la fois humorale et cellulaire, comparable à celle observée avec les vaccins vivants atténués mais dépourvus de leurs inconvénients, pourrait être intéressante dans une maladie où la pathogenèse n'est toujours pas entièrement comprise.

1°) Méthode

Le c-DNA est obtenu à partir de l'ARN positif viral purifié et sélectionné. Une transcription inverse (RT) est effectuée et le c-DNA correspondant aux protéines prM/M et E est amplifié par PCR puis purifié. Il est finalement inclus dans un plasmide vecteur, la séquence étant directement précédée par une séquence signal (séquence signal du virus DEN ou de CMV) et immédiatement suivie d'une séquence de terminaison (séquence poly-A de l'hormone de croissance bovine).

Cette méthode actuellement exploitée a déjà donné de bons résultats dans d'autres maladies liées à des *Flavivirus* (Encéphalite à Tique, Encéphalite de Saint-Louis, Encéphalite Japonaise).

Les premières publications concernant la recherche de vaccin de troisième génération pour la dengue date des années 1997-1998.

2°) Difficultés rencontrées

L'obtention de c-DNA chimérique ne pose pas de problème particulier : c'est une méthode éprouvée et relativement facile d'accès. L'immunogénicité de ces vaccins a été montrée très rapidement pour les différents virus .

Le problème réside dans le choix des gènes viraux utilisés : même si les différentes équipes de recherche s'accordent à utiliser les gènes d'enveloppe E et prM, de nombreuses divergences apparaissent dans les résultats d'études publiées jusqu'à présent. En effet, certaines équipes privilégient l'utilisation de gènes E tronqués : les protéines issues de ces gènes seraient débarrassées de leur site d'ancrage à la membrane cellulaire, ce qui faciliterait théoriquement leur sécrétion extra-cellulaire et donc augmenterait leur pouvoir immunogène [44]. L'utilisation de ce gène tronqué se serait même révélée indispensable à la production d'anticorps neutralisants chez les souris vaccinées [45].

D'autres équipes s'accordent à dire que l'utilisation de la protéine E entière est à l'origine d'une immunogénicité plus forte et d'une sécrétion cellulaire plus importante [46 ; 38].

La voie d'administration la plus efficace du vaccin ainsi que la nécessité de rappels sont à déterminer ; le rôle des différents adjuvants reste controversé.

3°) Résultats actuels

Les essais menés chez des souris ou des primates [38 ; 44] ont montré la faible réponse humorale des organismes testés : les taux d'anticorps neutralisants sont faibles voire indétectables ou tardifs. La réalisation de rappels a permis d'augmenter les taux d'anticorps sans toutefois obtenir des taux importants. Même l'utilisation des voies les plus immunogènes (voies intra-musculaire I.M. et surtout intra-dermique I.D.) n'a pas permis d'obtenir les taux souhaités. La supériorité de la voie I.D. pourrait s'expliquer par la présence en forte quantité de cellules présentatrices d'antigènes dont les cellules de Langerhans.

Cependant, la contamination provoquée effectuée après les séances de vaccination a permis de mettre en évidence une diminution de la virémie, ce qui permettrait d'évoquer la présence d'une mémoire immunitaire : le taux d'anticorps neutralisants n'est donc pas corrélé exactement à la protection accordée par la vaccination, du moins dans les modèles animaux utilisés.

Ces vaccins pourraient peut-être suffire à conférer une protection lors d'un usage humain mais les recherches actuelles visent à obtenir des vaccins fortement immunogènes avec des taux importants d'anticorps neutralisants : en effet, comme décrit précédemment, l'administration passive d'immunoglobulines spécifiques chez la souris permet de supprimer la létalité de l'infection . Les anticorps neutralisants semblent donc jouer un rôle majeur de protection.

4°) Evolution de la recherche actuelle

Les théories actuelles veulent que la faible réponse humorale des organismes observée lors de l'utilisation de ce type de vaccin soit liée au mode d'expression endogène des particules sub-virales : les protéines synthétisées dans les cellules seraient majoritairement exprimées via les molécules de CMH de type I ; or, il faudrait stimuler la présentation des fragments antigéniques par les molécules de CMH de type II afin de provoquer l'activation des lymphocytes B et T helpers et donc observer une réponse humorale de qualité.

Une étude a été publiée [47] (2001), mettant en avant le rôle d'une protéine LAMP (protéine membranaire associée au lysosome) issue des cellules 3T3 d'embryons de souris. Cette protéine est spécifiquement associée à la membrane des lysosomes par l'intermédiaire d'une séquence C-terminale.

Un plasmide transfectant a donc été créé où la protéine prM-E se trouve reliée à la protéine LAMP. Celle-ci a permis l'accumulation des protéines virales au sein des lysosomes des cellules transfectées, dont la membrane est riche en molécule CMH de type II.

L'injection de ce plasmide transfectant à des souris a permis d'observer une réponse humorale très augmentée. Cette réponse a même été amplifiée par l'injection concomitante d'un plasmide exprimant le GM-CSF murin. Celui-ci pourrait jouer un rôle immunomodulateur semblable à celui joué par les cytokines et pourrait stimuler certaines cellules immunitaires dont les cellules dendritiques immatures CD11c+.

Les vaccins de troisième génération ouvrent une nouvelle ère de la vaccination. Cependant, c'est une technique nouvelle qui nécessite de nombreuses précautions, notamment en raison du risque d'insertion de génomes viraux au sein de l'information génétique cellulaire du patient. Des risques d'activation d'oncogènes ont même été évoqués. Ces vaccins font donc

aujourd'hui plus partie du rêve scientifique que d'une réalité palpable.

Malgré les importants progrès réalisés dans le domaine de la recherche vaccinale, aucun vaccin n'est donc encore disponible pour prévenir la dengue.

CONCLUSION

La dengue est une maladie émergente particulièrement virulente en Asie, en Amérique du sud et en Océanie. Le nombre de cas, ainsi que le nombre des décès, ne cesse d'augmenter régulièrement au fil des décennies. L'absence de signes cliniques spécifiques en fait une maladie redoutable, d'autant que les pays concernés sont économiquement fragiles.

En l'absence de traitement spécifique, seule la vaccination et une meilleure compréhension de la maladie peuvent permettre d'éviter la survenue de cas mortels. Aucun vaccin n'est actuellement disponible sur le marché mais la recherche vaccinale est en pleine évolution et de nombreuses voies de recherche sont explorées. Les vaccins vivants atténués semblent les plus aboutis mais les vaccins de deuxième génération devraient apporter un compromis plus intéressant entre efficacité et sécurité. L'utilisation de vaccins de troisième génération, théoriquement prometteurs, semblent se heurter à de nombreuses difficultés.

Une étude très récente [57] menée chez des souris semblerait montrer l'intérêt de l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-TNF α dans les cas de DSS : une nouvelle voie de recherche dans le traitement spécifique de la dengue ?

BIBLIOGRAPHIE

[1] Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Division of Vector Borne Infectious Diseases, in: *Dengue*. [en ligne]. Disponible sur: <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/dengue/index.htm> (page consultée en décembre 2002).

[2] FIELDS B., KNIPE D., HOWLEY P., et al. - *Fields Virology* - vol. 1, 3rd edition, Lippincott-Raven Publishers, 1996, 1504p.

[3] KURANE I., TOMOHIKO T. - *Dengue fever and dengue haemorrhagic fever: challenges of controlling an enemy still at large* - Rev. Med. Virol., 2001, 11, p.301-311.

[4] RIGAU-PEREZ G., CLARK G., GUBLER D., et al. - *Dengue and dengue haemorrhagic fever* – The Lancet, 1998, 352, p.971-977.

[5] STROBEL M., LAMAURY I. - *Fièvre dengue: mise au point* – Rev Méd Interne, 2001, 22, p.638-647.

[6] GUZMAN M., KOURI G. – *Dengue: an update* – The Lancet infectious disease, 2002, 2, p.33-42.

[7] SOLOMON T., MINH DUNG N., VAUGHN D. et al. – *Neurological manifestations of dengue infection* – The lancet, 2000, 355, p.1053-1059.

[8] GARCIA-RIVERA E., RIGAU-PEREZ J. – *Encephalitis and dengue* – The Lancet, 2002, 360, p.261.

[9] World Health Organisation - *Weekly epidemiological record*- 2000, n°24, 75, p.193-2001. [en ligne]. Disponible sur: <http://www.who.int/wer>

[10] FLEURY H. - *Virologie humaine*- Masson coll. Abrégés, 3^{ème} éd., 1999, 205p.

[11] ALMOND J., CLEMENS J., ENGERS H., et al. - *Accelerating the development and introduction of a dengue vaccine for poor children, 5-8 December, Ho Chi Minh City, VietNam- Vaccine*, 2002, 20, p.3043-3046.

[12] PALMER C., VALIDUM L., VOMDAM V., et al. - *Dengue in Guyana- The Lancet*, 1999, 354, p.304.

[13] WHITE N. - *Variation in virulence of dengue virus- The lancet*, 1999, 354, p.1401-1402.

[14] World Health Organisation, Strategic Direction for Research. - In: *Dengue*. [en ligne]. Disponible sur: <http://who.int/tdr> (page consultée en janvier 2003).

[15] BARRAU K., BADIAGA S., BROUQUIL P., et al. - *Dengue d'importation observée dans les centres hospitaliers universitaires du sud de la France 1994-1999- B.E.H.*, 2001, 3, 6p.

[16] HALES S., DE WET N., MAINDONALD J., et al. - *Potential effect of population and climate changes on global distribution of dengue fever: an empirical model- The Lancet*, 2002, 360, p.830-834.

[17] PINHEIRO F., CORBER S. - *Global situation of dengue and dengue haemorrhagic fever, and its emergence in the Americas- Wld hlth stat. Quart.*, 1997, 50, p.161-168.

[18] VASQUEZ S., GUZMAN M, GUILLEN G., et al. - *Immune response to synthetic peptides of dengue prM protein- Vaccine*, 2002, p.1823-1830.

[19] KELLY E., GREENE J., KING A., et al. - *Purified dengue 2 virus glycoprotein aggregates produced by Baculovirus are immunogenic in mice- Vaccine*, 2000, 18, p.2549-2559.

[20] Institut Louis Malmé, Tahiti, in *Dengue*. [en ligne]. Disponible sur www.ilm.pf/deng_1.htm (page consultée en décembre 2002).

[21] CHAMBERS T., TSAI T., PERVIKOV Y., et al. - *Vaccine development against dengue and Japanese encephalitis: report of a World Health Organisation meeting- Vaccine*, 1997, 15, p.1494-1502.

- [22] LAFLEUR C., GRANADOS J., VARGAS-ALARCON G., et al. - *HLA-DR Antigen Frequencies in Mexican Patients With Dengue Virus Infection: HLA-DR4 as a Possible Genetic Resistance Factor for Dengue Haemorrhagic Fever*- Human Immunology, 2002, 63, p.1039-1044.
- [23] ROTHMAN A, ENNIS F. - *Immunopathogenesis of Dengue Hemorrhagic Fever*- Virology, 1999, 257, p.1-6.
- [24] CAUFOR P., MOTTA M., YAMAMURA A., et al. - *Construction, characterization and immunogenicity of recombinant yellow fever 17D-dengue type 2 viruses*- Virus research, 2001, 79, p.1-14.
- [25] GREEN S, KURANE I., EDELMAN R., et al. - *Dengue virus-specific human CD4+ T-Lymphocyte responses in a recipient of an experimental live attenuated dengue virus type 1 vaccine: bulk culture proliferation, clonal analysis, and precursor frequency determination*- Journal of Virology, 1993, 67, 10, p.5962-5967.
- [26] BANCROFT W. - *Current status of dengue vaccines and prospects for the future*- P R Health Sci J , 1987, 6, 1, p.23-26.
- [27] VAUGHN D., HOKE C., YOKSAN S. - *Testing of a dengue 2 live attenuated vaccine (strain 16681 PDK 53) in ten american volunteers*- Vaccine, 1996, 14, 4, p.329-336.
- [28] KINNEY R., BUTRAPET S., CHANG GJ., et al. - *Construction of Infectious cDNA Clones for Dengue 2 Virus: Strain 16681 and Its attenuated Vaccine derivative, Strain PDK-53*- Virology, 1997, 230, 2, p.300-308.
- [29] JIRAKANJANAKIT N, KHIN MM., YOKSAN S., et al. - *Dynamics of susceptibility of the live, attenuated, candidate vaccines dengue-1 PDK13, dengue-3 PGMK30F3, and dengue-4 PDK48 after oral infection in Aedes aegypti*- Am J Trop Med Hyg, 1999, 61, 4, p.672-676.
- [30] SARDELIS MR., EDELMAN R., KLEIN TA., et al. - *Limited potential for transmission of live virus vaccine candidate by Aedes aegypti and Aedes albopictus*- Am J Trop Med Hyg, 2000, 62, 6, p.698-701.
- [31] KANESA-THASAN N., SUN W., KIM-AHN G., et al. - *Safety and immunogenicity of attenuated dengue virus vaccines (Aventis Pasteur) in human volunteers*- Vaccine, 2001, 19, p.3179-3188.

[32] BHAMARAPRAVATI N, SUTEE Y. - *Live attenuated tetravalent dengue vaccine- Vaccine*, 2000, p.44-47.

[33] ROTHMAN A., KANESA-THASAN N., WEST K., et al. - *Induction of T lymphocyte responses to dengue virus by a candidate tetravalent live attenuated dengue virus vaccine- Vaccine*, 2001, 19, p.4694-4699.

[34] SABCHAERON A., LANG J., CHANTHAVANICH P., et al. - *Safety and immunogenicity of tetravalent live-attenuated dengue avaccines in Thai adult volunteers: role of serotype concentration, ratio, and multiple doses- Am J Trop Med Hyg*, 2002, 66, 3, p.264-272.

[35] BANCROFT WH., SCOTT RM., ECKELS KH. , et al. - *Dengue virus type 2 vaccine: reactogenicity and immunogenicity in soldiers- J Inf Dis*, 1984, 149, 6, p.1005-1010.

[36] KONISHI E., FUJII A. - *Dengue type 2 virus subviral extracellular particles produced by a stably transfected mammalian cell line and their evaluation for a subunit vaccine- Vaccine*, 2002, 20, p.1058-1067.

[37] SMUCNY JJ., KELLY EP., MACARTHY PO., et al. - *Murine immunoglobulin G subclasses response following immunization with live dengue virus or a recombinant dengue envelope protein- Am J Trop Med Hyg*, 1995, 53, 4, p.432-437.

[38] KOHEL T., RAVIPRAKASH K., HAYES C., et al. - *A dengue virus serotype-1 DNA vaccine induces virus neutralizing antibody and provides protection from viral challenge in Aotus monkeys- Vaccine*, 2000, 18, p.3166-3173.

[39] KONISHI E., TERAZAWA A., IMOTO J. - *Simultaneous immunization with DNA and protein vaccines against Japanese encephalitis or dengue synergistically increases their own abilities to induce neutralizing antibody in mice- Vaccine*, 2003, 3692, p.1-7.

[40] LAI C., BRAY M., CAHOUR A. et al. - *Evaluation of molecular strategies to develop a live dengue vaccine- Clinical and diagnostic Virology*, 1998, 10, p.173-179.

[41] BRAY M., MEN R., LAI C. - *Monkeys immunized with intertypic chimeric dengue viruses are protected against wild-type virus challenge- Journal of virology*, 1996, 70, 6, p.4162-4166.

- [42] GUIRAKHOO F., PUGACHEV K., ARROYO J., et al. - *Viremia and Immunogenicity in Nonhuman Primates of a Tetravalent Yellow Fever-Dengue Chimeric Vaccine: Genetic Reconstructions, Dose Adjustment, and Antibody Responses against Wild-type Dengue Virus Isolates*- *Virology*, 2002, 298, p.146-159.
- [43] MONATH T., McCARTHY K., BEDFORD P., et al. - *Clinical proof of principle for ChimeriVax™: recombinant live, attenuated vaccines against flavivirus infections*- *Vaccine*, 2002, 20, p.1004-1018.
- [44] KOHEL T., WU S., RAVIPRAKASH K., et al. - *Inoculation of plasmids expressing the dengue-2 envelope gene elicit neutralizing antibodies in mice*- *Vaccine*, 1997, 15, 5, p.547-552.
- [45] KONISHI E., YAMAOKA M., KURANE I., et al. - *A DNA vaccine expressing dengue type 2 virus premembrane and envelope genes induces neutralizing antibody and memory B cells in mice*- *Vaccine*, 2000, 18, p.1133-1139.
- [46] RAVIPRAKASH K., KOHEL T., EWING D., et al. - *Immunogenicity of dengue virus type 1 DNA vaccines expressing truncated and full length envelope protein*- *Vaccine*, 2000, 18, p.2426-2434.
- [47] RAVIPRAKASH K., MARQUES E., EWING D., et al. - *Synergistic Neutralizing Antibody response to a Dengue Virus Type 2 DNA Vaccine by Incorporation of Lysosome-Associated Membrane Protein Sequences and Use of Plasmid Expressing GM-CSF*- *Virology*, 2001, 290, p.74-82.
- [48] CHANG G., DAVIS B., HUNT A., et al. - *Flavivirus DNA vaccines: current status and potential*- *Ann N Y Acad Sci*, 2001, 951, p.272-285.
- [49] CHANG G., HUNT A., HOLMES D., et al. - *Enhancing biosynthesis and secretion of premembrane and envelope proteins by the chimeric plasmid of dengue virus type 2 and Japanese encephalitis virus*- *Virology*, 2003, 305, en cours d'impression.
- [50] COLLIER L. - *Human Virology*- Oxford University Press, 2nd ed., 2000, p.188.
- [51] SOLOMON T., MALLEWA M. - *Dengue and Other Emerging Flaviviruses*- *Journal of Infection*, 2001, 42, p.104-115.

[52] STEPHENSON J. - *Defective adenoviruses as novel vaccines for the Flaviviridae*- Clinical and Diagnostic Virology, 1998, 10, p.187-194.

[53] VELZING J., GROEN J., DROUET M., et al. - *Induction of protective immunity against dengue virus type 2: comparison of candidate live attenuated and recombinant vaccines*- Vaccine, 1999, 17, p.1312-1320.

[54] BARRET A. - *Japanese Encephalitis and Dengue Vaccines*- Biologicals, 1997, 25, p.27-34.

[55] GUZMAN MG. - *Advances in the development of a vaccine against dengue*- Acta Cient Venez, 1998 ; 49: p.38-45.

[56] VASQUEZ S., GUZMLAN MG., GUILLEN G., et al. - *Immune response to synthetic peptides of dengue prM protein*- Vaccine, 2002, 20, 13-14, p.1823-1830.

[57] ATRASHEUSKAYA A., PETZELBAUER P., FREDEKING T., et al. - *Anti-TNF α antibody treatment reduces mortality in experimental dengue virus infection*- Immunology and Medical Microbiology, 2003, 1641, p.1-10.

[58] JACOBS M. - *Dengue: emergence as a global public health problem and prospects for control*- Trans R Soc Trop Med Hyg, 2000, 94, 1: p.7-8.

[59] The Lancet Editorial - *Dengue in the Americas: time to talk*- The Lancet, 1997, 350, 9076, p.455.

[60] RAHMAN M., RAHMAN K., SIDDIQUE A., et al. - *First Outbreak of Dengue Hemorrhagic Fevre, Bangladesh*- Emerging Infectious Diseases, 2002, 8, 7, p.738-739.

[61] RODHAIN F. - *Fièvre jaune, dengue et autres arboviroses*- Encyclopédie Médico-Chirurgicale (Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS, Paris, tous droits réservés), Maladies infectieuses, 8-062-A-10, 2001, 19p.

SOMMAIRE

I- LA DENGUE : UN ENJEU MONDIAL POUR UNE MALADIE EMERGENTE

<u>A- Une maladie potentiellement létale</u>	p15
<u>1°) Forme asymptomatique</u>	p16
<u>2°) La fièvre dengue classique (DF)</u>	p16
a) <u>Tableau clinique</u>	p16
b) <u>Tableau biologique</u>	p18
c) <u>Influence du terrain sur l'évolution de la maladie</u>	p18
d) <u>Diagnostics différentiels</u>	p18
<u>3°) La fièvre dengue hémorragique (DHF)</u>	p19
a) <u>Tableau clinique</u>	p19
b) <u>Diagnostic différentiel</u>	p20
c) <u>Evolution vers le syndrome de choc (DSS)</u>	p21
<u>B- Epidémiologie</u>	p25
<u>1°) La dengue : une arbovirose</u>	p25
a) <u>Définition</u>	p25
b) <u><i>Aedes aegypti</i> : principal vecteur de la dengue</u>	p26
c) <u>Conséquences épidémiologiques</u>	p27
➤ <u>Présence des vecteurs</u>	p27
➤ <u>Répartition</u>	p27
➤ <u>Conditions de contamination</u>	p28
➤ <u>Relation entre les vecteurs et la virulence du virus</u>	p29

<u>2°) Situation passée, présente et prévisible de la dengue dans le monde</u>	p30
a) <u>Situation mondiale générale</u>	p30
b) <u>Etudes continentales</u>	p32
➤ <u>Asie</u>	p32
➤ <u>Amérique</u>	p35
➤ <u>Océanie</u>	p41
➤ <u>Afrique</u>	p42
➤ <u>Europe</u>	p42
c) <u>Etude transcontinentale</u>	p45
d) <u>Prévision de l'extension mondiale de la dengue</u>	p45

II- UNE MALADIE ENCORE IMPARFAITEMENT COMPRIS

A-Nature des agents infectieux.....p49

<u>1°) Les virus de la dengue : des <i>Flavivirus</i></u>	p49
a) <u>Acide nucléique</u>	p49
➤ <u>Protéines structurales</u>	p50
➤ <u>Protéines non structurales</u>	p50
b) <u>Capside</u>	p51
c) <u>Enveloppe</u>	p51

2°) Cycle de réplication.....p54

3°) Sérotypes et génotypes.....p55

B-La pathogenèse.....p58

1°) Propagation du virus après piqûre contaminante.....p58

<u>2°) Pathogenèse de la fièvre dengue hémorragique (DHF)</u>	p59
a) <u>Etude de la pathogenèse</u>	p59
b) <u>Réponse immunitaire des individus atteints</u>	p64

c) <u>Les facteurs de risque : l'hypothèse mixte de la virulence et de la surinfection</u>	p66
➤ <u>L'hypothèse immunologique</u>	p67
➤ <u>L'hypothèse de la virulence</u>	p69

III- LA STRATEGIE D'UN VACCIN

<u>A-Problèmes généraux liés à l'utilisation d'un vaccin contre la dengue</u>	p75
--	-----

<u>1°) Problèmes scientifiques</u>	p75
---	-----

<u>2°) Problèmes économiques</u>	p77
---	-----

B-Vaccins de première génération : bientôt sur le marché ?

.....	p77
<u>1°) Vaccins vivants atténués</u>	p77
a) <u>Atténuation des souches</u>	p78
b) <u>Absence de transmissions contaminantes</u>	p82
c) <u>Tolérance et immunogénicité</u>	p83
d) <u>Rôle de l'état immunitaire au moment de la vaccination</u>	p87

<u>2°) Vaccins entiers inactivés</u>	p88
---	-----

C-Vaccins de deuxième génération : encore à l'étude.....

<u>1°) Vaccins à sous-unités recombinées</u>	p89
---	-----

- Expression protéique par *Escherichia coli*.....p91
- Expression protéique par le *Baculovirus*.....p91
- Expression protéique de particules sub-virales (Eps) par une lignée cellulaire.....p93
- Synthèse des protéines prM et M en phase solide.....p93

2°) Vaccins vivants chimériques.....p95

a) Utilisation d'un clone DEN atténué.....p95

b) Utilisation du Chimerivax™.....p97

D-Vaccins de troisième génération : rêve scientifique ? ...p99

1°) Méthode.....p100

2°) Difficultés rencontrées.....p100

3°) Résultats actuels.....p101

4°) Evolution de la recherche actuelle.....p102

CONCLUSION

SERMENT DE GALIEN

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples:

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.

BON A IMPRIMER N° 315

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Vu, le Doyen de la Faculté

VU et PERMIS D'IMPRIMER
LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ

RESUME:

La dengue est l'arbovirose humaine la plus fréquente dans le monde: elle connaît un essor important depuis la seconde guerre mondiale et concerne aujourd'hui près de deux milliards d'individus, touche chaque année 50 à 100 millions de personnes et provoque environ 50 000 décès annuels.

En l'absence de traitement spécifique, la recherche vaccinale est primordiale, or la compréhension de cette maladie reste limitée. La recherche vaccinale est donc longue et difficile mais ouvre l'exploration et l'application de nombreuses et nouvelles voies de recherche.

TITLE : WILL DENGUE HAVE SOON A VACCINE? Explanation about motivations and difficulties for research.

SUMMARY :

Dengue is the most common human arboviral disease in the world: the number of cases has been growing very rapidly since the Second World War. It is now a great concern for about two billions of people. Each year, 50 to 100 millions of people suffer from dengue with a mortality of about 50 000 deaths per year.

Because of the lack of specific treatment, vaccine research is of most importance. But the disease is still not well understood. Therefore, vaccine research has been uneasy for a long time but has allowed the exploration of many new research paths.

DISCIPLINE: Diplôme d'état de docteur en pharmacie

MOTS-CLES: Dengue, Fièvre dengue hémorragique, Epidémiologie, Pathogénèse, Recherche vaccinale, Vaccin.

Faculté de Médecine – Pharmacie de Limoges, Laboratoire de Bactériologie-Virologie, rue du docteur Marcland, Limoges, FRANCE.