



**HAL**  
open science

## La dengue : un vaccin à l'horizon 2015

Jean-François Leorat

► **To cite this version:**

Jean-François Leorat. La dengue : un vaccin à l'horizon 2015. Sciences pharmaceutiques. 2011. dumas-00614768

**HAL Id: dumas-00614768**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-00614768v1>**

Submitted on 16 Aug 2011

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

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

UNIVERSITE JOSPEH FOURRIER  
FACULTE DE PHARMACIE

2011

THESE n°

# LA DENGUE : UN VACCIN A L'HORIZON 2015

## THESE

**PRESENTÉE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**DIPLÔME D'ÉTAT**

*par*

**M. LEORAT Jean-François**

***né le 14 juin 1982***

***à Roussillon***

THESE SOUTENUE PUBLIQUEMENT A LA FACULTE DE PHARMACIE DE  
GRENOBLE :

LE 1<sup>er</sup> Juillet 2011

DEVANT LE JURY COMPOSE DE :

Mme le professeur CORNET Murielle.

Président du jury

Mr le professeur DROUET Emmanuel

Mr le docteur CORNEILLE Jérémie

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER  
**FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE**  
Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté : Mme le Professeur **Renée GRILLOT**  
Vice –Doyen et Directeur des Etudes : Mme **Edwige NICOLLE**

**Année 2009-2010**

**MAITRES DE CONFERENCES DE PHARMACIE (n = 32)**

<b>ALDEBERT</b>	Delphine	Parasitologie - Mycologie (L.A.P.M)
<b>ALLENET</b>	Benoît	Pharmacie Clinique (THEMAS TIMC-IMAG / MCU-PH)
<b>BATANDIER</b>	Cécile	Nutrition et Physiologie (L.B.F.A)
<b>BRETON</b>	Jean	Biologie Moléculaire / Biochimie (L.C.I.B - LAN)
<b>BRIANCON-MARJOLLET</b>	Anne	Physiologie Pharmacologie (HP2)
<b>BUDAYOVA SPANO</b>	Monika	Biophysique (U.V.H.C.I)
<b>CAVAILLES</b>	Pierre	Biologie Cellulaire et génétique (L.A.P.M)
<b>CHOISNARD</b>	Luc	Pharmacotechnie (D.P.M)
<b>DELETRAZ-DELPORTE</b>	Martine	Droit Pharmaceutique
<b>DEMEILLIERS</b>	Christine	Biochimie (L.B.F.A.)
<b>DURMORT-MEUNIER</b>	Claire	Biotechnologies (I.B.S.)
<b>GEZE</b>	Annabelle	Pharmacotechnie (D.P.M.)
<b>GERMI</b>	Raphaële	Microbiologie (U.V.H.C.I. / MCU-PH)
<b>GILLY</b>	Catherine	Chimie Thérapeutique (D.P.M.)
<b>GROSSET</b>	Catherine	Chimie Analytique (D.P.M.)
<b>GUIEU</b>	Valérie	Chimie Analytique (D.P.M)
<b>HININGER-FAVIER</b>	Isabelle	Biochimie (L.B.F.A)
<b>JOYEUX-FAURE</b>	Marie	Physiologie –Pharmacologie (HP2)
<b>KRIVOBOK</b>	Serge	Biologie Végétale et Botanique (L.C.B.M)
<b>MOUHAMADOU</b>	Bello	Cryptogamie, Mycologie Générale (L.E.C.A)
<b>MORAND</b>	Jean-Marc	Chimie Thérapeutique (D.P.M.)
<b>MELO DE LIMA</b>	Christelle	Probabilités Biostatistiques (L.E.C.A)
<b>NICOLLE</b>	Edwige	Chimie Organique (D.P.M.)
<b>PEUCHMAUR</b>	Marine	Chimie Organique (D.P.M)
<b>PINEL</b>	Claudine	Parasitologie - Mycologie Médicale (CIB / MCU-PH)
<b>RACHIDI</b>	Walid	Biochimie (L.C.I.B)
<b>RAVEL</b>	Anne	Chimie Analytique (D.P.M.)
<b>RAVELET</b>	Corinne	Chimie Analytique (D.P.M.)
<b>SOUARD</b>	Florence	Pharmacognosie (D.P.M)
<b>TARBOURIECH</b>	Nicolas	Biophysique (U.V.H.C.I.)
<b>VANHAVERBEKE</b>	Cécile	Chimie organique (D.P.M.)
<b>VILLET</b>	Annick	Chimie Analytique (VP Form Adjoint UJF, D.P.M.)

Mise à jour du 03/09/2009

1

### **ASSISTANTS HOSPITALO-UNIVERSITAIRES (AHU) (N=2)**

<b>BUSSER</b> Benoit	Biochimie (IAB, AHU- Biochimie)
<b>MONNERET</b> Denis	Biochimie (HP2, AHU- Biochimie)

### **ENSEIGNANTS ANGLAIS (N = 3)**

<b>COLLE</b> Pierre Emmanuel	Maître de Conférence
<b>FITE</b> Andrée	Professeur Certifié
<b>GOUBIER</b> Laurence	Professeur Certifié

### **ATER (N = 5)**

ATER	<b>ELAZZOUI</b> Samira	Pharmacie Galénique
ATER	<b>SHEIKH HASSAN</b> Amhed	Pharmacie Galénique
ATER	<b>MAS</b> Marie	Anglais Master ISM
ATER	<b>ROSSI</b> Caroline	Anglais Master ISM
ATER	<b>SAPIN</b> Emilie	Physiologie Pharmacologie

### **MONITEURS ET DOCTORANTS contractuels (N= 6)**

**Lydia CARO** (01-10-2007 au 30-09-2010)  
**Benjamin DUCAROUGE** (01-10-2008 au 30-09-2011)  
**Romain HAUTECOEUR** (01-10-2008 au 30-09-2011)  
**Laureline POULAIN** (01-10-2009 au 30-09-2012)  
**Audrey BOUCHET** (01-10-2009 au 30-09-2012)  
**Mathieu FAVIER** (01-10-2009 au 30-09-2012)

**ATER** : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches

**CHU** : Centre Hospitalier Universitaire

**CIB** : Centre d'Innovation en Biologie

**DPM** : Département de Pharmacochimie Moléculaire

**HP2** : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire

**IAB** : Institut Albert Bonniot, Centre de Recherche « Oncogenèse et Ontogenèse »

**IBS** : Institut de Biologie Structurale

**LAPM** : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse des Microorganismes

**LBFA** : Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée

**LCBM** : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux

**LCIB** : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie

**LECA** : Laboratoire d'Ecologie Alpine

**TIMC-IMAG** : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation et de Cognition

**UVHCI**: Unit of Virus Host Cell Interactions

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER  
**FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE**  
Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté : Mme le Professeur **Renée GRILLOT**  
Vice –Doyen et Directeur des Etudes : Mme **Edwige NICOLLE**

**Année 2009-2010**

**PROFESSEURS A L'UFR DE PHARMACIE (N=17)**

<b>BAKRI</b>	Aziz	Pharmacie Galénique et Industrielle, Formulation et Procédés Pharmaceutiques (LR)
<b>BOUMENDJEL</b>	Ahcène	Chimie Organique (D.P.M.)
<b>BURMEISTER</b>	Wilhelm	Physique (U.V.H.C.I)
<b>CALOP</b>	Jean	Pharmacie Clinique (PU-PH)
<b>DANEL</b>	Vincent	Toxicologie (SMUR SAMU / PU-PH)
<b>DECOUT</b>	Jean-Luc	Chimie Inorganique (D.P.M.)
<b>DROUET</b>	Christian	Immunologie Médicale (GREPI – TIMC)
<b>DROUET</b>	Emmanuel	Microbiologie (U.V.H.C.I)
<b>FAURE</b>	Patrice	Biochimie (HP2 / PU-PH)
<b>GODIN-RIBUOT</b>	Diane	Physiologie – Pharmacologie (HP2)
<b>GRILLOT</b>	Renée	Parasitologie - Mycologie Médicale (Directeur UFR / LAPM, PU-PH)
<b>LENORMAND</b>	Jean Luc	Ingénierie Cellulaire, Biothérapies (Therex, TIMC)
<b>PEYRIN</b>	Eric	Chimie Analytique (D.P.M.)
<b>SEVE</b>	Michel	Biochimie - Biotechnologie (IAB, PU-PH)
<b>RIBUOT</b>	Christophe	Physiologie - Pharmacologie (HP2)
<b>ROUSSEL</b>	Anne-Marie	Biochimie Nutrition (L.B.F.A)
<b>WOUESSIDJEW</b>	Denis	Pharmacotechnie (D.P.M.)

### **PROFESSEUR EMERITE (N=1)**

**FAVIER**

Alain

### **PROFESSEURS ASSOCIES (PAST) (N=2)**

**BELLET**

Béatrice

Pharmacie Clinique

**RIEU**

Isabelle

Qualitologie (Praticien Attaché - CHU)

**TROULLER**

Patrice

**Santé Publique (Praticien Hospitalier - CHU)**

### **PROFESSEUR AGREGE (PRAG) (N=1)**

**GAUCHARD**

Pierre Alexis

Chimie (D.P.M.)

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire

HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire

IAB : Institut Albert Bonniot

LBFA : Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée

LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie

LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques

PAST : Professeur Associé à Temps Partiel

PRAG : Professeur Agrégé

UVHCI: Unit of Virus Host Cell Interactions

A NOTRE JURY DE THESE,

A Madame le professeur Muriel CORNET,

Vous nous faites l'honneur de présider notre jury de thèse.

Nous vous exprimons notre reconnaissance et notre profond respect.

A Monsieur le Professeur Emmanuel DROUET,

Vous nous faites le plaisir d'être le directeur de cette thèse.

Nous vous remercions pour la l'aide et la disponibilité.

A Monsieur le Docteur Jérémie CORNEILLE,

Vous nous avez aidés dans l'écriture de ce manuscrit.

Veillez trouver ici l'expression de nos sincères remerciements.

Mes remerciements vont également...

En premier lieu à mes parents pour leur soutien, leur confiance et les sacrifices qu'ils ont faits pour me permettre d'en arriver là. Je continuerai à tout faire pour que vous soyez fiers de moi.

A mes grands-parents, ma sœur et mon frère, mon beau-frère, mes oncles et tantes, mes cousins et cousines pour tous vos encouragements durant mes études.

A mon gros Nono pour tout le bonheur que tu m'as apporté du haut de tes 4 ans et à ta petite sœur qui va arriver, je t'aime mon grand.

A tous les professeurs qui ont jalonné ma scolarité ici à la fac mais aussi bien avant.

A tout le personnel de l'université Joseph Fourier.

A mes GT bien sûr. Vous êtes les meilleurs les gars « rouquin », « love machine », « pierro », « bonus » (toi tu as le droit à deux remerciements tu es sacrément bien vu), « malikoum », « Pierre- Alex », « le jouate », « romain ». On en a passé de sacrées soirées et ce n'est pas fini. A la prochaine.

A Nathalie, Stéphanie, Laetitia, Cricri, Thérèse et Aurélie pour tous les bons moments passés avec vous.

A Céline merci pour les conseils et la relecture, et désolé pour les fautes.

A tous les amis de pharma que j'ai pas cités.

A ma meute de loup et le club de foot de Beaurepaire, merci pour votre soutien et tous les apéros.



En hommage à Adri,

Déjà 9 ans que tu es parti.... Tu me manques...Je ne t'oublierai jamais ...

## Table des matières

<b>Liste des tableaux</b> .....	4
<b>Liste des figures</b> .....	5
<b>Liste des abréviations</b> .....	6
<b>Introduction</b> .....	8
<b>Première partie : état de l’art</b> .....	11
I. Le virus .....	19
A. Description .....	19
B. Polymorphisme moléculaire.....	20
C. Cycle cellulaire.....	20
D. Cellules cibles .....	23
II. Le vecteur.....	23
A. Description et répartition.....	23
B. Cycle de transmission.....	26
C. Situation en métropole. ....	27
III. La maladie.....	29
A. Dengue classique.....	29
B. La dengue hémorragique et la dengue syndrome choc. ....	30
C. Autre classification.....	32
D. Phase clinique.....	35
E. Complication particulière.....	37
IV. Epidémiologie .....	37
A. Vue d’ensemble .....	37
B. Paramètres épidémiologiques .....	38
1. L’âge.....	38
2. Prédisposition raciale.....	39
3. Sexe .....	40
4. Propagation en milieu rural .....	40
5. Le climat.....	41
V. Pathogénèse.....	43
A. Rôle de la réponse immunitaire.....	43
1. Immunité protectrice contre la dengue. ....	43

2. Dérégulation de la réponse immunitaire : rôle dans la pathogénicité.....	44
B. Virulence du virus.....	47
VI. Diagnostic biologique .....	47
VII. Traitement palliatif.....	50
VIII. Les moyens de lutte contre la maladie .....	53
A. Lutte contre le vecteur.....	53
1. But .....	53
2. Méthodes .....	54
B. Traitement antiviral .....	57
IX. Autres arboviroses .....	60
A. Arbovirose associées aux fièvres hémorragiques.....	60
B. Autres arboviroses répandues.....	60
<b>Deuxième partie: les vaccins.....</b>	<b>54</b>
I. Objectif d un vaccin .....	62
II. Vaccin vivant atténué.....	65
A. Vaccin dérivé de DENV.....	66
1. WRAIR / GSK Biologicals. ....	67
a) Recherche d'un vaccin monovalent.....	67
b) Vaccin tétravalent : phase I.....	68
c) Vaccin tétravalent : phase II.....	70
d) Premier essai du candidat sur des enfants.....	71
2. Vaccin Mahidol University/ Sanofi Pasteur.....	73
B. Vaccin chimérique.....	75
1. Virus de la fièvre jaune : VFJ17D (Acambis/Sanofi Pasteur). ....	76
a) Construction et développement préclinique.....	76
(1) Construction et production du vaccin .....	76
(2) Sécurité et immunogénicité <i>in vitro</i> .....	77
(3) Analyse <i>in vivo</i> .....	77
(4) Evolution sécurité relative aux caractères vivant et génétiquement modifié du vaccin .....	78
b) Evaluation clinique. ....	79
(1) Tolérance et virémie. ....	79
(2) Réponse humorale : mesure des AC neutralisants.....	80

(3) Evaluation de la réponse à médiation cellulaire.....	80
c) Conclusions et perspectives .....	80
2.Délétion région 3' non codante du virus DEN-4 : DEN $\Delta$ 30 (NIAID, NIH).....	81
a) Fabrication des candidats monovalents.....	81
b) Evaluation préclinique des monovalents.....	84
(1) Sur cultures cellulaires.....	84
(2) Chez la souris SCID-MICE-HUH-7 .....	84
(3) Chez le singe.....	85
c) Evaluation clinique.....	85
(1) Tolérance et virémie.....	85
(2) Séroconversion.....	86
d) Essai d'un vaccin tétravalent.....	86
e) Analyse particulière.....	87
(1) Analyse séquence ARN .....	87
(2) Transmission chez moustique .....	87
(3) Recombinaison.....	88
f) Conclusions et perspectives .....	88
3.Souche DEN-2 atténuée : DEN-2 PDK53 (CDC/In Viragen). .....	89
III.Vaccin inactivé.....	91
IV.Vaccin sous-unitaire.....	91
A.Candidat r80E (Hawaiï Biotech) .....	92
B.Candidat cEDIII (IPK/CIGB).....	93
C.Nucléo-capside DEN2: NLPs (Nucléocapside-Like Particules) .....	94
V. Vaccin à vecteur.....	94
A.Vecteur Adénovirus : CAdVax (GenPhar Inc.).....	95
B.Vecteur vaccin rougeole (CNRS/ Institut pasteur).....	97
VI. Vaccin ADN.....	99
VII. Nouvelle approche : virus à réplication incompétente : RepliVax. (Novartis).....	99
VIII.Stratégie vaccinale.....	101
<b>Conclusions</b> .....	97
<b>Annexes</b> .....	100
<b>Bibliographie</b> .....	107

## **Liste des tableaux**

Tableau 1 : classification FDH selon OMS. **P 24**

Tableau 2 : présentation des différents diagnostics biologiques. **P 42**

Tableau 3 : arbovirose a fièvre hémorragique. **P 52**

Tableau 4 : autres arboviroses répandues. **P 53**

Tableau 5 : résumé des caractéristiques du vaccin idéal. **P 56**

Tableau 6 : les principaux vaccins candidats contre la dengue. **P 95-96**

## Liste des figures.

Figure 1 : virus de la dengue. **P 10**

Figure 2 : génome du virus de la dengue. **P 10**

Figure 3 : arbre phylogénétique des souches des quatre sérotypes du virus de la dengue. **P 13**

Figure 4 : cycle réplcatif du virus de la dengue. **P 14**

Figure 5 : régions et pays en risque en 2008. **P 17**

Figure 6 : cycle de transmission du virus de la dengue par le moustique du genre *Aedes*. **P 17**

Figure 7 : évolution de la zone colonisée par *Aedes albopictus* en France métropolitaine entre 2004 et 2009. **P 20**

Figure 8 : zones d'observations d'*Aedes Albopictus* en France métropolitaine en 2009. **P 20**

Figure 9 : nouvelle classification selon l'OMS. **P 26**

Figure 10 : évolution clinique de la dengue. **P 28**

Figure 11 : chronologie des principaux symptômes de la FD et de la FDH. **P 28**

Figure 12 : prévalence et nombre de cas de dengue. **P 34**

Figure 13 : schéma représentatif de l'immuno-pathogénicité lors de la DHF. **P 34**

Figure 14 : Cinétique des Ag et des Ac lors d'une primo-infection de la dengue. **P 40**

Figure 15 : Cinétique des Ag et des Ac lors d'une infection secondaire de la dengue. **P 40**

Figure 16 : séquence de la région 3' de DEN4 sur laquelle les mutations ont été portées. **P 75**

Figure 17 : structure du vaccin chimère/recombinant rDEN2/DEN4Δ30. **P 75**

Figure 18 : pourcentage d'homologie de chaque séquence EDIII des quatre sérotypes. **P88**

Figure 19 : schéma des deux constructions CAdVax. **P88.**

Figure 20: représentation schématique du vaccin vecteur DEN1/rougeole. **P90**

Figure 21: représentation schématique des différentes construction tétravalente vecteur rougeole. **P90**

## Liste des abréviations

AC	Anticorps
Ag	Antigène
ADE	Antibody-Dependent Enhancement
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
C	Capside
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CIGB	Center for Genetic Engineering and Biotechnology
CNRS	Centre National de Recherche Scientifique
DEN-1, 2,3 ou 4	Virus de la dengue (sérotipe 1, 2, 3 ou 4)
DC-SIGN	Dendritique Cell- Specific Intercellular Adhesion molecule-3-Grabbing Nonintegrin
DSC	Dengue avec syndrome de choc
E	Protéine d'enveloppe
FD	Fièvre dengue
FDA	Food and Drug Administration
FDH	Fièvre dengue hémorragique
FH	Fièvre hémorragique
GSK	Laboratoire GlaxoSmithKline
HAS	Haute autorité de santé
Hct	hématocrite
IFN	Interféron
IL	Interleukine
INVS	Institut de Veille Sanitaire

IPK	Kouri Tropical Medicine Institute
JE	Encéphalite Japonaise
NIAID	National Institute of Allergy and Infectious Diseases
NIH	National Institutes of Health
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PDK	Cellules primaires de rein de chien
PNH	Primate non-humain
prM	(précurseur) protéine de membrane
PRNT	Plaque Reduction Neutralisation Assay
SNC	Système nerveux central
TNF	Facteur de nécrose tumorale
UTR	Untranslated region
VFJ	Virus de la fièvre jaune
VFJ17D	Virus de la fièvre jaune atténué vaccinale
VHC	Virus de l'hépatite C
VIH	Virus du sida
WNV	Virus du Nil occidental
WRAIR	Walter Reed Army Institute of Research



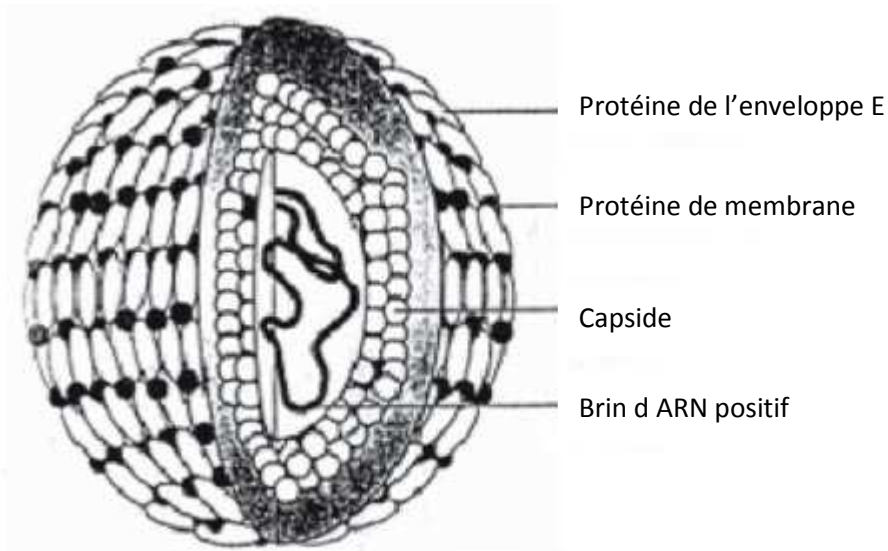
## INTRODUCTION

La dengue est une maladie récente dans l'histoire de l'humanité. Elle a été évoquée pour la première fois au XVII<sup>ème</sup> siècle dans les Antilles puis depuis la fin du XVIII<sup>ème</sup> en Asie, en Afrique et en Amérique du nord [1]. De premières épidémies eurent lieu en 1897 en Australie, en 1926 aux Seychelles, en 1927 à Tunis ou en 1928 à Athènes [2]. Mais cette maladie a connu une mondialisation et une forte expansion après la seconde guerre mondiale. La première épidémie majeure eu lieu en 1953 à partir de Manille aux Philippines et se propagea rapidement à la Thaïlande, au Viêt-Nam, à l'Indonésie puis d'autres pays d'Asie devinrent endémiques. Avant 1970 seuls 9 pays étaient endémiques, ils étaient 4 fois plus en 1995 [3], et presque 7 fois plus de nos jours [4]. Aujourd'hui, près de 40% de la population mondiale est exposée, regroupée dans la zone intertropicale là où le vecteur de la maladie, le moustique du genre *Aedes*, est trouvé [4]. Ces régions souvent pauvres, surpeuplées, avec des conditions d'hygiène difficiles sont des endroits très propices à la propagation du moustique et par conséquent de la maladie. De plus avec les modifications climatiques et la propagation du vecteur vers des contrées jusqu'ici hostiles, la maladie pourrait apparaître régulièrement dans nos régions comme en ont attesté les premiers cas autochtones dans le sud-est de la France en 2010 ou à Miami [5,6].

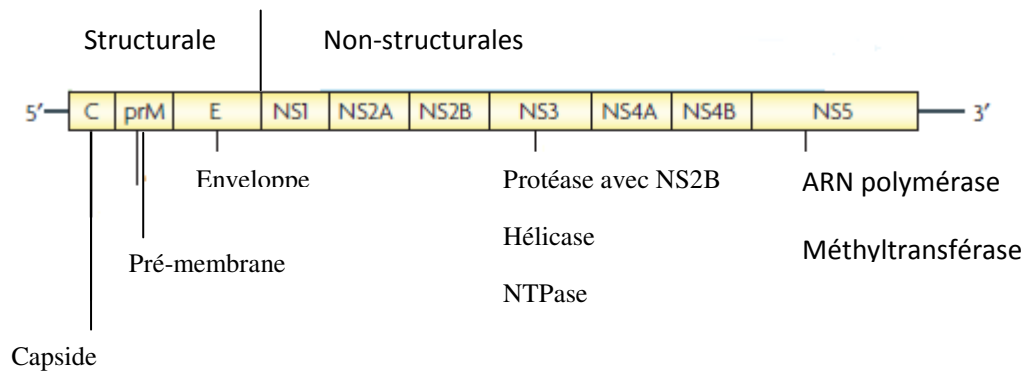
Autrefois appelée « petit paludisme », la dengue se traduit dans la plupart des cas par une fièvre accompagnée de douleurs et d'une forte asthénie. Mais parfois certains vont développer des symptômes beaucoup plus sévères regroupés sous les termes « fièvre dengue hémorragique » et « dengue avec syndrome de choc ». Le système immunitaire semble clairement lié à la physiopathologie de la maladie même si les mécanismes ne sont pas totalement élucidés. D'autres critères comme le sérotype viral, l'âge, le sexe ou l'origine ethnique du malade peuvent influencer le spectre de la maladie.

La lutte contre cette maladie, encore peu connue il y a quelques mois en France, est devenue depuis une vingtaine d'années une priorité. L'hypothétique réchauffement climatique et les déplacements de populations qui vont devenir de plus en plus importants rendent nécessaire de se donner les moyens pour y arriver. Trois grands axes peuvent être suivis : la lutte contre le vecteur, la recherche d'un vaccin ou l'utilisation de traitements antiviraux. La lutte contre le moustique a déjà montré son efficacité sur le continent américain dans les années 70 mais la baisse de vigilance a permis la réintroduction du vecteur. Malgré cela des moyens existent et je l'évoquerai dans ce texte. La recherche d'un vaccin est le principal objectif. Depuis plus de 20 ans certains sont en développement et se trouvent dans des phases cliniques avancées. Toutefois le développement d'un vaccin se heurte à plusieurs difficultés : l'absence de modèle animal, la nécessité d'une protection à long terme et contre les quatre sérotypes, les risques d'aggravation de la maladie dépendante des anticorps, les problèmes de réactogénicité. Malgré cela les récents progrès des technologies laissent apparaître de grands espoirs. Enfin l'utilisation d'une chimiothérapie antivirale, dont les avancées lors de la dernière décennie notamment dans le traitement du VIH ou de l'hépatite C ont été formidables, pourrait constituer une formidable alternative lors de traitement curatif ou préventif.

Le but de ma thèse va être d'évoquer les principaux vaccins actuellement en développement, leurs principales caractéristiques, leurs avantages et inconvénients afin de dégager un potentiel bon candidat.



**Figure 1: virus de la dengue.** Enveloppe d'un diamètre d'environ 50nm. Il contient un seul brin d'ARN positif d'environ 11kb et trois protéines structurales (capside (C), la membrane (M) et l'enveloppe (E))



**Figure 2: génome du virus de la dengue [7]:** Code pour 3 protéines structurales et 7 protéines non-structurales. Une coiffe en 5' (pas sur la figure) et deux régions non-traduites (UTR) en 3' et 5'.

# PREMIERE PARTIE : ÉTAT DE L ART

## I. Le virus

### A. Description

Le virus de la dengue est un flavivirus de la famille des flaviridae, qui contient d'autre virus dangereux comme celui de la fièvre jaune (VFJ) ou du virus du Nil (WNV). Il existe quatre phénotypes (DEN-1, DEN-2, DEN-3 et DEN-4) capables de causer l'ensemble des symptômes des plus asymptotiques aux plus graves. Ces quatre souches différentes co-circulent parfois dans une même zone endémique pouvant provoquer alors les symptômes les plus graves [7].

Le virus de la dengue est un virion entouré d'une enveloppe d'un diamètre d'environ 50nm. Il contient un seul brin d'ARN positif d'environ 11kb et trois protéines structurales (capside (C), la membrane (M) et l'enveloppe (E)) [7] (voir fig. 1).

Le génome contient une coiffe en 5' mais pas de queue polyadénylée en 3'. Il possède également deux régions non-traduites (UTR : Untranslated Region) en 3' et 5' ayant un rôle clé dans la régulation de la traduction et la réplication. La région 3'-UTR contient une structure en tige boucle très bien conservée chez les flavivirus ayant probablement un rôle important dans la réplication, dans la traduction et la synthèse d'ARN, et dans l'interaction avec des protéines virales et/ou cellulaires. Elle comporte d'autres motifs bien retrouvés chez les flavivirus à moustiques CS1, CS2 et RCS2 probablement impliqués eux aussi [8].

Le génome viral code finalement pour trois protéines structurales citées ci-dessus et sept protéines non-structurales (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b et NS5) (fig. 2).

La surface du virion mature est lisse avec les protéines de l'enveloppe alignées par paires parallèles à la surface du virion. La glycoprotéine E est impliquée

dans la fixation et la fusion du virion aux cellules et est également la principale cible des anticorps protecteurs. Elle est divisée en trois domaines structuraux ou fonctionnels: le domaine central, le domaine de dimérisation qui présente un peptide de fusion et le domaine de liaison aux récepteurs. La pénétration du virus dans la cellule se fait par l'intermédiaire de récepteurs à endocytose, puis est suivie par la fusion des membranes virales et cellulaires médiée par la protéine E pH-dépendant [7].

Les protéines non-structurales sont impliquées dans la pathogenèse de la maladie grave. NS1 est impliquée dans la réplication virale RNA. Elle peut-être exprimée à la surface du virion ou dans le milieu extracellulaire. Le taux de protéines NS1 sécrétées (sNS1) dans le plasma est positivement corrélé avec les titres viraux [10]. NS3 et NS5 jouent des rôles important dans la réplication virale [9] (fig. 2).

#### B. Polymorphisme moléculaire.

Le pourcentage d'homologie entre les quatre sérotypes varie entre 60 et 70%. Au sein même de ces sérotypes il existe des sous-types mis en évidence par l'analyse de l'arbre phylogénétique (fig.3). Certains de ces génotypes ont même des cycles sylvatiques, ce qui peut laisser penser que c'était le mode de transmission primitif avant l'apparition du cycle humain. Ces sous-types circulent en des endroits différents et l'introduction d'un génotype dans une autre zone géographique peut favoriser le remplacement d'un génotype par un autre et avoir des conséquences sur l'incidence et la gravité de la maladie [8].

#### C. Cycle cellulaire

Après la fusion, le génome ARN se dissocie de la nucléocapside virale et pénètre dans le cytoplasme où il fonctionne comme ARNm et est traduit sous la forme d'une polyprotéine précurseur. Celle-ci est clivée en protéine structurale ou NS par des protéases d'origine cellulaire ou virale (NS3). L'ARN-

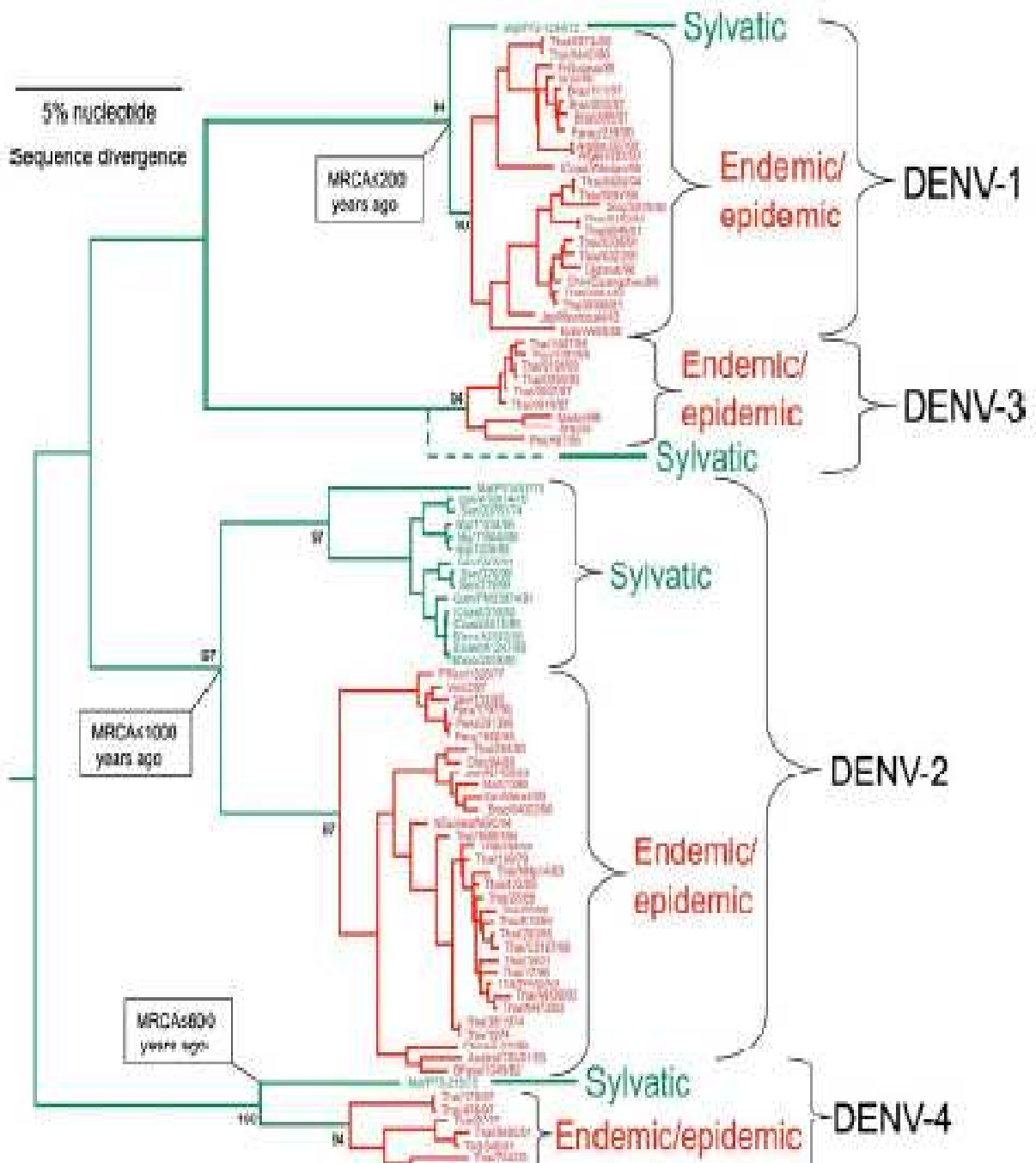


Figure 3: arbre phylogénétique des souches des quatre sérotypes du virus de la dengue [8].

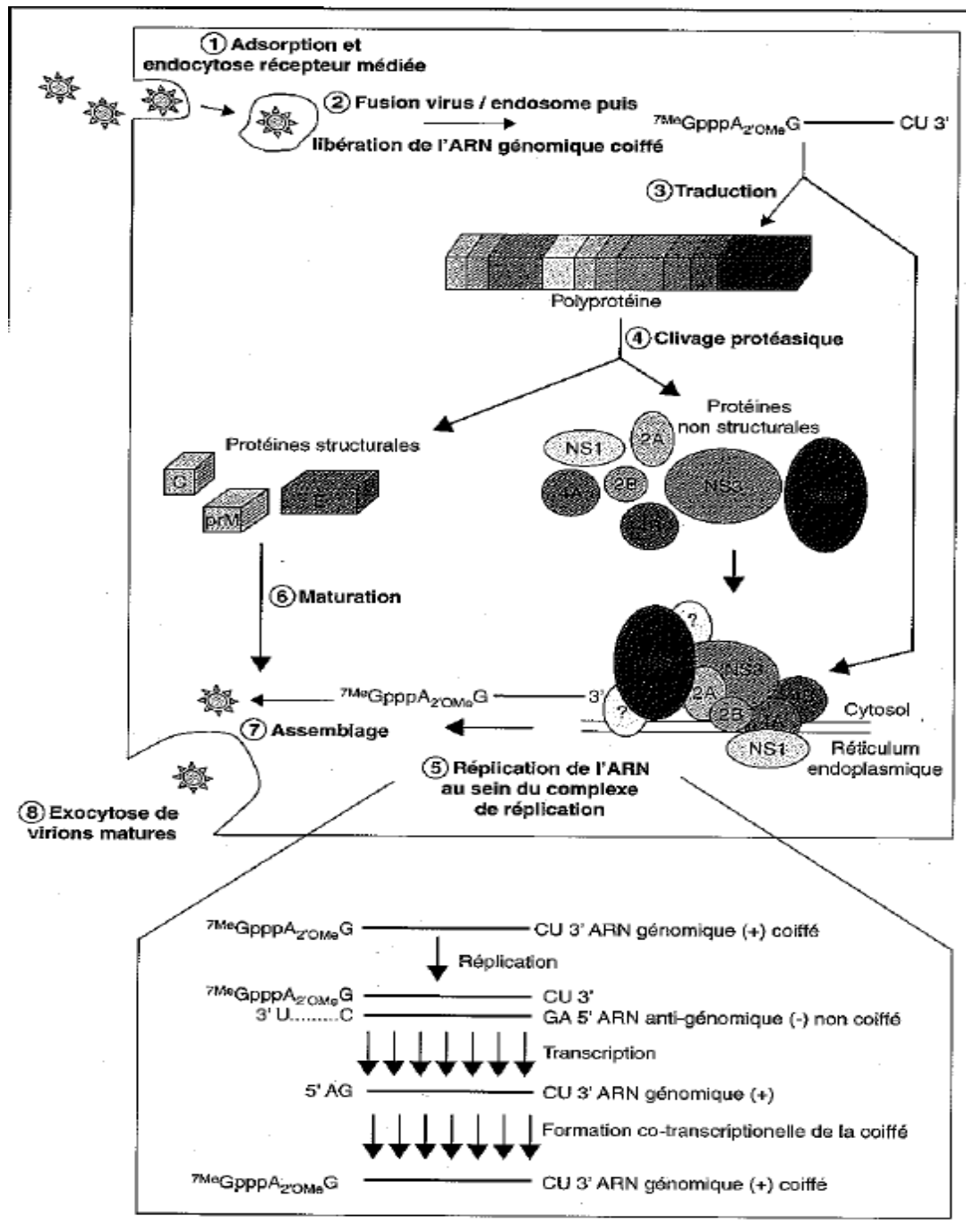


Figure 4: cycle répliatif du virus de la dengue [9].

polymérase virale (C-Terminal de NS5) permet la production d'ARN génomique et anti-génomique au sein d'un complexe de réplication (prot. NS + prot. Cellulaire). La protéine NS3 supporte également une activité hélicase et permet la pose de la coiffe. L'assemblage du virion se produit dans le réticulum endoplasmique et les virus peuvent sortir de la cellule par l'intermédiaire du réseau de Golgi. [7,9] (voir fig.4).

#### D. Cellules cibles

Du fait de l'absence de modèle animal mimant l'infection du virus chez l'homme, la compréhension de la pathogénie de la dengue est difficile [11]. Toutefois il a été démontré que les cellules dendritiques (CDs), les monocytes et les macrophages étaient les principales cibles du virus, les CDs étant les premières cibles lors de l'entrée du virus après la piqûre par le moustique. Les études sur les tissus issus de patients infectés laissent penser que d'autres lignées cellulaires comme les lymphocytes ou les cellules endothéliales peuvent être le site de la réplication du virus et que les organes cibles sont entre autres le foie, la rate, les ganglions lymphatiques, la moelle osseuse [11].

## II. Le vecteur

#### A. Description et répartition.

Le virus de la dengue est un arbovirus c'est-à-dire qu'il nécessite un vecteur arthropode suceur de sang en l'occurrence un moustique du genre *Aedes* pour effectuer son cycle reproductif, principalement *Aedes Aegypti*. Il s'agit d'une espèce tropicale ou subtropicale, largement distribué à travers le monde surtout entre la latitude 35°N et 35°S et particulièrement adapté à la vie urbaine. Cette limite géographique correspond environ à une isotherme hivernale de 10°C. Il a déjà été trouvé au delà du 45°N durant des mois très chauds mais n'a pas survécu à l'hiver. Aussi on ne le retrouve pas à des altitudes supérieures à 1000m [4]. (fig. 5)



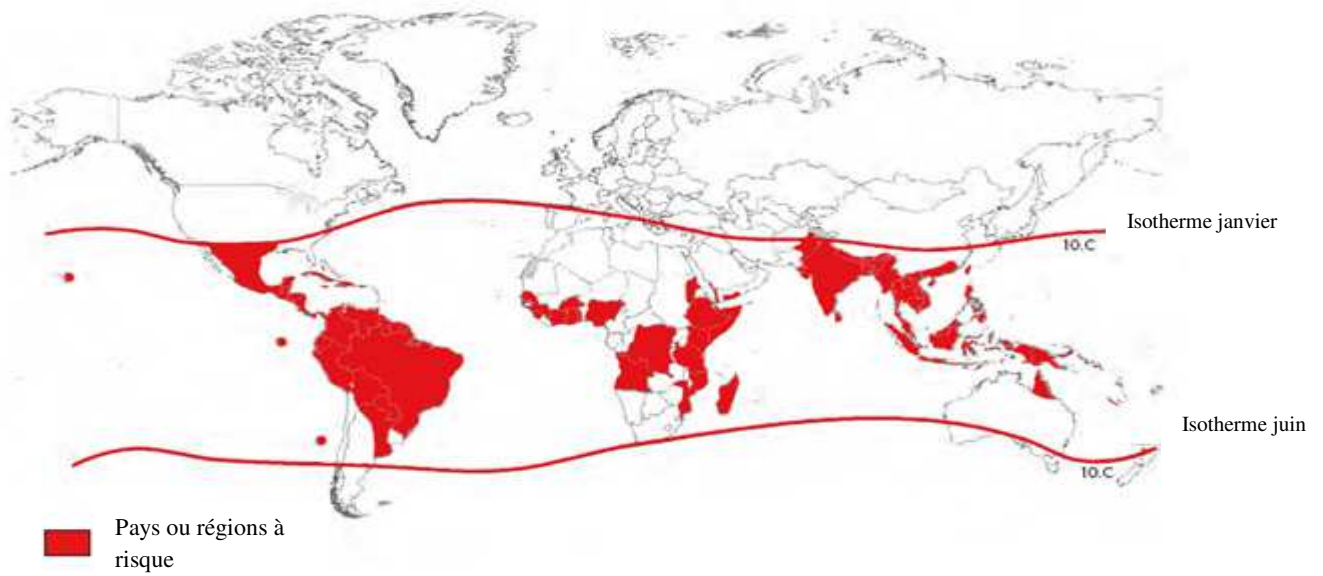
Les stades larvaires sont retrouvés généralement dans des habitats remplis d'eau, notamment des récipients artificiels liés à l'habitation et à l'activité humaine aussi bien à l'intérieur qu'à l'extérieur des habitations. Les types de récipients peuvent varier d'une région à une autre (surtout des céramiques aux Philippines et en Birmanie, des pneus ou des boîtes en Inde ou des petits bols en Thaïlande) [12].

D'après une étude menée dans des grandes villes de six pays d'Asie du sud-est, les conditions optimales de reproduction du vecteur seraient des récipients non protégés (par un couvercle par exemple), non utilisés (augmentation du nombre de pupes (stade larvaire) après une semaine), à l'extérieur sous des broussailles ou certains arbustes [12].

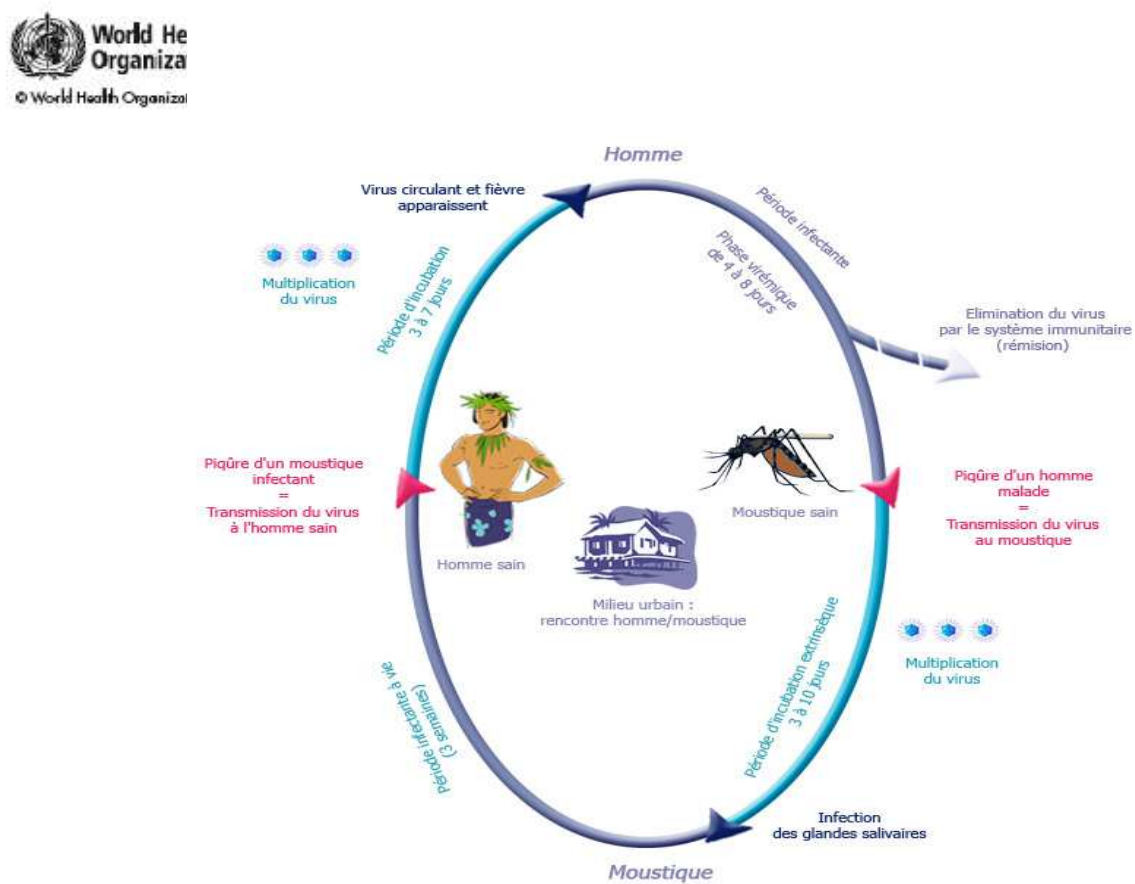
Ainsi les espaces privés, les zones péri- ou intra-domestiques sont plus à même d'offrir ces conditions que les lieux publics ou commerciaux même si dans les quartiers la présence d'édifices à forte densité (écoles, lieux de culte notamment) montre un nombre de lieux de reproduction plus important que ceux qui n'en possèdent pas [12].

La qualité de l'eau a aussi une importance. Ainsi les larves d'*Ae. Aegypti* se développent de préférence dans l'eau de pluie non traitée même si les récipients sont à l'intérieur.

Les conditions sanitaires et sociales jouent un rôle dans la reproduction du vecteur. Ainsi au Sri Lanka, les pupes sont retrouvées principalement dans des petits récipients laissés à l'abandon car rarement éliminés par les services de nettoyage ou la population qui préfère les grands récipients. Les mauvaises conditions de logement, la proximité d'un dépotoir ou d'un cimetière sont des variables qui semblent favoriser cette prolifération. De même la présence d'eau courante a une relation complexe avec la reproduction car un approvisionnement



**Figure 5: régions et pays à risque en 2008.** Les lignes isothermes de janvier et de juin indiquent les limites géographiques potentielles dans l'hémisphère nord et sud pour la survie à l'année de *Aedes Aegypti*, principal vecteur de la maladie. [4]



**Figure 6: cycle de transmission du virus de la dengue par le moustique de genre *Aedes*.**

irrégulier ou son absence peut conduire à une conservation prolongée de l'eau. Les conditions sociales sont corrélées à une plus ou moins bonne connaissance sur la dengue et sa transmission et par conséquent une meilleure connaissance permet une production limitée du vecteur [12].

Des études suggèrent que la plupart des femelles *Aedes Aegypti* peuvent passer leur vie dans ou autour des maisons où elles sont nées. Cela peut vouloir signifier que les populations plus que les moustiques peuvent déplacer rapidement le virus à l'intérieur et entre les communautés.

D'autres espèces de moustiques peuvent aussi transporter le virus de la dengue et l'inoculer par exemple *Aedes Albopictus*, *Aedes Polynesiensis* et plusieurs espèces d'*Aedes Scutellaris complexes*. Chacune de ces espèces a une écologie, un comportement et une répartition géographique particulière. Durant les dernières décennies *A. Albopictus* ou « moustique tigre » s'est propagé de l'Asie à l'Afrique, aux Amériques et en Europe notamment favorisé par le commerce internationale des pneus usagés dans lesquels les œufs sont déposés quand ils contiennent de la pluie. Les œufs peuvent restés viables plusieurs mois en absence d'eau [4]. Il a été responsable des épidémies de chikungunya et des premiers cas autochtones de la dengue en métropole française en septembre 2010.

#### B. Cycle de transmission.

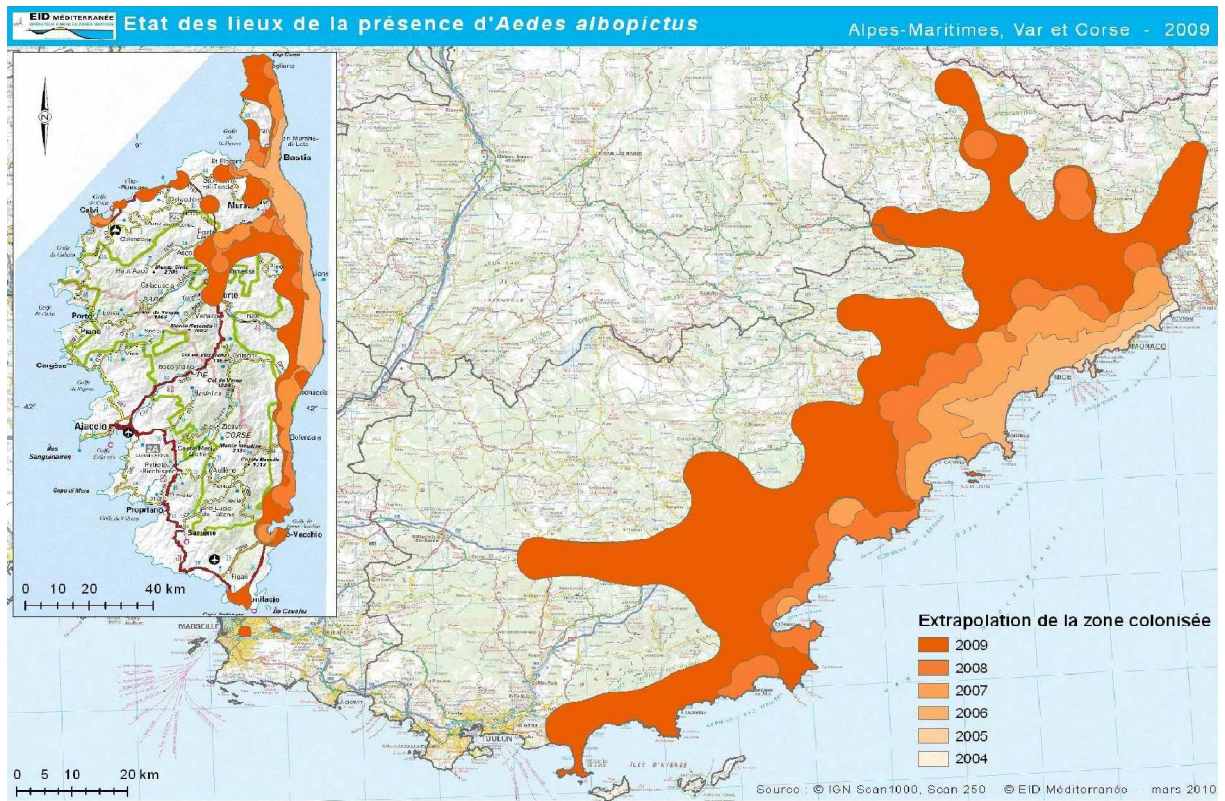
Le virus de la dengue est un des rares arbovirus à ne pas avoir de cycle enzootique c'est-à-dire nécessitant un animal amplificateur. Au contraire le virus est maintenu par un cycle de transmission homme-moustique-homme (figure 6). Un cycle sylvatique existe dans les forêts d'Asie et d'Afrique de l'ouest entre primate et moustique genres *Aedes*, mais la contribution de ce cycle semble mineur en comparaison au cycle épidémique observé dans les villes [7].

Grâce à la forte virémie occasionnée lors de l'infection de l'homme par le virus de la dengue, celui-ci ne nécessite pas d'hôte intermédiaire amplificateur. La femelle moustique se contamine lors d'un repas de sang. Le virus infecte ensuite le vecteur en 8 à 12 jours. Après cette période d'incubation extrinsèque le virus peut-être transmis à d'autres humains lors de piqûre. Le moustique reste infectieux toute sa vie. Une transmission verticale chez le moustique est possible. Plusieurs facteurs peuvent influencer la dynamique de transmission du virus - y compris les facteurs environnementaux et climatiques, les interactions hôte-pathogène et les facteurs immunologiques des populations touchées. [4]

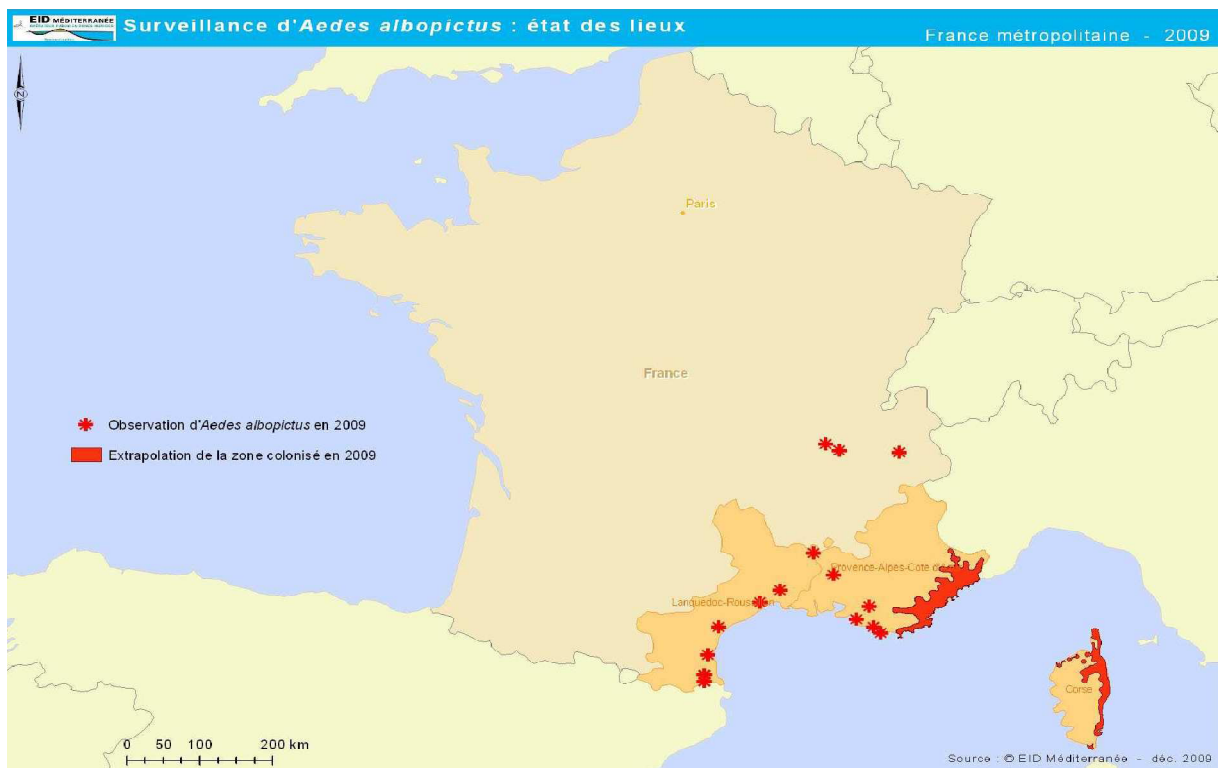
### C. Situation en métropole.

Présent en Italie et en Espagne depuis une vingtaine d'années, le ministère de la santé a mis en place un système de surveillance en 1998 contre le moustique *Aedes albopictus* ou « moustique tigre » [13]. Détecté pour la première fois de façon sporadique dans les départements de Haute-Corse et des Alpes-Maritimes entre 2002 et 2004, il s'est depuis 2006 installé dans ces départements ainsi que dans le Var et certains quartiers de Marseille [14] (fig. 7). En plus de la mise en évidence des populations implantées, des introductions spontanées ont été relevées dans d'autres régions (fig. 8). Ces détections ont permis un traitement efficace mais rendent compte de la vulnérabilité du territoire français [14].

Le moustique tigre est originaire de l'Asie du sud-est et a gagné de nombreux territoires. Son écologie est proche de celle d'*Ae. Aegypti* (gîtes de reproduction d'origine humaine) et il est particulièrement agressif et pique la journée notamment à l'aube et au crépuscule [14]. Il a été le vecteur en 2010 des premiers cas autochtones de dengue en France, dans la région de Nice.



**Figure 7: évolution de la zone colonisée par *Aedes albopictus* en France métropole entre 2004 et 2009 [14].**



**Figure 8: zones d'observations d'*Aedes albopictus* en France en 2009 [14]. On observe bien les points de détection hors de la zone d'implantation du moustique.**

### III. La maladie

La dengue est une maladie fébrile qui reste souvent pauci ou asymptomatique. Elle occasionne une forte poussée de fièvre dans sa forme classique, très rarement mortelle, mais parfois, dans environ 1% des cas, des complications bien plus graves peuvent se présenter notamment chez les préadolescents entraînant alors une fièvre hémorragique (FDH) ou un syndrome de choc (DSC). Ces deux complications peuvent être mortelles.

L'OMS a classé les formes cliniques de la dengue en trois catégories [15] : fièvre aiguë non spécifique, la fièvre dengue classique (FD) et la fièvre dengue hémorragique (FDH).

Alors que la dengue classique est connue depuis plus de deux cents ans, les premiers cas de FDH et DSC ont été relevé pour la première fois dans les années 1950.

#### A. Dengue classique.

La période d'incubation est généralement de 5 à 6 jours (extrêmes 3-15 jours). Lorsque les symptômes apparaissent, ils associent pendant 2-7 jours une fièvre élevée (le plus souvent  $> 39^{\circ}\text{C}$ , pouvant atteindre  $40^{\circ}\text{C}$ -  $41^{\circ}\text{C}$ ) de début brutal et des symptômes non-spécifiques tels que

- des céphalées frontales,
- des douleurs rétro-orbitaires,
- des douleurs musculo-articulaires,
- une asthénie,
- douleurs abdominales,
- nausées et vomissements.

Le malade présente souvent un rash ( $> 80\%$  des cas) transitoire, polymorphe (maculaire, maculo-papuleux, morbiliforme, scarlatiniforme), le plus souvent

situé sur le tronc et pouvant s'étendre sur les bras et les jambes et aux extrémités.

Les manifestations hémorragiques limitées ne sont pas rares : pétéchies, purpura, gingivorragies, épistaxis ou saignement digestif.

Sur le plan biologique sont associées de manière constante une leucopénie, une thrombopénie et une élévation des transaminases.

La dengue classique donne généralement un rétablissement complet en une à deux semaines même si dans de rares cas la convalescence est longue, notamment chez l'adulte, avec une phase prolongée d'asthénie. Mais parfois des formes atypiques peuvent être fatales sans pouvoir être classées dans les formes sévères que sont la FDH et la DSC.

#### B. La dengue hémorragique et la dengue syndrome choc.

Dans certains cas, l'infection évolue après deux à sept jours et la défervescence thermique vers un tableau clinique plus grave, en relation avec la thrombocytopénie, due à une élévation de la perméabilité vasculaire et une coagulopathie diffuse avec ecchymoses en nappe, saignement digestif abondant (hématémèse franche) avec ou sans syndrome de choc.

La FDH est ainsi définie par l'association de quatre critères suivants [16]:

- Fièvre ou antécédent de fièvre ayant duré 2 à 7 jours ;
- Manifestations hémorragiques
  - un test du tourniquet<sup>1</sup> (test du lacet) positif,

---

<sup>1</sup> Le test du tourniquet est effectué en gonflant pendant cinq minutes un brassard au niveau du bras à une pression équidistante de la pression systolique et de la pression diastolique. Le test est positif si 20 ou plus pétéchies sont retrouvés sur 2,5 cm<sup>2</sup>. Le test peut rester négatif durant la phase de choc profond. Il redevient positif, parfois fortement positif, si il est effectué après la récupération du choc.

- Pétéchies, ecchymoses ou purpura
- Saignement des muqueuses, du tube digestif, au niveau des sites d'injections
- Hématémèse ou méléna ;
- Trombocytopénie → Plaquettes  $\leq 100\ 000$  par  $\text{mm}^3$  ;
- Fuite plasmatique mise en évidence par au moins :
  - une hémococoncentration (hématocrite augmenté d'au moins 20% à la valeur normale pour l'âge, le sexe et la population, ou hématocrite diminué d'au moins 20% après remplissage vasculaire),
  - ou par la présence d'épanchements pleuraux, ascite ou hypoprotidémie.

Dans l'état de choc de la dengue tous les critères de la FDH doivent être présents associé à une insuffisance circulatoire manifestée par :

- pouls faible et rapide
- pression différentielle faible (20mmHg).

Ou par :

- hypotension<sup>2</sup> en rapport avec l'âge ;
- peau froide, moite et agitation.

L'OMS a classé la FDH en quatre grades, les grades III et IV correspondant à la DSC.

---

<sup>2</sup> : Hypotension est définie par une pression systolique < 80 mm Hg pour un enfant de moins de cinq ans et < 90 mm Hg pour des enfants de cinq ans et plus.



Tableau 1 : classification FDH selon OMS [16]

Grade I	Fièvre accompagné de symptômes non spécifiques, signes hémorragiques tels qu'ecchymoses, pétéchies, ou un test tourniquet positif
Grade II	Hémorragies spontanées
Grade III	pouls faible et rapide ; faible pression différentielle ou hypotension <sup>2</sup> en rapport avec l'âge et peau froide, moite et agitation
Grade IV	Choc profond avec hémorragie très importante, tension artérielle et pouls indétectable.

### C. Autre classification

Cette classification de l'OMS a été formulée en 1974 au cours d'un comité consultatif technique lors d'une réunion à Manille aux Philippines. Elle a été essentiellement basées sur les études pionnières réalisées au Children's Hospital de Bangkok au cours des années 60. Après des modifications mineures, l'OMS a donc publié la classification vue au paragraphe précédent [17].

Mais des études au début des années 2000 dans des régions endémiques ont démontré des incohérences et les difficultés à utiliser cette classification et jugé nécessaire une nouvelle manière de classer [18, 19].

Une étude menée au Viêt Nam [18] montre que parmi les quatre critères recommandés par l'OMS pour reconnaître une FDH, deux (saignement et thrombocytopenie) sont presque aussi fréquents chez les enfants avec une FD que ceux avec une FDH et relativement aussi fréquents chez enfants souffrant d'autres maladies fébriles. Le test du tourniquet montre aussi un manque de spécificité et de sensibilité. De même 18% des enfants ayant présenté un choc lors de l'étude ne remplissaient pas les quatre critères demandés par l'OMS.

De nombreux rapport ont mis en avant ces difficultés et demandaient une nouvelle définition [3, 20-23].

Certaines régions endémiques utilisent même des classifications différentes [3,20] pour faciliter la prise en charge des malades et la surveillance inter-épidémique.

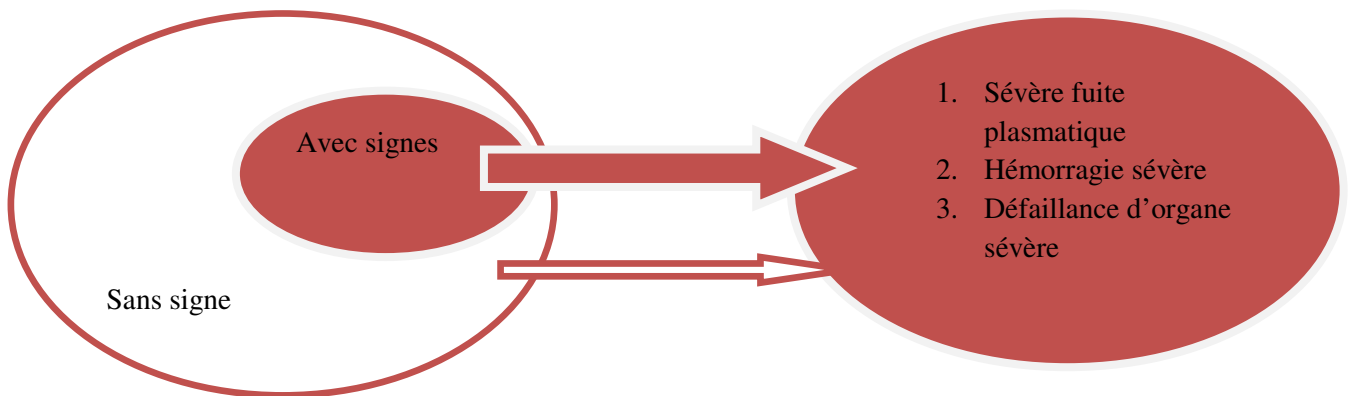
D'après les auteurs et les rapports, elle est inappropriée pour différentes causes :

- Les trois formes cliniques définies ne sont pas forcément trois entités distinctes mais plutôt un spectre continu de la maladie (par exemple thrombopénies et saignement sont retrouvés à fréquence presque égale entre FD et FDH).
- Les quatre critères exigés ne sont pas toujours trouvés ou ne peuvent pas toujours l'être.
  - Une numération plaquettaire seule ne peut pas toujours prouver une thrombopénie.
  - La détection d'une thrombopénie et d'une fuite capillaire précoce nécessite des tests de laboratoire souvent non disponibles dans les premiers centres de soins des régions endémiques les plus pauvres.
- La notion de fièvre hémorragique met trop l'accent sur le caractère « hémorragique » de la maladie alors que le critère principal devrait plutôt être l'augmentation de la perméabilité vasculaire. Les signes d'hémorragie peuvent être présent ou non durant la maladie ou inversement être présent chez les malades non atteints de FDH. Et lorsqu'une hémorragie mortelle se produit c'est presque toujours une manifestation tardive et associée à un choc profond et prolongé.
- La classification a été établie pour des enfants de l'Asie du sud-est hors il semble que l'âge, le sexe et la région endémique aient une influence sur l'expression de la maladie.

Suivant ces recommandations, un groupe d'experts réunis par l'OMS et le TDR (programme spéciale de recherche et de formation sur les maladies tropicales notamment dans les pays pauvres voir le lien : <http://apps.who.int/tdr/>) en 2008, ont proposé une nouvelle classification pour faciliter le travail des médecins et des infirmières, permettre à une identification plus rapide et l'administration des

## DENGUE +/- SIGNES D'ALARME

## DENGUE SEVERE



### CRITERE POUR DENGUE +/- SIGNE D'ALARME

### CRITERE POUR DENGUE SEVERE

#### Dengue probable

Vivant/voyageant dans une région endémique

Fièvre et 2 symptômes parmi :

- Nausées, vomissement
- Rash
- Douleur
- Test tourniquet positif
- Leucopénie
- Tout signe d'alarme

#### Signes d'alarme

- Douleurs abdominales
- Vomissements persistants
- Signe clinique d'accumulation de liquide
- Saignement des muqueuses
- Léthargie, instabilité psychomotrice
- Hypertrophie du foie > 2cm
- Laboratoire : augmentation hct associé à une rapide diminution des plaquettes

#### Fuite plasmatique sévère

Conduisant à

- Choc
- Accumulation de fluide avec détresse respiratoire.

**Saignement sévère** évalué par un clinicien

#### Défaillance d'organe

- Foie : ASAT/ALAT  $\geq$  1000
- SNC : troubles de la conscience
- Cœur et autres organes.

#### Confirmation par laboratoire

**Figure 9: nouvelle classification OMS [4].** Cette classification par degré de sévérité devrait être beaucoup plus simple, montrant bien que la dengue peut être vue comme une seule entité avec différentes présentations cliniques, et devrait faciliter le travail des cliniciens notamment lors des épidémies les plus sévères. Il faut retenir qu'une dengue sans signes d'alarme peut amener à une forme sévère.

traitements adéquats dans les cas des formes les plus sévères [24]. Ces révisions étaient fondées sur un examen des données cliniques provenant d'études récemment achevées dans sept pays d'Asie du sud-est, du pacifique occidental et d'Amérique latine appuyé par TDR et OMS et financé par l'Union Européenne et Welkom Trust.

L'étude multicentrique appelée DENCO (DENgue Control) a conclu qu'en utilisant des tests cliniques et de laboratoires simples, il était possible de classer les patients atteints de dengue plus simplement en deux catégories selon le niveau de gravité, avec certaines subdivisions, et tout en présentant quelques avantages opérationnels.

« L'identification rapide d'une maladie grave peut aider le personnel de santé à décider de l'hospitalisation du patient ou de son traitement en consultation externe » a déclaré le directeur du TDR Robert Ridley. « Une meilleure classification contribuera également à améliorer les rapports de surveillance et de détection précoce des épidémies de cette maladie dont la croissance est l'une des plus importantes » a-t-il ajouté.

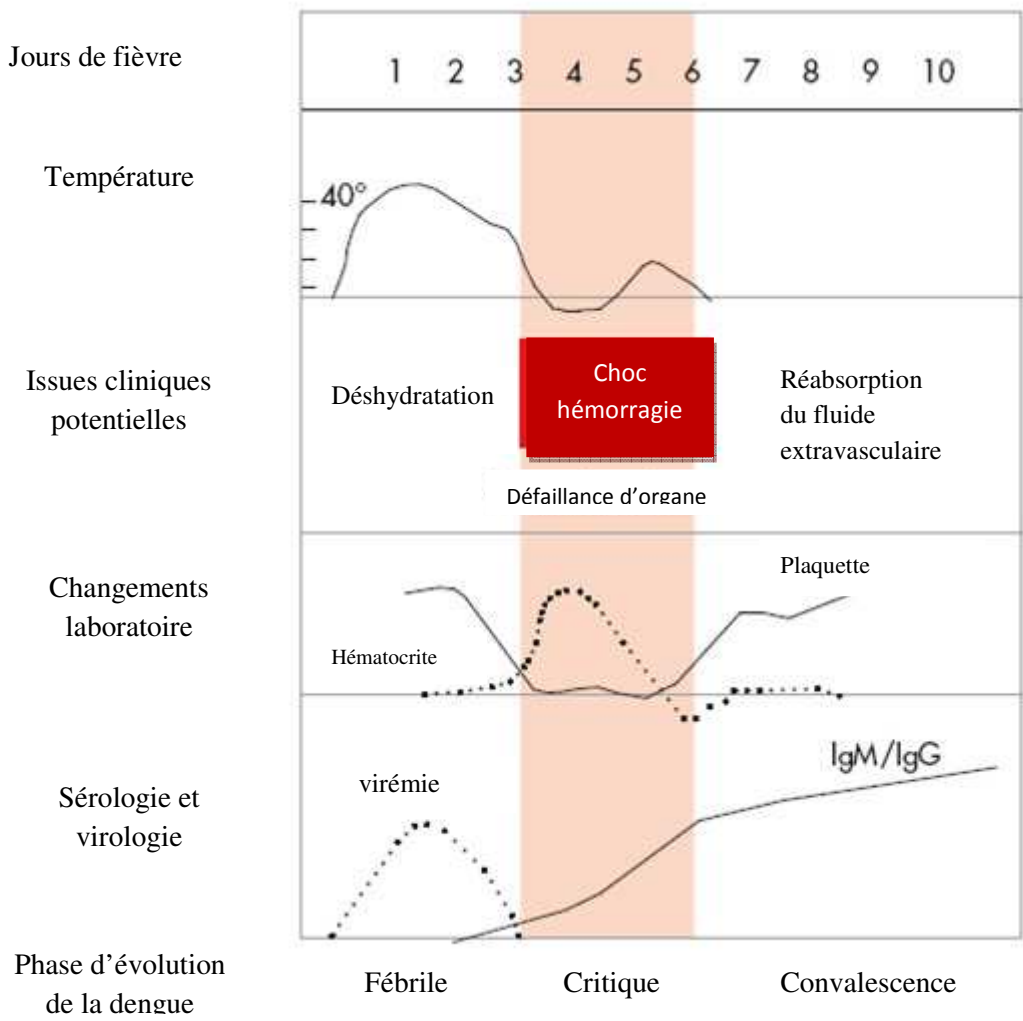
Cette nouvelle classification a été testée et évaluée durant douze mois dans 18 régions endémiques et comparée à l'ancienne classification. Le processus doit être finalisé durant l'année 2010.

Ainsi la nouvelle classification pourrait ressembler à ceci (fig. 9).

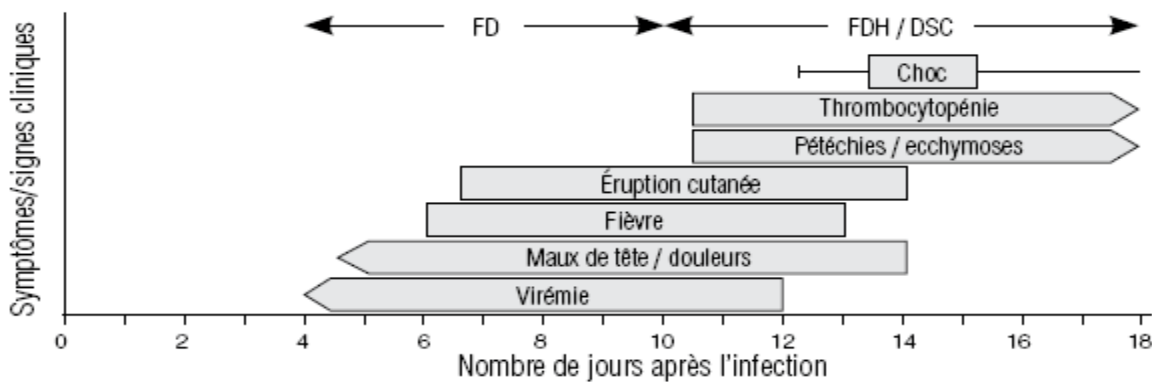
#### D. Phase clinique

Après la période d'incubation, la fièvre débute de façon abrupte et est suivie de trois phases, fébrile-critique-convalescence [4].

Voir les figures 10 et 11 pour suivre la chronologie des évènements.



**Figure 10: Evolution de la dengue [4].**



**Figure 9: chronologie des principaux symptômes de la FD et de la FDH. [7]**

### E. Complications particulières

Des complications graves de la dengue telles qu'une insuffisance hépatique, une coagulation intravasculaire disséminée, une encéphalopathie, une cardiomyopathie, une insuffisance rénale aiguë et un syndrome hémolytique sont rares, mais ont été notés pour être plus fréquents dans les épidémies récentes. [10]

## IV. Epidémiologie

### A. Vue d'ensemble

Le fardeau de la maladie est essentiellement supporté par l'Asie du sud est mais elle s'est largement propagée à l'ensemble des régions du monde et même plus récemment dans le sud-est de la France. Dans le Pacifique en 2003 trente-trois des trente-sept pays sont endémiques [3]. L'Amérique malgré un programme d'éradication du vecteur de la maladie dans les années 60 connut ses premiers cas dès 1977 à Cuba et sa première épidémie majeure en 1981 toujours à Cuba [3]. Depuis elle s'est propagée aux Caraïbes, à l'Amérique centrale et du sud.

L'OMS estime qu'aujourd'hui environ 2,5 milliards de personnes sont exposées à la maladie soit environ 40% de la population mondiale. Il y aurait entre 50 et 100 millions de nouveaux cas annuels dont 500 000 sont des cas graves nécessitant une hospitalisation (fig.12) [3, 4, 10]. Lors de ces hospitalisations le taux de létalité est d'environ 2,5% [3] mais ce taux varie selon les régions endémiques, les périodes épidémiques et il peut parfois être deux fois plus important [1,4].

Parfois le nombre de cas explose, on parle alors de « flambée ». Ces épidémies ont lieu selon des cycles de 3 à 5 ans, voir plus, selon les régions et provoquent une augmentation du nombre de cas graves et de la létalité.

La région Asie/Pacifique regroupe 70% de la population mondiale à risque et près de 75% de la morbidité mondiale. Ces deux régions géographiquement

proches se sont alliées dans un plan de lutte et de surveillance de la dengue [4]. C'est la partie sud-est de l'Asie (Bangladesh, Birmanie, Chine, Inde, Indonésie, Maldives, Sri Lanka, Thaïlande, Timor Oriental) qui est la plus concernée. Dans la région Pacifique, ce sont le Cambodge, la Malaisie, les Philippines et le Viêt-Nam qui sont les plus atteints (1 020 333 cas entre 2001 et 2008) même si les îles du pacifique notamment la Polynésie Française (35 869 cas sur la même période) sont également touchées [4].

Dans la région américaine, c'est l'Amérique du sud et surtout le Brésil (plus de 60% des cas) qui dénombrent le plus de cas de dengue et de cas mortels sur la période 2001- 2007 [4].

Malgré un système de surveillance défaillant sur ce continent, des épidémies se produisent régulièrement en Afrique et sont là aussi en augmentation [4].

## B. Paramètres épidémiologiques

Les raisons possibles et probables d'une telle explosion du nombre de cas lors des dernières décennies sont la forte croissance démographique, l'urbanisation incontrôlée en zone tropicale et intertropicale, la multiplication des sites de reproduction du vecteur et l'inefficacité des moyens de contrôle de ce vecteur. On peut aussi évoquer l'augmentation de la virulence du virus et le remplacement des génotypes les moins virulents par les plus virulents [10].

Mais d'autres paramètres comme l'âge, les caractéristiques ethniques, le sexe des malades ou le climat influencent l'incidence de la maladie.

### 1. L'âge.

La dengue est traditionnellement présentée comme une maladie dont les atteintes les plus graves sont présentes chez les enfants et les préadolescents. Ceci vient du fait qu'initialement la maladie avait été étudiée en Asie où la maladie touchait alors gravement cette classe d'âge. Mais il semblerait qu'il y ait une augmentation de la fréquence de la maladie dans les autres classes d'âge.

A Bangkok par exemple l'âge médian des cas de dengue a augmenté [3] :

- 3 ans et dix mois dans les années 60
- 7 ans et 7 mois dans les années 70
- 7 ans et 5 mois dans les années 80
- 8 ans dans les années 90.

A Singapour le pic de l'âge se déplace de pédiatrie (1973-1977) vers les adultes en 1982. Depuis 50% des cas mortels ont lieu chez des malades de plus de 15 ans. Entre 90 et 96 le groupe d'âge le plus concerné était celui des 16-34 ans. En Indonésie l'incidence de la maladie a augmenté chez les jeunes adultes. Au Bangladesh lors d'une épidémie en 2000 les adultes représentaient 82% des cas lors d'une étude de surveillance en milieu hospitalier, la plus forte proportion étant chez les 18-33 ans et tous les cas mortels étant retrouvés chez des malades de plus de cinq ans [25].

En Amérique latine et aux caraïbes la dengue touche de façon équivalente les enfants et les adultes, il y a même des épidémies ne touchant que des adultes [3].

## 2. Prédisposition raciale

Il y a des relations observées dans quelques études entre l'incidence de la maladie et l'origine ethnique du malade. Une étude rétrospective sur l'épidémie à Cuba entre 1977 et 1981 à montrer que les formes sévères étaient plus fréquentes chez les blancs alors que le nombre de personnes infestées par le virus était équivalent entre les deux communautés [25].

En Haïti une étude a observé que les enfants ne développent pas de fièvre hémorragique bien que plusieurs sérotypes circulent favorisant ainsi les cas graves. Les auteurs ont conclu à une preuve supplémentaire d'un génotype de résistance à la dengue chez les noirs. Un polymorphisme génétique (cytokine et protéine sanguine) est proposé comme facteur de protection. Deux autres études en Asie ont fait aussi état d'un phénomène de prédisposition raciale avec une



incidence de la forme hémorragique supérieure chez des hommes d'origine chinoise par rapport aux indiens et aux malais [25].

### 3. Sexe

Certaines études en milieu hospitalier et les surveillances de données lors d'épidémies suggèrent qu'il existe des différences dans les taux d'infection et la gravité de la maladie entre les hommes et les femmes. Trois études indépendantes, en Inde et à Singapour, ont montré que les hommes sont deux fois plus infectés que les femmes. Ces ratios peuvent varier d'une épidémie à une autre mais aussi d'une ethnie à une autre, les données de surveillance en Malaisie ont révélé une prédominance masculine (1,5 :1) pour les malais et les indiens mais le rapport est presque égal chez les patients d'origine chinoise [25].

Des études en Amérique du sud déclarent généralement que les deux sexes sont également touchés mais un ratio homme/femme de 0,65 :1 a été décrit comme « typique » de la dengue [25].

Deux études en Asie ont montré que les cas de maladie graves étaient systématiquement plus élevés chez les femmes malgré une incidence de la dengue plus élevée chez l'homme [25]. Ceci pourrait être expliqué par une réponse immunitaire plus forte ou une perméabilité accrue chez la femme. Mais il pourrait aussi s'agir d'un biais de recrutement des cas de dengue. Dans certaines régions l'accès aux soins pour les femmes, notamment en hôpital, là où se fait l'essentiel de la surveillance, est moins bon. Pour évaluer une véritable différence de l'incidence et de la gravité de la maladie entre les deux sexes il faudrait tenir compte de ces facteurs sociaux.

### 4. Propagation en milieu rural

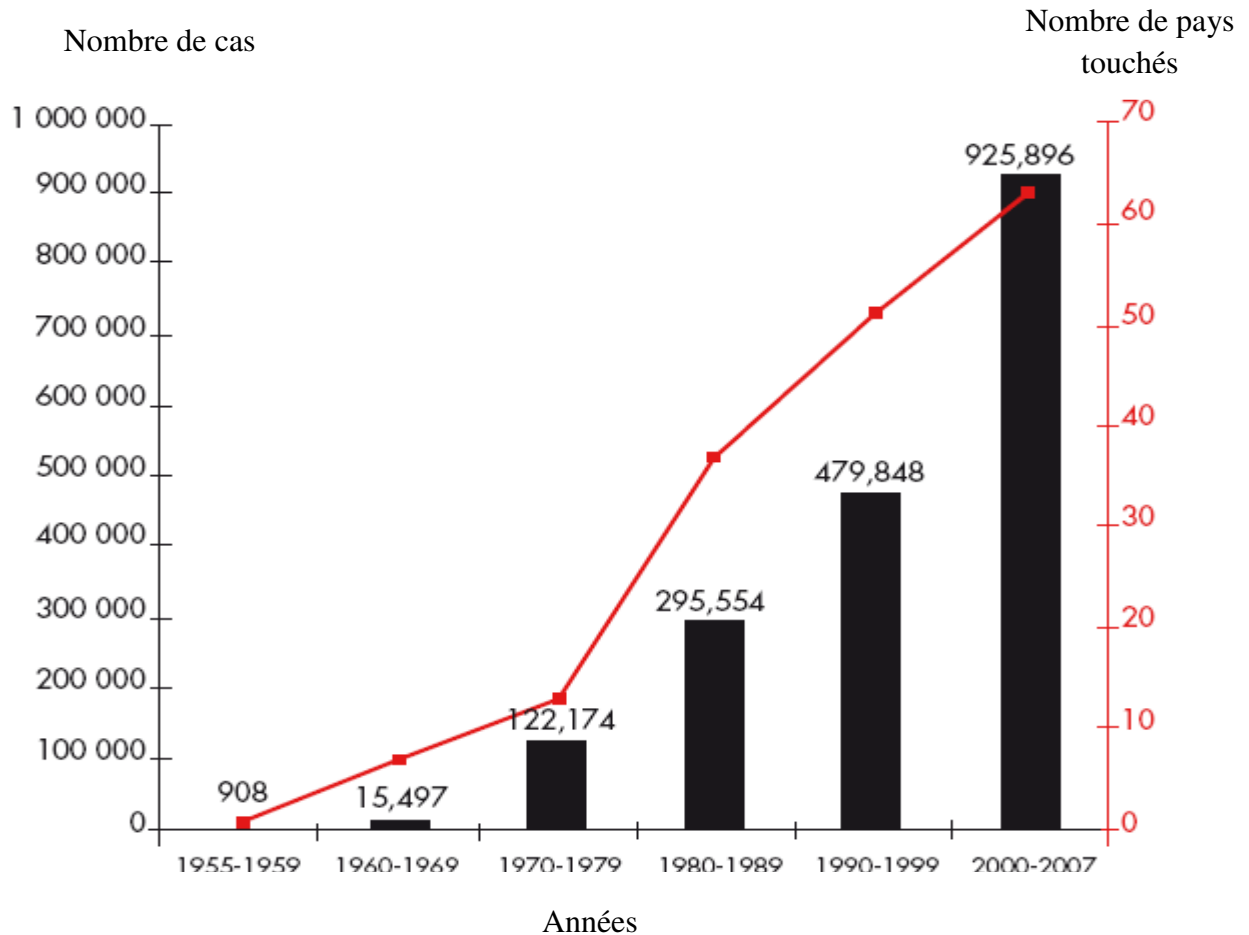
Même si la dengue est connue comme une maladie urbaine, il existe des épidémies et mêmes des flambées en milieu rural, dès 1976 en Indonésie par

exemple. De nos jours en Thaïlande l'incidence en milieu rural (102,2 pour 100 000) est même plus importante qu'en milieu urbain (95,4 pour 100 000) [25]. L'augmentation est aussi remarquée en Amérique du sud et dans les Caraïbes et des taux d'infection identiques sont rapportés [25].

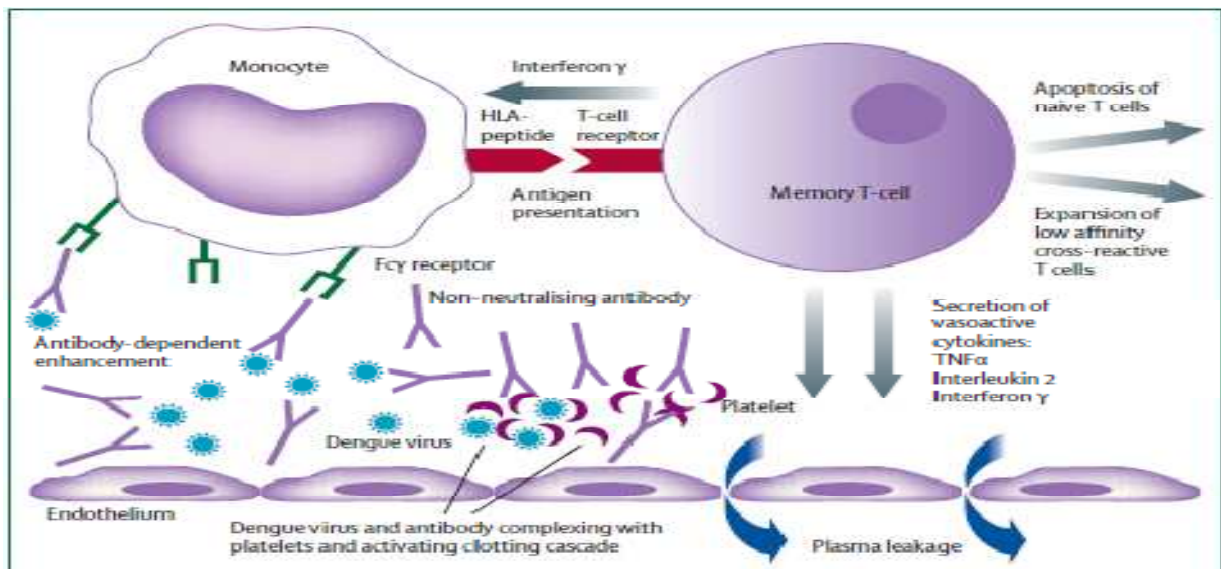
## 5. Le climat

Le climat est un facteur majeur influençant les arboviroses. La température influence les limites de distribution du vecteur, augmentent ses capacités de reproduction et le nombre de repas (donc le risque de transmission), et améliore le développement du virus au sein du moustique. L'humidité relative et les précipitations favorisent le développement et la propagation des moustiques (pupes et larves) et améliorent le métabolisme et la durée de vie des adultes. Un vent faible à modéré favorise la dissémination des moustiques [26, 27]. Toutefois de nombreuses études n'ont pas montré de relation entre les principales épidémies et les variations interannuelles du nombre de cas et le climat [25, 26, 28, 29, 30]. Même une relation avec le phénomène El-niño semble difficile à démontrer même si elle doit être prise en compte [31,32]. On peut expliquer cela par l'influence du climat sur le comportement humain et la complexité du système virus/vecteur/homme. Par exemple durant une période de sécheresse, les zones de stockage d'eau sont en augmentation favorisant la ponte des œufs, de plus les populations de prédateurs peuvent être en baisse favorisant les épidémies [27].

Le changement climatique va sûrement avoir une influence sur ce système mais cela reste difficilement prévisible [33]. L'augmentation de la température va favoriser le déplacement du vecteur vers des latitudes et des altitudes plus élevées et son implantation de façon régulière [27, 33]. Il pourrait aussi avoir comme conséquences des déplacements de population, l'accroissement de la pauvreté et des densités de population ou le déplacement de certaines souches de



**Figure 12: prévalence et nombre de pays touché par la dengue [4].** Les barres correspondent aux nombre de cas annuel de dengue. On s'aperçoit vraiment sur ce graphique que le nombre de cas de « dengue déclarée » et de pays touché a vraiment explosé depuis une trentaine d'années.



**Figure 1310: schéma représentatif de l'immuno-pathogénicité lors de la DHF [39].** On observe bien la complexité de la réponse immunitaire. Le phénomène ADE (à gauche) favorisé par les Ac non-neutralisants favorisant la multiplication virale et la formation de complexes à l'origine des problèmes de coagulation. Mais aussi le dérèglement de l'immunité cellulaire et l'expansion de LyT de faible affinité et ses sécrétions de cytokines vasoactives à l'origine des fuites plasmatiques et des hémorragies.

virus avec des conséquences possibles sur l'incidence et la gravité de la maladie. De plus certains phénomènes météorologiques extrêmes peuvent influencer les épidémies de dengue [27, 34, 35]. Il paraît difficile d'estimer la population qui sera exposée au virus à l'avenir ainsi que la gravité des épidémies mais il semble encore plus important d'améliorer la lutte contre la dengue.

## V. Pathogénèse.

### A. Rôle de la réponse immunitaire

La réponse immunitaire confère comme dans toutes infections les moyens de lutter contre une infection et de protéger contre une infection future. Mais inversement dans le cas de la dengue elle joue un rôle crucial dans l'aggravation de la maladie chez le patient atteint d'une forme sévère. [7]

#### 1. Immunité protectrice contre la dengue.

La réponse immunitaire contre la dengue est principalement médiée par les anticorps (Ac) [5, 36, 37]. Ils offrent une protection homotypique à long terme et à court terme contre les autres sérotypes qui ne dure que quelque mois [4,7, 36-39] et qui est due à la présence d'Ac à réaction croisée qui décroissent rapidement après l'infection [7]. L'Ac le plus important est celui dirigé contre le domaine III de la protéine de l'enveloppe (prot. E). Il est soit séro-spécifique soit à réaction croisée [7, 40]. Les autres épitopes sont les domaines I et II de la prot E, la prM et la protéine NS1 mais sont beaucoup moins neutralisants [7, 40]. Il existe une protection materno-fœtale par le transfert passif d'Ac neutralisants. Mais ils disparaissent au bout de quelques mois [7, 37]. *In vitro* les Ac neutralisent le virus en bloquant la fusion et/ou l'attachement aux cellules cibles, ou par la formation de complexes éliminés par les cellules phagocytes [7, 37].

L'immunité spécifique semble jouer un rôle plus mineur même si les Ly-T contribuent de manière spécifique à la clairance virale [7] et à tuer les cellules infectées [39].

Les cellules dendritiques sont les premières cellules de la réplication du virus et donc de la réponse immunitaire. Le récepteur CD 209/ DC-SIGN (Dendritique Cell- Specific Intercellular Adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin) permet la liaison à la protéine E et sert de corécepteur. La capacité des cellules dendritiques à façonner la réponse immune a un impact sur la qualité, la quantité et la durée de la réponse immune [36, 38].

## 2. Dérégulation de la réponse immunitaire : rôle dans la pathogénicité.

Comme nous l'avons vu dans un paragraphe précédent différents facteurs peuvent influencer le développement de la maladie mais l'immunité semble avoir un rôle essentiel dans son aggravation. Un dérèglement de la réponse immune dont le mécanisme est incertain et disputé favorise les principaux symptômes associés tels que l'hémorragie, la fuite plasmatique...

En effet les infections hétérologues ont été associées épidémiologiquement avec DHF. Halstead a observé que 90% des infections sévères se produisaient lors d'une infection hétérologue secondaire. Les 10% restant étant des primo-infections mais se déroulant chez le nouveau-né dans la deuxième moitié de leur première année. Ceci l'a conduit à émettre en 1977 une hypothèse d'une aggravation de la maladie dépendante des Ac (ADE pour « Antibody Dependant Enhancement ») [4, 36, 37, 41] qui a pu être démontrée par des expériences in vitro en utilisant des sérums immuns ou des Ac monoclonaux et des lignées monocytaires et B-lymphocytaires portant un récepteur FcR [37]. Des Ac hétérotypiques non-neutralisants à réaction croisée se lient à des épitopes à la surface des cellules infectées par le virus et forment des complexes et facilitent l'entrée du virus via les récepteurs FcRIIIa [4, 38, 39, 41] L'activation de ces

cellules (macrophages, monocytes et CD matures) entraîne une augmentation de la réplication du virus et donc de la virémie. Or la relation virémie/pathogénicité est claire [36, 37, 39]. De plus il a été démontré pour les cellules dendritiques matures que FcRIIa contribue également à l'activation de cytokine pro-inflammatoire (TNF- $\alpha$  et IL-6 surtout) liées à la sévérité de la maladie [7]. L'Ac anti-NS1, protéine non structurale, exprimée uniquement par le virus dans la cellule infecté, montre une affinité pour le fibrogène, les thrombocytes et les cellules endothéliales entraînant leur apoptose aggravant l'effet vasoactif des cytokines et aussi la chute des plaquettes [10, 36, 38].

Chez le nourrisson la présence d'Ac homologues reçus de la mère se trouvant à des dilutions au-dessous du seuil de neutralisation peut expliquer le risque encouru lors des premiers mois de leur existence [7, 37] et l'existence de DHF lors d'une primo-infection.

Cette théorie a fait l'unanimité pendant plusieurs années mais il semble maintenant que le mécanisme soit bien plus complexe et qu'une dérégulation de l'immunité cellulaire, la sécrétion excessive de cytokines et autres médiateurs, l'activation du complément, engendrent un dysfonctionnement des cellules endothéliales à l'origine de la fuite plasmatique et de l'hémorragie [38].

- Dérèglement de l'immunité cellulaire

Des Ly T CD4+ et CD8 + rapidement activés au début de l'infection par les cellules dendritiques normalement importants pour contrer précocement le virus vont fausser la réponse. Ils vont montrer une faible affinité pour le sérotype infectant et une plus forte affinité pour un autre sérotype, imitant ce qu'on appelle le « péché originel antigénique » [36, 39]. Expansion sélective de ces Ly-T mémoires qui supplantent les Ly-naïfs. Ils libèrent plus de cytokine pro-inflammatoire, meurent par apoptose, la réponse immune est moins efficace et ce qui se traduit par une augmentation de la charge virale [4, 36, 39]. On

remarque également une inversion du rapport TH1/TH2 de la réponse cellulaire au profit de la réponse TH2 lors des infections sévères pouvant expliquer la sévérité de la maladie [39].

- Activation du complément

Chez les patients atteints de dengue sévère ont été retrouvées de fortes concentrations de C3a révélant un rôle du complément dans l'infection. La sécrétion de C3a et d'autres anaphylotoxines vont permettre de recruter toujours plus de macrophages, de monocytes et de cellules dendritiques, de réguler la vasodilatation et de favoriser la perméabilité vasculaire. Elles favorisent également la libération de cytokines pro-inflammatoires, la dégranulation des polynucléaires et les phénomènes oxydatifs [36].

- Tempête de cytokines

Sous l'effet de ces désordres immunitaires de grandes quantités de cytokines et d'autres médiateurs chimiques vont être libérés. Ils vont cibler les cellules endothéliales et favoriser le phénomène pathologique crucial de la maladie, la perméabilité plasmatisque et la fuite capillaire. De grandes quantités de cytokines telle que Interféron  $\gamma$ , TNF  $\alpha$  et les interleukines IL 2, 6, 8 et 10 sont libérées [39]. TNF  $\alpha$  pourrait favoriser l'apoptose des cellules endothéliales par la libération de radicaux libres favorisant le stress oxydatif et la perte d'intégrité endothéliale [42].

La pathogénèse de la dengue semble du à la fois à la multiplication du virus et ses effets sur les cellules cibles (hépatocytes, cellules endothéliales...) mais surtout à la dérégulation de la réponse immune impliquée dans le dysfonctionnement des cellules endothéliales et du système de la coagulation. Mais le mécanisme hémorragique de la dengue n'est pas totalement élucidé. Pourquoi elle se développe dans certains cas et pas dans d'autres. L'intervalle de temps entre deux infections semble jouer un rôle (plus il est important plus les

infections sévères sont nombreuses). Le type de virus hétérotypique suivant la primo-infection semble aussi déterminant [4].

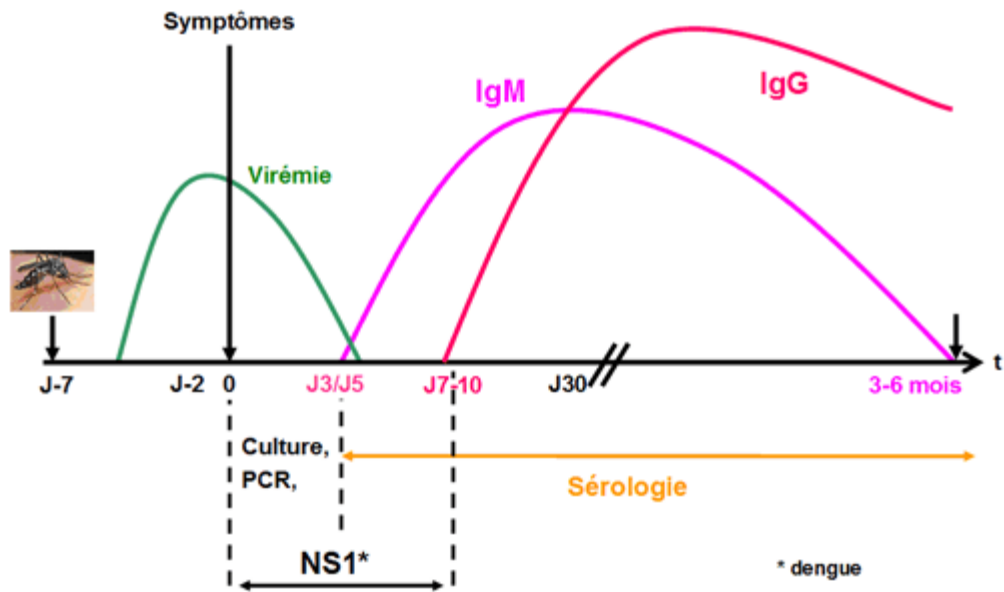
#### B. Virulence du virus.

Le niveau de virulence des différentes souches est difficile à démontrer cependant de nombreuses études épidémiologique tendent à démontrer des différences entre les sérotypes et même dans les génotypes dans leur capacité à provoquer des formes sévères de la maladie. Des données collectées lors d'épidémies de DF/ DHF ont établi que DEN2 [43-46] et de façon moins importante DEN3 [47-49] et DEN1 [30, 50] étaient associés à une augmentation du risque d'hospitalisation et de formes sévères tandis que DEN4 donne des symptômes moins sévère. Une analyse des données collectées à Bangkok entre 1994 et 2006 a permis de confirmer cette tendance : DEN2 entraîne les symptômes les plus sévères lors d'une infection secondaire, DEN2 et DEN3 provoque deux fois plus de DHF lors d'une infection secondaire que DEN4 [51]. D'autres études ont également montré que DEN1 et DEN 3 provoquaient des symptômes plus importants lors d'une infection primaire que DEN2 et DEN4 [30, 46, 52]. De même la séquence virale infection primaire/infection secondaire pourrait avoir un rôle [53]. Il semble également qu'au sein d'un même sérotype la virulence des différents sous-types diffèrent, ainsi les génotypes d'Asie du sud-est et du subcontinent indien sont reconnus pour causer plus d'épidémies de DHF/DSS et des primo-infections plus sévères. Ces virus plus virulents ont même été capables de déplacer les virus autochtones provoquant des épidémies sévères et les premiers cas de DHF sur le continent américain [54].

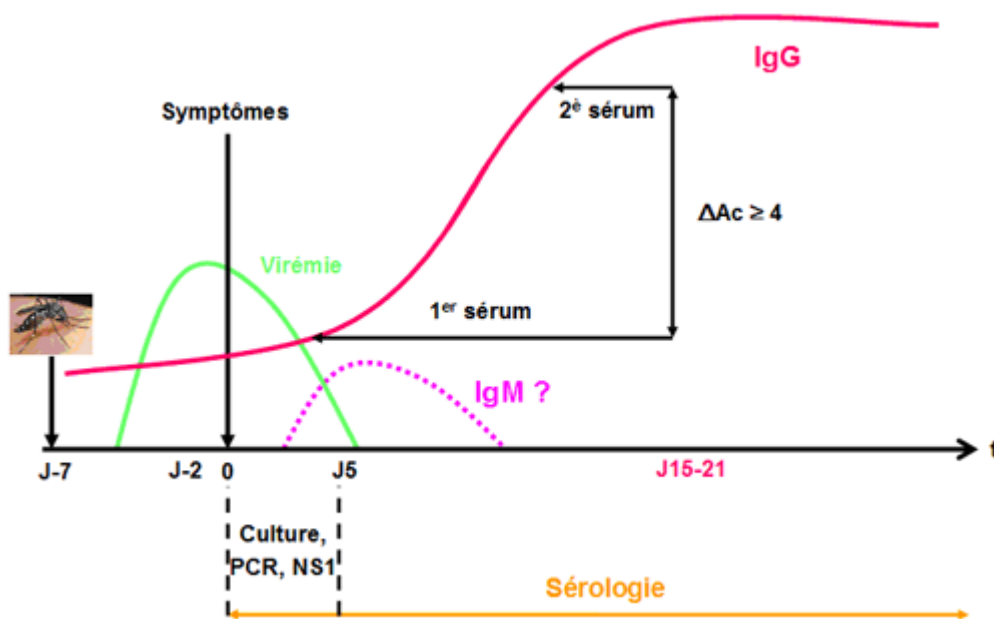
## VI. Diagnostic biologique

Un diagnostic efficace et précis est de première importance pour les soins cliniques (à savoir la détection précoce des cas graves, la confirmation du cas et le diagnostic différentiel avec d'autres maladies infectieuses), les activités de





**Figure 14: Cinétique des Ag et des Ac lors d'une primo-infection de la dengue:** virémie de J-2 à J5. virémie de J-2 à J5. La recherche de l'antigène NS1 peut être positive dès J0 et jusqu'à J7-J10. La détection des IgM est possible dès vers J5 pour la dengue. La détection des IgG débute vers J10. Les IgM disparaissent vers le 6-8<sup>e</sup> mois.



**Figure 15: Cinétique des Ag et des Ac lors d'une dengue secondaire :** la virémie est identique à celle d'une dengue primaire et la PCR est donc un outil diagnostique majeur. La réponse IgM peut exister mais reste discrète, fugace voire non détectable. Le titrage des IgG augmente (x 4) sur 2 prélèvements à 10 jours d'intervalle

surveillance, de contrôle de l'épidémie, la pathogénèse, la recherche universitaire, le développement de vaccins, et les essais cliniques. Un éventail de méthodes existe dont le choix va dépendre de la finalité pour laquelle les essais sont effectués, du type d'installation, des coûts et du moment de prélèvement [4]. On distingue les tests précoces comme la détection du virus, de son matériel génétique ou d'Ag NS1, et des tests plus tardifs mettant en évidence la présence d'Ac (IgM ou IgG). Les Ac restent détectables quelques mois voir toute la vie et leur cinétique permet de renseigner sur la qualité primaire ou secondaire de la maladie (fig. 14 et 15). Ces tests peuvent être réalisés sur des échantillons de sérum, de sang, de plasma ou de tissu.

Compte-tenu de ces caractéristiques, le calendrier de collecte de l'échantillon et l'état immunitaire de l'individu influent tous les deux sur la nature des tests de laboratoire requis pour confirmer le diagnostic [55].

Lors de la phase fébrile avant le 5<sup>ème</sup> jour de la maladie, la recherche du virus, de matériel génétique ou d'Ag NS1 va être réalisée. Après le 5<sup>ème</sup> jour les tests sérologiques seront pratiqués, l'« hémagglutination inhibition test » (HI test) ayant été remplacé par la recherche des IgM/IgG. [4, 55].

Dans les régions endémiques l'accès aux tests biologiques n'est pas toujours facile ou leurs utilisations pas toujours bonne. En France, l'Invs recommande une RT-PCR et une sérologie si le patient consulte avant le 7<sup>ème</sup> jour et uniquement une sérologie si le patient consulte au-delà [56]. Dans un rapport de l'HAS, un groupe d'expert estime que le test Ag NS1 peut-être utilisé en première intention, toutefois si il se montre négatif la surveillance doit être poursuivie (RT-PCR ou sérologie) [56]. (Tableau 2).

## VII. Traitement palliatif

Pour une maladie aussi complexe dans ses manifestations, sa gestion est assez facile, peu couteuse et très efficace pour sauver des vies sous conditions que l'intervention soit correcte et est lieu en temps voulu. La clé est la reconnaissance et la compréhension des problèmes cliniques durant les différentes phases de la maladie. Le triage à l'arrivée des patients va permettre d'identifier les patients et de les classer en trois groupes [4].

- Groupe A : patient peut rentrer chez lui
- Groupe B : patient doit être géré par un centre hospitalier.
- Groupe C : patient nécessite un traitement d'urgence et un transfert en soin intensif.

Dans le premier groupe, le patient tolère des quantités suffisantes de liquides par voie orale, est capable d'uriner au moins une fois toutes les six heures et ne présente aucun signe d'alarme avant coureur en particulier lors de la défervescence. Le traitement consistera simplement à la prise de soluté de réhydratation, de jus de fruit ou toute autre solution contenant électrolytes et sucres perdus lors de la fièvre et des vomissements. Comme antalgique seul le paracétamol est conseillé, l'acide acétylsalicylique, l'ibuprofène et tout AINS sont à proscrire.

Dans le groupe B, le patient peut être administré dans un centre hospitalier secondaire. Sont inclus les patients ayant des signes d'alarmes, ou ceux dont l'état physiopathologique peut aggraver la maladie ou nécessite un management plus compliqué (femme enceinte, enfant, personne âgée, obèse, diabétique, insuffisant rénal, maladie hémolytique chronique). Pour le patient présentant des signes d'alarme le but est avant tout d'obtenir un bon hémocrite par l'administration de solution isotonique comme NaCl 0.9%, ou soluté de Ringer. Ensuite des solutés de réhydratation par IV sont administrés pour maintenir une

Tableau 2: présentation des différents diagnostic biologiques.

Indications	Test diagnostique	Avantage	Inconvénients
<b>Diagnostic en phase aigue</b>	Détection <i>acide nucléique</i> (RT-PCR) <sup>(1)</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Le plus sensible et spécifique</li> <li>Identification du sérotype</li> <li>Résultat en 24-48h, impact possible sur prise en charge du patient</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Potentiel faux positif</li> <li>Onéreux</li> <li>Matériel important et personnel qualifié</li> <li>Problème de conservation échantillon</li> <li>Ne différencie pas infection I<sup>aigre</sup> et II<sup>aigre</sup></li> </ul>
	<i>Isolation du virus</i> en culture cellulaire et identification par immunofluorescence	<ul style="list-style-type: none"> <li>Spécifique</li> <li>Possible indentification sérotype</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Besoin de personnel qualifié</li> <li>Long &gt;1 semaine</li> <li>Problème de conservation échantillon</li> <li>Ne différencie pas infection I<sup>aigre</sup> et II<sup>aigre</sup></li> </ul>
	Détection Ag <i>NSI</i> <sup>(2)</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Facilité d'utilisation</li> <li>Diagnostic précoce → impact sur patient</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Moins sensible</li> </ul>
	Test sérologique : <i>IgM</i> Séroconversion : HI ou * 4 taux <i>IgG</i> par Elisa entre deux prélèvement phase aigue et convalescence	<ul style="list-style-type: none"> <li>Utilisable pour confirmation phase aigue</li> <li>Le moins cher</li> <li>Facile à pratiquer</li> <li>Permet distinction infection I<sup>aigre</sup> et II<sup>aigre</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Parfois cas oublié car taux <i>IgM</i> faible ou indétectable lors infection II<sup>aigre</sup></li> <li>Besoin de deux échantillons</li> <li>Délais dans la confirmation du cas</li> </ul>
<b>Identification lors de surveillance et de flambée ; Surveiller efficacité des interventions</b>	Détection <i>IgM</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Identification des cas probables</li> <li>Facile à pratiquer</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Parfois cas oublié car taux <i>IgM</i> faible ou indétectable lors infection II<sup>aigre</sup></li> <li>Seulement dans laboratoire de références</li> <li>Besoin d'échantillon phase aigue : attention à la conservation</li> </ul>
	Isolation <i>virus</i> et détection <i>ARN</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Confirmation de cas</li> <li>Identification du sérotypes</li> </ul>	

<sup>1</sup>: des kits de diagnostic RT-PCR en temps réel sont actuellement évalués [4,55]

<sup>2</sup>: il y a deux kits actuellement commercialisés pour recherche NS1 par méthode ELISA, ils sont relativement simples et rapides à utiliser. [55, 56].

bonne perfusion et un bon débit urinaire. Si le patient ne présente aucun signe inquiétant il faut favoriser la réhydratation par voie orale voir par IV.

Le groupe C va regrouper les patients présentant par exemple une sévère fuite plasmatique avec choc et/ou accumulation de fluide avec détresse respiratoire, ou hémorragie sévère ou une défaillance d'organe sévère. Tous les patients administrés avec une dengue sévère devront être admis à l'hôpital avec accès aux soins intensifs et transfusion sanguine. Une réanimation liquidienne en IV est le traitement essentiel et généralement l'unique intervention. La solution cristalloïde doit être isotonique et le volume choisi pour maintenir une circulation efficace pendant la fuite plasmatique. Une transfusion sanguine peut être nécessaire en cas de saignement sévère.

La réanimation liquidienne doit être distinguée de la simple administration de liquide. Là il s'agit de donner au patient de plus grands volumes de liquide (ex 10-20 ml par bolus) sur une durée limitée et sous étroite surveillance. Le but est d'améliorer la circulation centrale et périphérique et la perfusion des organes, de maintenir un débit urinaire  $> 0,5\text{ml/kg/h}$  et de diminuer l'acidose métabolique.

En cas de choc associé, le traitement va être orienté selon s'il y a compensation ou une chute de tension. Il consiste en une réanimation liquidienne, dont les volumes varient selon le cas, et la recherche d'un hématokrite normal. Pour plus de renseignement se reporter au figure 2.2 et 2.3 de la section 2.3.2.3 du guide de l'OMS sortit en 2009 « *Dengue: Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control* ».

Les complications (saignement sévère, hémorragie, fuite de liquide pleural, ascite, défaillance d'un organe) se feront au cas pas cas.

## VIII. Les moyens de lutte contre la maladie

Hormis la recherche d'un vaccin que j'évoquerai dans la partie suivante deux autres solutions se présentent pour contrer la maladie, la lutte contre le vecteur et l'utilisation de traitement antiviraux.

### A. Lutte contre le vecteur.

#### 1. But

La prévention et la réduction de la transmission du virus repose principalement sur le contrôle du vecteur et l'arrêt du contact humain et vecteur. Il va surtout être orienté contre *Ae. Aegypti*, sauf si autre vecteur principal, à son stade larvaire ou adulte, à proximité des habitations ou dans les lieux publics les plus sensibles (écoles, lieux de culte...), sur les récipients contenant de l'eau.

Le programme de l'OMS de lutte anti vectoriel intégrée (IVM) se veut un processus de prise de décision rationnelle pour l'utilisation optimale des ressources pour cette lutte [4]. Il repose sur cinq éléments :

- Mobilisation sociale et politique, la lutte devant être un objectif du développement politique, des organisations et de la société civile ;
- Collaboration entre secteur de santé et d'autres secteurs publics et privés.
- Approche intégrée contre la maladie (utilisation rationnelle des ressources, méthodes chimiques ou non et intégration d'autres méthodes).
- Adaptation des stratégies et des interventions à l'écologie des vecteurs locaux ; à l'épidémiologie et aux ressources ;
- Renforcement des capacités : développement des infrastructures essentielles, des ressources financières et humaines au niveau national et local.

Toute cette approche a pour but de contrôler le vecteur de la dengue en supprimant les habitats conteneurs, en empêchant leur accès, par de fréquent

nettoyage ou vidange, en diminuant le développement du vecteur par des moyens chimiques ou non, par l'utilisation d'adulticide ou de larvicide.

Historiquement au début des années 70 les efforts de contrôle avaient permis l'éradication d'*Ae. Aegypti* dans la région subtropicale américaine. Mais des réintroductions ont suivi et ont amené à la recréation des populations de vecteurs [4].

Le but va donc être de maintenir une densité faible de population vectorielle notamment dans les lieux à risque ou de diminuer la longévité des femelles.

## 2. Méthodes

*Ae. Aegypti* possède un large éventail de gîtes larvaires (humain ou naturel). Il est difficile de contrôler tous les stades immatures du moustique et certains habitats en produisent plus que d'autres. Il va falloir cibler ceux qui sont le plus prolifique tout en prenant en compte les caractéristiques écologiques des vecteurs locaux et les attitudes et habitudes des habitants concernant les contenants [4].

### a) Management environnemental

Prévenir ou modifier la propagation du vecteur et le contact vecteur/humain en détruisant, en modifiant, en éliminant ou recyclant les conteneurs non essentiels. C'est le pilier de la lutte :

- Modification environnementale : modification des installations d'approvisionnement d'eau → favoriser l'eau courante avec un apport fiable pour éviter l'utilisation de forme de stockage de l'eau.
- Manipulation environnementale : gestion des conteneurs essentiels par des vidange ou des nettoyages des réservoirs de stock d'eau, des vases à fleurs...; en interdisant leur accès (couvercle hermétique, grille suffisamment fine pour laisse passer l'eau et pas moustique, perle de polystyrène en surface formant une barrière physique) ; nettoyage des

gouttières, recyclage ou élimination des déchets solides non biodégradables abandonnés (pneus, boîtes, véhicules hors d'usage...), nettoyage des rues, gestion ou suppression des plantes ornementales (l'eau peu stagner au niveau de ramifications, au creux des feuilles), des broussailles.

- Changement des habitudes et des comportements des habitants : installation de moustiquaires, limiter les structures qui peuvent servir de gîtes dans les nouveaux bâtiments.

#### b) Contrôle chimique

Il va être pratiqué en complément de la lutte environnementale par l'utilisation de larvicide ou d'adulticide notamment sur les contenants ne pouvant être gérés (trop loin des habitations, nettoyage ou vidange impossible..). Il va avoir pour but de bloquer les stades larvaires ou de diminuer la densité, la longévité et les paramètres de transmission des adultes. Lors des dernières décennies on a fait appel, essentiellement, pour ce qui concerne le traitement des gîtes larvaires, au téméphos, insecticide organophosphoré ou à des formulations biologiques à base de *Bacillus thuringiensis israelensis* et pour ce qui concerne les pulvérisations imagocides, à des insecticides de la famille des organophosphorés ou/et des pyréthrinoides de synthèse [23].

Mais leur utilisation est limitée par des cibles pas toujours accessibles, leur possible toxicité humaine ou animale ou l'apparition de résistance. D'ailleurs nombre d'entre eux pourraient être supprimés.

#### c) Protection individuelle.

La protection individuelle tient une place prépondérante dans la gestion des épidémies de dengue, notamment en prévenant l'infection d'hôtes humains sains. Toutefois, ce rôle préventif ne doit pas se limiter à la seule protection des personnes saines mais sur le rôle de la protection individuelle dans la prévention du contact entre un hôte humain malade et un vecteur sain. Elle doit donc être



envisagée dans les hôpitaux et les cabinets médicaux, pour protéger les cas de dengue hospitalisés (à l'aide pourquoi pas de moustiquaires imprégnées) ou suspects (avec des répulsifs). Toujours dans ce même cadre de prévention du contact hôte malade / vecteur sain, une recommandation a été formulée sur l'importance de la protection individuelle au sein de son propre foyer une fois atteint par la dengue [23].

Cette protection individuelle est recommandée également aux voyageurs. Elle se base principalement sur la protection par des vêtements, l'utilisation de spray sur la peau ou les vêtements, de diffuseurs ou de moustiquaires imprégnées. Les principaux agents répulsifs sont le DEET (N, N-diéthyl-3-méthylbenzamide), IR3535 (3 - [Nacetyl-N-butyl ester]-aminopropionique éthylique de l'acide) ou de l'icaridine (acide 1-piperidinecarboxylic, 2 - (2-hydroxyéthyl) -1 - méthylpropylester). [4]

#### d) Contrôle biologique

L'introduction d'organismes qui se nourrissent, parasitent ou entrent en concurrence avec le vecteur cible peut-être un moyen de lutte efficace. Mais cela reste difficilement applicable car couteux, l'élevage est difficile, ou le milieu doit correspondre à l'organisme [4].

#### e) Mobilisation et communication sociale.

Les actions de communication et de mobilisation sociale font partie intégrante de la lutte contre les maladies transmises par les insectes. En effet on peut voir sur l'ensemble des points évoqués jusqu'à présent que la lutte va reposer sur une mobilisation collective et/ou individuelle. Or l'ignorance de la maladie et de son mode de transmission sont des facteurs aggravants de reproduction et de contact vecteur/humain.

Le but doit donc être d'informer les politiques, les secteurs de santé et sanitaires, les populations les plus ignorantes. Les services concernés doivent donc mettre en œuvre des actions de communication de différents ordres (informations TV,

radio, affichage, tract...) à l'occasion d'épidémies ou d'actions de communication de proximité. Les objectifs à retenir sont d'améliorer la perception des personnes déjà conscientes des dangers et des risques et/ou de chercher à améliorer la perception des personnes qui sont exclues des circuits classiques de la communication et de l'éducation [4].

f) Une autre solution : leur couper les ailes.

Une équipe de recherche anglo-américaine a introduit une nouvelle espèce de moustiques dont les femelles sont incapables de voler, afin de tenter d'endiguer l'expansion du virus de la dengue.

Les moustiques génétiquement modifiés ont été créés par un consortium de scientifiques de l'université de Californie-Irvine (UCI) aux États-Unis, de l'université d'Oxford et d'Oxitec, une entreprise de biotechnologie du Royaume-Uni. Les nouveaux moustiques femelles, dépourvues d'ailes, devraient mourir rapidement dans la nature, ce qui permettrait une réduction rapide de la transmission de la maladie. L'équipe de recherche a modifié génétiquement des moustiques mâles de l'espèce *Ae. Aegypti* pour qu'après l'accouplement, la progéniture femelle ne puissent pas voler. L'équipe espère que cette nouvelle espèce pourrait éliminer la population autochtone de moustiques en tout juste 9 mois. [57]

B. Traitement antiviral

Une chimiothérapie antivirale constitue une stratégie appropriée et alternative pour lutter contre la dengue. Utilisée suffisamment tôt elle pourrait baisser la charge virale, la morbidité, la mortalité et la transmission du virus. Elle pourrait également être utilisée en prophylaxie lors d'une épidémie importante. L'évolution récente des technologies de *drug discovery* (criblage à haut débit ou HTS, *high throughput screening*, bio-informatique et biologie structurale, amélioration de la relation structure activité) et l'amélioration de la chimiothérapie antivirale notamment pour le VIH ou VHC (virus de l'hépatite

C) sont des signes très encourageant dans le développement d'une telle technique pour la dengue [9].

Il existe principalement trois cibles potentielles du virus de la dengue pouvant être visées par les molécules antivirales. La première est la protéine E ayant une double fonction dans l'interaction avec les récepteurs cellulaires et lors de la fusion. Son inhibition est très attractive car de telles molécules ne pénètrent pas dans la cellule et sont donc susceptibles de présenter une meilleure biodisponibilité. De petits fragments peptidiques ou non peptidiques seraient capables d'interagir avec des structures particulières de la protéine empêchant sa réorganisation [9]. Les recherches ont déjà permis de trouver des molécules potentiellement actives [58, 59].

La deuxième cible est la protéine NS3 et plus précisément deux domaines. La partie protéase, notée NS3Pro, et le domaine hélicase, NS3Hel. Les protéases sont les cibles de nombreux médicaments antiviraux notamment dans le VIH. Nécessaire à la maturation de la polyprotéine virale, sa structure est connue et elle est active uniquement associée à son cofacteur NS2B. Des médicaments pourraient inhiber cette liaison ou jouer le rôle de faux substrat [9, 60, 61, 62]. Le domaine hélicase comporte trois activités enzymatiques qui pourraient chacune être une cible potentielle même si la firme Novartis s'est rendue compte que l'inhibition de l'une d'entre elles n'inhibait pas l'activité de l'hélicase. Il n'y a actuellement pas de molécules candidates [9].

Enfin la dernière protéine cible est NS5 qui supporte notamment un domaine très prisé des antiviraux : la polymérase, NS5Pol. Ainsi deux types d'inhibiteurs peuvent être développés. Des inhibiteurs nucléosidiques se comportant comme un faux substrat et bloquant l'élongation. Un premier, d'abord développé pour le VHC, puis un deuxième analogue de ce type se sont montrés plutôt efficace mais présentant trop d'effets indésirable lors d'étude toxique in vivo [63]. Cependant la voie est ouverte. L'autre classe d'inhibiteurs de la polymérase sont

les inhibiteurs non-nucléosidiques qui se lient à des poches allostériques des protéines et bloquent l'activité enzymatique. Ainsi Sanofi a identifié une molécule grâce au HIS dont le potentiel inhibiteur est intéressant [63].

Un deuxième domaine de NS5 pourrait servir de cible aux molécules antivirales : domaine méthyles-transférase. Impliqué dans la formation de la coiffe elle a été peu exploitée jusqu'à maintenant dans le développement des antiviraux contre le VIH ou le VHC notamment. Mais de récentes études sur la dengue ont montré que c'est une voie qui pouvait être exploitée [64].

## IX. Autres arboviroses

### A. Arbovirose associée aux fièvres hémorragiques

Tableau 3: arbovirose à fièvre hémorragique [65, 66,67].

Famille	virus	maladie	Symptômes chez l'homme	Distribution géographique	Transmission	réservoir
flaviridae	Virus amaril	Fièvre jaune	Fièvre hémorragique et hépatonéphrite	Afrique, Amérique du sud	Moustique genre Aedes	primate
	Omsk	Fièvre hémorragique d'Omsk	Fièvre hémorragique	Sibérie	Tiques	Rongeurs
	Kyasanur	FH de la forêt de Kyasanur	Fièvre hémorragique avec risque d'encéphalite dans deuxième phase	Inde (état de Karnataka)	Tiques <i>Haemaphysalis</i>	Rongeurs, bétails et singes
Bunyaviridae	Nairovirus : Crimée-Congo	FH de Crimée-Congo <sup>3</sup>	Hémorragie, insuffisance pulmonaire ou hépatorénale, coma, Létalité 30%	Afrique, Asie, Russie, Europe, Moyen-Orient	Tiques	Bétails, oiseaux
	Phlebovirus : virus de la vallée du rift	FH de la vallée du Rift	Fièvre hémorragique, atteinte oculaire, méningo-encéphalite <sup>4</sup>	Afrique, Arabie Saoudite, Yémen	Moustiques <sup>5</sup> ( <i>Aedes</i> , <i>Anopèles</i> , <i>Culex</i> , <i>Mansonia...</i> )	Bétails, chameaux

Il existe d'autres fièvres hémorragiques non transmises par un arthropode comme la fièvre de Lassa, Ebola ou de Marburg.

### B. Autres arboviroses répandues

<sup>3</sup> Seule fièvre arbovirale nosocomiale.

<sup>4</sup> Ces formes graves ne représentent que 3 à 4 % des cas, sinon souvent asymptomatique ou syndrome dengue-like.

<sup>5</sup> La contamination par les moustiques constitue le deuxième mode de transmission après le contact direct avec le réservoir.

Tableau 4: autres arboviroses. [65, 66,67].

<b>Famille</b>	<b>virus</b>	<b>maladie</b>	<b>Symptômes chez l'homme</b>	<b>Distribution géographique</b>	<b>Transmission</b>	<b>réservoir</b>
<b>flaviridae</b>	Virus de l'Encéphalite Japonaise	Encéphalite Japonaise	Fièvre, méningite ou <b>encéphalite</b>	Asie	Moustiques <i>Culex</i>	Animaux domestiques (cochon +++)
	West Nile Virus		Syndrome dengue-like <b>encéphalite</b>	Europe, Asie, Afrique puis Amérique	Moustiques <i>Culex</i>	oiseaux
	Virus de l'encéphalite de st-Louis	Encéphalite de st-Louis	1 <sup>ère</sup> cause <b>encéphalite</b> virale aux E-U	Etats-Unis	Moustiques <i>Culex</i>	oiseaux
<b>Togaviridae</b>	Alphavirus : chikungunya	chikungunya	Syndrome dengue-like avec rash et arthralgie +++	Afrique subsaharienne, Asie sud-est, sous continent indien	Moustique Aedes	Oiseaux, primates

## DEUXIEME PARTIE : LES VACCINS

### I. Objectif d un vaccin

La mise au point d'un vaccin est devenu l'un des principaux objectifs de la lutte contre la dengue notamment devant l'augmentation du nombre de cas sévères les difficultés de mise en place des programmes de contrôle du vecteur et l'accroissement rapide de son territoire. Depuis plusieurs décennies, les organismes de santé publique appellent au développement d'un vaccin pour contrôler la maladie [68]. Ce vaccin devant offrir une **protection longue** contre les **quatre sérotypes** et bien sûr une **sécurité d'emploi** sans réactions significatives [7,39]. Plusieurs points entrent dans la stratégie de développement du vaccin :

- **Profil du patient** : l'immunisation des jeunes enfants est reconnue depuis plusieurs années par les organismes de santé publique comme une stratégie potentielle de contrôle de l'endémie [68]. L'âge auquel les autorités vont mettre en place une vaccination de routine va dépendre de facteurs locaux tel que l'âge spécifique de prévalence des anticorps (Ac) maternels, l'âge spécifique de risque de maladie, la complexité des calendriers de vaccination pédiatrique [69, 70]. De même la dengue est très présente chez les voyageurs et ce qui est un grand moyen de propagation de la maladie et donc les programmes de vaccinations doivent aussi prendre en compte cette notion [68, 70]. Enfin une pré-immunisation contre des flavivirus (flavivirus(+)) pourrait avoir une influence lors de la vaccination et est prise en compte lors des études sur les vaccins [68].
- **Profil du vaccin** : le vaccin doit être suffisamment immunogène contre les quatre sérotypes même si certains pensent qu'une séroconversion trivalente pourrait suffire à offrir une protection contre n'importe quelles

souches [69]. Deux aspects majeurs de l'immunité du DENV rendent possible cette immunisation. Premièrement la protection est largement médiée par les Ac neutralisants facilement induit par un vaccin vivant atténué ou un vaccin tué. Enfin le virus peut infecter même en présence d'une immunité homologe préexistante, une propriété qui permet de générer une réponse anticorps secondaire en utilisant un vaccin vivant atténué [7]. Enfin le vaccin doit être peu ou pas réactogène et ne pas entraîner de syndrome dengue-like.

- **Aspect socio-économique** : la dengue est endémique surtout dans des pays pauvres ou en voie de développement et afin de protéger l'ensemble de la population il faut que le coût de production du vaccin ne soit pas trop élevé [7]. L'immunisation doit être obtenue avec un nombre de doses le plus faible possible.
- Un autre point qui se dégageait au début de l'aventure c'était de choisir le meilleur modèle animal pour les études précliniques. C'est le macaque rhésus<sup>6</sup> qui a été choisi comme meilleur modèle de primate non humain (PNH). Bien que la maladie s'exprime peu cliniquement, la virémie obtenue après inoculation du virus mime l'infection chez l'homme. Les chercheurs pouvaient ainsi évaluer l'immunogénicité et la sécurité des vaccins [39, 68].

Voir tableau récapitulatif 5.

Les progrès en biologie moléculaire et vaccinologie ont permis de nouveaux espoirs dans le développement de différents vaccins vivant atténués à l'heure actuelle en phase clinique et d'un panel de vaccins inactivés en phase préclinique. (*Voir en annexe 1 les différentes phases de développement d'un vaccin*).

---

<sup>6</sup> Espèce de singe très répandue couramment utilisée dans les laboratoires. Egalement appelé singe rhésus.



**Tableau 5 : Tableau caractéristiques du vaccin idéal. [39]**

---

<ul style="list-style-type: none"><li>• Bon profil de sécurité.</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Immunisation rapide nécessitant une ou deux injection s’inscrivant dans programme de vaccination actuel.</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Equilibre entre immunogénicité et réactogénicité.</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Approprié pour un usage dans les groupes d’âges cibles.</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Génétiquement stable.</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Stimulant les anticorps neutralisants et l’immunité cellulaire TH1.</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Immunité longue et prolongé.</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Immunité contre les quatre sérotypes.</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Ne pas contribuer à une immuno-pathogénèse (ADE induite par le vaccin).</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Facilement stocké et transporté.</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Abordable et rentable.</li></ul>

---

L’innocuité et l’opérabilité des candidats vaccins seront évaluées lors de chaque phase clinique de développement. Le relevé des effets indésirables locaux ou généraux pourront être relevés lors d’entretiens individuels, téléphoniques, ou lors d’examens médicaux et biologiques. Ils seront surtout importants lors de la phase clinique 1 pour éliminer les vaccins monovalents ou tétravalents les plus réactogènes [70]. Du fait de l’absence de modèle animale, le test PRNT (Plaque Réduction Neutralisation Test) s’est montré comme le « gold standard » pour caractériser et mesurer le taux d’Ac anti dengue circulant et donc évaluer le pouvoir neutralisant d’un sérum ou d’un vaccin [71]. Comme les Ac sont considérés comme les principaux effecteurs de la protection contre le virus, ce test va être utilisé pour déterminer le pouvoir immunogène du vaccin. Il va chercher à déterminer le titre d’Ac nécessaire pour réduire la taille des plages de lyse du virus mis en contact avec des cellules sensibles (C Vero<sup>7</sup> ou LLC-MK<sub>2</sub><sup>8</sup>).

---

<sup>7</sup> Cellules épithéliales de rein de singe vert.

<sup>8</sup> Cellules de rein de singe rhésus.

Il est admis que ce titre sera exprimé par la dilution du sérum entraînant une réduction de 50 % des plages de lyse comptabilisées dans le témoin virus (c'est-à-dire sans sérum), on parle alors de titre PRNT50. Il est généralement admis que la séroconversion est acquise chez un sujet naïf si son titre PRNT50 est supérieur à 10 (c'est-à-dire une dilution sérique réduisant 50 % des plages de 1 : 10) [71]. Cependant ce test pose problème car il ne prend en compte que le pouvoir neutralisant des Ac et ne tient pas compte des autres mécanismes immunitaires qui semblent impliqués et il ne fait pas la différence entre les Ac neutralisants et ceux à réaction croisée. De plus une étude a démontré qu'il existe de grandes variations dans les résultats lorsque les conditions du test varient [72].

Le dosage de l'immunité cellulaire peut se révéler intéressant pour confirmer le profil d'innocuité du vaccin, pour mesurer la mémoire immunologique ou la durée de protection [70].

## **II. Vaccin vivant atténué.**

Ce sont les vaccins pour lesquels le développement est le plus avancé, avec deux têtes de liste le vaccin co-développé par le Walter Reed Army Institute of Research (WRAIR) et GSK Biologicals et le vaccin chimérique de la fièvre jaune co-développé par Acambis et Sanofi Pasteur [7, 39]. Il existe donc deux voies de développement des vaccins vivants atténués, ceux dérivant directement des virus naturels et ceux issus de virus modifiés chimériques. Plusieurs principes ont guidé leur développement [7] :

- Vaccin vivant atténué occasionne une immunité humorale et cellulaire, mimant l'infection, basée sur les protéines structurales et non-structurales pour les dérivés atténués, alors que la réponse contre les protéines NS des chimères dépendra de la structure de base.

- Réplication doit être suffisamment restrictive pour prévenir une maladie dengue-like. Fièvre, maux de tête et douleurs articulaires ne sont pas acceptables alors qu'un rash faible, une légère élévation des enzymes du foie ou leucopénie transitoire sont acceptés comme signes normaux de la réplication du virus atténué pour induire une réponse immune protectrice. C'est l'équilibre délicat entre réactogénicité et immunogénicité.
- Réduire la transmissibilité par les moustiques en contrôlant la virémie ou par des mutations virales réduisant la réplication chez le moustique.
- Le virus a une forte infectivité donc infectieux à faible dose et se répliquant bien dans les cultures cellulaires réduisant le coût de production.
- Chaque partie du vaccin doit se répliquer suffisamment chez l'homme pour induire une bonne balance d'Ac neutralisants pour chaque sérotype.
- La base génétique de l'atténuation de chaque sérotype est connue et stable lors de chaque étape jusqu'à l'utilisation chez l'homme.

#### A. Vaccin dérivé de DENV

Historiquement largement touché par des cas de dengue lors de ses campagnes dans des pays endémiques, l'armée américaine a sponsorisé de nombreuses recherches pour la fabrication d'un vaccin atténué. En 1971 elle crée le WRAIR au Département de Médecine Tropicale et de Microbiologie Médicale de Hawaï [68, 74]. La découverte par Eckel *et al* de plaques de différentes morphologies sur culture cellulaire plus ou moins sensibles à la température [73, 75] a permis le développement de vaccins monovalents testés sur des PNH et quelques volontaires mais les résultats ont démontrés que la sensibilité à la température et la morphologie des plaques étaient insuffisantes pour prévoir une atténuation chez l'homme [68]. La découverte par Halstead de l'atténuation sur cellules primaires de rein de chien (PDK pour Primary Dog Kidney cells) a été le point

de départ du développement des deux vaccins vivants atténués [68, 73, 74]. Deux groupes ont été formés un à la Mahidol University à Bangkok et l'autre au WRAIR pour développer un vaccin suivant cette méthode d'atténuation [68]. Nous verrons ces deux vaccins l'un après l'autre.

## 1. WRAIR / GSK Biologicals.

Il s'agit d'un des deux vaccins les plus avancés à l'heure actuelle en phase 2 de recherche clinique, et même testé sur de jeunes enfants [69].

### a) Recherche d'un vaccin monovalent

Pour aboutir à la forme tétravalente aujourd'hui testée, il a fallu avant tout créer des vaccins monovalents sûrs et suffisamment immunogènes pour chaque sérotype. Halstead et Marchett ont commencé par perfectionner la culture cellulaire sur cellule PDK pour modifier le virus en faisant fluctuer le nombre de passage et par un passage terminal sur cellules diploïdes de poumon de singe rhésus (FRhL). Une première souche a ainsi été testée avec succès sur un petit groupe de volontaires ouvrant la voie à la fabrication de vaccins candidats [73]. Entre 1987 et 1996, des essais ont été menés à l'université du Maryland pour établir les candidats les plus immunogènes et les moins réactogènes. Dix candidats monovalents, ayant montrés une baisse de la virémie chez des singes rhésus, ont été testés chez 65 volontaires. L'immunogénicité était mesuré par le taux d'AC neutralisants et seul les plus immunogènes ont été conservés (3 candidats pour DEN-1, et 1 pour les trois autres sérotypes [68]).

Sun *et al.* ont administré les quatre candidats à 49 volontaires flavivirus naïfs (personnes ne présentant aucun antécédent de vaccination ou d'infection contre un flavivirus). Pour le vaccin DEN-1 a été choisi le candidat d'atténuation intermédiaire PDK-20 (20 correspond au nombre de passage sur cellules PDK) [68]. Pour mesurer la fréquence et l'intensité des effets indésirables a été créé

un index de réactogénicité (IR). Ils étaient notés par les volontaires eux-mêmes sur un journal durant les 21 jours suivant l'injection, lors d'entretiens téléphoniques ou directs avec le personnel de l'étude, mais aussi par prélèvements sanguins et examens cliniques [68, 76, 77]. L'étude a confirmé l'immunogénicité et la sécurité des candidats mais à souligner la nécessité d'une deuxième dose. Une deuxième étude a démontré une amélioration de la séroconversion et une baisse de la réactogénicité après une deuxième dose sans pouvoir déterminer le meilleur intervalle de temps (1 ou 3 mois) [68, 77]

Les quatre vaccins monovalents retenus comme candidats étaient [76, 77].

- DEN-1(45AZ5) PDK20
- DEN-2 (S16803) PDK50
- DEN-3 (CH53489) PDK20
- DEN-4 (341750) PDK20

Entre parenthèse est noté le nom de la souche utilisée, ensuite est noté le nombre de passages consécutifs sur cellules PDK.

#### b) Vaccin tétravalent : phase I

L'étape suivante consistait à la formulation d'un vaccin tétravalent en combinant les différents candidats monovalents. La conception de cette formule a été influencée par le fait que un ou plusieurs sérotypes dans le mélange pourraient améliorer ou supprimer la réplication, l'immunogénicité et la réactogénicité des autres types vaccinaux et aussi par l'expérience acquise et la nécessité de deux doses de vaccins [76]. Lors de deux études menées au WRAIR [77] et à l'université du maryland [76], 16 formulations ont été testées en faisant varier les doses de chaque monovalent selon les doses hautes (F) et basses (f)

obtenues après passage sur cellules PDK (exemple DEN-1 :  $1 \times 10^6$  PFU<sup>9</sup>/ml pour forte dose et  $1 \times 10^{4,5}$  PFU/ml pour la faible dose).

Exemple de formule : respectivement DEN -1 -2 -3 -4

- f-f-f-f
- F-f-f-f
- F-F-f-f
- F-F-F-F

Ces deux études ont permis de déterminer trois formules ayant une balance immunogénicité/ réactogénicité satisfaisante même si elles n'ont pas garantie une séroconversion tétravalente. Mais elles ont soulevé plusieurs points pour des essais ultérieurs.

A commencer par l'intervalle de temps entre deux doses de vaccins. La revaccination à un mois fait apparaître une incohérence et une imprévisibilité dans la réponse des AC. Certains taux augmentaient et d'autres diminuaient. A la différence de l'essai mené au WRAIR où pour un intervalle de temps plus long ( $\geq 3$  mois) un solide rappel a été noté. C'est certainement l'immunité hétérotypique qui est responsable de ce phénomène. Les AC développés après la première dose inhibent la réplication des virus atténués si le rappel est trop proche. Les auteurs suggèrent un rappel à trois mois ou plus pour offrir une meilleure réponse immunitaire.

L'interaction entre sérotypes, souche et dose est complexe rendant difficile les prédictions cliniques basées sur les vaccins monovalents. Par exemple de faibles doses de DEN2-3 ou 4 sont plus réactogène si associé à de fortes doses de DEN1, ou alors aucune relation entre la dose et l'immunogénicité sauf pour DEN1. DEN1 a été le plus réactogène comme lors des essais sur les vaccins

---

<sup>9</sup> PFU : Plaque-Forming Unit, unité fonctionnelle utilisé pour mesurer le nombre de particules virales capables de former des plaques par unité de volumes.

monovalents suggérant un problème d'atténuation. DEN4 s'est montré moins immunogène que les autres souches sans que les interférences entre souche n'y soient pour quelque chose. Il semblerait que ce soit les propriétés de DEN-4 (souche la moins virulente dans la nature) ou une trop grande atténuation qui soit en cause.

### c) Vaccin tétravalent : phase II

Suite à ces résultats une étude de phase II a été menée sur des adultes naïfs [78]. Elle reprenait deux des trois formules (appelés f13 et f14) évoquées ci-dessus, la troisième ayant été éliminée. Une troisième formule inédite a aussi été évaluée. Elle se basait sur les conclusions des études citées ci-dessus. Ainsi DEN1PDK-20 a été remplacé par PDK-27 (plus atténué) et DEN4-PDK-20 par PDK-6 (moins atténué). Ce nouveau candidat tétravalent (f17) a montré son efficacité chez le macaque rhésus [79] mais n'avait pas encore été évalué chez l'homme. L'étude a été menée sur un échantillon plus important (71 sujets mais seulement 52 ont reçu une deuxième dose).

La formule f13 a très vite été éliminée car elle a provoqué un syndrome dengue-like chez trois sujets. Mais les sujets ont quand même reçus la deuxième dose. Dans les deux autres groupes les effets indésirables de grade 3 (sévère) ont été observés chez un sujet dans chaque groupe mais sont restés brefs et sans importance. Une élévation des transaminases a été observée chez 13 sujets restés asymptomatiques. Toutefois les élévations les plus importantes ont été relevées chez deux sujets ayant eu des taux anormaux avant le début de l'étude et ceci après chaque injection. Une maladie sous jacente du foie chez un vacciné peut prédisposer à une hépato-toxicité. Il faut rappeler qu'une élévation des enzymes du foie est associée à une dengue sévère. Les transaminases devront ainsi être très surveillées dans les essais ultérieurs.

La virémie évaluée à J10 après chaque injection, a été observée seulement après la dose 1 et associée avec une augmentation de réactogénicité. Le sérotype en

cause n'a pas été recherchée mais il s'agit sûrement de DEN1. L'augmentation de la réplication DEN4 dans la formule 17 a été observée par l'augmentation de la séroconversion et de la virémie.

Comme prévu, l'étude a confirmé que la seconde dose de vaccin boostait la réponse AC (sauf pour f13), était plus sûre et ne donnait pas d'effets indésirables. C'est f17 qui a eu le meilleur taux de séroconversion tétravalente (63 %) (De plus une séroconversion trivalent de 25% ce qui pourrait suffire pour protéger contre la maladie). **Ainsi c'est la formule f17 qui a été choisie par le WRAIR et GSK pour des études plus poussées.**

d) Premier essai du candidat sur des enfants.

Devant un taux de séroconversion satisfaisant les étapes suivantes sont la vaccination sur un échantillon encore plus important mais aussi des essais sur des enfants, population très concernée par la maladie.

Pour ce faire, une évaluation du candidat tétravalent a été menée sur des enfants Thaï car potentiellement les plus à risque de développer la maladie et du fait des infrastructures déjà présentes pour l'évaluation d'un vaccin (cf. vaccin Mahidol University). Elle doit être réalisée sur trois populations distinctes :

1. Enfants scolarisés « flavivirus naïf »
2. Nourrisson dans sa deuxième année « flavivirus naïf »
3. Enfant de tout âge quelque soit son statut immunitaire.

Ceci pour minimiser les risques pour les volontaires et maximiser les informations sur immunogénicité du vaccin [69].

En 2008 sont parus les résultats menés sur la première population [69]. L'échantillonnage a été plutôt compliqué. Les enfants éligibles devaient avoir entre 6 et 9 ans, être en bonne santé et n'avoir jamais été vaccinés contre l'encéphalite japonaise (JE). Ensuite des prises de sang et des examens (hémagglutinine inhibitrice et AC) étaient effectués pour prouver l'absence de contact précédent avec DENV et JE virus (JEV). Ce qui fait que sur un total de



89 participants au départ seul 8 entraient dans les critères de sélections. Mais un enfant fébrile à J0 a été exclu. L'échantillon était donc de sept participants tous ont reçus deux doses de vaccins pour la dengue (f17) à six mois d'intervalles puis deux doses de vaccin JE un mois après à un intervalle de quatorze jours pour évaluer la possibilité de réaction croisée entre les deux vaccins. Un enfant a été éliminé de l'analyse de l'immunogénicité mais pas de la réactogénicité car infecté par DENV-2 entre le recrutement et J0 (détection Ac).

Comme dans les études précédentes, la sécurité du vaccin a été évaluée grâce à l'IR. Les effets indésirables, locaux ou généraux, ont une nouvelle fois été plus fréquents après la première dose. Ils sont restés brefs et sans gravité particulière. Il n'y a pas eu de symptômes hémorragiques, d'hépatomégalie et de splénomégalie. Les valeurs biologiques sont restées normales. Le volontaire qui a été amorcé par le DENV-2 juste avant J0 a eu des symptômes après le vaccin équivalents aux autres. Les effets indésirables après les deux doses de vaccin JE ont été encore moins fréquents.

La séroconversion chez les six enfants a été satisfaisante. Plutôt faible à J30, deux n'avaient pas d'AC détectables et aucun une séroconversion tétravalente. Mais les taux d'AC ont augmentés entre les deux doses. En effet à J180, jour de la seconde dose, tous avaient au moins un type d'AC détectable et un avait une réponse tétravalente. Et comme dans les essais précédents, la dose 2 a joué son rôle et boosté l'immunité. A J30, tous enfants montraient une réponse tétravalents. A noter toutefois qu'un volontaire n'avait plus d'AC DEN-4 détectable à J75. Ceci peut montrer les limites des essais PRNT<sub>50</sub> qui détecterait les AC à réaction croisée ou alors la présence d'AC neutralisants à vie courte pour une souche trop atténuée.

**La sécurité et le pouvoir immunogène du candidat ont pour le moment été assez satisfaisants malgré certains effets indésirables et des réponses immunogènes pas toujours très équilibrées. Il ne semble pas qu'une pré-infection par DENV joue un rôle sur la vaccination [68] et que le vaccin**

**produise des AC contre le vaccin de l'encéphalite japonaise. Ces données sont à confirmer dans des études plus poussées, sur des échantillons plus importants et sur une population de nourrissons.**

**Dans les différents essais, les critères de sélection étaient la présence d'AC et la sécurité, mais à aucun moment l'immunité cellulaire n'a été mesurée. Récemment le WRAIR a publié un article dans lequel il a pu confronter des personnes vaccinées à des souches virales atténuées mais suffisantes pour provoquer les symptômes de la maladie ce qui pourrait être utile pour évaluer l'immunité protectrice obtenue par une vaccination. Autre fait intéressant, ils ont montré une corrélation entre l'activation de l'immunité cellulaire et la sécrétion d'IFN $\gamma$  (immunité TH1 protectrice dans le cas de la dengue). Ainsi dans des études postérieures la mesure du taux d'IFN $\gamma$  pourrait être le marqueur de la protection cellulaire [80].**

**Les prochaines études devraient donc se porter sur des nourrissons et des adultes ayant un statut flavivirus ou dengue positif.**

## **2. Vaccin Mahidol University/ Sanofi Pasteur.**

Parallèlement au développement d'un candidat vaccin par la WRAIR, l'université de Mahidol à Bangkok en association à Aventis puis Sanofi/Pasteur a mis au point des candidats vaccins par atténuation par passages successifs sur des cultures cellulaires primaires certifiées. Les candidats monovalents DEN-1, 2 et 4 ont été développés sur des cellules primaires de rein de chien (PDK) alors que pour DEN-3 l'atténuation a été obtenue sur des cellules de rein de singe vert d'Afrique. Les candidats ont ensuite été testés sous forme mono-, bi-, tri- et tétravalente sur des thaï. Ils se sont montrés suffisamment sûrs et immunogènes à la fois sur des adultes et des enfants [81]. Le candidat monovalent-2(PDK-53) a ensuite été testé sur des dix américains volontaires, se montrant immunogène et sans effet indésirable important [82].

Devant ces résultats satisfaisants, les quatre souches ont été transférées vers Sanofi-Aventis en France pour faciliter la fabrication industrielle. Les premiers essais cliniques sur des échantillons plus importants ont été menés aux E-U sur des adultes « flavivirus naïfs ». Mais il en ressortait une dominance du sérotype 3 après une seule injection de la formule tétravalente évaluée, non observée dans les essais précédents [83]. Pour palier ce problème, des essais ont été menés sur des adultes thaïs naïfs, pour chercher à savoir si la variation des concentrations, notamment en diminuant celle du sérotype dominant, permettaient de diminuer les interférences entre souches et d'améliorer l'immunogénicité. La baisse de la concentration de la souche DEN3 a surtout permis d'abaisser la réactogénicité alors qu'une meilleure séroconversion a été obtenue par l'administration d'une deuxième dose six mois plus tard [84]. Une étude menée sur des enfants thaïs a confirmé les résultats malgré une dominance persistante de la souche 3 après la première dose [85]. Mais le développement a connu un coup d'arrêt à la suite d'une étude menée en Australie sur des militaires « flavivirus naïfs ». Devant des effets indésirables trop importants après la première injection, non comparables aux études précédentes, Sanofi/Aventis a décidé de stopper l'étude [86].

Cet incident rend compte des principaux problèmes d'élaboration d'un vaccin vivant atténué tétravalent que sont les interférences entre souches ou la domination d'une d'entre elles. Elles sont difficilement prévisibles et pas forcément présentes chez le modèle animal [83]. Mais un autre phénomène mis en évidence dans ces études peut expliquer en partie ce dernier résultat. En effet l'âge pourrait avoir un rôle en jouant un rôle direct sur la réactogénicité. Lors d'une primo infection, la fièvre associée à la maladie est moins invalidante pour le pré adolescent que pour l'adulte [86]. Et dans les études précédentes les effets indésirables observés suite à la première dose de vaccin ont été moins importants chez les enfants entre 5 et 8 ans que ceux ayant entre 9 et 12 ans et ceux chez les adultes ont été encore plus marqués [85].

Cependant certains points importants sont encourageants pour la recherche de futurs vaccins ou pour ceux en construction:

- **L'absence de phénomène ADE** après deuxième dose.
- **L'induction d'une réponse Ly T CD4+ et CD8+** par vaccin tétravalent contre plusieurs sérotypes dès la première dose suggère que le vaccin immunise à la première dose et peut offrir une **protection à long terme**. La réponse était déséquilibrée mais confirme que la réponse cellulaire devrait être recherchée lors des essais. Toutefois une protection complète nécessite probablement une réponse tri- ou tétravalente Ac et cellulaire [83, 87].
- **La protection a long terme (entre 3 et 8 ans après) semble satisfaisante** [88].
- Il semble que **sujet flavivirus + devrait induire des Ac neutralisants hétérologues et/ou homologues contre les 4 sérotypes après une dose de vaccin** [85] ce qui pourrait avoir son importance lors de campagne de vaccination dans les pays endémiques.

Les vaccins vivants atténués sur culture cellulaire, qui ont été les premiers candidats prometteurs développés, se sont heurtés à de nombreuses difficultés d'atténuation ou d'interaction entre sérotypes pour un atteindre un équilibre satisfaisant entre immunogénicité et réactogénicité. Il ne semble plus que ce type de vaccin soit l'avenir dans les cas de la dengue.

## B. Vaccin chimérique

Parallèlement des structures génétiquement modifiées ont été utilisées pour mettre en place des vaccins tétravalents atténués. Le but est d'exprimer par ces structures les gènes les plus immunogènes que sont les protéines E et prM tout en ayant la même machine répliquative et peut-être réduire les problèmes

d'interférences. Trois vaccins de ce type sont actuellement développés, l'un d'entre eux étant même remarquablement bien avancé et pouvant espérer une licence d'exploitation d'ici 4 ou 5 ans. Je vais ainsi les classer par structure recombinante de base.

1. Virus de la fièvre jaune : VFJ17D (Acambis/Sanofi Pasteur).

Devant l'échec de son vaccin vivant atténué (voir ci-dessus), Sanofi-Pasteur a ensuite porté ses efforts sur le développement d'un vaccin chimère basé sur la machine répliquative du vaccin de la fièvre jaune 17D (VJF17D) et exprimant les gènes de l'enveloppe de chaque sérotype de la dengue [89]. Technologie née à Saint-Louis aux EU, le premier vaccin de ce type développé fut celui de l'encéphalite japonaise en 1999. En 2000 fut construit à l'Acambis Inc. le premier chimère monovalent pour DEN-2 [90].

a) Construction et développement préclinique

(1) Construction et production du vaccin

Les gènes des protéines structurales prM et prot. E du VJF17D sont remplacés par les gènes correspondants de chaque sérotypes du virus de la dengue. De cette manière, quatre vaccins chimériques monovalents ont été mis au point, chacun d'entre eux présentant un phénotype de surface différent et profitant tous de la même machinerie de répliquation du virus de la fièvre jaune [89,91]. (Annexe 2).

Chacun des quatre vaccins est produit sur des cellules Vero en conformité avec les standards de calibrations de la pharmacopée européenne et selon les normes de la FDA et de l'OMS.

La stabilité génétique a été évaluée à chaque étape de la fabrication depuis la préparation des premières semences jusqu'au stade en vrac et s'est avérée très

satisfaisante pour les quatre génotypes, attribuée au faible taux d'erreurs de la RNA polymérase du virus vaccinale de la fièvre jaune 17D [90].

La stabilité phénotypique a aussi été suivie en parallèle sur des lignées cellulaires (taux de multiplication et tailles des plages de lyses) ainsi que sur des modèles animaux. Enfin la caractérisation biochimique des vaccins est en cours, visant en particulier à identifier le nombre de sites de glycosylation présent sur la protéine d'enveloppe de chacun des sérotypes et la nature de cette glycosylation. En effet celle-ci est notamment impliquée dans l'interaction avec les récepteurs DC-SIGN, présent sur certaines cellules dendritiques cutanées, et pourrait jouer un rôle dans l'interaction avec le vaccin [89].

### (2) Sécurité et immunogénicité *in vitro*

Les cellules dendritiques étant les premières cibles du virus après la piqûre du moustique, elles ont été choisies pour évaluer les conséquences de leur infection par les différents vaccins. Ainsi les quatre candidats ont entraîné une activation et une maturation de ces cellules *via* le récepteur DC-SIGN, la production de certaines cytokines et chémokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires et l'expression cohérente et significative d'interféron de type 1 (notamment IFN  $\beta$ ) jouant un rôle important dans le contrôle de la réplication virale. Les différents composants du vaccin tétravalent induisent une réponse contrôlée des cellules dendritiques, première étape d'une réponse spécifique [89, 90].

### (3) Analyse *in vivo*

L'utilisation de modèles animaux a permis d'évaluer la sécurité (souris, PNH) et l'immunogénicité (PHN). Les quatre candidats CYD (chimeras Yellow fever Dengue) se sont montrés plus atténués que le vaccin père VJF17D, plus sûrs et sans problèmes de neurovirulence ou de tropisme viscéral.

Ils ont montré un bon profil de tolérance et d'immunogénicité chez le singe, induisant un niveau significatif d'Ac neutralisants entraînant un contrôle de la virémie après confrontation au virus sauvage. Le candidat DEN-4 s'est montré légèrement dominant entraînant des interférences après administration du vaccin de référence. Mais l'espacement des doses permet de limiter de ce phénomène.

Enfin une pré-immunisation contre un flavivirus (notamment fièvre jaune) n'a pas montré de nocivités et au contraire a amélioré les réponses AC comme chez les singes ayant reçu une pré-vaccination par le VJF17D [90].

#### (4) Evolution sécurité relative aux caractères vivant et génétiquement modifié du vaccin

Il existe des risques liés à ces caractères. Tout d'abord le risque d'infection et/ou de transmission par les vecteurs. Le vaccin père peut infecter les cellules épithéliales de *Aedes* mais ne diffuse pas et ne peut être transmis. Les CYD eux se sont montrés incapables d'infecter et de se répliquer dans les tissus intestinaux d'*Ae. Aegypti* et *Ae. Albopictus*. Ainsi le faible niveau de virémie observé chez les vaccinés et l'absence de transmission chez le moustique garantissent l'absence de risque de propagation des CYD dans la nature [90].

Un autre problème pour les vaccins vivants est le risque de retour à la virulence. Or la grande stabilité génétique du VJF17D et l'absence de retour à la virulence du vaccin fièvre jaune après 70 ans d'utilisation montrent que le risque est absent [90].

Sanofi Pasteur a également évalué le risque de recombinaison des chimères avec les virus sauvages, théoriquement plus élevé dans les zones endémiques où les virus co-circulent en nombre. Mais la forte atténuation, l'absence de réplication chez le vecteur limitent un tel risque [90].

## b) Evaluation clinique.

Comme pour les vaccins précédents la présence d'Ac neutralisants est le marqueur principal recherché par le test PRNT<sub>50</sub>. Ils ont cherché aussi à évaluer la sécurité du vaccin dans différentes classes d'âge et avec des sujets dont les statuts immuns étaient différents.

### (1) Tolérance et virémie.

La première étude a été menée sur le candidat monovalent CYD-2. Son profil d'innocuité était similaire au vaccin VFJ-17D, avec des effets indésirables faibles à modérés, sans effet de grande gravité, et a induit une virémie transitoire faible. Une pré-immunisation par le vaccin fièvre jaune n'a pas entraîné de modification de la tolérance au vaccin monovalent [92].

Des essais ont ensuite été menés avec le vaccin tétravalent dans trois régions de niveau d'endémie différente permettant d'avoir des statuts immunitaires différents afin de mieux connaître l'effet d'une pré-exposition à un flavivirus (80% de positifs aux Philippines et 4 et 8 % aux EU et au Mexique). Dans les trois essais les sujets recevaient trois doses de vaccin (0, 3-4, 12 mois) divisés en deux groupes, le premier recevant trois fois le vaccin tétravalent (Chimerix-TV), le groupe témoin recevant à la première dose soit un placebo (EU) soit un vaccin témoin (fièvre typhoïde aux Philippines, fièvre jaune au Mexique) puis deux doses de vaccin Chimerix-TV [89].

Les résultats ont confirmé la très bonne tolérance du vaccin et montré des profils de tolérance similaire quelque soit le statut immunitaire du patient. On a seulement observé (i) une virémie faible après la première dose, dominée par DEN-4, mais absente après rappel et non augmentée chez le sujet sensibilisé par statuts immun + et (ii) des effets indésirables d'intensité faible, visibles surtout après la première dose et indépendants du statut immunitaire [89, 90].



## (2) Réponse humorale : mesure des AC neutralisants

La séroconversion a été satisfaisante dans chaque essai. Aux EU, elle a été tétravalente à 100% chez les sujets flavivirus (-) après trois doses de Chimerix-TV. Au Mexique, elle a été de 77 à 92 % dans une tranche d'âge de 2 à 45 ans confirmant les données des EU. Elle a même été de 88 à 100 % pour les enfants de 2 à 5 ans après trois doses et une pré-vaccination par le vaccin de la fièvre jaune potentialise l'effet du Chimerix-TV. Aux philippines, les taux de séroconversion ont augmenté après chaque dose, ont été très satisfaisants chez les enfants et ont permis d'établir qu'un schéma vaccinal de deux doses administrées entre 8 et 9 mois d'intervalle avait un profil similaire au schéma à trois doses standards [89].

## (3) Evaluation de la réponse à médiation cellulaire.

Sanofi-Pasteur a tenu aussi à évaluer la réponse cellulaire vue son implication dans l'infection par le virus et dans la maladie. Les réponses CD4 et CD8 ont ainsi été évaluées chez des sujets avec un statut immunitaire positif ou négatif, lors de trois essais menés aux EU (voir ci-dessus) et en Australie. Ils ont démontré aucune augmentation des taux de cytokines pro-inflammatoires quelque soit le statut immun du sujet. On a pu observer aussi une réponse de type TH1 dominé par IFN $\gamma$  et l'absence de réponse TH2, ce qui est intéressant car l'augmentation de cette dernière est corrélée à une augmentation de la sévérité de la maladie [89].

## c) Conclusions et perspectives

Le chimerivax-TV a montré des profils de sécurité et de d'immunogénicité très bon lors des essais cliniques de phase I/IIa, ouvrant la voie à des essais de plus grande ampleur lors de phase IIb et III. Les **perspectives sont très bonnes** car les résultats se sont montrés très satisfaisant chez les enfants et chez les sujets

avec un statut flavivirus positif, très encourageant pour la vaccination en zone endémique. **Une étude de phase IIb a d'ailleurs débuté en Thaïlande ainsi que la construction d'une usine pouvant fournir le vaccin à l'échelle industrielle et une étude de phase III est en projet en Australie.** Si les prochains essais sont concluants, la soumission du produit aux autorités réglementaires peut être envisagée 2014 ou 2015 [89]. On peut noter que VFJ17D a permis également la mise au point d'un vaccin chimérique contre l'encéphalite japonaise (JE) dont les bons résultats en phase III devrait permettre la mise sur le marché prochainement [93].

2. Délétion région 3' non codante du virus DEN-4 : DEN $\Delta$ 30 (NIAID, NIH).

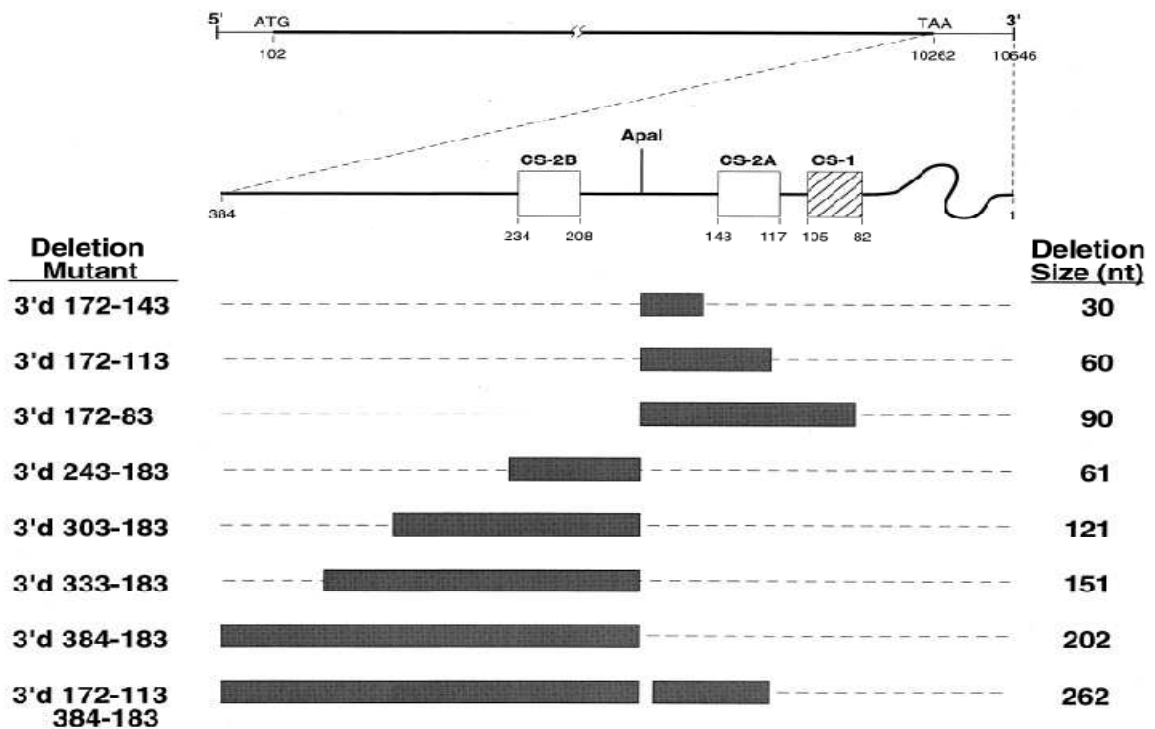
Le laboratoire des maladies infectieuses du « National Institute of Allergy and Infectious Disease », dans le Maryland, a utilisé la technique de la « reverse genetics » pour fabriquer de nouveaux candidats vaccins. Elle permet la fabrication de virus infectieux génétiquement homogène à partir d'ADNc cloné dans des cellules de culture tissulaire. Le but a été d'utiliser la manipulation génétique sur ADN pour obtenir des virus recombinants atténués homogènes avec des mutations définies [94, 95]. Mais ces délétions n'ont pu être obtenues pour tous les sérotypes nécessitant la mise au point de chimères.

a) Fabrication des candidats monovalents

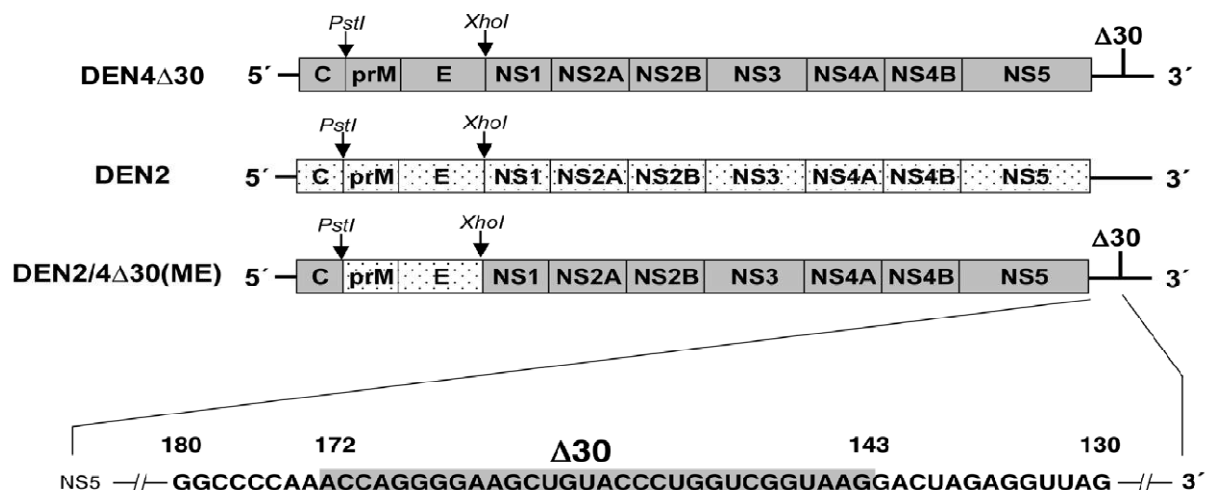
L'attention s'est portée sur la région 3'-UTR. Elle contient de courtes séquences impliquées dans l'initiation et la régulation de la réplication, au niveau de sa partie terminale, une structure secondaire stable elle aussi impliquée dans la réplication, mais aussi plusieurs séquences conservées par les flavivirus [partie I.A, 94].

Les premiers essais ont été menés sur le sérotype DEN-4. Les mutations ont été introduites dans les régions conservées car elles peuvent être considérées comme importantes dans interactions avec la cellule ou les protéines virales durant la réplication [94]. Des clones ADNc de la région 3'-UTR ont ainsi été produits entre les nucléotides (nt) 10104 et 10647. Pour plus de facilité le nt 10646 a été renommé nt 1. Le site *Apal* (nt 173) a été choisi comme site pour générer les délétions en amont et en aval, des délétions de 30 à 262 nt selon les mutants (fig. 16). Des clones sont ainsi formés par PCR puis transcrits, transférés et récupérés sur des cellules LLC-MK<sub>2</sub> de singe ou sur des cellules C6/36 de moustiques. Les niveaux de répliquions et les analyses morphologiques des plaques montrent une atténuation des mutants et une baisse de la réplication, toutefois suffisante pour certains pour être rentable à la production. Inoculés ensuite à des singes, l'atténuation des mutants a été confirmée, avec des niveaux de virémies significativement plus faibles que la souche sauvage. Et malgré une virémie peu ou pas détectable, certains ont développé des taux d'Ac satisfaisants. A partir de ces observations trois mutants ont été sélectionnés le 3' 303-183, 172-113 et 172-143 [94]. Mais seul le dernier a finalement été conservé pour des études plus poussées et renommé rDEN4 $\Delta$ 30 [96].

Devant le succès de ce candidat chez le moustique [97] et chez l'homme [96], la même technique a été appliquée aux autres sérotypes en incluant une délétion  $\Delta$ 30 dans la région 3'-UTR des virus [98, 99, 100]. Si le vaccin rDEN1 $\Delta$ 30 a montré une atténuation satisfaisante (voir plus loin), les mutants rDEN2 $\Delta$ 30 et rDEN3 $\Delta$ 30 se sont montrés respectivement modérément et aucunement atténués [99, 100]. Des alternatives ont été mises en place mais la principale a été la construction de chimère dont la base répliquative est le vaccin rDEN4 $\Delta$ 30 [100, 101]. Dans ces constructions les gènes codants pour les protéines structurales de rDEN4 $\Delta$ 30 ont été remplacés par ceux de DEN2 et DEN3. L'introduction des gènes (C), (E) et (prM), lors de la construction du vaccin chimère



**Figure 16:** séquence de la région 3' de DEN4 sur laquelle les mutations ont été portées [94]. Le génome de la souche DEN4 utilisé comporte 10646nt, dont les 384 derniers à l'extrémité 3' sont non-codants. Pour faciliter l'utilisation, les emplacements des différentes structures sont numérotés dans le sens inverse. On retrouve la structure secondaire en 3' (nt1 à nt81), la CS1 (nt82-nt105), CS-2A (nt117 à nt 143) et CS-2B (nt 208 à nt 234). Le site *Apal* a été choisi pour être le site de la délétion se situe entre les sites CS-2A et CS-2B. La taille des délétions figure sur la droite et sur la gauche la séquence de nt enlevée.



**Figure 17:** structure du vaccin chimère/recombinant rDEN2/DEN4 $\Delta$ 30 [104]. Les séquences codant pour les protéines E et prM de DEN2 ont été introduit à la place de celles du virus recombinant rDEN4 $\Delta$ 30.

rDEN2/DEN4 $\Delta$ 30 a donné un mutant trop atténué chez le singe, alors que celui ne contenant que les gènes E et M a eu une réplication satisfaisante (fig. 17). Ainsi les deux vaccins ont été construits sur ce modèle [100, 101].

b) Evaluation préclinique des monovalents

(1) Sur cultures cellulaires

La délétion $\Delta$ 30 rendait impossible l'utilisation des cellules Véro pour la transfection et la récupération des virus vaccins, mais toutefois la multiplication sur ces cellules est significativement plus faible que les virus sauvage du fait de leur atténuation mais suffisamment efficace pour permettre une fabrication industrielle à moindre coût.

Aucun essai n'a été effectué *in vitro* sur des cellules type monocytes pour évaluer la libération de cytokines ou autres médiateurs pro ou anti inflammatoires.

(2) Chez la souris SCID-MICE-HuH-7

Il s'agit d'un nouveau modèle animal avec des souris portant une tumeur intra péritonéale de cellules HuH-7 de foie humain. Ce modèle a été démontré comme une bonne prédiction de l'atténuation chez l'homme et le singe [98]. Les quatre vaccins candidats pressentis pour être dans la formule du tétravalent, ont montré des niveaux de réplication significativement plus faible que la souche sauvages [98, 100, 101]. Si pour les candidats rDEN4 $\Delta$ 30 et rDEN1 $\Delta$ 30 la délétion  $\Delta$ 30 est responsable de cette atténuation [98], pour les deux autres, rDEN2/DEN4 $\Delta$ 30 et rDEN3/DEN4 $\Delta$ 30, c'est la chimérisation qui tient le rôle le plus important [100, 101].

### (3) Chez le singe

L'évaluation chez le singe a montré des niveaux d'atténuation très satisfaisant. Aucun jour de virémie pour les vaccins DEN 3 ET 4 [94, 100] et des niveaux de virémie faible et de durée inférieure à un jour pour DEN 1 et 2 [98, 101]. Elles ont confirmé le rôle essentiel de la chimérisation dans l'atténuation des monovalents 2 et 3 [100, 101].

Malgré ces niveaux de virémie peu ou pas détectable, tous les singes ont développé lors des différents essais des taux d'Ac neutralisants leur offrant une protection lors de confrontation aux virus sauvages [98, 100, 101].

#### c) Evaluation clinique

Devant les résultats obtenus les quatre candidats ont pu être testés chez l'homme. Pour rDEN3/DEN4 $\Delta$ 30 les résultats ne sont pas encore connus.

#### (1) Tolérance et virémie

Les niveaux de virémie rapportée ont été faibles ( $<1,1 \log_{10}$  PFU/ml), bien loin des taux relevés lors de maladie aiguë, et ne durant pas plus d'un jour. Il n'y a eu aucun symptôme type dengue-like, les effets indésirables les plus courants ont été un rash le plus souvent asymptomatique indépendant de la concentration pour rdEN4 $\Delta$ 30 [102], une neutropénie faible et transitoire et une légère élévation des ALAT pour les différents candidats [96, 103, 104].

Lors d'un essai de phase 2, la sécurité de rDEN4 $\Delta$ 30 a été confirmée sur un échantillon plus important. Il a été montré que la virémie était indépendante de la concentration (testé à  $10^5$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  et  $10^1$  pfU/ml), et que seule l'élévation des enzymes hépatiques était dose dépendant [102].

## (2) Séroconversion

Les candidats se sont montrés très immunogènes avec des niveaux de séroconversion de 95 à 100% [96, 102, 103, 104]. De plus ces taux d'Ac élevés se sont maintenus sur des périodes prolongées.

Il est à noter que tous ces résultats ont été obtenus après une seule dose.

### d) Essai d'un vaccin tétravalent

Un vaccin tétravalent, regroupant les monovalents évoqués ci-dessus, a été testé chez la souris et le singe (noté TV1). Il a été comparé à un tétravalent regroupant toutes les souches sauvages (TVwt) et un autre où les chimères ont été remplacés par rDEN2 $\Delta$ 30 et rDEN3 $\Delta$ 30 (TV2) [105]. Chez la souris (SCID-mice-HuH-7), TV1 et TV2 se sont montrés atténués comme on pouvait s'y attendre avec des niveaux de répllication proches de ceux à l'état de monovalent. Seul rDEN2 $\Delta$ 30 s'est moins répliqué mais cette baisse est probablement due à l'atténuation de la souche et non à une interférence. La formule tétravalente n'améliore pas l'atténuation de rDEN3 $\Delta$ 30 dans TV2.

Chez le singe, là aussi les deux vaccins TV ont eu un niveau et une durée de virémie réduits par rapport au TVwt. De façon surprenante rDEN3 $\Delta$ 30 a montré un niveau de répllication acceptable, phénomène d'interférence qui était non visible chez souris et non attendu du fait des niveaux de cinétique proches lors des essais sur monovalent. Dans TV1, rDEN4 $\Delta$ 30 s'est montré dominant. Il y a eu 100% de séroconversion chez le groupe TV2 malgré la dominance de rDEN3 $\Delta$ 30 mais la faible atténuation de cette souche limite son utilisation future chez l'homme. Le phénomène d'interférence a été confirmé pour TV1. La réponse Ac a été moins équilibrée avec des taux de séroconversion beaucoup plus faibles pour DEN2 et DEN3 par rapport aux formes monovalentes. Toutefois TV1 s'est montré protecteur après challenge par virus sauvage au bout d'une

dose pour DEN 1,3 et 4 et de deux doses administrées à 4 mois d'intervalle pour DEN2.

En se basant sur ces résultats une troisième formule a été avancée pour essayer d'obtenir une réponse plus équilibrée, TV3 avec rDEN1 $\Delta$ 30, rDEN2 $\Delta$ 30 (plus immunogène que rDEN2/DEN4 $\Delta$ 30 dans TV) et rDEN4 $\Delta$ 30. Et comme il a été remarqué dans d'autres études qu'en modifiant les doses on pouvait atténuer les phénomènes de dominance [105], rDEN3/DEN4 $\Delta$ 30 a été inclus à une dose dix fois plus importante  $10^6$  pfU/ml. Testé chez le singe, il a montré un niveau de virémie faible, une réponse AC plus équilibré et un taux de séroconversion de 100% après administration d'une deuxième dose à 4 mois, confirmant efficacité d'un rappel.

e) Analyse particulière

(1) Analyse séquence ARN

Des analyses de l'ARN viral ont été faites à plusieurs étapes de la fabrication du virus ainsi que chez les singes et les hommes chez qui ont avaient relevé une virémie. La délétion  $\Delta$ 30 est apparue extrêmement stable, aucune mutation n'ayant apparue.

Des mutations ponctuelles sont apparues lors de la multiplication sur cellules Véro dont une s'est constamment produite au même endroit sur les différents vaccins. Son rôle dans l'atténuation ne semblerait pas important par rapport à  $\Delta$ 30.

(2) Transmission chez moustique

La transmission chez le moustique a été analysée pour l'ensemble des candidats principaux [97, 98, 100, 101]. Même s'ils se sont montrés capables de se répliquer *in vitro* sur ces cellules C6/36 de moustique, ou dans l'intestin du moustique, leur faible capacité à diffuser à travers la barrière intestinale associée



aux faibles virémies retrouvées lors des essais cliniques rend très peu probable la transmission au moustique.

### (3) Recombinaison

Les quatre candidats au vaccin tétravalent présentant la même mutation qui plus est très stable, le risque de recombinaison est nul.

#### f) Conclusions et perspectives

Bon vaccin qui constitue une bonne alternative aux vaccins développés précédemment notamment du fait de son efficacité et d'une sécurité jusqu'ici satisfaisante, mais aussi de la bonne stabilité génétique des recombinants. Des candidats alternatifs ont parallèlement été développés pour pallier d'éventuels problèmes ou améliorer efficacité et sécurité :

- Des candidats rDEN3 $\Delta$ 30 plus atténués [106]. Des mutations supplémentaires ont été ajoutées en 3' ou également la chimérisation avec la région 3' non-codante du dérivé de rDEN4 $\Delta$ 30 a été testée. Deux candidats rDEN3 $\Delta$ 30/31 et rDEN3-3'DEN4 $\Delta$ 30 ont donné de bons résultats en test préclinique et vont être étudiés chez l'homme [106].
- rDEN4 $\Delta$ 30 avec des mutations supplémentaires ayant un tropisme hépatique diminué (rDEN4 $\Delta$ 30-200,201) [107] ou une diminution des effets indésirables (rash et trouble hépatique) avec le virus recombinant rDEN4 $\Delta$ 30-4995 [108]. Ils se sont montrés tous les deux plus atténués lors des phases précliniques et cliniques tout en gardant un pouvoir immunogène.
- ou encore un chimère DEN1 [109].

Bien que ces résultats soient encourageants, le risque d'interférence immunologique entre les quatre sérotypes inclus dans le vaccin tétravalent présente un obstacle potentiel qui n'a pas encore été évalué pour ces candidats-

vaccins chez l'homme. En particulier, parce que trois des quatre vaccins candidats partagent tous les mêmes gènes DEN4-NS1, le développement de l'immunité à ce gène pourrait limiter la durée de présentation de l'antigène et de confondre l'induction d'une réponse immunitaire aux composants structurels du virus chimériques, fournissant une immunité incomplète [110].

### 3. Souche DEN2 atténuée : DEN2-PDK53 (CDC/In Viragen).

Un troisième vaccin chimère a été développé en utilisant cette fois-ci comme squelette le virus atténué développé par l'université de Mahidol DEN2-PDK 53 dont le pouvoir d'atténuation a été étudié : des mutations stables, connues et qui avaient l'avantage de se trouver sur des protéines non structurales [111]. Deux premiers candidats vaccin pour DEN1 contenant la région C-prM-E du virus DEN-1 basé sur deux variants du virus DEN2-PDK53 (un contenant tous les marqueurs d'atténuation (E) et l'autre seulement 8/9 (V)) ont montré une efficacité comparable voir supérieure au vaccin vivant atténué DEN1 de Mahidol, précédemment évoqué, chez la souris et le singe [112, 113].

Suivant ces résultats, de nouveaux candidats mais exprimant cette fois les gènes prM et E des virus DEN-1,3 et 4 (DEN2/1, DEN2/3 et DEN2/4) ont été conçus toujours avec les deux modèles (E et V) du virus atténué DEN2-PDK53 [114]. Ils ont montré des niveaux d'atténuation satisfaisants *in vitro* et *in vivo* par rapport aux virus sauvages et aux virus chimères sauvages respectifs. Toutefois, grâce à des mutations supplémentaires, ils ont montré de très bons niveaux de développement sur cultures cellulaires (Cellules Vero), encourageant en cas de développement à grande échelle. En revanche sur cellules C6/36 de moustiques, ils se sont significativement moins multipliés que les virus sauvages laissant penser à un faible risque de transmission aux moustiques (atténuation permis par le squelette DEN2-PDK53). Chez la souris, les chimères ont entraîné des niveaux d'Ac égaux ou légèrement inférieurs comparés aux virus sauvages. Ils

se sont montrés immunogènes, protecteur pour DEN2/1, les mutations additionnelles n'ayant pas affectées l'immunogénicité pour DEN2/3 et DEN2/4 (ces deux chimères n'ont pu être challengé par un virus sauvage). On a pu remarquer également que la séquence « prM-E » était plus immunogène que la séquence « C-prM-E » pour DEN2/1.

La formulation de vaccins tétravalents (TVE et TVV) a induit des taux d'Ac équivalent aux candidats monovalents et boostés après un rappel. Seul le chimère DEN2/4 donnait des taux Ac un peu plus faible ce qui laisse penser que lui aussi n'échappe pas aux problèmes d'interférences entre phénotypes.

Ces résultats laissent penser que DEN2-PDK53 peut être un bon candidat chimère car :

- Les mutations ne se trouvent pas sur des protéines structurales (sauf une mais pas très significative).
- Permet expression de protéines prM et E optimales pour immunisation
- Les mutations de stabilisation sur les chimères ne modifient pas l'immunogénicité.
- Faible risque de réversion.
- Faible risque de transmission aux moustiques

Il pourrait même montrer son intérêt dans la vaccination d'autres flavivirus comme cela été le cas pour le WNV [115].

Toutefois ces résultats sont à confirmer par des études plus poussées car les marqueurs d'atténuation utilisés jusque là (réduction des plages de lyse, sensibilité à température et baisse de la neurovirulence chez la souris) ne sont pas des indicateurs sûrs d'une protection chez l'homme [110]. Mais la dernière étude date de 2003.

### **III. Vaccin inactivé**

Cette catégorie de vaccin est moins attractive que les vaccins atténués car susceptible de donner une réponse immune moins robuste (pas de réponse cellulaire TH1) et moins durable, nécessité de plusieurs doses, et sont plus cher à produire [39]. Toutefois ils comportent des avantages: une plus grande sécurité, malgré l'utilisation d'adjuvants, et une réponse plus équilibrée [7].

Jusqu'à présent peu d'études ont été menées. Un premier vaccin inactivé DEN-2 (au formol) a été testé chez le macaque rhésus montrant une réactogénicité et une immunogénicité satisfaisante sans pour autant au final offrir une protection totale contre le virus [116]. Plus récemment un vaccin inactivé DEN1 (par psoralène) s'est montré immunogène chez la souris. Le psoralène s'est montré intéressant par rapport au formol, car il conserve la structure tridimensionnelle du virus inactivé permettant le développement d'Ac pour de multiples épitopes qui participent à l'immunité. Toutefois le déclin des taux d'Ac après 90 jours suggère que des stratégies doivent être développées pour améliorer la réponse (variation du nombre d'injection, des adjuvants ou des voies d'administrations). L'étude devrait être étendue aux autres sérotypes et chez les PNH [117].

L'utilisation des ces vaccins dans le futur est discutée surtout dans régions endémiques mais ils pourraient se montrer intéressants pour les militaires ou les voyageurs voir dans des stratégies de vaccination [7] (voir plus loin partie stratégie vaccinale)

### **IV. Vaccin sous-unitaire**

Le développement de vaccin à sous unités virales utilisant des composants antigéniques purifiés s'est étendu récemment afin de proposer une alternative aux vaccins atténués. L'absence de répllication virale les rend plus sûrs et l'utilisation d'Ag pur et uniforme permet une réponse immune plus équilibrée.

Les efforts ont principalement été dirigés vers la protéine E et notamment le domaine III, le plus immunogène. Mais comme pour les vaccins inactivés l'utilisation d'adjuvants s'est avérée nécessaire et les systèmes de production des particules recombinantes (bactérien, virale ou eucaryote) doivent être efficaces et non pathogène [7, 39].

#### A. Candidat r80E (Hawaï Biotech)

Un premier candidat a été développé à l'université de Hawaï utilisant une forme tronquée de la protéine E (r80E : 80% de la partie amino-terminale de E). L'utilisation de *Drosophila Melanogaster* a permis l'expression de sous particules en grande quantité, et présentant une conformation dans l'espace originelle [116,118]. Les premiers résultats avec r80ED2 (souche DEN2) ont montré des taux d'Ac neutralisants satisfaisants chez la souris et le singe mais qui n'offrait pas une immunité stérilisante [116]. L'utilisation d'un nouvel adjuvant, ISOMATRIX®, a permis une amélioration de la réponse Ac DEN2 chez la souris et une protection prolongée avec des doses d'Ag réduites [118]. L'efficacité et la sécurité de cette nouvelle formule ont été confirmées pour les autres sérotypes chez la souris et le singe puis testées avec une formule tétravalente. Et malgré la dominance de DEN 1 et 2, les réponses immunes humorale et cellulaire ont été satisfaisantes, offrant une protection à long terme. Fait étonnant les doses antigéniques les plus faibles ont offert les meilleurs niveaux de réponses humorale et cellulaire. Ceci reste à démontrer et pourrait être lié à un certain nombre de facteurs comme l'avidité, les sous-classes et/ou la spécificité des Ac. Un effet sur l'équilibre de la réponse TH1/TH2, des données suggèrent que de faibles quantités Ag associé à un adjuvant tel ISOMATRIX® favorisent réponse TH1, pourrait être une explication [118].

Ainsi la production de sous unités vaccinale r80E à partir de cellules de *drosophila S2*, capables d'occasionner des réponses humorales et cellulaires

protectrices et mémoires, est envisageable dans le développement d'un bon vaccin. De plus ces effets peuvent être obtenus selon un calendrier beaucoup plus court que pour les vaccins atténués (2-3 mois contre 9 à 12 mois) ce qui le rend grandement intéressant pour les voyageurs. Donc des études plus approfondies sont envisagées [118].

## B. Candidat cDEIII (IPK/CIGB)

Développé à Taiwan, ce candidat utilise comme sous unité antigénique le domaine III de E. L'élimination des domaines I et II qui donnent des Ac non-neutralisant et à réaction croisée diminue le risque de propagation de la DHF [119]. Les chercheurs ont préparé un consensus du domaine EIII noté cDEIII. Pour ce faire, ils ont aligné différentes séquences d'acides aminés de EIII de chaque sérotype afin d'obtenir un consensus pour les quatre virus. Puis à partir de ces nouvelles séquences, ils ont établi cDEIII (voir annexe 3 et 4). La différence d'homologie variant entre 60 et 80% (figure 18). L'hypothèse est que cDEIII doit induire des Ac neutralisants à réaction croisée contre chaque sérotype.

Testé chez la souris, à raison de trois doses administrées à deux semaines d'intervalles, cDEIII s'est montré peu immunogène seul puis l'ajout d'adjuvant (phosphate d'aluminium) a permis une meilleure production d'Ac neutralisants à réaction croisée, d'Ac mémoires et une protection après challenge. Cependant les taux d'Ac ont été inégaux et corrélés au % d'homologie des séquences. Pour compenser le faible niveau de réponse on pourrait optimiser la séquence de cDEIII ou introduire cDEIII4, qui a la plus mauvaise réponse, dans la formule. Ce nouveau vaccin devrait être testé prochainement chez le singe [119].

### C. Nucléo-capside DEN2: NLPs (Nucléocapside-Like Particules)

Un groupe à Cuba s'est concentré sur la capsidite et sa capacité a stimulé l'immunité cellulaire. Alors que pour la plupart des vaccins la recherche d'Ac neutralisant est le principal marqueur de protection, ce groupe a pris en compte le rôle des Ly T dans cette protection. Ils ont injecté des particules de capsidite purifiées (adjuvant : alum) à des souris avant infection par DEN2. Ils ont alors observé une réponse humorale mais qui s'avérait non neutralisante contre DEN2 alors que l'immunité cellulaire *via* les Ly T CD4+ et CD8+ a offert une protection. Des études plus prolongées sur PHN pourraient montrer l'utilité de ce candidat [120].

### V. Vaccin à vecteur

L'intérêt d'utiliser des vecteurs non répliatifs est de permettre la synthèse intracellulaire *de novo* de l'Ag cible, qui miment l'infection naturelle. Plusieurs virus vecteurs ont été explorés dans le développement de vaccins contre les flavivirus. Plusieurs critères limitent le choix du vecteur, il doit être sûr, capable d'accepter l'insertion de grande quantité de gènes étrangers, immunogène et permettre expression des Ag viraux. Un des problèmes majeurs est l'existence de pré-immunité contre ces vecteurs. Réunissant ces critères, les Poxvirus ont été les premiers explorés, comme le vaccin modifié « Ankara » ou celui de la vaccine, notamment pour développer un vaccin contre la malaria, la tuberculose ou le VIH [39,110]. Cependant, ils se sont montrés trop peu immunogènes dans le développement d'un vaccin contre JE [39,110]. Un autre axe de recherche qui se poursuit actuellement est l'utilisation d'Adénovirus à répliation défective (Ad). Grâce à sa grande sécurité, sa facilité de production et sa forte capacité à accepter du matériel génétique étranger, il a été très étudié [110, 121, 122, 123]. Nous étudierons ici le CAdVax développé par GenPhar Inc. Enfin il existe un autre virus vecteur utilisé le vaccin de la rougeole [124, 125].

#### A. Vecteur Adénovirus : CAdVax (GenPhar Inc.).

Ce sont des structures adénovirales contenant les séquences prM/E des différents sérotypes de la dengue. Ad pouvant contenir et exprimer de grande quantité d'ADN étranger, deux structures bivalentes ont été construites. CAdVax-12 exprimant les gènes de DEN 1 et 2 et cAdVax-34 exprimant ceux de DEN 3 et 4 [122] (Fig. 19). Efficace chez la souris, induisant des Ac contre tous les sérotypes et une réponse cellulaire contre les Ag synthétisés *de novo* [122], les deux structures ont été rassemblées dans une formule tétravalente testée chez le singe [123]. Le vaccin a induit une immunisation tétravalente rapide après deux doses espacées de 8 semaines. Les Ac étaient toujours présents six mois plus tard. Par contre l'immunité cellulaire n'a pu être démontrée. L'immunité à court et long terme obtenue a permis la protection des singes après leur exposition aux virus sauvages à quatre semaines ou à six mois après la vaccination. Les singes ont dans les deux cas été complètement protégés contre les sérotypes 1 et 3 alors que une baisse significative de la virémie a été observée pour les sérotypes 2 et 4. Il est possible que les taux d'Ac nécessaires soient plus importants pour ces deux sérotypes ou alors que la position du matériel génétique dans Ad ait un rôle dans leur expression bien qu'ils soient tous sous le contrôle d'un même promoteur (les sérotypes 1 et 3 sont dans la région  $\Delta 1$  et 2 et 4 dans région  $\Delta 4$ , fig. 19). Ces considérations sont donc à prendre en compte pour maximiser réponse immunitaire de CAdVax-TV. Enfin il ne semble pas que l'immunité anti-vectorielle empêche l'administration de plusieurs doses.

Ce vaccin semble être une bonne alternative vaccinale, entraînant une immunité à court et long terme, offre une bonne protection et administré selon un calendrier raccourci.



	cED III	DEN-1 consensus	DEN-2 consensus	DEN-3 consensus	DEN-4 consensus
cED III					
DEN-1 consensus	79.6% <sup>a</sup>				
DEN-2 consensus	80.6%	65.0%			
DEN-3 consensus	74.8%	70.9%	60.2%		
DEN-4 consensus	67.0%	55.3%	60.2%	50.5%	

Figure 18: pourcentage d'homologie de chaque séquence EDIII des quatre sérotypes [119].

#### CAdVax-Den12



#### CAdVax-Den34

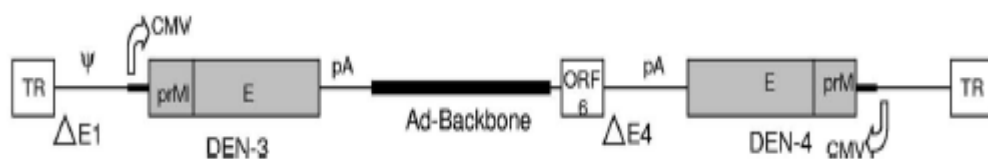


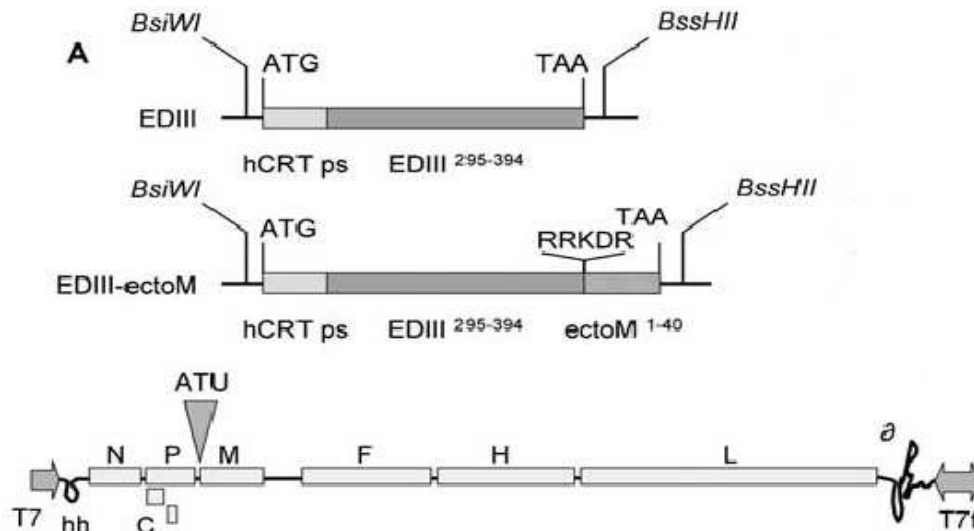
Figure 19: Schéma des deux constructions CAdVax [123]. Les séquences prM/E sont introduites dans des régions identiques associées à un promoteur CMV et une séquence polyAdénillée (pA) d'origine bovine permettant une haute expression de chaque protéine. TR : répétition terminale. E1 et E4 sont les sites de délétion. Ψ : séquence d'encapsulation. ORF : cadre de lecture ouverte.

## B. Vecteur vaccin rougeole (CNRS/ Institut pasteur).

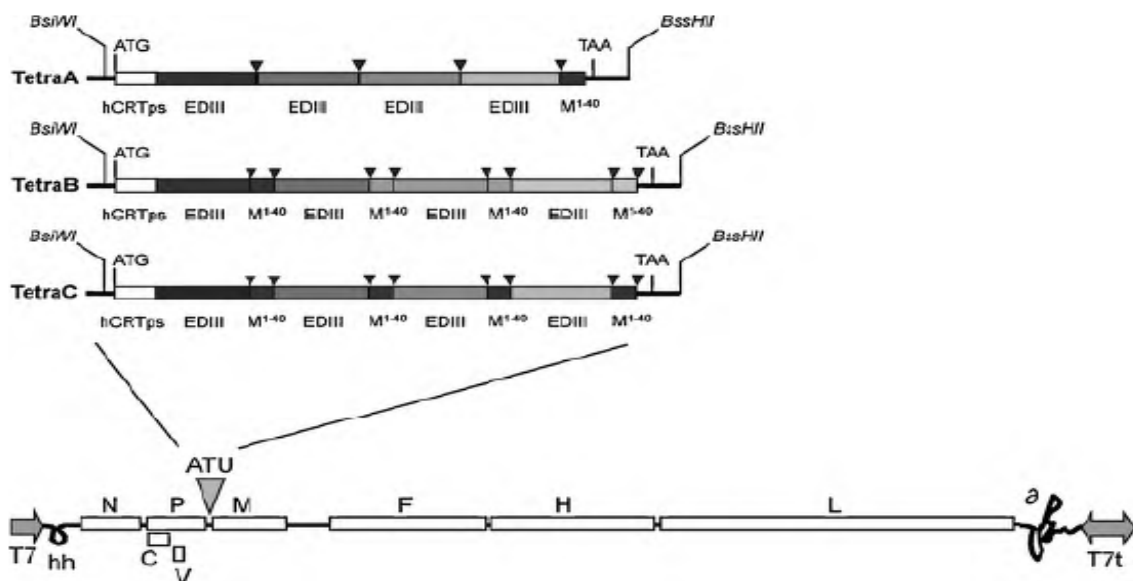
Le virus de la rougeole présente plusieurs avantages à son utilisation comme vecteur. La vaccination est obligatoire, il est très stable, ne peut se recombiner et a déjà prouvé son efficacité et sa sécurité. Il s'agit d'un vaccin vivant atténué, produit à grande échelle dans de nombreux pays, distribué à bas coût et qui pourrait offrir une co-administration chez les jeunes enfants dans les pays touchés par les deux maladies [124, 125].

Un premier vaccin a été développé contre la souche DEN1 à partir d'un dérivé du vaccin (MV) de Schwarz [124]. Dans ce cas seul le domaine EIII a été choisi pour exprimer des Ag. Une séquence spécifique de 40 nt de la protéine E lui a été associé, notée EctoM (fig.20). Cette séquence pro-apoptique clonée en aval de EDIII favorise la formation des ponts disulfure et son repliement dans l'espace mais aussi sa bonne orientation vers les voies de sécrétions. Ainsi cette association permet une forte expression et sécrétion de l'Ag EIII. Le vaccin MV-EDIII-EctoM a induit des taux élevés d'Ac sérospécifiques chez la souris, sans Ac à réaction croisées, une réponse immune anamnétique et a également favorisé la maturation des cellules dendritiques et la sécrétion de cytokines et/ou de chemokines. Ce phénomène est dû au formidable rôle d'adjuvant de EctoM [124].

Une construction tétravalente a, par la suite, été formulée. En fait trois formules différentes ont été construites et une seule a été conservée, celle-ci comprenant EDIII de chaque sérotype et une séquence EctoM de DEN1 (fig.21). Ce candidat a induit après deux injections des Ac neutralisants contre les quatre sérotypes, provoquant une réponse immune protective et mémoire. La réponse anamnétique observée après inoculation de virus sauvage prouve la présence de Ly B et T mémoire contre tous les sérotypes [125]. Un vaccin tétravalent amélioré est actuellement testé chez le macaque.



**Figure 20: représentation schématique du vaccin vecteur DEN1/rougeole.** hCRT ps : séquence du peptide signal humain calréticuline. EDIII : domaine III de prot. E. EctoM : ectodamine. RRKDR : site de clivage de type furine. Les gènes MV sont indiqués comme suit: la nucléoprotéine (N), phosphoprotéine et protéines accessoires V/C (PVC), la matrice (M) de fusion (F), l'hémagglutinine (H) et la polymérase (L). Promoteur T7 RNA polymérase (T7), T7 terminateur d'ARN polymérase (T7t), virus de l'hépatite delta ribozyme (h), ribozyme Hammerhead (hh). [124]



**Figure 21: représentation schématique des différentes construction tétravalente vecteur rougeole.** TetraA : contient une seule séquence EctoM d'origine DEN1, TetraB : chaque séquence EIII est associé à un site EctoM originaire de son propre brin. TetraC : la aussi quatre séquence EctoM mais toute la même issu de DEN1. La présence de quatre séquence apoptique EctoM a entrainé une baisse de la répliation sur culture cellulaire et l'absence d'Ac neutralisant chez la souris. Seul le vaccin tétraA a été conservé. [125]

## **VI. Vaccin ADN**

La recherche s'est récemment intéressée aux vaccins ADN du fait de leur sécurité et qu'il contourne l'immunité vectorielle [110]. Utilisant des plasmides exprimant des séquences ADN des protéines E ou prM ou de protéines non structurales, ils produisent des Ag intracellulaires donnant une immunité adaptative, sont stables et facile à construire [126]. Et ils n'offrent aucun risque d'interférence ou de dominance. Malheureusement ils sont faiblement immunogènes, et nécessitent des adjuvants augmentant ainsi leur coût de production, pas très intéressant dans les pays endémiques. Après plusieurs doses, ils ne garantissent pas une immunisation à long terme et une protection totale chez l'animale [39, 110]. Malgré quelques progrès [127-129], les vaccins ADN ne constituent pas la meilleure option. Toutefois ils pourraient trouver leur place dans des stratégies vaccinales comme les vaccins inactivés dans le but de diminuer les problèmes d'interférences des vaccins vivants ou recombinants [39] (partie stratégie vaccinale).

## **VII. Nouvelle approche : virus à réplication incompétente : RepliVax. (Novartis)**

Ces vaccins de troisième génération combinent la capacité de réplication des vaccins vivants atténués et la sécurité des vaccins inactivés sans la préoccupation de la virulence résiduelle et/ou le retour à la virulence des premiers ou la difficulté de production et le faible potentiel des seconds [110]. Elle repose sur deux techniques soit des virus à réplication déficiente, mutant contenant des mutations les rendant incapables de répliquer leur génome viral, soit des virus à cycle unique, également nommé virus pseudo infectieux ou particule infectieuse à un seul cycle, incapable d'assembler et de libérer leur descendance virale [110].

RepliVax est un vaccin à cycle unique arborant un gène C tronqué qui empêche RepliVax d'être emballé dans une particule infectieuse à moins que le gène C soit fourni par la cellule infectée en transfection (lors de la production). RepliVax peut infecter une cellule normale chez vacciné qui libère ensuite des sous unités virale (E et prM) et NS1 induisant une réponse immune humorale et cellulaire mais il ne peut pas se propager, du fait de son gène tronqué, et causer de maladie en faisant un vaccin vivant atténué très sûr (annexe 5) [130].

RepliVax a été construit à partir du WNV, montrant son efficacité [110, 130]. Un chimère a été construit pour le virus JE. Un vaccin DEN2 a également été formé en remplaçant les gènes prM/E du WNV. Des mutations supplémentaires sur les protéines structurales ont permis formation d'un chimère RepliVax D2.2, à l'infectivité et la croissance suffisante sur cellules exprimant prot. C du WNV. Ce vaccin s'est montré sûr et immunogène chez la souris immunodéprimée, efficace lors de la confrontation à un virus DEN2 létal.

Cette nouvelle génération de vaccin qui s'est montré également efficace pour le WNV et le JE, représente une promesse de nouveaux vaccins combinant puissance, efficacité et économie des vaccins vivants et sécurité des vaccins inactivé notamment chez les immunodéprimés [110]. Dans le cadre de la fabrication d'un vaccin TV, ils pourraient se montrer intéressants en diminuant les risques d'interaction entre sérotypes [130]. De plus la production à grande échelle ne requiert pas de conditions de confinement particulières, car, dans les nombreuses expériences menées jusqu'ici, aucune recombinaison d'ARN ou d'auto-réplication compétente n'ont été détectées [131].

Récemment un nouveau projet de développement d'un tel vaccin a été mis en place mais en utilisant comme machinerie répliquative le VFJ et les glycoprotéines de DEN2 et une technologie à deux composantes (particules pseudo-infectieuses et ARN auxiliaire avec un gène absent, ici NS1) facilitant l'emballage des virions (annexe 6). Les particules pseudo-infectieuses ont cette

fois été conçu avec des mutations sur les protéines prM et NS2A, qui abolissent la transformation de ces dernières et rendre le virus défectif capable de produire soit des particules non infectieuses, immatures et / ou des sous-unités virales de DEN2. Les génomes de ces chimères peuvent être conditionnés à des titres élevés dans des virions infectieux *in vitro* en utilisant l'ARN-auxiliaire du VFJ déficient en gène NS1, et les deux peuvent alors être passées comme deux composants du génome des virus à une échelle progressive [131] (annexe 6).

Ces nouvelles technologies ouvrent de nouvelles perspectives dans la mise au point d'un vaccin sûr, efficace et économique, et devraient être améliorées et appliquées à un vaccin tétravalent contre la dengue.

### **VIII. Stratégie vaccinale**

Une stratégie alternative pourrait permettre de lutter contre les différents problèmes rencontrés jusqu'ici : réactogénicité ou problème de dominance des vaccins vivants, faible immunité des vaccins non répliatif. Mais on pourrait se servir de leurs points forts dans une stratégie vaccinale hétérologue pour améliorer la réponse et aussi son délai d'obtention. Ainsi une étude a été menée pour évaluer l'efficacité d'une telle mesure [132].

Elle consistait en un premier vaccin non répliatif (inactivé ou ADN) suivi d'un rappel avec vaccin vivant atténué. Le premier servant d'amorce (baisse des effets indésirables, pas de problème de dominance d'un sérotype, baisse de l'intervalle avec la deuxième dose) et le deuxième servant de booster (augmentation des AC et amélioration de la protection).

L'étude a donc été menée avec un vaccin inactivé par formol (adjuvant : hydroxyde aluminium), un vaccin ADN (raviprakash, 2003) et vaccin vivant (WRAIR). Ils ont d'abord montré que la stratégie vaccin inactivé/vaccin vivant était la meilleur chez le macaque. Les singes ont été protégés après challenge ne

montrant aucun jour de virémie. Les taux d'Ac après la première injection étaient faibles mais détectables montrant le succès de l'amorçage. Et ils n'ont pas empêché la réplication des virus atténués après la deuxième injection favorisant l'augmentation des taux d'Ac (10 fois plus), indiquant une forte réponse anamnestic. Ce rappel n'a entraîné aucun jour de virémie chez les macaques. Après challenge par des virus sauvage tous les macaques ont été protégés et n'ont montré aucun jour de virémie et une augmentation des taux d'Ac. Une telle stratégie pourrait être poursuivie lors d'essai sur l'homme.

Type de vaccin	développeur	Phase clinique	description	commentaires
Vaccin vivant atténué	WRAIR/ GSK biologicals	Vaccin tétravalent Phase 2	Virus atténué par passage successif sur culture cellulaire (PDK)	Premier vaccin à être développé il a montré des résultats encourageants malgré des problèmes d'interférences dans la formule tétravalente. La sécurité et l'efficacité sont à confirmer lors d'essais plus poussés.
Vaccin vivant atténué	Université Mahidol/ Sanofi Pasteur	Vaccin arrêté en phase 2a	Virus atténué par passage successif sur culture cellulaire (PDK pour DEN1, 2 et 4 et sur cellules de singe pour DEN3)	Formule tétravalente arrêtée car trop d'effets indésirables lors d'une étude.
Vaccin chimérique (chimerivax)	Acambis/ Sanofi Pasteur	Vaccin tétravalent en phase 2b/3	Gènes des protéines E et prM du virus recombinant de la fièvre jaune VFJ17D remplacé par ceux des virus de la dengue	Vaccin le plus abouti pour le moment il devrait entrer prochainement dans des essais de phase et peut-être obtenir une AMM d'ici 4 ou 5 ans.
Vaccin recombinant rDEN4Δ30/ chimérique	NIAID /NIH	Vaccin monovalent phase 1 et tétravalent en phase préclinique	Vaccin recombinant DEN4 avec délétion de 30 nucléotides en UTR 3' supporte les gènes E et prM des autres sérotypes	Vaccins monovalents prometteurs. Formule tétravalente pas encore déterminée. De nouveaux monovalents pourraient entraîner sa reformulation.
Vaccin chimérique DEN2-PDK53	CDC/In Viragen	Préclinique (monovalent et tétravalent)	Deux variants du virus atténué DEN2-PDK53 expriment les gènes prM/E des autres sérotypes.	Les chimères formés ont gardé les caractéristiques d'atténuation de DEN2-PDK53. Bon résultats chez la souris et le singe.
Vaccin sous-unitaire r80E	Hawai biotechnology	Préclinique	Partie amino-terminale (80%) de la protéine d'enveloppe E associé à un adjuvant isomatrix®.	Grâce à l'utilisation de l'adjuvant isomatrix®, cette formulation a vu son efficacité améliorée chez souris et singe et se montrer intéressante chez le voyageur (calendrier vaccinale raccourci).

Tableau 6: résumé des vaccins candidats pour la dengue en développement



Type de vaccin	développeur	Phase clinique	description	commentaires
Vaccin sous-unitaire cDEIII	IPK/ CIGB	Préclinique	Consensus de séquence d'acide aminé du domaine III de la protéine E des différents sérotypes pour obtenir d'Ac neutralisants à réactions croisées contre les quatre sérotypes.	Immunogénique chez la souris mais réponse Ac inégales dépendantes du % d'homologie.
Vaccin sous-unitaire (NLPs)		Préclinique (DEN2)	Particules de capsid purifiées (DEN2) associé à un adjuvant (alum)	Réponse humorale non stérilisante mais réponse cellulaire protectrice chez la souris.
Vaccin vecteur cADVax	GenPhar Inc.	Préclinique.	Formule tétravalente composée de deux constructions bivalentes adénovirale exprimant les gènes prM et E des sérotypes.	Réponse Ac à court termes et long terme offrant une protection contre tous les sérotypes chez le macaque.
Vaccin vecteur rougeole.	CNRS/Institut Pasteur	préclinique	Vecteur dérivé du vaccin vivant atténué de la rougeole de Schwarz exprime Ag (EIII) des virus de la dengue.	Réponses immune protectrice et mémoire chez la souris avec la formule tétravalente. Pourrait se montrer intéressant pour une double vaccination chez l'enfant.
Vaccin réplication incompétente RepliVax	Novartis	préclinique	Virus WNV avec gène capsid tronqué portant les gènes codant pour prM et E de DEN2.	RepliVax D2.2 sûr et immunogène chez la souris immunodéprimées. Pourrait être une solution pour les patient VIH.

THESE SOUTENUE PAR : LEORAT JEAN-FRANÇOIS

TITRE : LA DENGUE : UN VACCIN A L'HORIZON 2015

## CONCLUSIONS

La dengue, décrite comme une « grippe tropicale » depuis le XVIII<sup>e</sup> siècle, est une maladie virale transmise à l'homme par des moustiques du genre *Aedes*. Les formes graves de la maladie sont la dengue hémorragique et la dengue avec syndrome de choc qui peuvent s'avérer mortelles. L'incidence de la dengue progresse actuellement de manière très importante au niveau mondial. L'OMS estime à 50 millions le nombre de cas annuels, dont 500 000 cas de dengue hémorragique qui, faute de traitement, peuvent être mortels dans 20% des cas. Ainsi la dengue est devenue ces 30 dernières années un problème de santé publique. Alors que le réchauffement climatique pourrait encore étendre son territoire, la lutte contre cette maladie devient primordiale. Si la lutte contre le vecteur semble possible mais difficile (mise en place, coût, population pas toujours réceptive), l'utilisation de traitement antiviraux n'est pour le moment pas d'actualité. La mise au point d'un vaccin apparaît comme la meilleure solution, encore faut-il que celui-ci soit facilement accessible aux populations cibles qui se trouvent généralement dans des pays plutôt pauvres.

De nombreuses difficultés existent : (i) Tout d'abord les caractéristiques de la maladie, une réponse immunitaire complexe, les risques de maladie grave lors d'une infection secondaire hétérotypique. (ii) Le vaccin doit protéger contre les quatre sérotypes, induire une réponse Ac neutralisant protectrice mais probablement aussi une réponse cellulaire. (iii) Le calendrier vaccinal est aussi complexe, le vaccin nécessitant plusieurs doses, et doit s'imbriquer dans les habitudes vaccinales. (iv) Les fabricants doivent faire aussi avec l'absence de

modèle animal, compliquant les phases précliniques et les extrapolations à l'homme. Ils doivent également étudier les effets d'une pré-immunisation à un sérotype de la dengue ou un autre flavivirus.

Malgré cela, quelques vaccins semblent aujourd'hui prometteurs notamment le Chimerivax<sup>®</sup>, vaccin chimérique construit sur le modèle du vaccin amaril VJF17D. Vaccin le plus abouti à ce jour, il a montré une grande efficacité et une bonne sécurité, se basant sur un squelette « VJF17D » qui a déjà fait ses preuves. Il a surtout jusqu'à maintenant favorisé une réponse immune équilibrée, humorale et cellulaire, et mémoire. La construction d'une usine de fabrication et l'entrée du vaccin dans des essais de phase III semble promettre une mise sur le marché prochaine. Toutefois, il semble pertinent de faire des études rétrospectives sur les sujets vaccinés lors des premières études afin d'évaluer le réel pouvoir protecteur du vaccin.

D'autres vaccins en développement pourraient offrir de bonnes alternatives. Si le vaccin vivant atténué du WRAIR/GSK semble limité par des problèmes d'interférences et d'effets indésirables, le vaccin recombinant/chimérique rDEN4Δ30 constitue un bon candidat. Le vaccin de nouvelle génération RepliVax<sup>®</sup> combinant les effets positifs des vaccins vivants atténués et des vaccins inactivés sera sans doute une bonne réponse aux problèmes de vaccination chez l'immunodéprimé. Si jamais la vaccination chez le nourrisson ou le jeune enfant est difficile, un vaccin vecteur basé sur le vaccin de la rougeole (MV Schwarz) pourrait permettre une double vaccination rougeole/dengue. Celui utilisant comme machine répliquative l'adénovirus (CAAdVax<sup>®</sup>) a permis une protection des singes rhésus après un calendrier raccourci, ce qui pourrait être utile pour la vaccination des voyageurs.

La vaccination contre la dengue a largement progressé depuis une quinzaine d'années grâce à l'amélioration des techniques et, derrière le leader chimerivax<sup>®</sup>, plusieurs autres candidats pourraient se positionner dans des

stratégies vaccinales. Mais une meilleure compréhension des mécanismes immunopathologiques entre le virus et les cellules cibles est un préalable nécessaire à l'élaboration du vaccin doué du meilleur potentiel « avant que la terre ne devienne dingue ».

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble le 8/6/11

LE DOYEN

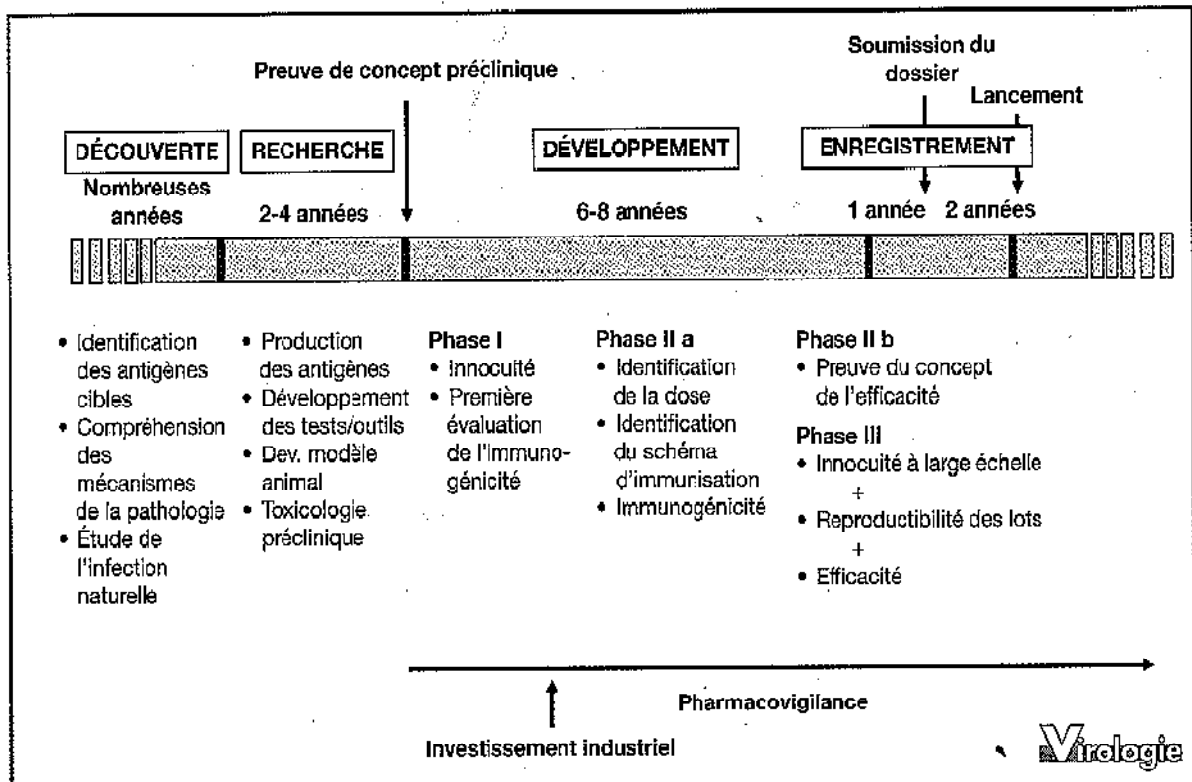


LE PRESIDENT DE THESE

Professeur CORNET

# ANNEXES

**Annexe 1: schéma de développement d'un vaccin [89].**



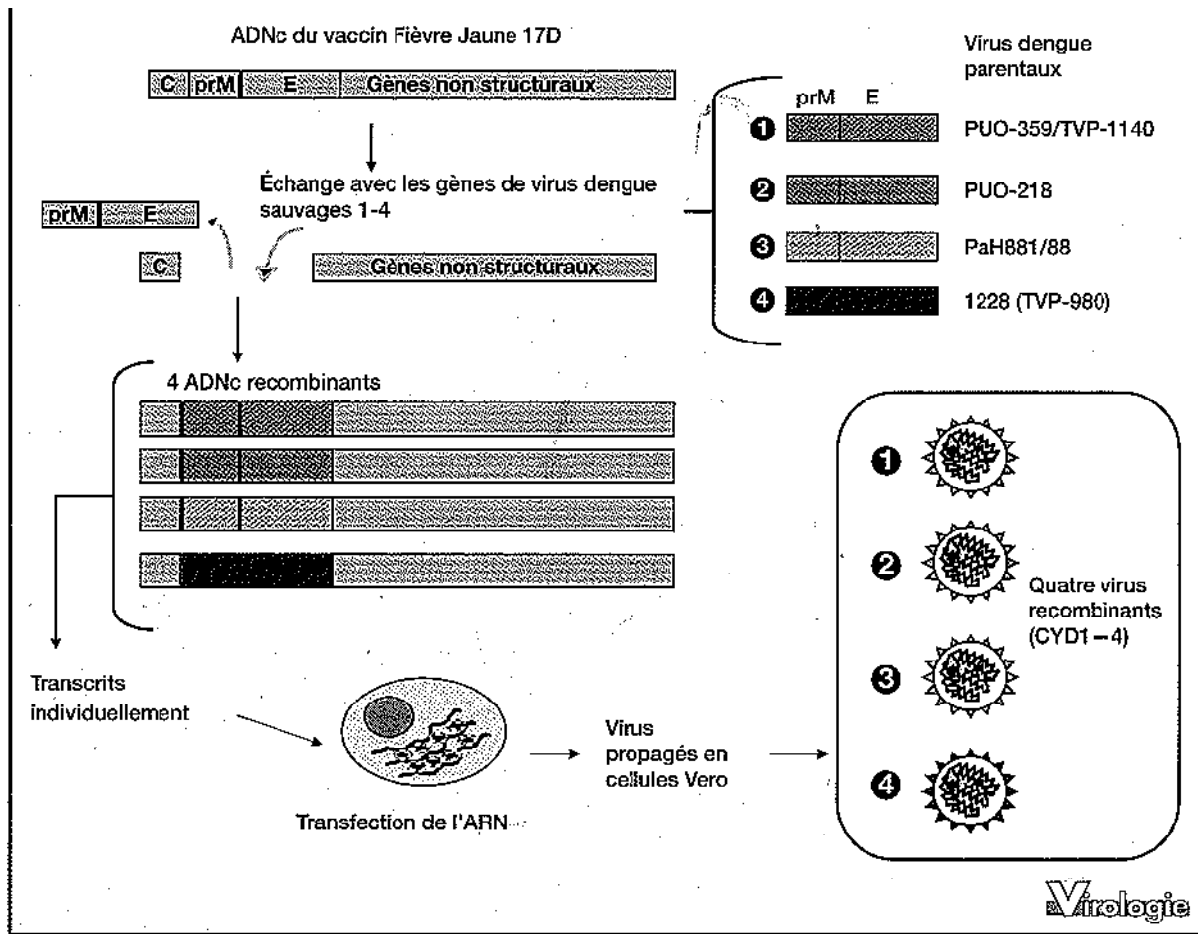
La **phase clinique 1** va donner des informations sur la sévérité et l'intensité des effets indésirables des vaccins (monovalent ou tétravalent) et aussi sur la capacité immunogène du candidat. Elle se déroule sur des sujets flavivirus naïfs résidant dans des régions où la dengue ne sévit pas.

Les **essais de phase clinique 2a** sont conçus pour étendre l'information sur l'immunogénicité, la sécurité, et la dose-réponse. Le cas échéant, le nombre, les intervalles, et la dose de vaccin doivent être affinée et élargie en étude de phase 2. Les essais peuvent être menés sur des populations à risque de contact avec la dengue ou un autre flavivirus. Les **essais de phase 2b** (randomisés, double aveugle, contrôlés) sont la pour amplifier les données de phase 2a sur des échantillons plus important dans des populations à haut risque et obtenir une estimation préliminaire de l'efficacité du vaccin.

Les **essais de phase 3** (randomisés, en double aveugle et contrôlés) sont menés dans une région endémique sur une large population (plusieurs centaines d'individu) partiellement immunisée contre un ou plusieurs sérotypes. Les individus des deux groupes doivent au même risque de développé la dengue. Ils doivent permettre de démontrer de façon significative l'efficacité du vaccin, associé à une production à grande échelle et d'examiner la sécurité et les corrélats de protection.

Les **essais de phase 4** sont des études poste licence pour étudier les effets indésirables rares l'efficacité dans des conditions de routine. [70, 133]

Annexe 2: schéma de construction du chimère VFJ/dengue [89].



Les gènes des protéines structurales (prM et E) du virus vaccinal de la fièvre jaune (VFJ17D) sont remplacés par les gènes correspondants de chacun des quatre sérotypes du virus de la dengue. Ces gènes proviennent de souches ayant subi un minimum de passages *in vitro* après isolement sur le terrain. Après obtention des ADNc, transcription et transfection de l'ARN correspondant dans les cellules Vero, 4 virus vaccins chimériques sont obtenus, dont la combinaison forme le vaccin tétravalent. Chaque vaccin monovalent comprend un phénotype de surface correspondant à un sérotypage de virus dengue, tout en ayant en commun le même moteur de répllication du VJF17D.

Annexe 3: TABLEAU REPRESENTANT LES SOUCHES UTILISEES POUR FABRIQUER CDEIII [119]

Table 1  
The representative dengue viruses used in this study.

Viral serotype	Virus stain	Accession number
Type 1	Brazil/97-11/1997	P27909
	Jamaica/CV1636/1977	P27913
	Nauru/West Pac/1974	P17763
	Singapore/S275/1990	P33478
	Thailand/AHF 82-80/1980	P27912
Type 2	16681-PDK53	P29991
	China/D2-04	P30026
	Jamaica/1409/1983	P07564
	Malaysia M2	P14338
	Malaysia M3	P14339
	Peru/IQT2913/1996	Q9WDA6
	Puerto Rico/PR159-S1/1969	P12823
	Thailand/0168/1979	P14337
	Thailand/16681/84	P29990
	Thailand/NGS-C/1944	P14340
	Thailand/PUO-218/1980	P18356
	Thailand/TH-36/1958	P29984
	Tonga/EKB194/1974	P27914
Type 3	China/80-2/1980	Q99D35
	Martinique/1243/1999	Q6YMS3
	Philippines/H87/1956	P27915
	Singapore/8120/1995	Q5UB51
	Sri Lanka/1266/2000	Q6YMS4
Type 4	Dominica/814669/1981	P09866
	Philippines/H241/1956	Q58HT7
	Singapore/8976/1995	Q5UCB8
	Thailand/0348/1991	Q2YHF0
	Thailand/0476/1997	Q2YHF2

Toutes ces souches sont issues de la base de données du centre national de biotechnologie. (réf nouveau candidat)



## Annexe 4: ALIGNEMENT DES DIFFERENTES SEQUENCES AA DEIII ET FABRICATION cDEIII [119]

**A**

DEN-1 consensus	KGMSYVMCTGSFKLEKEVAETQHGTVLVQVKYEGTDAPCKIPFSSQDEKGVTONGRRLITANFIVTDKEKFPVNEAEPFFGESYIVVGAGEKALKLSWFKKGSS
P17763	-----I-----
P27909	--T-----T-----T-----
P33478	-----T-----QC-----
P27912	--V-----I-----
P27913	-----I-----S-----

**B**

DEN-2 consensus	KGMSYSMCTGKFKVVKIEIAETQHGTVIRVQYEGDGSFCKIPFEIMDLKRRHVLGRRLITVNFIVTEKDSFVNEAEPFFGDSYIIIGVEPGQLKLNWFKKGSS
P07564	-----I-----
P14339	--I-----I--F-----I-----C--Y-----D-----I-----H-L-----
P30026	-----QI-----L-----H-----
P27914	-----I-----D-----
Q9WDA6	-----I-----A-----D-----
P12823	-----T-----T-----D-----
P14338	-----E-----L--DN-----V--L-----
P14337	-----
P14340	-----
P18356	-----
P29984	-----E-----
P29990	-----
P29991	-----

**C**

DEN-3 consensus	KGMSYAMCLNTFVLKKEVSETQHGTVILIKVYKYGEDAPCKIPFSTEDGQGAHNGRLITANFVYTKKEEFVNEAEPFFGESNIVIGIGDKALKINWYFKKGSS
P27915	-----R-----
Q5UB51	-----
Q6YMS3	-----T-----N-----
Q6YMS4	-----T-----N-----
Q99D35	-----R-----

**D**

DEN-4 consensus	KGMSYTMCSGKFSIDKEMAETQHGTVTVVKYEGAGAPCKVPIEIRDVNKEKVVGR.IISSTPFAENTNSVTNIELEPPFGDSYIVIGVGD SALT LHWFKKGSS
P09866	-----L-----N-----
Q5UCB8	-----V--L-----N-----
Q2YHF0	-----T-----
Q2YHF2	-----R-----T-----
Q58HT7	-----Y-----

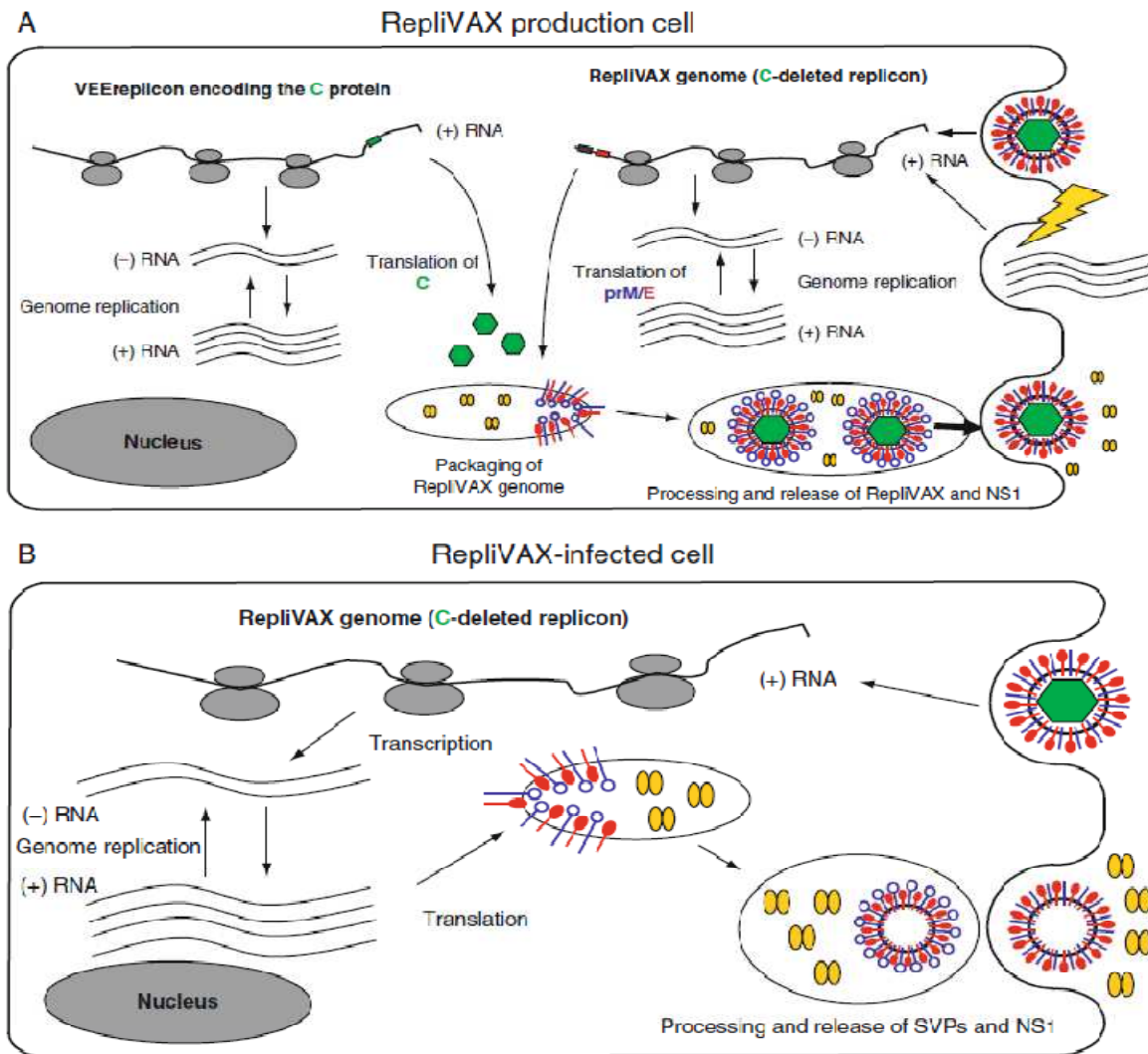
**E**

cED III	KGMSYAMCTGKFKLEKEVAETQHGTVILIKVYKYGEDAPCKIPFEIQDVERKRVNGLRLITANFIVTDKESFVNEAEPFFGDSYIVIGVGD KALKLNWFKKGSS
DEN-1 consensus	---V---S---V-VQ---TD---SS--EKGVTQ---K-----E---V-A-E---S-----
DEN-2 consensus	---S---S---VV==I---V-R=Q---S---M=L--R==L---V---E-D---I---EPGQ---S-----
DEN-3 consensus	---LNT-V-K---S---E-K-ED---STE-GQG-AH---V-K-E---E-N---I---I---Y-----
DEN-4 consensus	---T---S---SID--M---TVV---A---V-I--R--N-EK-V--I--SST-FAENTN-VT---L---S---T-H--R---

Les chercheurs ont aligné les séquences d'acides aminés de EIII de différents sous types de virus pour chaque sérotypes et ont obtenu alors quatre consensus cDEIII 1 (A), cEDIII2 (B), CEDIII3 (C), cEDIII4 (D).

(E) : les quatre consensus ont ensuite été alignés pour obtenir une nouvelle séquence cEDIII utilisé comme vaccin.

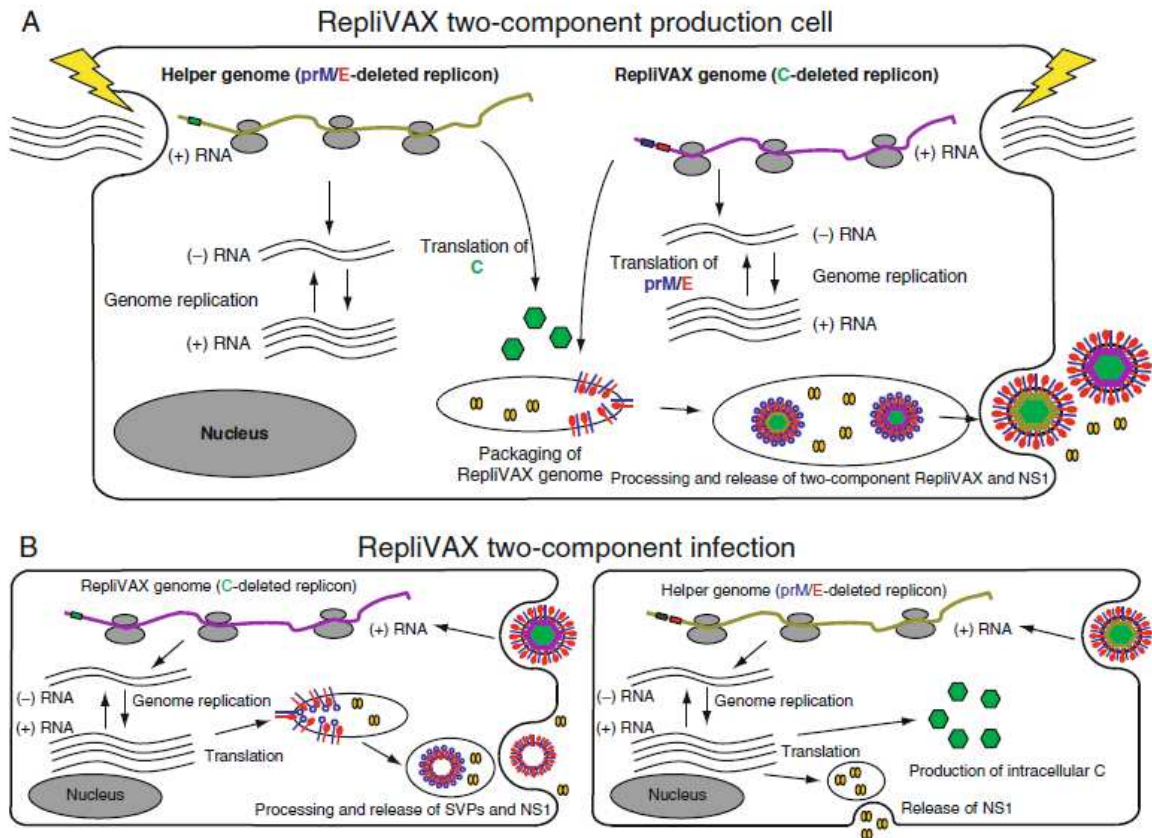
## Annexe 5: PRODUCTION ET INFECTION PAR REPLIVAX [110]



**A** : production RepliVax dans cellule exprimant C. Le génome de RepliVax délesté du gène C sont introduit par électroporation dans cellule exprimant le gène C manquant à partir d'un non cytopathique VEErep (Venezuelan equine encephalitis virus replicon). RepliVax produit tous les composants nécessaires à la réplication du génome et l'expression du gène C par le VEErep suivi de l'emballage du génome RepliVax en particules infectieuses qui sont libérées [avec NS1 et sous-unités virales (SUV) (non représenté)] par exocytose. Sinon, particules RepliVax infectieuses matures peuvent être utilisées (à la place de matériel génétique par électroporation) pour lancer le processus d'infection pour la culture à grande échelle.

**B** : RepliVax infection des cellules normales en culture ou dans un individu vacciné. L'infection des cellules avec RepliVax imite les événements précoces de l'infection à flavivirus naturelles. Le génome RepliVax est reproduit dans la cellule, et des composants antigéniques [y compris les produits libérés et des peptides qui peuvent être chargés sur les molécules du CMH (non représenté)] sont produits. L'absence de C empêche génome RepliVax d'être emballé dans des particules infectieuses, mais ne n'interfère pas avec la sécrétion des autres composants antigéniques. SUV non-infectieuses et NS1 sont libérées par les cellules infectées par RepliVax, leur permettant d'obtenir l'immunité humorale protectrice chez les individus vaccinés.

## Annexe 6: NOUVEAU MODELE DE PRODUCTION DE REPLIVAX AVEC DEUX COMPARTIMENTS INFECTIEUX [110]



**A Production de deux composants RepliVax par infection multiple dans les cellules normales en culture.** Génome RepliVax délesté du gène-C et génome helper délesté des gènes-prM/E sont simultanément introduit par électroporation dans les cellules normales. Les deux génomes produisent les composants nécessaires à la réplication du génome. Expression des prM / E par le génome RepliVax de concert avec l'expression du gène C par le génome helper permet l'emballage des deux génomes en particules individuelles infectieuses qui sont libérées [avec NS1 et SUV (non représenté)] par exocytose. Alternativement, ces particules infectieuses matures RepliVax et helper peuvent également être utilisés (à la place de matériel génétique par électroporation) pour initier ce processus lorsque infection par est réalisée à MOI (multiplicity of infection) supérieur à 1.

**B Infection par deux composants RepliVax des cellules normales en culture ou chez des personnes vaccinées.** L'infection des cellules soit par des particules RepliVax soit helper imite les événements précoces de l'infection à flavivirus naturels. Ce type d'infection se produit in vivo et in vitro à des MOI inférieur à 1. A gauche: Le génome RepliVax est répliqué dans la cellule, produisant SUV et protéine NS1. L'absence de Capside empêche génomes RepliVax d'être emballés dans des particules infectieuses, mais n'interfère pas avec la sécrétion des SUV ou NS1. Droit: Le génome helper est reproduit dans la cellule, et NS1 est produite. L'absence des prM et E empêche génomes helper d'être emballés dans des particules infectieuses.

# **BIBLIOGRAPHIE**

1. [http://www.sfm.u.org/urgences2007/donnees/pdf/46\\_laversanne.pdf](http://www.sfm.u.org/urgences2007/donnees/pdf/46_laversanne.pdf), juin 2010.
2. [http://www.pasteur.fr/ip/easysite/pasteur/fr/presse/fiches-sur-les-maladies-infectieuses/dengue\\_juin](http://www.pasteur.fr/ip/easysite/pasteur/fr/presse/fiches-sur-les-maladies-infectieuses/dengue_juin) 2010.
3. Anonymous, Dengue, Dengue Haemorrhagic Fever and Dengue Shock Syndrome in the Context of the Integrated Management of Childhood Illness. World Health Organization (2005), WHO/FCH/CAH/05.13.
4. Anonymous (2009). Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. WHO library Cataloguing-in publication data (Geneva).
5. [http://www.lemonde.fr/societe/article/2010/09/18/un-deuxieme-cas-autochtone-de-dengue-signale-a-nice\\_1413177\\_3224.html](http://www.lemonde.fr/societe/article/2010/09/18/un-deuxieme-cas-autochtone-de-dengue-signale-a-nice_1413177_3224.html) septembre 2010
6. <http://www.zemedical.com/actualites/dengue-usa-miami> novembre 2010.
7. Whitehead SS, Blaney JE, Durbin AP and Murphy BR, Prospects for a dengue virus vaccine, *Nat rev microbiol*, 2007, **5**(7):518-528.
8. Weaver SC, Vasilakis N. Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infect Genet Evol.* 2009, **9**(4):523-40
9. Massé N., Selisko B., Malet H. *et al.* Le virus de la dengue : cibles virales et antiviraux, *Virologie*, 2007, **11**(2):121-133.
10. Gurugama P, Garg P, Perera J, Wijewickrama A, Seneviratne SL. Dengue viral infections. *Indian J Dermatol*, 2010 **55**:68-78.
11. Bente DA and Rico-Hesse R, Models of dengue virus infection, *Drug Discov Today Dis Models.* 2006 ; **3**(1): 97–103.
12. Arunachalam N, Tana S, Espino F et al, Eco-bio-social determinants of dengue vector breeding: a multicountry study in urban and periurban Asia, *Bull World Health Organ* 2010; **88**(3):173–184.
13. Anonymous (2010). Surveillance du moustique *Aedes albopictus* en France métropolitaine Bilan 2009. EID méditerranée. [http://www.invs.sante.fr/surveillance/dengue/bilan\\_albo\\_2009.pdf](http://www.invs.sante.fr/surveillance/dengue/bilan_albo_2009.pdf), avril 2011.
14. Anonymous, Surveillance du moustique exotique *Aedes albopictus* en France métropolitaine, ville d'Hyères (Var). [http://www.ville-hyeres.fr/visiteur/informations/communiqués\\_presse/2010/juin/plaquette\\_DGS\\_moustique.pdf](http://www.ville-hyeres.fr/visiteur/informations/communiqués_presse/2010/juin/plaquette_DGS_moustique.pdf), avril 2011.
15. Anonymous, Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd edition. Geneva : World Health Organization. 1997

16. <http://www.who.int/csr/resources/publications/dengue/012-23.pdf>) juin 2010.
17. Bandyopadhyay S, Lum LC and Kroeger A, Classifying dengue: a review of the difficulties in using the WHO case classification for dengue haemorrhagic fever, *Trop Med Int Health* 2006, **11**(8):1238-55.
18. Phuong CXT, Nhan NT, Kneen R, *et al.* Clinical Diagnosis and assessment of severity of confirmed dengue infections in Vietnamese Children: Is the World Health Organization Classification system helpful. *Am J Trop Med Hyg*, 2004; **70**(2):172-9.
19. Gupta P, Khare V, Tripathi S *et al*, Assessment of World Health Organization definition of dengue hemorrhagic fever in North India, *J Infect Dev Ctries* 2010; **4**(3):150-155.
20. Deen J, Harris E, Wills B *et al.* The WHO dengue classification and case definitions: time for a reassessment. *Lancet*, 2006, **368**(9530):170-173
21. Rigau-Perez J. Severe dengue: the need for new case definitions. *Lancet Infect Dis*, 2006, **6**(5):297–302
22. Bandyopadhyay S, Lum LC, Kroeger A. Classifying dengue: a review of the difficulties in using the WHO case classification for dengue haemorrhagic fever. *Tropical Medicine and International Health*, 2006, **11**(8):1238--1255.
23. Organisation Retex, bulletin d’alerte et de surveillance Antilles Guyane, janvier 2008. [http://www.moustifluid.fr/fic/articles\\_divers/article\\_invs/antilles\\_dengue\\_n1basag2008\\_1.pdf](http://www.moustifluid.fr/fic/articles_divers/article_invs/antilles_dengue_n1basag2008_1.pdf), juin 2010.
24. <http://apps.who.int/tdr/svc/news-events/news/dengue-classification>, juin 2010.
25. Guha-Sapir D and Schimmer B, Dengue fever: new paradigms for a changing epidemiology, *Emerg Themes Epidemiol*, 2005, **2**(1): 1.
26. Hay SI, Myers MF, Burke DS *et al.* Etiology of interepidemic periods of mosquito-borne disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000, **97**(16):9335-9.
27. Toussaint J.-F., Kerkhofs P., De Clercq K. Influence des changements climatiques globaux sur la progression des arboriroses. *Ann. Méd. Vét.*, 2006, **150**, 56-63
28. Anders KI, Nguyet NM, Chau NV *et al.* Epidemiological Factors Associated with Dengue Shock Syndrome and Mortality in Hospitalized Dengue Patients in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2001, **84**(1):127–134
29. Lambdin BH, Schmaedick MA, McClintock S *et al.* Dry Season Production of Filariasis and Dengue Vectors in American Samoa and Comparison with Wet Season Production. *Am J Trop Med Hyg*. 2009; **81**(6):1013-9

30. Thu HM, Lowry K, Myint TT *et al.* Myanmar Dengue Outbreak Associated with Displacement of Serotypes 2, 3, and 4 by Dengue 1. *Emerg Infect Dis.* 2004, **10**(4):593-7.
31. Johansson MA, Cummings DA, Glass GE. Multiyear Climate Variability and Dengue—El Niño Southern Oscillation, Weather, and Dengue Incidence in Puerto Rico, Mexico, and Thailand: A Longitudinal Data Analysis. *PLoS Med.* 2009, **6**(11):e1000185.
32. Tipayamongkhogul M, Fang CT, Klinchan S, Liu CM, King CC. Effects of the El Niño-southern oscillation on dengue epidemics in Thailand, 1996-2005, *BMC Public Health.*, 2009, **9**:422..
33. Tabachnick WJ., Challenges in predicting climate and environmental effects on vector-borne disease epistemics in a changing world. *J Exp Biol.* 2010; **213**(6):946-54.
34. Hsieh YH, Chen CW., Turning points, reproduction number, and impact of climatological events for multi-wave dengue outbreaks. *Trop Med Int Health.* 2009; **14**(6):628-38.
35. Khan E, Kisat M, Khan N, Nasir A, Ayub S, Hasan R., Demographic and clinical features of dengue fever in Pakistan from 2003-2007: a retrospective cross-sectional study. *PLoS One.* 2010; **5**(9).
36. Green S. et Rothman A., Immunopathological mechanisms in dengue and dengue hemorrhagic fever, *Curr Opin Infect Dis*, 2006, **19**(5):429–436.
37. Halstead SB, Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses, *Adv Virus Res.* 2003; **60**:421-67.
38. Nielsen D.G, The relationship of interacting immunological components in dengue pathogenesis, *Virology J.* 2009, **6**:211.
39. Webster DP, Farrar J, Rowland-Jones S, Progress towards a dengue vaccine, *Lancet Infect Dis.* 2009, **9**(11):678-87.
40. Beltramello M, Williams KL, Simmons CP *et al.*, The human immune response to Dengue virus is dominated by highly cross-reactive antibodies endowed with neutralizing and enhancing activity, *Cell Host Microbe.* 2010, **8**(3):271-83.
41. Dejnirattisai W., Jumnainsong A, Onsirisakul N *et al.*, Cross-Reacting Antibodies Enhance Dengue Virus Infection in Humans, *Science.* 2010, **328**(5979):745-8.
42. Yen YT, Chen HC, Lin YD, Shieh CC, Wu-Hsieh BA, Enhancement by Tumor Necrosis Factor Alpha of Dengue Virus-Induced Endothelial Cell Production of Reactive Nitrogen and Oxygen Species Is Key to Hemorrhage Development, *J virol*, 2008, **82**(24):12312–12324.

43. Thein S, Aung MM, Shwe TN, *et al.* (1997) Risk factors in dengue shock syndrome. *Am J Trop Med Hyg*, **56**(5): 566–572.
44. Sangkawibha N, Rojanasuphot S, Ahandrik S, Viriyapongse S, Jatanasen S, *et al.* (1984) Risk factors in dengue shock syndrome: A prospective epidemiologic study in Rayong, Thailand. I. the 1980 outbreak. *Am J Epidemiol* **120**(5): 653–669.
45. Guzmán MG, Kourí G, Valdés L, Bravo J, Vázquez S, Halstead SB, Enhanced severity of secondary dengue-2 infections: death rates in 1981 and 1997 Cuban outbreaks. *Rev Panam Salud Publica*, 2002. **11**(4):223-7.
46. Balmaseda A, Hammond SN, Pérez L, Tellez Y *et al*, Serotype-specific differences in clinical manifestations of dengue. *Am J Trop Med Hyg*, 2006. **74**(3):449-56.
47. Nisalak A, Endy TP, Nimmannitya S, Kalayanarooj S *et al*, Serotype-specific dengue virus circulation and dengue disease in Bangkok, Thailand from 1973 to 1999. *Am J Trop Med Hyg*, 2003, **68**(2): 191–202.
48. Harris E, Videz E, Pérez L, Sandoval E *et al*, Clinical, epidemiologic, and virologic features of dengue in the 1998 epidemic in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg*, 2000. **63**(1-2): 5-11.
49. Endy TP, Chunsuttiwat S, Nisalak A, Libraty DH *et al*, Epidemiology of inapparent and symptomatic acute dengue virus infection: A prospective study of primary school children in Kamphaeng Phet, Thailand. *Am J Epidemiol*, 2002, **156**(1): 40–51.
50. Graham RR, Juffrie M, Tan R, Hayes CG *et al*, A prospective seroepidemiologic study on dengue in children four to nine years of age in Yogyakarta, Indonesia I. studies in 1995-1996. *Am J Trop Med Hyg*, 1999. **61**(3): p. 412-9.
51. Fried JR, Gibbons RV, Kalayanarooj S, Thomas SJ *et al*, Serotype-Specific Differences in the Risk of Dengue Hemorrhagic Fever: An Analysis of Data Collected in Bangkok, Thailand from 1994 to 2006, *PLoS Negl Trop Dis*. 2010, **4**(3):e617.
52. Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, *et al*, Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis*. 2000, **181**(1):2-9.
53. Endy TP, Nisalak A, Chunsuttiwat S *et al*, Spatial and Temporal Circulation of Dengue Virus Serotypes: A Prospective Study of Primary School Children in Kamphaeng Phet, Thailand, *Am J Epidemiol*, 2002, **156**(1):52-9.
54. Rico-Hesse R., Dengue virus evolution and virulence models. *Clin Infect Dis*. 2007, **44**(11):1462-6.



55. Hanna JN. Dengue diagnostics: recommendations from the Asia-Pacific and the Americas dengue prevention boards. International Vaccine Institute. [http://www.pdvi.org/email\\_news/pdf/Dengue\\_Diagnostics\\_Recommendations\\_Combine\\_d\\_DPBs.pdf](http://www.pdvi.org/email_news/pdf/Dengue_Diagnostics_Recommendations_Combine_d_DPBs.pdf), mars 2011.
56. Tricou V. Etude comparative de deux tests de détection rapide de la protéine NS1 pour le diagnostic de la dengue. Université Claude Bernard- Lyon1, 2010, Thèse n°56. [http://ispb.univ-lyon1.fr/theses/these\\_integ/tricou/these\\_tricou.pdf](http://ispb.univ-lyon1.fr/theses/these_integ/tricou/these_tricou.pdf), mars 2011.
57. [http://cordis.europa.eu/fetch?CALLER=FR\\_NEWS&ACTION=D&SESSION=&R\\_CN=31816](http://cordis.europa.eu/fetch?CALLER=FR_NEWS&ACTION=D&SESSION=&R_CN=31816) juin 2010.
58. Wang Q-Y, Patel SJ, Vangrevelinghe E *et al.* A Small-Molecule Dengue Virus Entry Inhibitor, *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, **53**(5):1823–1831.
59. Zhou Z, Khaliq M, Suk J-E *et al.* Antiviral Compounds Discovered by Virtual Screening of Small-Molecule Libraries against Dengue Virus E Protein, *ACS Chem Biol*, 2008, **3**(12): 765–775.
60. Yang CC, Hsieh YC, Lee SJ *et al.* Novel dengue virus-specific NS2B/NS3 protease inhibitor, BP2109, discovered by a high-throughput screening assay, *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, **55**(1):229-238.
61. Tomlinson SM, Watowich SJ. Anthracene-based inhibitors of dengue virus NS2B-NS3 protease, *Antiviral Res*, 2011, **89**(2):127-35.
62. Tomlinson SM, Malmstrom RD, Russo A, Mueller N, Pang Y-P *et al.* Structure-based discovery of dengue virus protease inhibitors, *Antiviral Res*, 2009, **82**(3):110–114.
63. Niyomrattanakit P, Chen Y-L, Dong H *et al.* Inhibition of Dengue Virus Polymerase by Blocking of the RNA Tunnel, *J Virol*, 2010, **84**(11):5678–5686.
64. Lim SP, Sonntag LS, Noble C *et al.* Small-molecule inhibitors that selectively block dengue virus methyltransferase, *J Biol Chem.*, 2010, **286**(8):6233-40.
65. : <http://medecinetropicale.free.fr/cours/arbovirose.htm>, janvier 20011.
66. TD de jéréemie corneille, faculté de médecine Paris.
67. Pilly E, maladie infectieuse et tropicales, 2008, 21<sup>ème</sup> édition, 510-514.
68. Innis B.L and. Eckels K.H, Progress in development of a live-attenuated, tetravalent dengue virus vaccine by the United States Army Medical Research and Materiel Command, *Am J Trop Med Hyg.* 2003, **69**(Suppl 6):1-4.

69. Simasathien S, Thomas S.J, Watanaveeradej V *et al*, Safety and Immunogenicity of a Tetravalent Live-attenuated Dengue Vaccine in Flavivirus Naive Children, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2008, **78**(3):426–433.
70. Anonymous, Guidelines for the clinical evaluation of dengue vaccines in endemic areas, 2008, WHO Document Production Services, Geneva, Switzerland.
71. Anonymous, Guidelines for Plaque-Reduction Neutralization Testing of Human Antibodies to Dengue Viruses, WHO/IVB/07.07.
72. Thomas SJ, Nisalak N, Anderson KB *et al*, Dengue Plaque Reduction Neutralization Test (PRNT) in Primary and Secondary Dengue Virus Infections: How Alterations in Assay Conditions Impact Performance, *Am J Trop Med Hyg.* 2009, **81**(5):825–833).
73. Eckels K.H, Dubois D.R, Putnak R *et al*, Modification of dengue virus strains by passage in primary dog kidney cells: preparation of candidate vaccines and immunization of monkeys, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2003, **69**(Suppl 6): 12–16.
74. Halstead S.B et Marchette N.J, Biologic properties of dengue viruses following serial passage in primary dog kidney cells: studies at the University of Hawaii. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2003, **69**(Suppl 6):5–11
75. Eckels KH, Brandt WE, Harrison VR, McCown JM, Russell PK. Isolation of a temperature-sensitive dengue-2 virus under conditions suitable for vaccine development. *Infect Immun*, 1976, **14**(5):1221–1227.
76. Edelman R, Wasserman S.S, Bodison S.A, Phase I trial of 16 formulations of a tetravalent live-attenuated dengue vaccine, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2003, **69**(Suppl 6): 48–60.
77. Sun W, Edelman R, Kanesa-Thanan N *et al*, Vaccination of human volunteers with monovalent and tetravalent live-attenuated dengue vaccine candidates, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2003, **69**(Suppl 6):24–31.
78. Sun W, Cunningham D, Wasserman S.S *et al*, Phase 2 clinical trial of three formulations of tetravalent live-attenuated dengue vaccine in flavivirus-naïve adults, *Hum Vaccin*, 2009, **5**(1):33-40.
79. Koraka P, Benton S, van Amerongen G, Stittelaar KJ, Osterhaus ADME. Efficacy of a live attenuated tetravalent candidate dengue vaccine in naïve and previously infected cynomolgus macaques. *Vaccine*, 2007; **25**(29):5409-16.
80. Gunther VJ, Putnak R, Eckels KH *et al* .A human challenge model for dengue infection reveals a possible protective role for sustained interferon gamma levels during the acute phase of illness. *Vaccine*, 2011.**29**(22):3895-904.

81. *Bhamarapravati N, Yoksan S.* Live attenuated tetravalent dengue vaccine. *Vaccine* 2000, **18**(suppl 2):44–7.
82. Vaughn DW, Hoke CH Jr, Yoksan S, *et al.* Testing of a dengue 2 live-attenuated vaccine (strain 16681 PDK 53) in ten American volunteers. *Vaccine*, 1996, **14**(4):329-36.
83. 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**(23-24):3179–3188.
84. Sabchareon A, Lang J, Chanthavanich P *et al*, Safety and immunogenicity of tetravalent live-attenuated dengue vaccines in Thai adult volunteers: role of serotype concentration, ratio, and multiple doses, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2002, **66**(3):264–272.
85. Sabchareon A, Lang J, Chanthavanich P *et al*, Safety and immunogenicity of a three dose regimen of two tetravalent live-attenuated dengue vaccines in five- to twelve-year-old Thai children, *Pediatr Infect Dis J*, 2004;**23**(2):99–109.
86. Kitchener S, Kitchener M, Nasveld P *et al*, Immunogenicity and safety of two live-attenuated tetravalent dengue vaccine formulations in healthy Australian adults, *Vaccine*, 2006, **24**(9):1238–1241.
87. Rothman A.L, Kanesa-thasan N, West K, Janus J, Saluzzo J-F, Ennis F.A, Induction of T lymphocyte responses to dengue virus by a candidate tetravalent live attenuated dengue virus vaccine, *Vaccine*, 2001, **19**(32):4694–4699.
88. Chanthavanich P, Lunxembruger C, Sirivichayakul C *et al*, Short report: immune response and occurrence of dengue infection in thai children three to eight years after vaccination with live attenuated tetravalent dengue vaccine, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2006, **75**(1):26–28.
89. Guy B, Saviile M, Lang J, Développement d’un vaccin tétravalent contre la dengue, *Virologie*, 2010, **14**(5):311-21.
90. Guy B, Guirakhoo F, Barban V, Higgs S, Monath T.P, Lang J. Preclinical and clinical development of YFV 17D-based chimeric vaccines against dengue, West Nile and Japanese encephalitis viruses, *Vaccine*, 2010, **28**(3):632–649.
91. Guirakhoo F, Arroyo J, Pugachev K.V. *et al.* Construction, Safety, and Immunogenicity in Nonhuman Primates of a Chimeric Yellow Fever-Dengue Virus Tetravalent Vaccine, *J Virol*, 2001, **75**(16):7290–7304.

92. Galler R, Marchevsky RS, Caride E *et al.* Attenuation and immunogenicity of recombinant yellow fever 17D-dengue type 2 virus for rhesus monkeys. *Braz J Med Biol Res.*, 2005, **38**(12):1835-46.
93. Appaiahgari MB, Vрати S. IMOJEV(®): a Yellow fever virus-based novel Japanese encephalitis vaccine. *Expert Rev Vaccines.* 2010; **9**(12):1371-84.
94. Men R, Bray M, Clark D, Chanock R.M, Lai C-J. Dengue Type 4 Virus Mutants Containing Deletions in the 3' Non-coding Region of the RNA Genome: Analysis of Growth Restriction in Cell Culture and Altered Viremia Pattern and Immunogenicity in Rhesus Monkeys, *J Virol*, 1996, **70**(6):3930–3937.
95. Blaney JE Jr, Durbin AP, Murphy BR, Whitehead SS. Development of a Live Attenuated Dengue Virus Vaccine Using Reverse Genetics. *Viral Immunol*, 2006, **19**(1):10-32.
96. Durbin A.P, Karron R.A, Sun W *et al.*, Attenuation and immunogenicity in humans of a live dengue virus type-4 vaccine candidate with a 30 nucleotide deletion in its 3'-untranslated region, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2001, **65**(5): 405–413.
97. Troyer J.M, Hanley K.A, Whitehead S.S *et al.* A live attenuated recombinant dengue-4 virus vaccine candidate with restricted capacity for dissemination in mosquitoes and lack of transmission from vaccinees to mosquitoes, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2001, **65**(5):414–419.
98. Whitehead S.S, Falgout B, Hanley K.A, Blaney jr J.E, Markoff L et Murphy B.R. A Live, Attenuated Dengue Virus Type 1 Vaccine Candidate with a 30-Nucleotide Deletion in the 3' Untranslated Region Is Highly Attenuated and Immunogenic in Monkeys, *J Virol*, 2003, **77**(2):1653–1657.
99. Blaney jr J.E, Hanson C.T, Hanley K.A, Murphy B.R et Whitehead S.S. Vaccine candidates derived from a novel infectious cDNA clone of an American genotype dengue virus type 2, *BMC Infect Dis*, 2004, **4**:39.
100. Blaney jr J.E, Hanson C.T, Firestone C-Y, Hanley K.A, Murphy B.R et Whitehead S.S. Genetically modified, live attenuated dengue virus type 3 vaccine candidates, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2004, **71**(6):811–821.
101. Whitehead SS, Hanley KA, Blaney JE Jr, Gilmore LE, Elkins WR, Murphy BR, Substitution of the structural genes of dengue virus type 4 with those of type 2 results in chimeric vaccine candidates which are attenuated for mosquitoes, mice, and rhesus monkeys, *Vaccine.* 2003, **21**(27-30):4307-16.

102. Durbin AP, Whitehead SS, McArthur J *et al.* rDEN4 $\Delta$ 30, a live attenuated dengue virus type 4 vaccine candidate, is safe, immunogenic, and highly infectious in healthy adult volunteers, *J Infect Dis*, 2005; **191**(5):710–8.
103. Durbin AP, McArthur J, Marron JA *et al.*, The Live Attenuated Dengue Serotype 1 Vaccine rDEN1 $\Delta$ 30 is Safe and Highly Immunogenic in Healthy Adult Volunteers, *Hum Vaccin*, 2006, **2**(4):167-173.
104. Durbin AP, McArthur J, Marron JA *et al.* rDEN2/4 $\Delta$ 30(ME), A Live Attenuated Chimeric Dengue Serotype 2 Vaccine Is Safe and Highly Immunogenic in Healthy Dengue-Naïve Adults, *Hum Vaccin*, 2006, **2**(6):255-260.
105. Blaney JE Jr, Matro J, Murphy B.R et Whitehead S.S. Recombinant, Live-Attenuated Tetravalent Dengue Virus Vaccine Formulations Induce a Balanced, Broad, and Protective Neutralizing Antibody Response against Each of the Four Serotypes in Rhesus Monkeys, *J Virol*, 2005, **79**(9):5516–5528.
106. Blaney JE Jr, Sathe NS, Goddard L *et al.*, Dengue virus type 3 vaccine candidates generated by introduction of deletions in the 3' untranslated region (3'-UTR) or by exchange of the DENV-3 3'-UTR with that of DENV-4, *Vaccine*, 2008, **26**(6):817–828.
107. McArthur J, Durbin AP, Marron JA *et al.* Phase I Clinical Evaluation of rDEN4 $\Delta$ 30-200,201: A Live Attenuated Dengue 4 Vaccine Candidate Designed for Decreased Hepatotoxicity, *Am J Trop Med Hyg.* 2008, **79**(5):678–684.
108. Wrigth PF, Durbin AP, Whitehead SS *et al.* Phase 1 trial of the dengue virus type 4 vaccine candidate rDEN4 $\Delta$ 30-4995 in healthy adult volunteers. *Am J Trop Med Hyg*, 2009, **81**(5):834-841.
109. Blaney jr J.E, Sathe NS, Hanson CT, Firestone C-Y, Murphy B.R et Whitehead S.S. Vaccine candidates for dengue virus type 1 (DEN1) generated by replacement of the structural genes of rDEN4 and rDEN4 $\Delta$ 30 with those of DEN1, *Virol J*, 2007, **4**:23.
110. Widman DG, Frolov I, Mason PW. Third-Generation Flavivirus Vaccines Based on Single-Cycle, Encapsidation-Defective Viruses, *Adv Virus Res.* 2008, **72**:77-126.
111. Butrapet S, Huang CY, Pierro DJ, Bhamarapavati N, Gubler DJ, Kinney RM. Attenuation markers of a candidate dengue type 2 vaccine virus, strain 16681 (PDK-53), are defined by mutations in the 5' noncoding region and nonstructural proteins 1 and 3. *J Virol.* 2000, **74**(7):3011-9.
112. Huang CY, Butrapet S, Pierro DJ *et al.* Chimeric dengue type 2 (vaccine strain PDK-53)/dengue type 1 virus as a potential candidate dengue type 1 virus vaccine. *J Virol.* 2000, **74**(7):3020-8.

113. Butrapet S, Rabablert J, Angsubhakorn S *et al.* Chimeric dengue type 2/type 1 viruses induce immune responses in cynomolgus monkeys. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2002, **33**(3):589-99.
114. Huang CY, Butrapet S, Tsuchiya KR *et al.* Dengue 2 PDK-53 virus as a chimeric carrier for tetravalent dengue vaccine development. *J Virol*, 2003, **77**(21):11436-47.
115. Huang CY, Silengo SJ, Whiteman MC, Kinney RM. Chimeric dengue 2 PDK-53/West Nile NY99 viruses retain the phenotypic attenuation markers of the candidate PDK-53 vaccine virus and protect mice against lethal challenge with West Nile virus. *J Virol*, 2005, **79**(12):7300-10.
116. Putnak JR, Collier B-A, Voss G *et al.*, An evaluation of dengue type-2 inactivated, recombinant subunit, and live-attenuated vaccine candidates in the rhesus macaque model, *Vaccine*, 2005, **23**(35):4442–4452.
117. Maves RC, Castillo Ore RM, Porter KR, Kochel TJ. Immunogenicity of a Psoralen-Inactivated Dengue Virus Type 1 Vaccine Candidate in Mice, *Clin Vaccine Immunol*, 2010, **17**(2):304–306.
118. Clements DE, Collier B-A, Lieberman MM *et al.*, Development of a recombinant tetravalent dengue virus vaccine: Immunogenicity and efficacy studies in mice and monkeys, *Vaccine*, 2010, **28**(15):2705–2715.
119. Leng C-H, Liu S-J, Tsai J-P *et al.*, A novel dengue vaccine candidate that induces cross-neutralizing antibodies and memory immunity, *Microbes Infect*, 2009, **11**(2):288-295.
120. Gil L, Lopez C, Lazo L *et al.*, Recombinant nucleocapsid-like particles from dengue-2 virus induce protective CD4+ and CD8+ cells against viral encephalitis in mice, *Int Immunol*, 2009, **21**(10):1175–1183.
121. Khanam S, Rajendra P, Khanna N, Swaminathan S. An adenovirus prime/plasmid boost strategy for induction of equipotent immune responses to two dengue virus serotypes, *BMC Biotechnol*, 2007, **7**(10).
122. Holman DH, Wang D, Raviprakash K *et al.* Two Complex, Adenovirus-Based Vaccines That Together Induce Immune Responses to All Four Dengue Virus Serotypes, *Clin Vaccine Immunol*, 2007, **14**(2):182–189.
123. Raviprakash K, Wang D, Ewing D *et al.* A Tetravalent Dengue Vaccine Based on a Complex Adenovirus Vector Provides Significant Protection in Rhesus Monkeys against All Four Serotypes of Dengue Virus, *J Virol*, 2008, **82**(14):6927–6934.

124. Brandler S, Lucas-Houran M, Moris A *et al*, Pediatric Measles Vaccine Expressing a Dengue Antigen Induces Durable Serotype-specific Neutralizing Antibodies to Dengue Virus, *PLoS Negl Trop Dis*, 2007, **1**(3):e96. doi:10.1371/journal.pntd.0000096.
125. Brandler S, Ruffie C, Najburg V *et al*. Pediatric measles vaccine expressing a dengue tetravalent antigen elicits neutralizing antibodies against all four dengue viruses, *Vaccine*, 2010, **28**(41):6730–6739.
126. Murrell S, Wu SC, Butler M. Review of dengue virus and the development of a vaccine. *Biotechnol Adv.*, 2011, **29**(2):239-47.
127. Pérez-Vélez ME, García-Nieves T, Colón-Sánchez C, Martínez I. Induction of neutralization antibodies in mice by Dengue-2 envelope DNA vaccines. *P R Health Sci J*. 2009, **28**(3):239-50
128. Blair PJ, Kochel TJ, Raviprakash K *et al*. Evaluation of immunity and protective efficacy of a dengue-3 pre-membrane and envelope DNA vaccine in *Aotus nancymae* monkeys. *Viral Immunol.* 2008, **21**(2):123-32.
129. Lima DM, de Paula SO, França RF *et al*. A DNA vaccine candidate encoding the structural prM/E proteins elicits a strong immune response and protects mice against dengue-4 virus infection. *Vaccine*. 2011, **29**(4):831-8.
130. Suzuki R, Winkelmann ER, Mason PW. Construction and Characterization of a Single-Cycle Chimeric Flavivirus Vaccine Candidate That Protects Mice against Lethal Challenge with Dengue Virus Type 2, *J Virol*, 2009, **83**(4):1870–1880.
131. Shustov AV, Frolov I. Efficient, trans-complementing packaging systems for chimeric, pseudoinfectious dengue 2/yellow fever viruses. *Virology*, 2010, **400**(1):8-17.
132. Simmons M, Simmons T, Lynch J, Putnak R. Protection against dengue virus by non-replicating and live attenuated vaccines used together in a prime boost vaccination strategy, *Virology*, 2010, **396**(2):280–288.
133. Letson GW, Singhasivanon P, Fernandez E *et al*, Dengue vaccine trial guidelines and role of large-scale, post proof-of-concept demonstration projects in bringing a dengue vaccine to use in dengue endemic areas, *Hum Vaccin*, 2010, **6**(10):802-809.



# Serment des Apothécaires



Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens 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 et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des 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.