



**Pourquoi le développement
d'un vaccin contre la dengue
est-il si complexe ?**

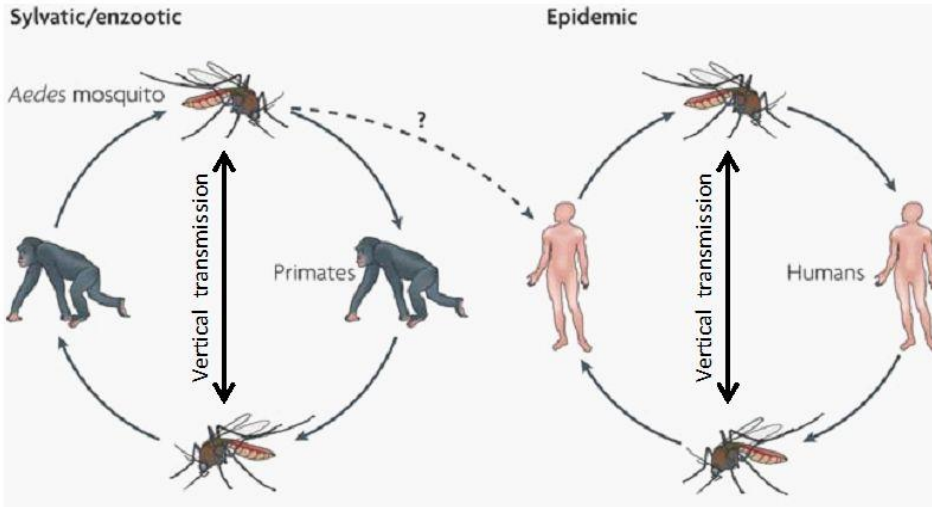
Vincent Deubel

Sommaire

- Généralités sur la dengue et la pathogenèse
- Généralités sur le virus de la dengue (DENV) et sur sa structure antigénique
- Les vaccins contre la dengue et les défis de la vaccination

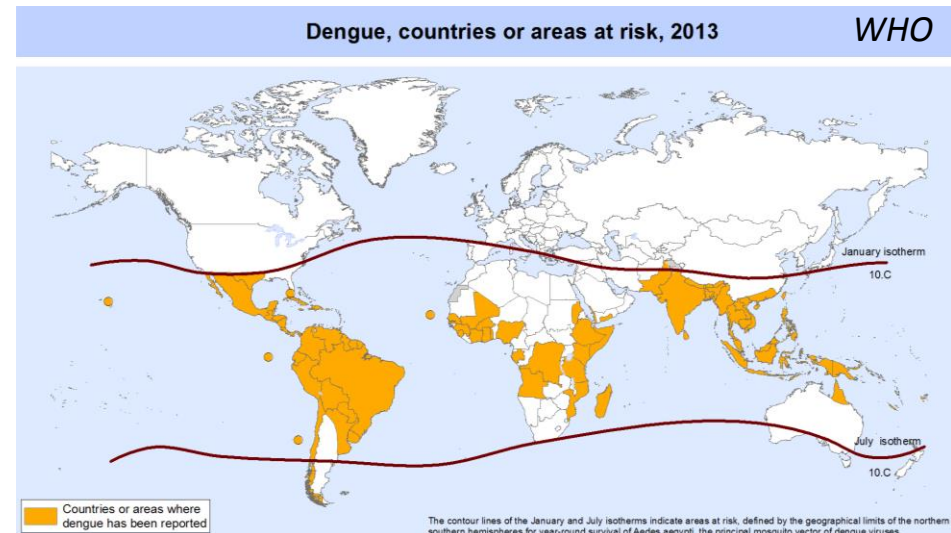
Dengue

Anthropozoonose

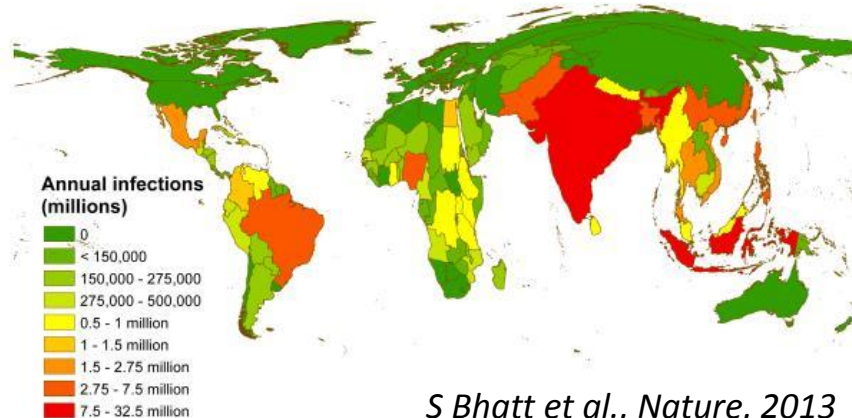
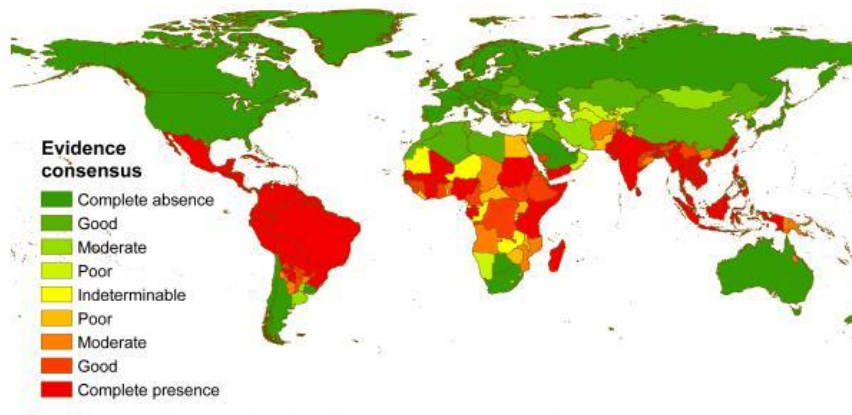


- Les **4 sérotypes** du virus de la dengue (DENV) appartiennent au genre **Flavivirus** de la famille des *Flaviviridae*
- Les DENV sont transmis par des moustiques du genre ***Aedes***

Les DENV sont endémiques dans plus de 100 pays tropicaux et **5.5%** de leur population sont infectés chaque année. Mais 3 infections sur 4 sont **asymptomatiques**.



Epidémiologie de la dengue



S Bhatt et al., Nature, 2013

- Le nombre de cas de dengue augmente avec l'urbanisation et la globalisation.
- L'OMS estime à environ **96 millions** le nombre annuel d'infections **symptomatiques**.
- **500,000** patients, principalement des enfants, sont **hospitalisés** chaque année.
- Le dengue sévère cause une mortalité chez les jeunes enfants d'Asie et d'Amérique Latine.
- Il y a plus de **20,000 décès** liés à la dengue, en particulier chez les enfants.

Caractéristiques cliniques de la dengue

La dengue s'accompagne d'un syndrome grippal chez les enfants et les adultes

Le diagnostic clinique repose sur au moins 2 critères suivants: céphalées, douleur rétro-orbitale, **douleur des muscles et des articulations**, nausée, vomissements, inflammation des ganglions, **rash**.

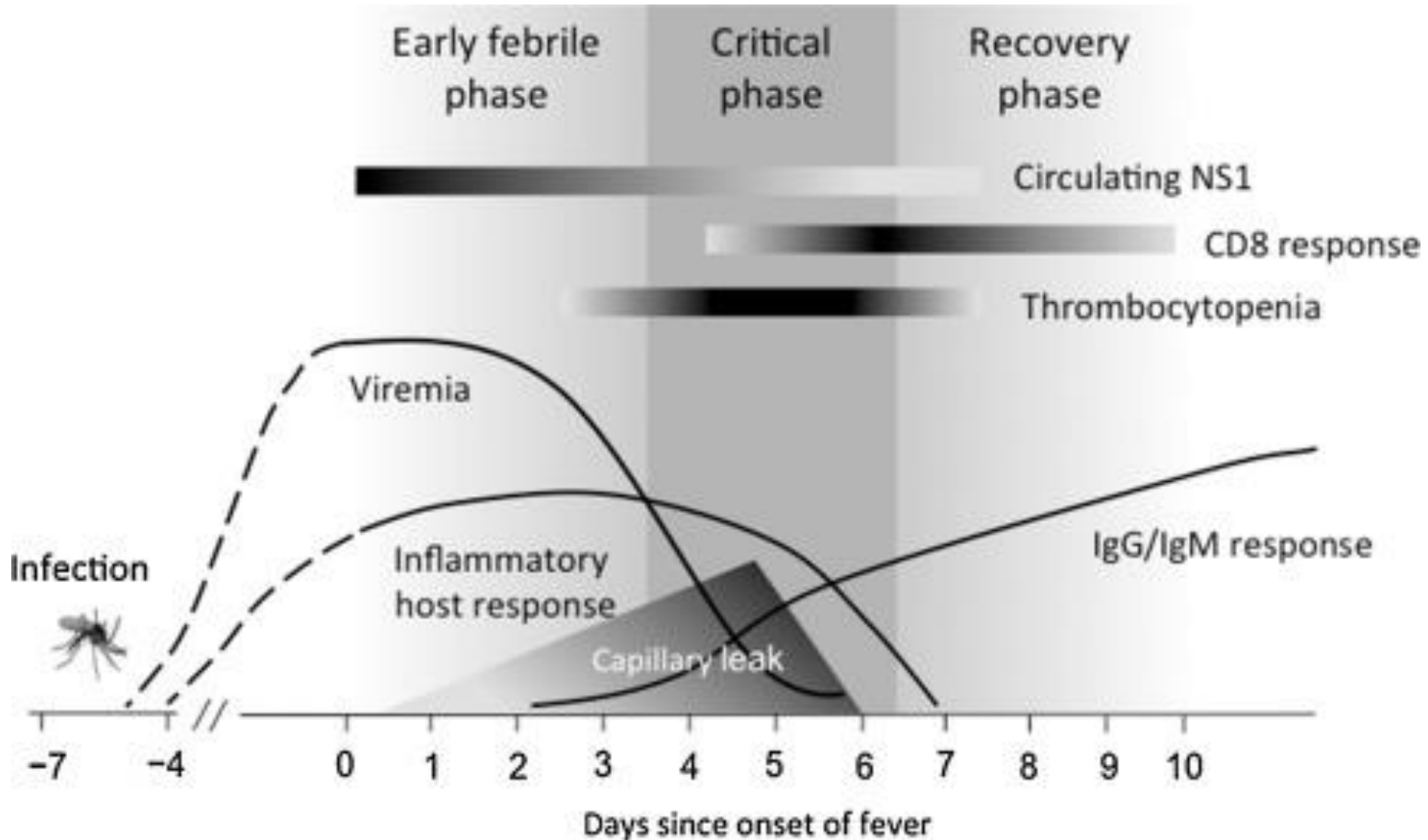
Les signes alarmants sont: douleurs abdominales, vomissements persistants, léthargie, agitation, épanchements séreux, saignements des muqueuses, élargissement du foie >2cm, **augmentation de l'hématocrite et diminution rapide des plaquettes**.

La dengue sévère est une complication parfois mortelle due à une **perméabilité vasculaire** conduisant à un choc hypovolémique, accumulation de liquide, détresse respiratoire, hémorragies sévères, dysfonctionnement organique (foie, reins, coeur...)



➤ **Sans traitement spécifique, une prise en charge du malade en soins intensifs peut éviter les complications et la mort (<1% des cas sévères)**

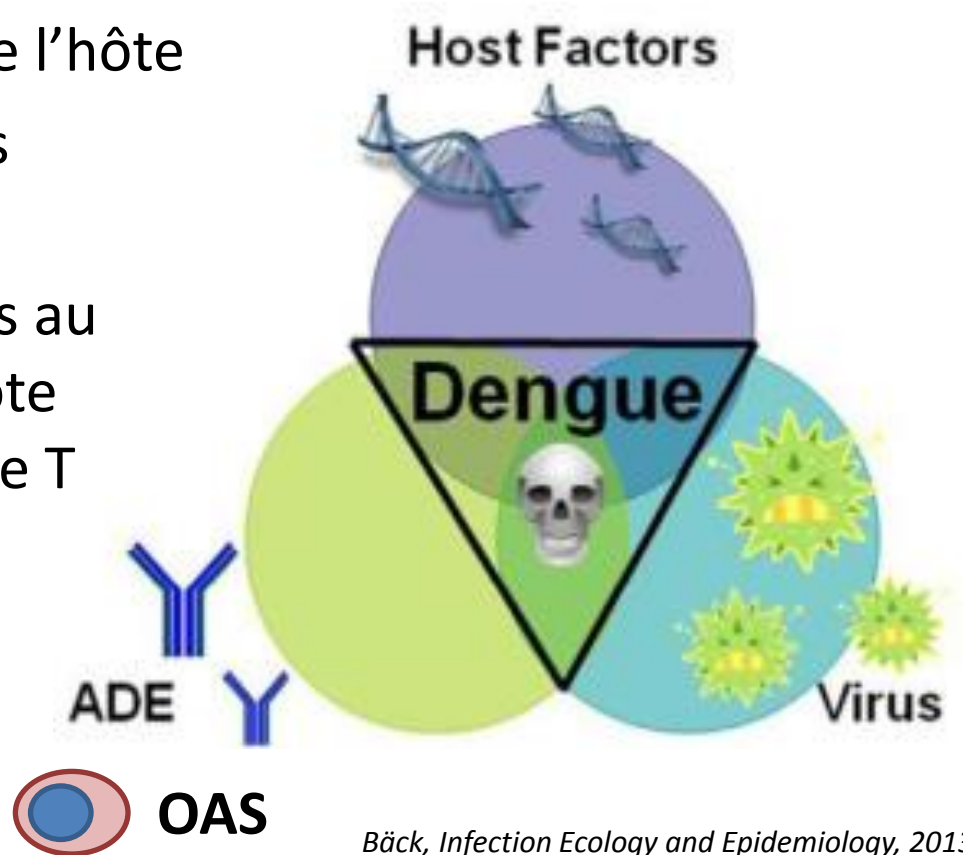
Evolution des signes cliniques et biologiques et des symptômes de la dengue



Facteurs de risque de la dengue sévère

Les causes n'en sont pas encore entièrement identifiées et les mécanismes pas tous caractérisés, mais elles sont multifactorielles!!!

- Facteurs intrinsèques dus à des caractéristiques **génétiques** de l'hôte
- Facteurs liés à la **virulence** des souches virales
- Facteurs extrinsèques associés au statut **immunologique** de l'hôte (anticorps et réponse cellulaire T préexistants acquis lors d'une précédente infection par un sérotype viral différent)

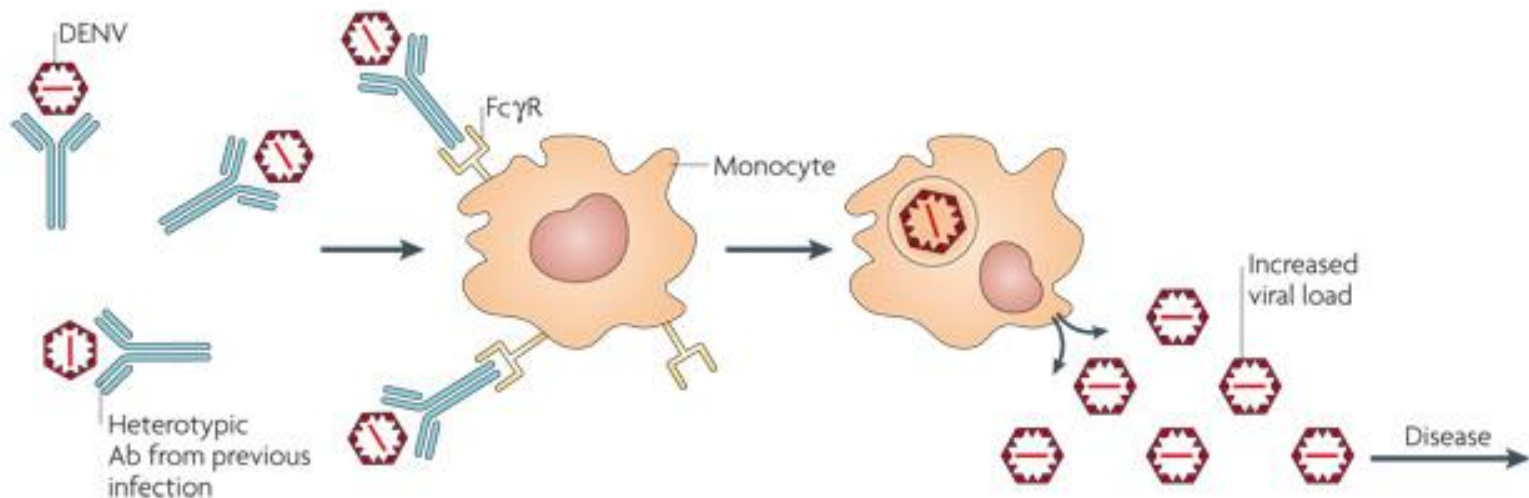


Facilitation dépendante d'anticorps

Antibody dependent enhancement (ADE)

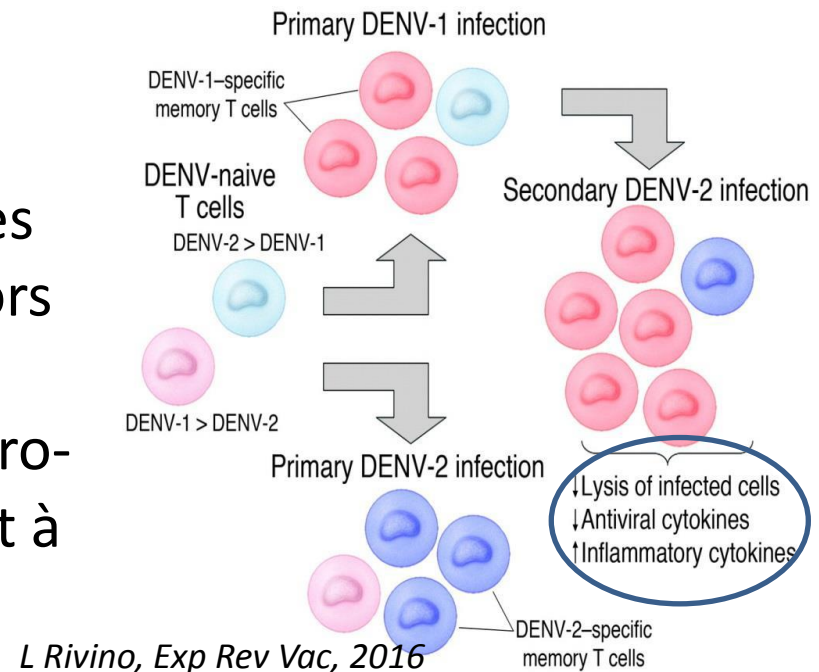
- La réponse immune à une infection primaire peut conduire à une augmentation du risque de **dengue sévère lors d'une infection secondaire.**
- Les nourrissons possédants des **anticorps maternels** contre la dengue sont plus à risque d'infection sévère s'ils ne sont pas homologues au virus infectant.

→ **Un vaccin contre la dengue doit induire des anticorps neutralisants spécifiques pour chacun des sérotypes**



Péché antigénique originel Original antigenic sin (OAS)

- Hypothèse: Au cours d'une **infection secondaire**, la réponse T est majoritairement composée de cellules mémoires non spécifiques induites lors de la primo-infection et de faible activité qui sécrètent des cytokines pro-inflammatoires (ex: $TNF\alpha$ contribuant à la perméabilité vasculaire).



- Mais des **sous-classes de cellules T mémoires** préexistantes sécrétant de l' $IFN\gamma$ peuvent contribuer à la prévention de dengue sévère lors d'une infection secondaire [*Mangada et al., 2002*].

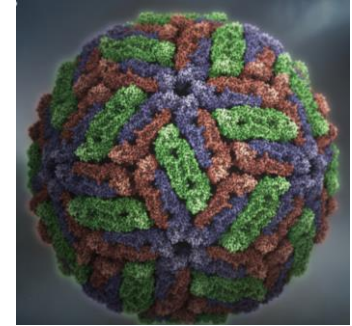
→ **Un vaccin contre la dengue doit induire des cellules T cytotoxiques spécifiques pour chacun des sérotypes**

Conclusion sur le rôle potentiel de la réponse immune dans la dengue sévère

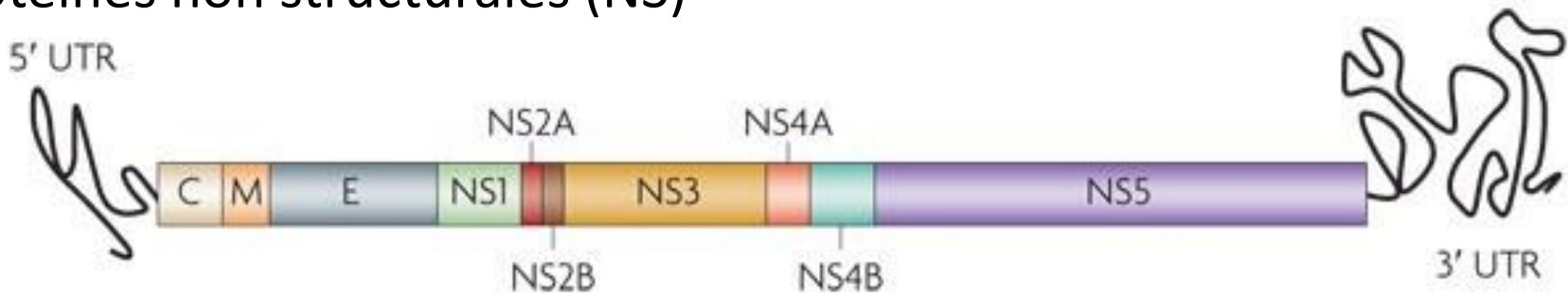
- La **dengue sévère** survient le plus souvent lors d'une **infection secondaire** (ADE ou autres phénomènes additionnels?): Rôle des **anticorps** induits lors d'une infection primaire (anti-E, anti prM, anti-NS1) dans la pathogenèse?
- Le pic de symptômes, la fuite vasculaire et le contrôle viral coïncident avec une tempête de cytokines, caractérisée par des niveaux circulants élevés de médiateurs pro-inflammatoires: Rôle des **cellules T mémoires** dans la pathogenèse?

Structure du virus de la dengue

- Virus enveloppé et **ARN** génomique monocaténaire de **sens positif**.
- La particule virale infectieuse de 50 nm de diamètre possède **90 dimères de protéine E**.
- Génome approx. **11 kb**



Phase unique de lecture codant pour 3 protéines structurales et 7 protéines non structurales (NS)



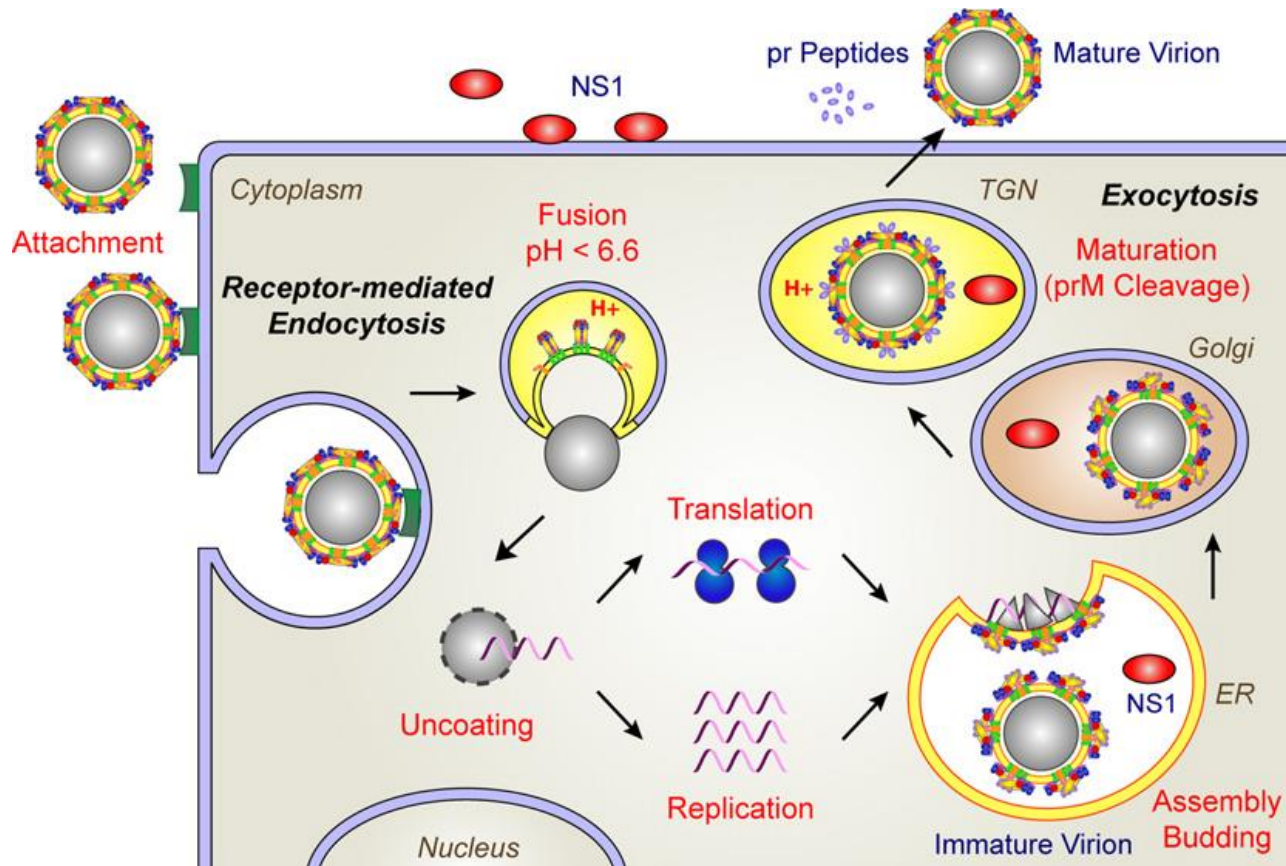
Protéines C, prM/M et E

Structure et infection

Proteins NS

Réplication, assemblage, modulation de la réponse cellulaire T cytotoxique

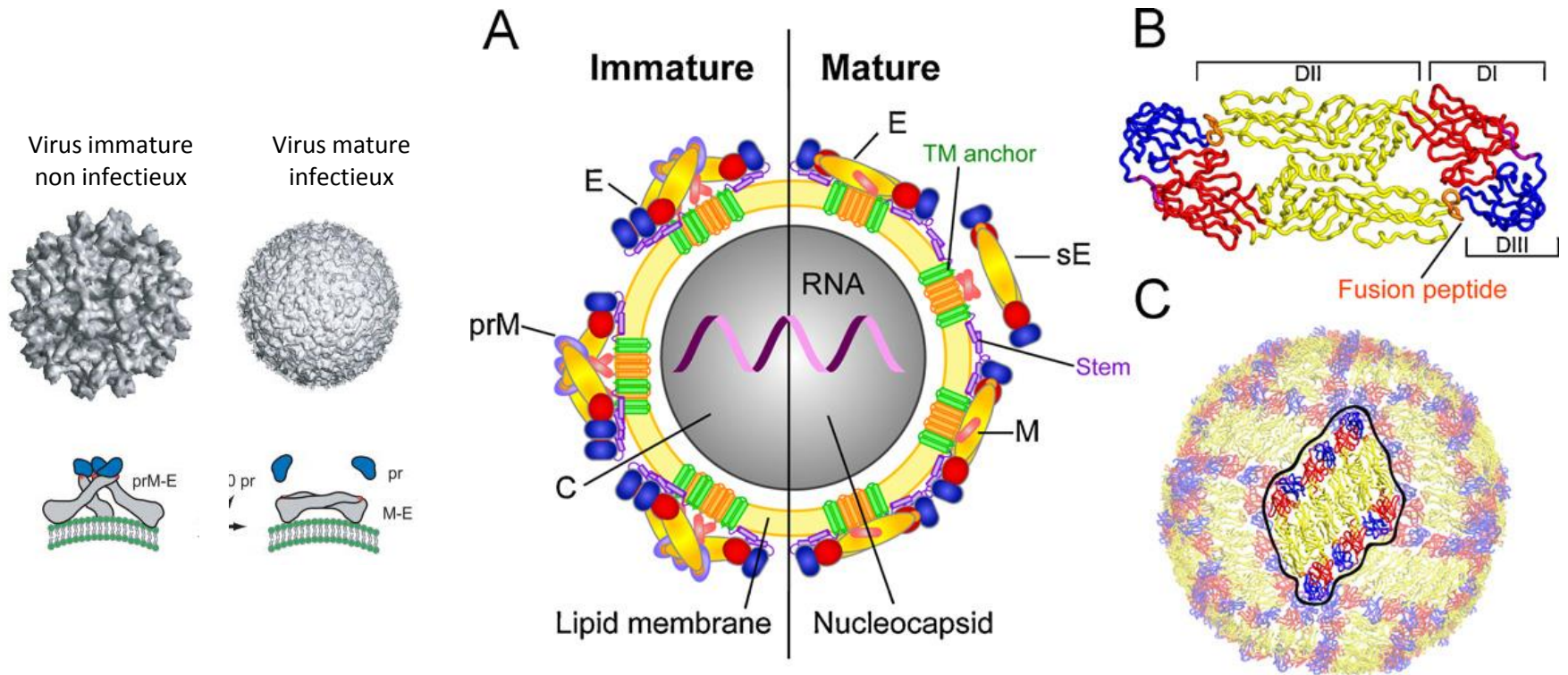
Cycle cellulaire du virus de la dengue



F. Heinz & K. Stiasny, Vaccine 2012

- prM-E: Le clivage conditionne la **maturation** de l'enveloppe virale.
- NS1: Structure complexe, co-facteur de la réplication virale, rôles complexes dans la **protection et la pathogénèse**.

Modèle schématique de la particule virale de la dengue

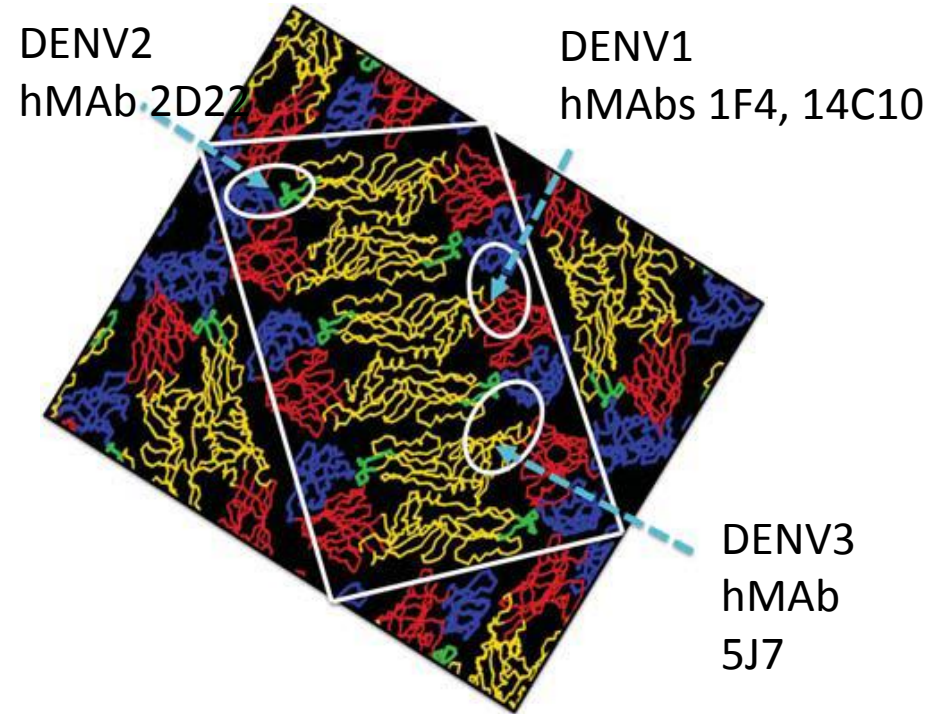


F.X. Heinz & K. Stiasny, Vaccine, 2012

- **DIII** est impliqué dans la reconnaissance du récepteur et dans la fusion avec les membranes cellulaires.
- Le coude **DI-DII** est important pour les mouvements de E lors de l'entrée du virus
- La boucle de fusion du **DII** est essentielle pour la fusion de l'enveloppe avec les membranes intracellulaires

Des anticorps humains neutralisants ciblent des épitopes complexes de la protéine E de la dengue

- Les anticorps monoclonaux humains (hMAbs) dirigés contre des épitopes de la protéine E de **virions matures** sont **moins facilitants et à fort pouvoir neutralisant**.
- Les épitopes de **structure quaternaires** de la protéine E sont reconnus par des hMAbs **neutralisants monospécifiques**.



→ **Les vaccins doivent contenir des particules virales (VVA, VLP) dont la structure « mature » induit en majorité ce type d'anticorps neutralisants**

Conclusions sur la nature des anticorps neutralisants

- De nombreux hMAbs qui neutralisent fortement le DENV se lient à des epitopes de **structures quaternaires** de E.
- Les hMAbs neutralisants reconnaissent principalement le **domaine complexe I-II** de E.
- Bien que les hMAbs spécifiques du domaine III de E soient fortement neutralisants, ils représentent une **minorité** du répertoire.
 - Le **domaine III de E n'est pas immunodominant**
- Un grand nombre d'anticorps neutralisants ciblant des structures quaternaires de E sont fréquemment détectés dans le sérum de sujets infectés par le DENV.
 - **La conception du vaccin contre la dengue devrait préserver ces structures complexes de E pour induire une réponse d'anticorps efficace dans la protection contre l'infection.**

Test de neutralisation: quel corrélat de protection *in vivo*?

Les tests de neutralisation ne traduisent pas la fonction biologique de la réponse humorale.

- La neutralisation est la résultante de l'effet net d'un **mélange d'anticorps** ciblant différents antigènes et des épitopes avec différentes capacités de neutralisation ou de facilitation.
- Des quantités variables de **prM** à la surface des virus expérimentaux peuvent affecter les performances du test détectant la neutralisation ou la facilitation.

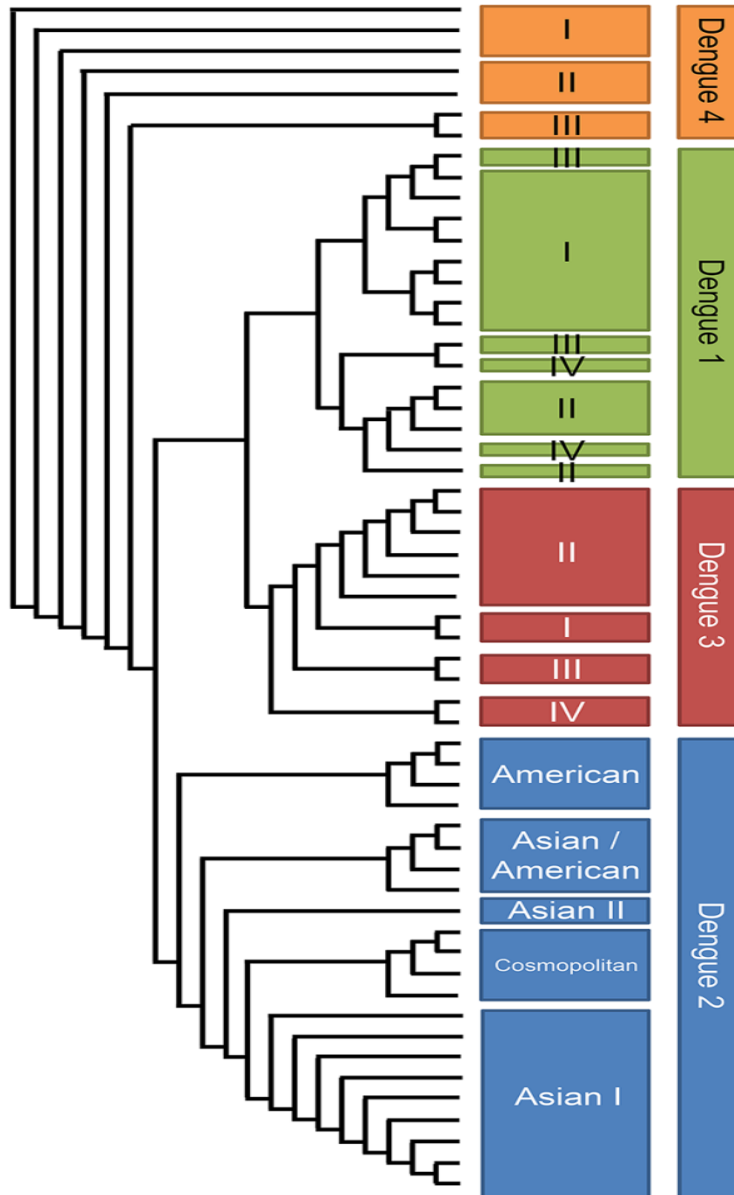
→ **Standardiser** les préparations de **virus** (récents) pour déterminer les niveaux de protéines prM et E à la surface des virions.

→ **Standardiser** la lignée **cellulaire** caractérisée avec des récepteurs pertinents tels que Fc γ .

→ Définir un **seuil** de consensus pour déterminer l'activité de neutralisation (PRNT₉₀ vs PRNT₅₀).

Variabilité génétique / sérologique des DENV

(séquence aa de la protéine E)



Jusqu'à 40% de divergence dans la séquence aa de la protéine d'enveloppe E entre les 4 sérotypes (<45 avec le ZIKV!).

Jusqu'à 9% de divergence dans la séquence aa à l'intérieur d'un même sérotype.

Hétérogénéité antigénique des sérotypes de DENV

De nombreux isolats de DENV se rapprochent antigéniquement autant d'un virus d'un type différent qu'à certains virus du même type.

LC Katzelnick et al., Sciences 2015

Les **propriétés antigéniques** des DENV jouent un rôle essentiel dans la biologie des infections : les différences dans **l'ampleur des épidémies** peuvent être déterminées non seulement par le **sérotipe** mais aussi par les différences antigéniques entre les virus infectants au cours des **épidémies séquentielles**.

→ **Rechercher les déterminants antigéniques associés à la sévérité de la maladie et à l'ampleur épidémique pour élaborer des vaccins plus appropriés.**

Propriétés de la protéine NS1 du DENV

L'injection de protéine soluble NS1 du DENV induit une **protection** contre l'infection chez la souris mais son rôle dans la **pathogénèse** est démontré *in vitro*:

- La forme hexamérique de NS1 est associée à des lipides: similitudes avec des **lipoprotéines (HDL)** impliquées dans l'homéostasie et le dysfonctionnement de **l'endothélium vasculaire**.
- NS1 induit des **anticorps délétères** (produits anaphylactiques dérivés de l'activation du complément, autoimmunité).
- NS1 interagit avec des caspases et **bloque l'apoptose** des cellules infectées.
- La protéine NS1 de DENV interagit avec le **récepteur TLR4** impliqué dans la **perméabilité vasculaire**.

→ **Rôle de NS1 dans la protection vs pathogénèse?**

LES VACCINS CONTRE LA DENGUE

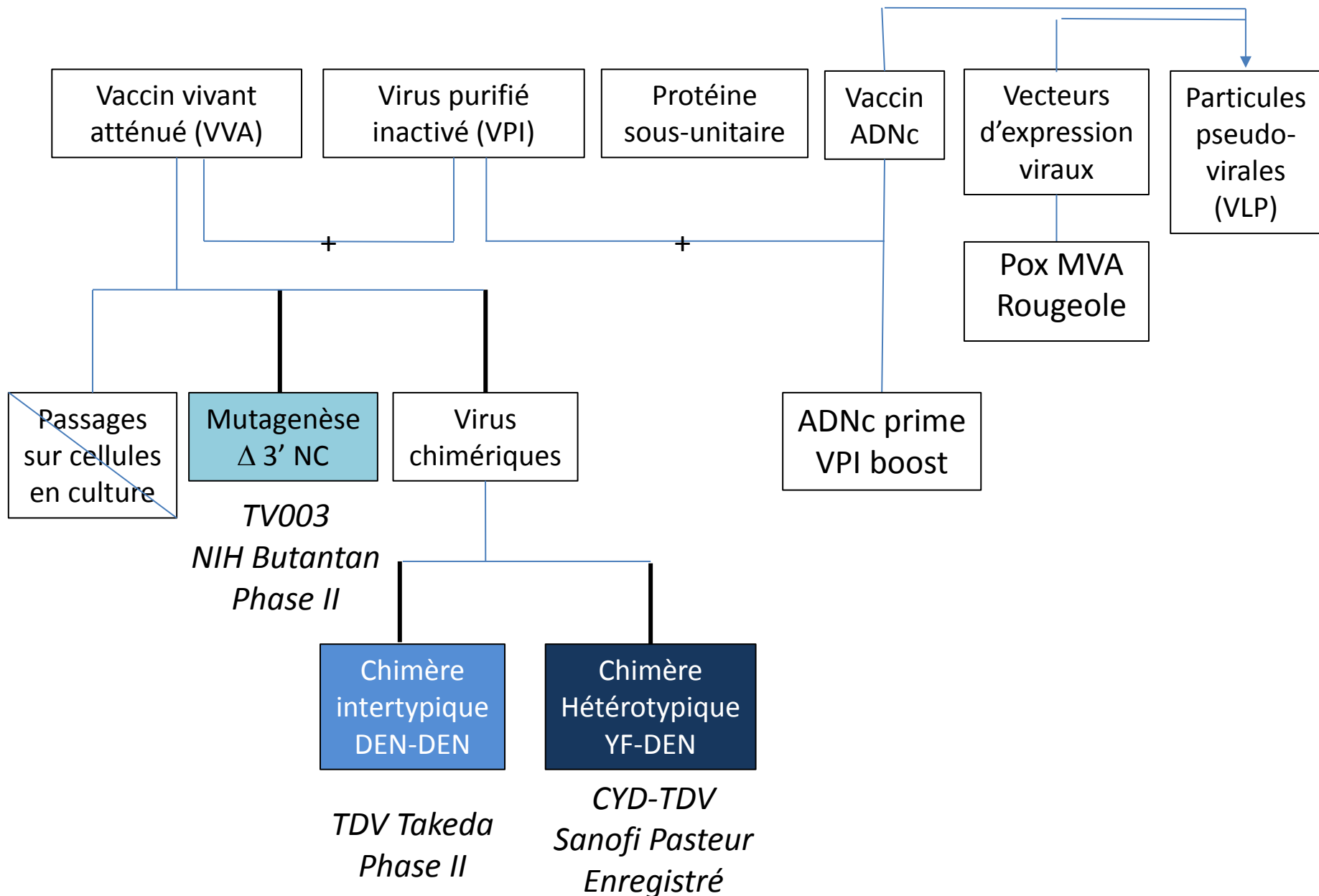
Défis pour le développement d'un vaccin contre la dengue

- **Virus hétérogènes** (4 sérotypes et plusieurs génotypes) sans protection croisée entre eux (sérotypes; génotypes?).
- Risque de **sensibilisation** (facilitation ADE) → Induction de nAbs visant les structures quaternaires des protéines E des 4 sérotypes de DENV.
- Identifier *in vitro* le **corrélât de protection** (titre, nature des nAb).
- Méconnaissance des mécanismes de **virulence** de certains virus et de **facteurs humains** de prédisposition à une infection sévère.
- Absence de **modèle animal** pour évaluer la protection (Stérilisation de la virémie et de la réponse anamnesticque c/o humain ou singe?).
- **Rôle de NS1** dans la réponse innée/acquise chez l'individu (pathogénèse ou protection) non identifié?
- La **réponse cellulaire T** peu étudiée mais semble être un élément essentiel pour un vaccin sûr, efficace et durable?

Innocuité et efficacité d'un vaccin contre la dengue

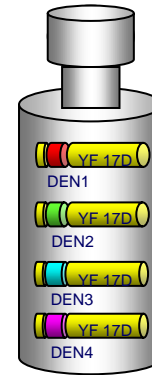
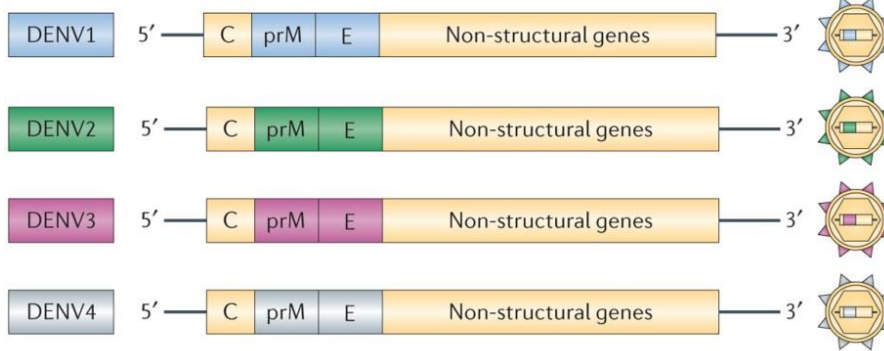
- Bonne **innocuité** (minimum d'effets indésirables ou sévères).
- **Large éventails** des âges (de 9 mois aux adultes).
- Nombre de doses minimum et induction d'une immunité rapide et **durable contre les 4 sérotypes**.
- Absence d'interférence avec une **immunité préexistante** contre d'autres flavivirus.
- Absence de risque de **facilitation** vis-à-vis d'une infection postérieure par un DENV (ou ZIKAV) virulent.
- Vaccination **jointe** à d'autres vaccins de l'enfance (ex: rougeole) ou co-circulant en zone d'endémie (Zika?) .
- Vaccin vivant **non transmissible** aux moustiques.

Candidats vaccins contre la dengue



Vaccins tétravalents à base de DENV chimeriques

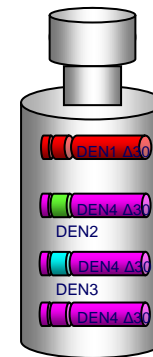
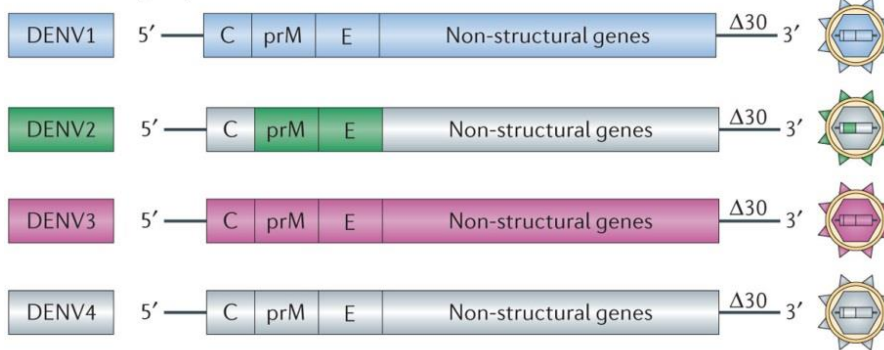
a CYD-TDV (Sanofi Pasteur)



Sanofi Pasteur (Acambis)

Trois doses
0, 6, 12 mois
Enregistré-Diffusé

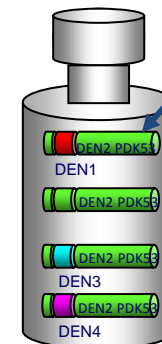
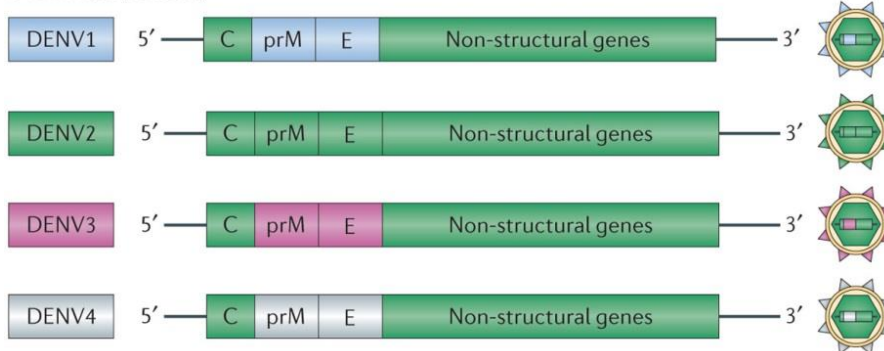
b LATV Δ30 (NIH)



NIH

Une dose
Phase III

c DENVax (Takeda)



Inviragen (Takeda Pharmaceuticals CDC)

Attenuated (Mahidol)

Deux doses
Phase III

Efficacité de la protection du vaccin CYD-TDV de Sanofi-Pasteur

PHASE TRIAL	IIb	III	III
LOCATION	Thailand	Southeast Asia	Latin America/the Caribbean
AGE OF THE CHILDREN	4 to 11 years	2 to 14 years	9 to 16 years
NUMBER OF CHILDREN INVOLVED	4002	10275	20869
PRNT AFTER 3 INJECTIONS (after 1 yuear)			
DENV1	76.5 [48.2-121.5]	NC	NC
DENV2	122.5 [78.8-190.4]	NC	NC
DENV3	94.8 [62.5-137.9]	NC	NC
DENV4	153 [110-212]	NC	NC
OVERALL EFFICACY	30,2 % [CI 95 % : 13,4-56,6]	56,5 % [IC 95 % : 43,8-66,4]	60.8% [CI 95%: 52-68]
EFFICACY AGAINST INFECTION			
DENV1	55.6%	50%	50.3%
DENV2	9.2%	35%	42.3%
DENV3	75.3%	75%	74%
DENV4	100%	75%	77.7%
EFFICACY AGAINST HOSPITALIZATION	NA	80.3%	
		58.1% in children <9 years 80.8% in children >9 years	

A Sabchareeon et al., Lancet, 2012
MR Capeding et al., Lancet, 2014
L Villar et al., NEJM, 2014

Leçons apprises lors des essais du vaccin Dengvaxia®

- Les génotypes viraux des vaccins sont anciens et ont subi plusieurs passages en cellules → **ils ne correspondent pas aux génotypes circulant** actuellement dans le monde.
- La présence d'**anticorps neutralisants** (spécifiques?) chez des individus vaccinés n'est **pas le corolaire de la protection** → génotypes, x passages, maturité particules virales vaccinates, standardisation...?
- **L'efficacité du vaccin est meilleure chez les individus primo-infectés** que chez les séronégatifs → vaccin à n'administrer que chez les enfants testés préalablement DENV séropositifs?
- Un nombre plus **élevé d'enfants séronégatifs vaccinés ont été hospitalisés** par rapports aux contrôles → sensibilisation, âge, différence temporaire, ADE?
- L'efficacité du vaccin est meilleure pour les **sérotypes 3 et 4**, dont la meilleure répllication avait été enregistrée chez les HNP (titre en nAb).
- Rôle de la réponse **T CD8** dans la protection?

Réponses cellulaires T cytotoxiques induites par les vaccins de la dengue chez les individus séronégatifs pour les flavivirus

- **CYD-TDV Sanofi Pasteur:** Induit une réponse spécifique **CD8** contre NS3 du **virus YF** mais pas contre NS3 du DENV, suggérant une réactivité croisée minimale entre NS3 des deux virus.
- **DENV CDC-Takeda:** Induit une réponse T **CD8+** multifonctionnelle dirigée contre les protéines NS1, NS3 et NS5 qui réagissent de manière **croisée** avec les protéines NS des autres sérotypes, en particulier NS3 [*H. Chu et al., J Infect Dis, 2015*].
- **DEN NIH:** Induit une réponse des lymphocytes T contre des épitopes conservés des protéines NS **similaire** à celle provoquée par une infection naturelle [*D Weiskopf et al., J Infect Dis, 2015*].

→ **Rôle de la réponse T CD8+ dans la protection contre la dengue à mieux caractériser.**

Conclusions et directions futures pour un vaccin efficace et sûr contre la dengue

- Le vaccin contre la dengue doit induire des réponses anticorps protecteurs contre des **épitopes quaternaires complexes de E**.
- Le rôle de la **réponse cellulaire CD8** dans la protection doit être validé.
- Les rôles de la **protéine NS1** et de ses anticorps dans la protection ou la pathogénèse de la dengue doivent être mieux cernés.
- Il est nécessaire d'identifier *in vitro* et *in vivo* des **corrélats solides de la protection** (nouveaux **tests de neutralisation** standardisés, vaccin **stérilisant** chez le singe ou chez l'homme?).
- Développer des **tests d'épreuve chez l'humain** (à défaut d'avoir un modèle animal adéquat) pour fournir des données aux systèmes d'analyse et pour vérifier l'efficacité d'un vaccin?

Remerciements

- Association des Anciens Elèves de l'Institut Pasteur
Drs Pierre Saliou et Jean-Luc Guesdon
- Réseau International des Institut Pasteur
- Crédit aux chercheurs des publications mentionnées (résultats et figures)