

CHAPITRE 7

Optimisation de la lutte contre la fièvre dengue dans les DFA

Méthodes et outils de détection du virus et de surveillance de son activité

Jean-Paul GONZALEZ, Pascal CHAUD

Abréviations

ARN = Acide ribonucléique

BD = Base de données

CHU = Centre hospitalier universitaire

CIRE = Cellule interrégionale d'épidémiologie

D1, D2, D3 et D4 = Sérotypes des virus de la fièvre dengue de 1 à 4

DASS = Direction de l'action sanitaire et sociale

DENV = Virus de la dengue virus (en anglais : *dengue virus*)

DFA = Départements français d'Amérique

DH = Dengue hémorragique

DSDS : Direction de la santé et du développement social

DSS = Dengue avec syndrome de choc

ELISA = Enzyme Linked immuno Assay

FD = Fièvre dengue (le mot « dengue » peut être employé seul)

FDH = Fièvre dengue hémorragique

IgA, G, M = Immunoglobulines A, G, M

IP = Institut Pasteur

IVS = Institut de veille sanitaire

Mac = Monoclonal antibodies (anticorps monoclonaux)

NP = nucléoprotéines

PCR = Polymerase chain reaction (en français : amplification génomique)

RT PCRSIG = reverse transcriptase PCR

SIG = Système d'information géographique

Préambule et notes pratiques

Dans le cadre de cette expertise collégiale sur l'optimisation de la lutte contre la fièvre dengue (FD), cet exposé traite de façon spécifique de la question de l'apport des techniques et des méthodes de diagnostic dans la lutte contre la dengue dans les départements français d'Amérique (DFA). On a voulu distinguer d'une part les systèmes de surveillance de la dengue qui s'adressent à tous les niveaux de manifestation de l'activité du virus, dans le cadre de la prévention de la maladie, et d'autre part les outils et techniques permettant d'identifier de façon pratique et rapide l'état de l'infection chez les patients et de caractériser le virus lui-même après isolement. Par souci de clarté, on fait précéder l'exposé de quelques notes pratiques.

L'origine du mot « dengue »

Si dès l'an 1635 des fièvres attribuables à une infection virale du type « dengue » étaient reconnues dans les Antilles françaises sous les termes de « coup de barre », l'origine du mot « dengue » reste incertaine, aujourd'hui encore. On trouve mention d'une fièvre hémorragique, en 1801, sous le terme de « denga », dans la correspondance de la reine d'Espagne avec les gouverneurs des îles espagnoles des Caraïbes. Plus tard, en 1823, les auteurs anglo-saxons reconnaissent au terme de « dengue » une origine swahili dans le phonème « ki dinga pepo » utilisé à Zanzibar, et sa traduction anglaise se retrouve en 1827 transformée sous le vocable de « Dandy fever » à Saint Thomas dans les îles Vierges. C'est enfin, lors de l'épidémie de 1828 à Cuba, que le terme de « dengue » s'impose et se substitue à celui de « denga », qui était jusqu'alors utilisé dans l'île et reprenait le mot en usage en Espagne et dans ses colonies dès le début du XIX^e siècle.

La dengue et les départements français d'Amérique

La dengue est, dans les DFA, comme dans toute la Caraïbe, devenue en quelques années une préoccupation constante et croissante de santé publique, souvent prioritaire parmi toutes les maladies infectieuses connues de cette région. Des événements récents, liés principalement à la fréquence accrue du syndrome sévère de dengue hémorragique, à la survenue de cas mortels en 1994 et à une manifestation épidémique d'une ampleur jamais connue dans les DFA (1997), ont participé à une information élargie du public et à une mise en garde contre cette maladie, sa sévérité et son risque d'extension.

Remarques préliminaires

Faut-il faire de la dengue une maladie à déclaration ou à « signalement » obligatoire ?

Le signalement obligatoire viendrait renforcer le système de surveillance existant. Une première proposition dans ce sens consisterait à se donner les moyens d'identifier, dans chacun des DFA, et aussi entre eux grâce à une coordination interdépartementale, un (des) service(s) spécifique(s) d'enregistrement des cas de dengue. Il faudrait aussi favoriser activement la circulation de l'information en relation directe avec les systèmes de santé et de lutte. Cela nécessite en particulier des ressources humaines pour la saisie, le traitement et l'analyse des données et une informatisation de la chaîne allant de la saisie jusqu'à la restitution des données brutes et analysées.

Ce signalement obligatoire (SO) est à distinguer de la déclaration obligatoire (DO) qui s'appliquerait pour sa part aux cas importés dans les DFA et/ou aux cas exportés vers la métropole à partir des zones épidémiques. Cette question fera l'objet d'une proposition dans les recommandations.

Les DFA constituent-ils une unité épidémiologique ?

Les trois DFA sont par essence différents dans leur peuplement, les environnements naturels et anthropiques qui y prévalent et leur fonctionnement social. Il sera toujours tenu compte de ces différences, afin d'ajuster l'analyse si nécessaire. Toutefois, en pratique, les outils de l'analyse et les stratégies qui doivent conduire à la surveillance se doivent d'être uniformes afin de constituer une base comparative logique, nécessaire pour ajuster, si besoin est, les stratégies de lutte. On doit donc considérer deux niveaux d'analyse, qui ne sont pas contradictoires : celui qui prend en compte la situation régionale et celui plus spécifique des situations locales.

Tableau 1 : Les virus du genre *Flavivirus*, famille des *Flaviridae*

Groupe espèce (1)	Type, sous-type, sérotype (2)	Principal vecteur (3)	Hôte vertébré	Distribution
DENGUE				
Virus de la fièvre Dengue	Dengue type 1* (4)	<i>Aedes aegypti</i>	Homme, primates	trop. & sub-trop.
Virus de la fièvre Dengue	Dengue type 2*	<i>Ae. aegypti</i>	Homme, primates	trop. sub-trop.
Virus de la fièvre Dengue	Dengue type 3*	<i>Ae. aegypti</i>	Homme, primates	trop. sub-trop.
Virus de la fièvre Dengue	Dengue type 4*	<i>Ae. aegypti</i>	Homme, primates	trop. sub-trop.
SPONDWENI				
Virus Zika	Zika	<i>Aedes sp.</i>	Singes ?	Afr. ECW ; As. SE
Virus Spondweni	Spondweni	<i>Aedes sp. & various</i>	–	Afr. SW
FIÈVRE JAUNE				
Virus de la fièvre jaune	Yellow fever*	<i>A. aeg., Hemagogus sp.</i>	Homme, primates,	Afr. WCE ; Am. S.
Virus Banzi	Banzi	<i>Cx. rubinotus</i>	marsupiaux	Afr. SE
Virus Edge Hill	Edge Hill	<i>Oc. Vigilax</i>	–	Austr.
Virus Jugra	Jugra	<i>Aedes species</i>	Marsupiaux	Malaysia
Virus Saboya	Saboya	– (5)	–	Afr. W
Virus Saboya	Potiskum	–	Gerbille, rongeurs	Afr. W
Virus Sepik	Sepik	<i>Ficalbia sp., various</i>	Rongeurs ?	Austr. (NGuinea)
Virus Uganda S	Uganda S	<i>Aedes sp.</i>	–	Afrique
Virus Wesselsbron	Wesselsbron*	<i>Aedes sp.</i>	Oiseaux, singes ?	Afrique
Virus Entebbe bat	Entebbe bat	–	Domestic animals	Afr. C
ENCEPHALITE JAPONAISE				
Virus de l'encéphalite japonaise	Japanese encephalitis*	<i>Cx. tritaeniorhynchus</i>	Oiseaux, porcs	As. ES
Virus Cacipacore	Cacipacore	–	Oiseaux	Brazil
Virus Koutango	Koutango# (4)	<i>Culex sp. ?, ticks</i>	Gerbille	Afr. WC
Virus de l'encéph. Murray Valley	Murray Valley encephalitis*	<i>Cx. annulirostris</i>	Oiseaux	Austr. E. Indon. ?
Virus de l'encéph. Murray Valley	Alfuy	<i>Cx. annulirostris</i>	Oiseaux	Australia
Virus de l'encéph. de St Louis	St Louis encephalitis*	<i>Cx. pipiens/Cx. tarsalis</i>	Oiseaux, cheiroptère	Am. NS
Virus Usutu	Usutu	<i>Culex sp.</i>	Oiseaux	Afr. ECSW
Virus du Nil de l'Ouest	West Nile*	<i>Cx. species, Argas hermani,</i>	Oiseaux	Afr., Eur. SE, ME,

Virus du Nil de l'Ouest Virus Yaoundé	Kunjin Yaoundé	<i>Hyalomma marginatum</i> , <i>Rhipicephalus mushamae</i> <i>Cx. annulirostris</i> <i>Culex sp.</i>	Oiseaux Oiseaux rongeurs ?	Ind. Austr./Malaysia Afr. C & W
KOKOBERA				
Virus Kokobera Virus Kokobera	Kokobera# Stratford	<i>Cx annulirostris</i> <i>Ochlerotatus vigilax</i>	Marsupiaux ? Marsupiaux ?	Australia Australia
AROAVIRUS				
Virus Aroa Virus Aroa Virus Aroa Virus Aroa	Aroa Bussuquara Iguape Naranjal	None known <i>Culex sp.</i> Not known <i>Culex species</i>	Hamster sentinelle Rongeurs Rongeurs ? hamster sentinelle	Venezuela Brazil Brazil Ecuador
VECTEUR INCONNU				
Virus Apoi Virus Modoc Virus Cowbone Ridge Virus Sal Vieja Virus San Perlita Virus Jutiapa Virus Montana Myotis Virus Carey Island Virus Phnom Pehn bat Virus Rio Bravo Virus Bukalasa bat Virus Dakar bat	Apoi Modoc Cowbone Ridge Sal Vieja San Perlita Jutiapa Montana Myotis Carey Island Phnom Pehn bat Rio Bravo# Bukalasa bat Dakar bat	– – – – – – – – – – – –	Rongeurs ? Rongeurs Rongeurs Rongeurs Rongeurs ? Rongeurs Rongeurs Chéiroptère Chéiroptère Chéiroptère Chéiroptère Chéiroptère	Japon Am. N États-Unis Guatemala États-Unis, Am. S. Asie As. S-E Am. N, Mexique Afr. W

(suite...)

Groupe espèce	Type, sous-type, sérotype	Principal vecteur	Hôte vertébré	Distribution
ENCÉPHALITES À TIQUES, ET (ANGL. TICK BORNE ENCEPHALITIS, TBE)				
Virus de l'ET d'Europe (Central European Encephalitis, CEE)	European TBE*	<i>Ixodes persulcatus</i> , <i>Ix. ricinus</i>	Rongeurs	Europe
CEE	Neudoerfl	<i>Ix. ricinus</i>	–	Europe
CEE	Hypr.	<i>Ix. ricinus</i> , <i>Dermacentor marginatus</i> , <i>Haemaphysalis inermis</i>	Rongeurs, oiseaux, chéiroptère	Europe
CEE	Kumlinge	<i>Ix. ricinus</i>	Rongeurs, oiseaux, homme	Europe
CEE	Hanzalova	–	–	Europe
Virus de l'ET de l'Est (Russian spring summer encephalitis, RSSE)	Russian spring summer encephalitis (Far Eastern TBE)*	<i>Ix. persulcatus</i> , <i>Ix. ricinus</i> , <i>Ix. ricinus</i> , <i>Ix. marginalis</i> , <i>Ix. ovatus</i>	Homme, rongeurs, oiseaux, chien ?	Asie, Europe
RSSE	Royal Farm	<i>Argas hermani</i>	Oiseaux	Afghanistan
RSSE	Absettarov	–	Homme	Europe
RSSE	Sofjin	–	Homme	Europe
Virus de l'ET de Sibérie	Siberian TBE*	<i>Ix. persulcatus</i>	Oiseaux	Europe
Virus Langat	Langat	<i>Ix. granulatus</i> , <i>Ix. ovatus</i> , <i>Hae. papuana</i>	Rongeurs	Asie
Virus Powassan	Powassan	<i>De. andersonu</i> , <i>Ix. cookei</i> , <i>Ix. marxi</i> , <i>Ix. spinipalpus</i> , <i>Ix. dammini</i>	Rongeurs	Am. N.
Virus de la tremblante du mouton	Louping III	<i>Ixodes ricinus</i>	Rongeurs, oiseaux, mouton. Artiodactyles. Lagomorphes	Europe
Louping III virus, LIV	Irish Louping III	<i>Ixodes ricinus</i>	Mouton	Europe
LIV	Spanish Louping III	Tique ?	Mouton	Europe
LIV	Turkish Louping III	<i>Ixodes ricinus</i>	Mouton	Europe
LIV	Negishi	–	Homme	Japan
Virus de la fièvre hémorragique d'Omsk	Omsk Hemorrhagic fever*	<i>De. marginatus</i> , <i>De. persulcatus</i> , <i>De. pictus</i>	Rongeurs	Asie (?) Europe
Virus de la maladie de la forêt de Kyasanur	Kyasanur Disease*	Forest <i>Ha. spinigera</i> , <i>Ha. wellingtoni</i> , <i>Ha. bispinosa</i> , <i>Ix. petauristae</i>	Primates, rongeurs, oiseaux, chéiroptère	Asie
Virus Sokuluk	Sokuluk	Tique	Homme, chéiroptère	Europe
Virus Gadgets Gully	Gadgets Gully	<i>Ix. uriae</i>	–	Australie

Virus Karshi	Karshi	<i>Ornithodoros papillipes</i> , <i>Hy. asiaticum</i>	Rongeurs	Asie
TYULENIY				
Virus Kadam	Kadam	<i>Rhipicephalus parvus</i> , <i>Hy. dromedarii</i>	Oiseaux	Afr. Russie, Am. N.
Virus Kama	Kama	<i>Ix. lividus</i>	Oiseaux, chéiroptère	Russie
Virus Meaban	Meaban	<i>Or. (A) maritimus</i>	Oiseaux	Europe
Virus Tyulenity	Tyulenity	<i>Ix. putus</i>	Oiseaux	Asie. Am. N.
Virus Saumaraez Reef	Saumaraez Reef	<i>Or. capensis</i> , <i>Ix. eudypitidis</i>	Oiseaux marins	Australie
NTAYA				
Virus Bagaza	Bagaza	<i>Culex sp.</i>	–	Afr. CW
Virus Ilheus	Ilheus	<i>Psorophora ferox</i>	Oiseaux, chéiroptère ?	Am. S C
Virus Ilheus	Rocio	<i>Psorophora ferox</i>	Oiseaux	Am. S
Virus Israel turkey	ITME	Moustiques, culicoides	Oiseaux (turkeys)	Israël, Afr. S
Virus Ntaya	Ntaya	<i>Culex sp.</i>	–	Afr. ECW
Virus Tembusu	Tembusu	<i>Culex gelidus</i>	–	Malay. Thaïl.

* = pathogène pour l'homme ; # = pathogénicité limitée pour l'homme ; – = inconnu.

1) Chaque groupe représente un ensemble monophylétique de taxa déterminé par l'analyse du génome et confirmé par des parentés antigéniques.

« L'espèce virale » est encore une entité mal définie en virologie et fondée essentiellement sur des critères antigéniques, génétiques et écologiques dont les limites quantitatives (limite entre deux espèces) sont définies pour une famille virale et différentes de celles des autres espèces.

2) Le type viral rassemble des souches de virus proches antigéniquement et génétiquement (monophylétiques) et appartenant à un même taxon (espèce).

* : virus hautement pathogène pour l'homme.

+ : virus peu pathogènes pour l'homme.

3) Le vecteur principal est donné, sachant que d'autres vecteurs potentiels peuvent intervenir efficacement dans la transmission des virus (*i.e.*: *Aedes albopictus*, vecteur des virus de la dengue au Sud-Est asiatique).

– : vecteur principal inconnu.

4) Hôte vecteur inconnu.

Afr = Afrique. W = ouest. E = est. N = nord. S = sud. C = central.

Am = Amérique. As = Asie. ME = Moyen-Orient. Eur = Europe. Malay = Malaisie. Trop = tropical. Aust = Australie. Indo = Indonésie. Ind = India.

NGuin = Nouvelle-Guinée.

Hem = hémorragiqu

Introduction

Les virus responsables de la dengue appartiennent au groupe des arbovirus, une entité de classement qui réunit des virus transmis par des arthropodes aux vertébrés (de l'anglais *Arthropod Borne Virus*, soit « virus portés par des arthropodes »). Ces arbovirus sont transmis à l'homme, ou aux vertébrés domestiques et sauvages, principalement par des insectes piqueurs hématophages (moustiques, phlébotomes) ou des tiques.

Le virus de la dengue appartient du point de vue taxonomique au genre *Flavivirus* de la famille des *Flaviviridae*. Ce groupe héberge d'importants virus pathogènes pour l'homme comme le virus de la fièvre jaune, le virus West Nile ou celui de l'encéphalite japonaise (voir ci-avant tableau 1).

En plus du genre *Flavivirus*, qui abrite environ 70 types de virus dont plus d'un tiers sont pathogènes pour l'homme, les *Flaviviridae* comptent aussi deux autres genres : le genre *Pestivirus* avec des virus d'importance vétérinaire, comme le virus de la peste porcine, et le genre *Hepacivirus* avec le virus de l'hépatite virale C. Le genre *Flavivirus* comprend plusieurs groupes phylogénétiques qui se distribuent dans quatre grands *phyla* :

- Les flavivirus transmis par les moustiques du genre *Aedes*, avec les groupes « fièvre jaune » et « dengue ».
- Les flavivirus transmis par les moustiques du genre *Culex*, avec le groupe « encéphalite japonaise ».
- Les flavivirus transmis par les tiques, avec les groupes des « encéphalites à tiques » et des virus d'oiseaux (groupe Tyuleny).
- Les « virus sans vecteurs connus » (anglais NKV, *Non Known Vectors*). La plupart de ces flavivirus ont été isolés sur des micromammifères comme les rongeurs ou les chauves-souris (*Cheiroptera s.l.*).

Le virus de la dengue

Structure et fonction (figure 1)

Comme les autres flavivirus, le virus de la dengue est un virus fragile qui résiste pendant un temps limité hors de son hôte, des conditions physico-chimiques étant requises pour sa survie, comme l'équilibre ionique ou la température. Le virus ne peut survivre et se multiplier qu'avec l'aide des cellules permissives (cibles) de son hôte vertébré (primate) ou arthropode (moustique). Pour sa survie dans la nature, le virus de la dengue doit, comme les autres virus, passer par un cycle de multiplication qui nécessite une cellule hôte et entraîne une cascade d'événements depuis son entrée dans la cellule jusqu'à la libération de particules virales nouvelles. L'ensemble des protéines structurales et non structurales (de type enzymatique) et propres au virion (cf. *infra*) servira à ce phénomène qui constitue le cycle de réplication du virus dans la cellule hôte.

Les flavivirus sont des virus sphériques de type enveloppé. Ils sont constitués d'un noyau, la nucléoprotéine (NP) et d'une membrane lipo-protéinique. La NP contient l'acide nucléique porteur du génome viral intimement lié à une protéine de capsid. Elle renferme le matériel génomique nécessaire à la survie (la réplication) du virus dans les cellules hôtes ; elle possède aussi des sites antigéniques à l'origine de la production chez l'hôte d'anticorps non neutralisants, anticorps les plus efficaces pour inactiver ou détruire le virion (cf. plus bas tableau 2). L'enveloppe lipo-protéinique comprend une couche lipidique bi-moléculaire de polarité hydrophobe tournée vers l'intérieur, ainsi que des protéines (M, E) qui traversent cette membrane et sont appelées pour cette raison protéines membranaires (cf. ci-après figure 1).

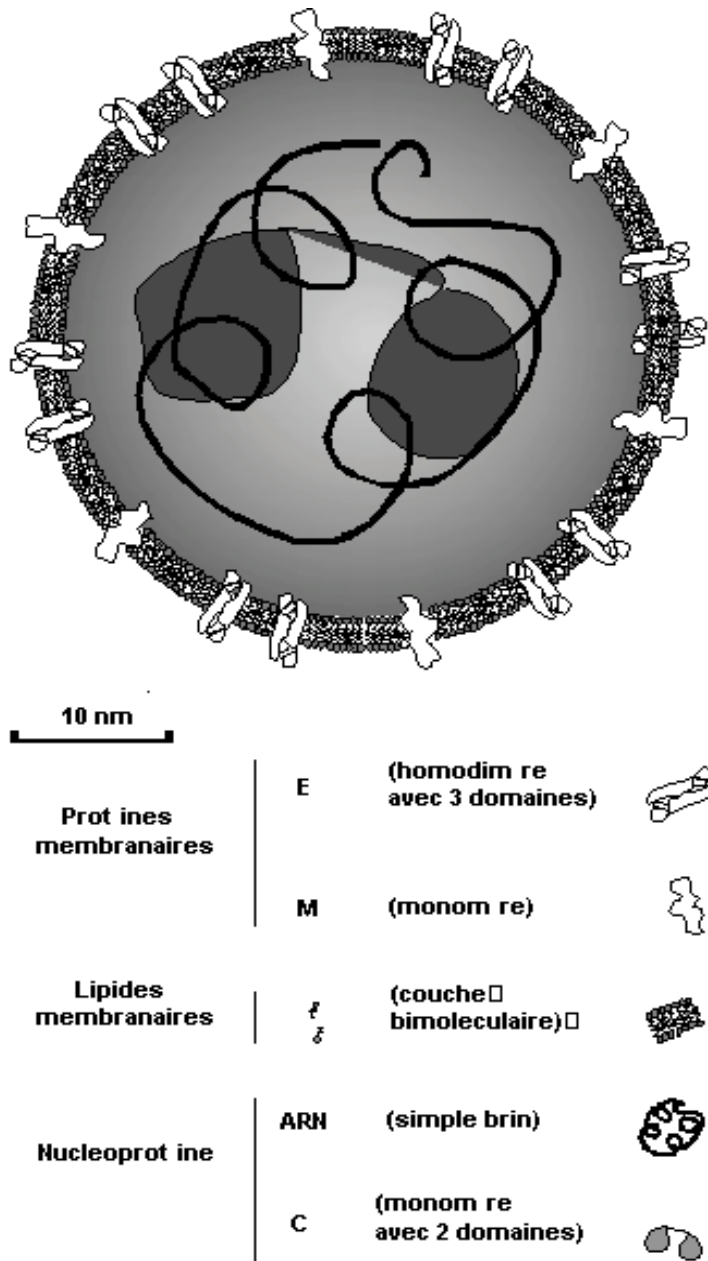


Figure 1 : Représentation schématique du virus de la dengue avec ses principaux composants structuraux.

Tableau 2 : Les protéines du virus de la dengue et leurs fonctions

Protéine	Polyprotéine	Fonction	Immunogénicité
Capside	Ci	Précurseur de Cv	Immunogénique mais pas d'Ac neutralisant
	Cv	Assemblage de la nucléocapside	
Membrane	Pr M	Dans le virion immature précurseur de M Associé à la protéine E	Ac protecteurs neutralisants
	M	Participe à la fusion du virion avec la cellule	
Enveloppe	E	Protéine majeure de surface du virion Infectivité (neurovirulence) Récepteur Hémagglutinine Fusion Assemblage du virion (+ M)	Anticorps neutralisants majeurs
Protéines non structurales de type 1	NS1	Glycoprotéines En surface de la cellule hôte ou dans le compartiment extracellulaire Maturation du virion (?) Réplication (?)	Production d'anticorps fixant le complément
Protéines non structurales de type 2 et 4	NS2A	Petite taille	?
	NS2 B	Protéase qui intervient dans le clivage de NS1 et de NS2 B-NS3 Activité conformationnelle protéasique du complexe NS2 B-NS3	
	NS4 A	? interaction dans le complexe NS3-NS5	
	NS4 B	?	
Protéines non structurales de type 3	NS3 + NS2 B NS3	Protéase Hélicase <i>Capping</i> et méthylation de l'ARN viral (?) Régulation de la réplication de l'ARN ?	
Protéines non structurales de type 5	NS5	ARN Polymérase ARN dépendante Méthyltransférase (ARN <i>capping</i>) (?) avec NS3	Anticorps anti ARN- Poly-ARN dépendante

Le virus ainsi constitué présente sur sa surface des sites de reconnaissance relatifs aux protéines membranaires qui lui permettent des interactions avec les cellules hôtes ; la présentation de ses sites antigéniques entraînera en particulier la production d'anticorps par les cellules compétentes de l'hôte.

Le virus. Du point de vue conceptuel, ce terme désigne le virus dans son ensemble en y incluant ses caractéristiques taxonomiques et écologiques. On peut ici distinguer quatre sérotypes qui sont désignés par dengue 1 (DEN-1), dengue 2 (DEN-2), dengue 3 (DEN-3) et dengue 4 (DEN-4), lesquels constituent des types ou sous-espèces du virus de la dengue. Ces sérotypes sont antigéniquement proches mais distincts, et ils se définissent en particulier par l'induction chez l'hôte d'anticorps neutralisants dirigés contre des épitopes spécifiques de chaque sérotype. Ces sérotypes sont aussi génétiquement clairement identifiables.

Le virion. On considère sous ce terme la particule virale physique avec ses différents composants : protéines structurales (protéines d'enveloppe et nucléoprotéines) et protéines non structurales (protéines enzymatiques par exemple).

Les protéines structurales. Il existe quatre protéines majeures de ce type, la protéine de capsid (codée par le gène C), la protéine pré-membranaire (gène PrM) qui est aussi le précurseur de la protéine de membrane (M) et de la protéine d'enveloppe (E).

Les protéines non structurales (NS). Ces protéines sont codées par différents gènes (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B et NS5) qui donnent des polypeptides actifs directement ou après clivage en sous-unités protéiques, chacune de ces unités ayant une fonction différente, de type enzymatique en général. Les fonctions de ces protéines et leur rôle dans les mécanismes d'infection ne sont encore que partiellement connus (cf. ci-après figure 2).

Voici une représentation schématique du génome du virus de la dengue, des régions de codage des protéines virales et de leur fonctionnalité. La structure du génome présente l'enchaînement suivant :

Cap5'-C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3

Le génome est représenté par une succession de cadres qui figurent les gènes indépendants. Les protéines dérivées de ces gènes sont figurées par des cadres séparés les uns des autres.

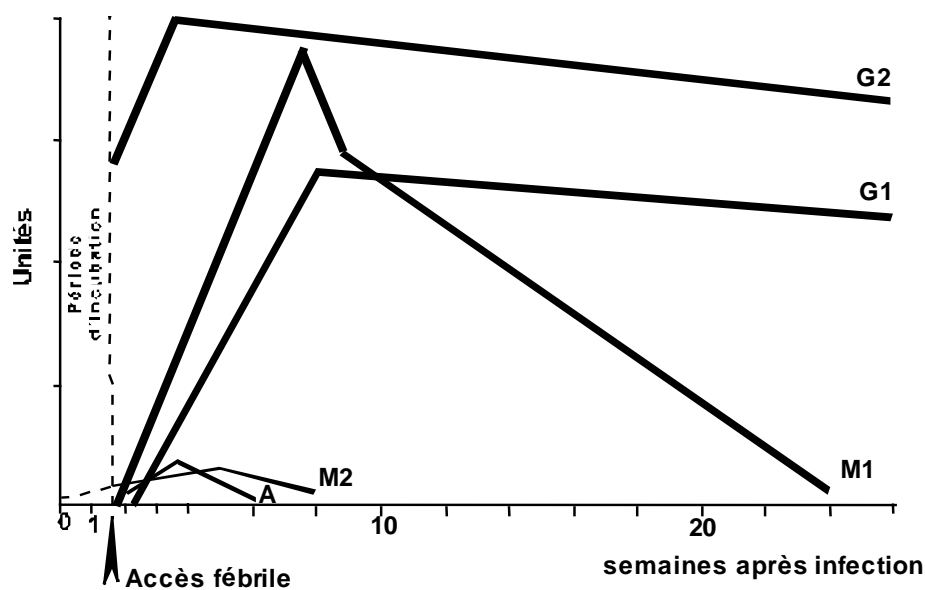


Figure 2 : Structure génomique fonctionnelle du virus de la dengue

Acides nucléiques. Les virus de la dengue possèdent un simple brin (une seule molécule d'ARN (acide ribonucléique, ARN)), positif et infectieux ; cet ARN est dit « infectieux » dans la mesure où le génome est de type ARN « messenger » (positif) et peut directement entraîner dans la cellule hôte la polymérisation des acides aminés codés par le génome et nécessaires à la réplication du virus. La taille de la molécule d'ARN dépasse 11×10^3 paires de bases, avec une variabilité de quelques dizaines de paires selon le sérotype. Le génome se divise en deux régions codantes contiguës, avec un sens de lecture initialisé à partir de son extrémité 5' ; pour un quart du génome, il code pour les protéines de structure. En continuité, vient la région qui occupe les trois quarts du génome et qui code pour les protéines NS. Cette région codante est flanquée à ses deux extrémités par deux séquences non codantes (NC), soit 5'NC et 3'NC, qui sont aussi variables dans leur taille, leur fonction (encore peu connue) et leur appartenance à un groupe taxonomique de flavivirus.

Il faut en pratique retenir de la structure et de la fonctionnalité du virus de la dengue une organisation génomique relativement simple, commune aux quatre sérotypes et aussi en grande partie avec d'autres flavivirus. Cette organisation favoriserait, entre souches de dengue différentes, des recombinaisons génomiques dont les conséquences infectieuses sont encore à l'étude, mais pourraient représenter un facteur d'évolution et/ou de risque d'apparition de souche d'un nouveau type (le putatif type « DEN5 »). Les différentes protéines virales donnent lieu à la production d'anticorps d'importance variée en termes de défense de l'hôte contre l'infection et pour ce qui est de leur utilisation pour le diagnostic (tableau 2).

Les éléments du diagnostic de laboratoire

Les mêmes outils de la virologie (isolement viral, technique d'amplification génomique, PCR – pour *Polymerase Chain Reaction*, ou réaction de polymérisation en chaîne –, réaction antigène-anticorps) sont utiles pour le diagnostic, le suivi des patients, les études épidémiologiques, le suivi du devenir de la maladie et de ses tableaux cliniques, ou la recherche fondamentale et l'évolution des virus. Le diagnostic, la surveillance et le contrôle de l'extension des épidémies de dengue, la connaissance précise tant de leur incidence que de leur sévérité clinique, dépendent avant tout de la qualité (sensibilité, spécificité) et de la rapidité du diagnostic, donc des méthodes et matériels qui le permettent, de leur accessibilité (coût et disponibilité), des systèmes d'information associés (transfert des résultats, constitution de banques de données) et, *in fine*, de la formation des personnels aux techniques retenues.

Les difficultés du diagnostic biologique

Le diagnostic biologique de la dengue est confronté d'abord à la co-circulation de virus antigéniquement proches des virus de la dengue qui, d'une part, peuvent aussi donner des tableaux cliniques proches et, d'autre part, nécessitent des outils de diagnostic spécifiques pour distinguer biologiquement les réactions immunitaires induites par le virus de la dengue et les réactions hétérologues. Le même diagnostic biologique doit être poussé de façon à distinguer les différents sérotypes de dengue entre eux (sérotypage) et, quelquefois, il sera aussi nécessaire de caractériser la souche d'un sérotype et de la distinguer ainsi par génotypage d'autres souches du même sérotype. Un autre facteur limitant du diagnostic biologique est celui de la rapidité de la réponse en cas de diagnostic positif : plusieurs cas peuvent se présenter en fonction de l'évolution de la maladie, de l'état immunitaire du sujet par rapport à des infections antérieures par d'autres flavivirus ou par d'autres sérotypes du virus de la dengue, et enfin de la qualité et de la préparation de l'échantillon biologique à tester. C'est l'ensemble de ces éléments très divers qui vont faciliter, ralentir ou quelquefois empêcher le diagnostic de certitude.

Il faut donc en priorité confirmer l'infection active par un virus de la dengue (séro-conversion, augmentation des anticorps de type IgM, isolement viral ou identification de l'ARN viral), puis générer une information suffisante nécessaire (génotype reconnu pour une pathogénicité exacerbée), le tout pour la prise en charge du patient et la surveillance (séquence temporelle d'apparition des sérotypes) de la circulation des virus.

Virémie et réponse immunitaire

Les cinétiques de la virémie et des réponses immunitaires pourront être utilisées dans le double intérêt, *primo*, de la prise en charge du malade pour un suivi efficace, *secundo*, d'une meilleure connaissance de la phase épidémique ou endémique pendant laquelle se manifeste l'activité du virus de la dengue ; elles sont indispensables à la compréhension de la dynamique de l'infection et des manifestations épidémiques.

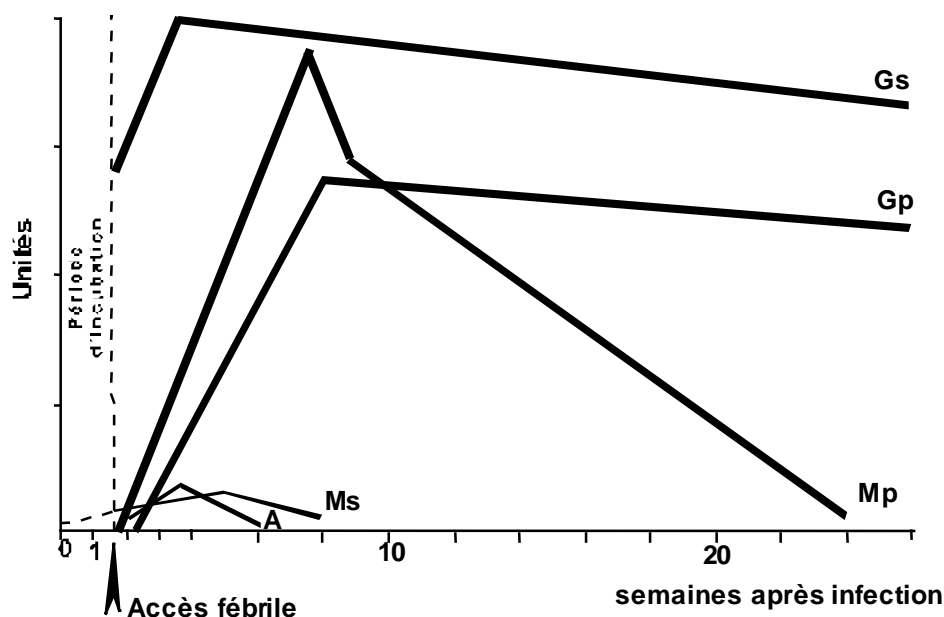


Figure 3 : Réponse immunitaire à l'infection par les virus de la dengue

La réponse immunitaire à une primo-infection (p) par un des virus de la dengue est figurée par la cinétique d'apparition des immunoglobulines de classe G soit (Gp) puis de classe M (Mp). De la même façon, la réponse immunitaire à une seconde infection est figurée respectivement par les courbes de montée en anticorps Gs et Ms. La cinétique d'apparition des anticorps est quant à elle figurée avec une échelle de temps en semaines sur l'axe des ordonnées et, sur l'axe des abscisses, une unité arbitraire permet d'apprécier la dynamique quantitative de l'apparition des anticorps (titres en anticorps) et ainsi d'obtenir un comparatif (ces valeurs sont basées sur les tests ELISA et de neutralisation).

Virémie (figure 3)

Le virus est injecté à l'homme sain lors du repas sanguin d'une femelle de moustique *Aedes aegypti*, porteuse du virus dans ses glandes salivaires. Le virus ne reste présent dans la circulation sanguine de l'hôte que pour une courte période (une à deux heures) à un titre faible et généralement non détectable. Le virus va ensuite entrer dans une phase intracellulaire de répllication active, phase d'éclipse de un à deux jours pendant laquelle il n'est plus détectable dans la circulation sanguine. Puis le virus va subir une phase de répllication intense, avec libération de virion dans les espaces extracellulaires et diffusion des particules virales infectantes dans l'organisme de l'hôte pendant six à quatorze jours (en moyenne cinq à sept jours) ; cette phase correspond à la période d'incubation et au passage à la phase virémique. La production de particules virales est exponentielle. À partir d'un certain titre viral dans la circulation sanguine, la fièvre va apparaître de façon abrupte et durer de cinq à sept jours ; la courbe des températures est bimodale, avec un pic fébrile à 24 heures puis un autre au troisième ou quatrième jour de fièvre. La fièvre peut dans certains cas durer de 10 à 12 jours de façon continue sans cet aspect bimodal. La virémie est donc aisément détectable dès l'apparition de la fièvre, et le restera pendant deux à trois jours, avec un pic virémique entre 24 et 48 heures après le début de la fièvre.

Réponse immunitaire (figures 3 et 4)

Lors d'une primo-infection par un des sérotypes de la dengue, les immunoglobulines de classe M (IgM) apparaissent avant les immunoglobulines de classe G (IgG), entre le deuxième et le troisième jour après l'accès fébrile. Le taux d'IgM augmente pendant deux et quatre semaines et dépasse largement le taux en IgG. Un pic est atteint vers le 20^e jour après le début de la maladie, le taux d'IgM diminue alors rapidement pendant 10 jours, puis plus lentement, pour enfin disparaître après trois à six mois.

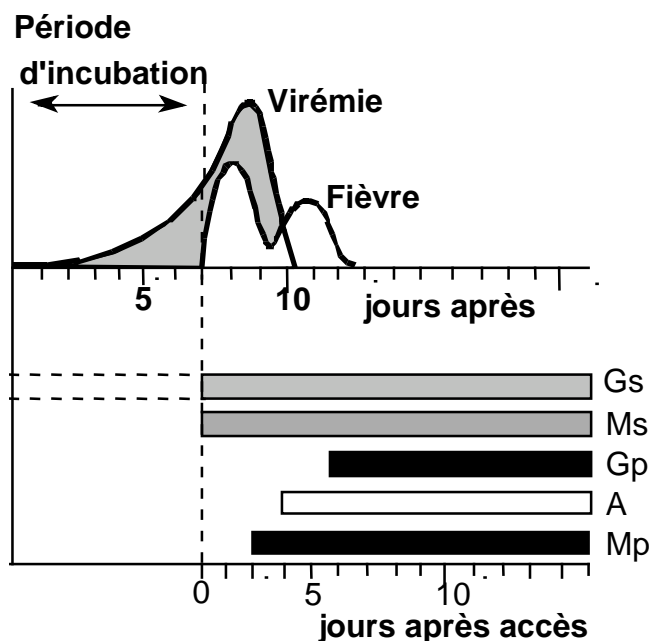


Figure 4 : Cinétique d'apparition des anticorps

La cinétique d'apparition des anticorps contre le virus de la dengue après infection par un sérotype et réinfection par un sérotype hétérologue, en phase précoce de la maladie, est représentée en fonction de l'apparition des premiers signes cliniques et de la virémie. L'apparition et la production des immunoglobulines de classe G et M sont représentées en fonction d'une primo-infection (p) ou d'infections secondaires.

La virémie et la courbe de température sont quant à elles indiquées sur la même échelle de temps.

Si le virus peut théoriquement être détecté dès l'accès fébrile, en pratique, l'isolement viral par les méthodes actuelles ne permet de mettre en évidence le virus que pendant 24 à 48 h autour du pic de la virémie dans les premiers jours de la phase clinique ; ce dernier survient à un moment variable avec les individus et les souches virales.

Les IgG apparaissent tardivement au moment de la défervescence ou en début de convalescence, vers le cinquième jour (à deux jours près) après le début de la maladie. Les IgG vont augmenter pendant deux à trois semaines mais à un taux inférieur à celui des IgM, puis elles vont très lentement diminuer et pourront être détectables pendant plusieurs dizaines d'années.

Enfin, une réponse en anticorps de type A (IgA) peut être mise en évidence à un taux de quatre à six fois moins élevé que celui des IgM. Les IgA apparaissent 24 heures après les IgM et montrent un pic au huitième jour d'évolution. La cinétique des IgA suit ensuite celle des IgM et les IgA deviennent indétectables après 40 jours.

Lors d'une infection secondaire par un autre sérotype du virus de la dengue, les IgM apparaissent tardivement durant les derniers jours de la fièvre, généralement après la montée en IgG. Le pic d'IgM se situe alors vers la troisième semaine d'évolution de la maladie, et reste de huit à dix fois moins élevé que dans le cas de la primo-infection. Inversement, les IgG sont détectables dès le début de la maladie, et elles augmentent fortement pendant deux semaines, pour ne décroître que très lentement.

Au total, dans tous les cas, les IgG et les IgM sont détectables dès les deuxième ou troisième jours qui suivent la montée de fièvre. La présence d'IgM témoigne respectivement d'une infection récente de moins de six mois et celle d'IgA d'une infection de moins de quarante jours. Une montée significative du taux d'IgG, dans les trois premières semaines après le début de la maladie, signe une infection active par un flavivirus. Une augmentation significative en IgM signe une infection active par un virus de la dengue.

Pour une redescription sémiologique de la dengue

Diagnostic clinique

Le diagnostic clinique est *a priori* peu spécifique et il n'existe pas, comme dans d'autres infections virales, de signes cardinaux qui puissent aboutir à un diagnostic de certitude. Les symptômes et le syndrome général d'infection se retrouvent dans de nombreuses autres arboviroses. D'autres infections peuvent aussi faire penser à une infection par les virus de la dengue, et en l'absence de signes spécifiques (et rares) le diagnostic ne pourra être orienté que par le contexte épidémiologique dans lequel le patient est supposé avoir été infecté. En effet, et en particulier dans une situation non endémique ou inter-épidémique, la dengue pourra aisément être confondue avec d'autres fièvres virales exanthématiques. De nombreux arbovirus peuvent ainsi donner une infection de type « dengue-like » et le contexte géographique en orientera éventuellement le diagnostic (exemples du virus de la fièvre Chikungunya dans le Sud-Est asiatique, ou de la fièvre de Mayaro du massif amazonien). De plus, plusieurs virus peuvent aussi co-circuler en même temps et dans la même population, et de ce fait peuvent rendre le diagnostic différentiel plus complexe (dengue et rougeole, ou dengue et oreillons, dengue et grippe, dengue et entérovirus, par exemple). Enfin, dans la phase aiguë de la dengue, d'autres maladies infectieuses pourront être évoquées : paludisme, typhoïde, leptospiroses, hépatite A, scarlatine, rickettsioses, infections bactériennes.

Tableau clinique

Si on peut décrire un cadre général classique d'infection par les virus de la dengue, des tableaux cliniques variés sont observés, qui doivent être reconnus et pris en compte en raison de leur évolution vers la sévérité.

Plus précisément, le tableau classique d'infection par un virus de la dengue se limite dans la plupart des cas à une affection fébrile d'évolution favorable en cinq à sept jours vers la guérison totale sans séquelles. Quelques heures avant l'accès fébrile, des céphalées, une asthénie marquée, une anorexie, des frissons, peuvent être considérés comme des prodromes de l'infection par les virus de la dengue.

La dengue se manifeste par l'apparition brutale d'un accès fébrile avec un profond malaise, des douleurs musculaires, dorsales, brachiales, jambières et rétro-orbitaires. Un exanthème est souvent observé, accompagné d'un syndrome digestif et de céphalées tenaces. La fièvre disparaît au sixième jour sans avoir excédé 40,5 °Celsius. Quelquefois, après trois jours de fièvre, des signes plus sévères peuvent être observés et qui vont prolonger la maladie de cinq à sept jours (photophobie, dysurie, saignements, lymphadénopathies). Enfin, on décrit plusieurs syndromes de gravité variable, associés à l'infection par les virus de la dengue et d'apparition inconstante au décours de la maladie :

1) Syndrome hémorragique : dans 5 à 30 % des cas cliniques, les signes de trouble de la coagulation peuvent aller de l'apparition de simple pétéchies à un syndrome hémorragique massif et fatal. Les signes cliniques les plus fréquents évoluent dans toute la gamme qui va des *purpura*, épistaxis, gingivorragies et ménorragies, aux saignements gastro-intestinaux, aux hématuries et hémorragies cataclysmiques, aux états de choc et à la mort.

2) Syndrome hépatique : il s'agit généralement d'un « léchage hépatique » avec des constantes biologiques souvent légèrement élevées. Si un syndrome ictérique est exceptionnellement rencontré, une hépatomégalie peut-être observée dans un tiers des cas. L'atteinte hépatique est souvent aggravée par un syndrome hémorragique qui lui est postérieur et elle peut aussi être associée à un syndrome neurologique. Du point de vue anatomopathologique, le virus de la dengue se réplique directement dans les cellules hépatiques et les détruit. Plusieurs descriptions du syndrome de Reye (nécrose des hépatocytes) associées à l'infection par les virus de la dengue se retrouvent dans la littérature.

3) Syndromes cutanés : on peut observer au tout début de la maladie un érythème cutané limité à la face et au cou. Puis, de deux à six jours après l'accès fébrile, un érythème maculaire (*rash*) s'installe dans plus de 50 % des cas, cette fois sur le tronc et la face, pour durer de deux à trois jours.

4) Syndrome neurologique : là encore, il peut se présenter avec une gravité variable allant de symptômes mineurs (céphalées, irritabilité, vertiges), observés dans les cas de dengue bénigne, aux

manifestations neurologiques sévères (méningisme, confusion), ou encore au syndrome d'encéphalopathie tardive (dépression, paralysies).

Ce syndrome est de plus en plus rapporté, avec des signes de gravité accrus. Plus généralement observé chez des patients adultes dans les années 1980, le syndrome neurologique à type d'encéphalopathie aiguë est désormais fréquemment signalé chez les enfants, entraînant une mortalité importante. On note une absence de signes inflammatoires au niveau du liquide céphalo-rachidien, mais la présence d'IgM peut y être détectée.

5) Des symptômes respiratoires, cardiaques, musculaires, rénaux, biliaires, pancréatique, spléniques, oculaires, ascitiques, transplacentaires, peuvent apparaître comme des prodromes de l'infection ou, plus gravement, être associés à un tableau de dengue hémorragique. Des troubles du rythme cardiaque ont été observés ; ils sont généralement passagers et souvent associés à un syndrome dominant de dengue hémorragique.

Comme on l'a vu lors de la description clinique classique des signes cutanés ou musculaires, des signes rénaux (hématurie, urémie) sont souvent observés, quelquefois de façon passagère, et peuvent être exacerbés avec l'évolution de la dengue vers un syndrome grave, généralement de type hémorragique.

Splénomégalie, ascites, œdèmes de la rétine, ont aussi été rapportés et s'intègrent le plus souvent aux tableaux cliniques précédemment présentés mais ils doivent être recherchés dans tous les cas.

Enfin, la dengue chez la femme enceinte représente un danger pour le couple mère-enfant. Si un effet tératogène n'a pas été jusqu'ici démontré, des études supplémentaires sont sans doute nécessaires. L'infection par voie transplacentaire du nouveau-né présente généralement un pronostic de gravité et le risque hémorragique est important lors de l'accouchement.

En conclusion, l'infection par les virus de la dengue présente des tableaux cliniques variés (forme bénigne, syndromes hémorragique, neurologique, hépatique) et des symptômes associés souvent aggravés lors d'une évolution défavorable du syndrome dominant.

Plusieurs observations tendent à rapporter la sévérité des tableaux cliniques à l'infection par des souches virales hautement pathogènes ou à une sensibilité accrue de certains sujets. À la lueur de ces observations, il devient nécessaire de recadrer le tableau clinique de l'infection par les virus de la dengue afin d'aboutir à une meilleure prise en charge des patients et de mettre en évidence des facteurs de risques d'aggravation de la maladie : génotype viral et susceptibilité de l'hôte par exemple.

Collecte des échantillons

La récolte et le choix des échantillons biologiques doivent être faits en fonction du marqueur recherché (virus, anticorps, ARN viral), du test à utiliser (ELISA, PCR), de l'évolution du tableau clinique (phase aiguë), de la précision recherchée (IgM spécifiques, séroconversion) pour l'aide au diagnostic.

En phase aiguë de la maladie : un prélèvement de sang veineux total sera fait généralement au pli du bras sur un tube sec ou hépariné, puis le sérum sera décanté et conservé congelé à -20°C pour être utilisé dans les techniques de détection des anticorps (sérologie), ou à 4°C pour une utilisation dans les 48 heures (sérologie, détection d'ARN). Pour l'isolement viral, ce même échantillon ne sera pas conservé au-delà de six heures dans les conditions précitées et, s'il n'est pas immédiatement inoculé aux cultures cellulaires, il devra être congelé à -80°C pour un isolement viral différé. La date du prélèvement prend toute son importance en fonction de l'évolution de la maladie (figure 3A et 4) et pour la recherche d'un marqueur théoriquement présent (IgM, G, A, : virus, ARN viral). À partir de ce prélèvement, les cellules de la lignée blanche pourront être utilisées pour la détection de l'antigène viral intracellulaire (immunofluorescence indirecte ou directe) ou pour l'isolement viral par co-culture avec des cellules de lignées de laboratoire.

En phase tardive ou post-clinique (convalescence) de la maladie : un prélèvement de sang réalisé dans une phase avancée de la maladie (au-delà de dix jours après l'accès fébrile) permettra une recherche des immunoglobulines (pour la mise en évidence d'une séroconversion par comparaison avec le prélèvement obtenu dans la phase aiguë de la maladie) et, exceptionnellement (en situation de

tableau clinique prolongé, par exemple), la présence de virus ou d'ARN viral dans le sérum pourra être recherchée.

D'autres échantillons biologiques peuvent être utiles au diagnostic mais présentent un intérêt limité et s'adressent plus à la recherche : ponction lombaire pour l'obtention de liquide céphalo-rachidien dans le cas d'encéphalite, biopsie *post mortem* des organes internes.

Détection des anticorps

Matériel et méthode

Il peut être procédé à la détection des anticorps par immunofluorescence indirecte (IFI, très sensible mais peu spécifique), par ELISA, Mac-ELISA (plus ou moins spécifique, toujours très sensible) par inhibition de l'hémagglutination (IH, sensible mais peu spécifique), par neutralisation (spécifique des sérotypes et sensible). D'autres tests peuvent être utilisés, mais qui présentent un intérêt limité pour le diagnostic : *dot blot*, fixation du complément (FC).

La mise en évidence des anticorps nécessite une réaction antigène-anticorps et une préparation de l'antigène obtenue généralement par lysat cellulaire de cellules infectées expérimentalement, ou l'utilisation de cellules infectées, fixées sur un support pour l'observation microscopique.

Stratégie

La détection des anticorps répond à deux objectifs. D'une part, la mise en évidence d'une infection récente ou active chez un patient, et d'autre part celle d'une infection ancienne pour une étude de séroprévalence.

Dans le premier cas, on cherchera à mettre en évidence une séroconversion ou une montée des anticorps (IgM et/ou IgG) contre les virus de la dengue. Si le premier sérum (sérum précoce) est totalement négatif, une séroconversion du sérum tardif sera en faveur d'une primo-infection, en écartant la possibilité d'une primo-infection par un autre flavivirus, grâce à un titre en anticorps IgM préférentiel élevé contre l'antigène utilisé.

Dans le second cas, on pourra assister à une montée des anticorps (IgG et IgM) préexistant dans le sérum précoce. La réaction d'IH, couplée au test ELISA, permettra assez souvent d'identifier le flavivirus et, dans le cas des virus de la dengue, le sérotype responsable. La réalité d'une infection récente active par un sérotype particulier de virus de la dengue pourra être confirmée de deux façons :

- sérologiquement, par l'utilisation du test de séro-neutralisation, très spécifique mais long et coûteux ;
- virologiquement, par l'isolement du virus ou de son ARN.

La présence d'IgM signera une activité récente (de moins de six à dix mois) du virus de la dengue. La présence d'IgG marquera une infection ancienne sans distinction possible entre un des virus de la dengue et un flavivirus antigéniquement proche.

Détection du virus

Les outils de détection

En matière de diagnostic biologique et de mise en évidence des germes pathogènes, en particulier des différents sérotypes et souches des virus de la dengue, on peut distinguer deux sortes d'outils :

- les outils qui permettent de détecter spécifiquement le virus de façon directe (isolement viral, détection de l'antigène viral, des protéines structurales ou non structurales, des acides nucléiques, de l'ARN ou des protéines libres) ;
- les outils qui permettent la mise en évidence de la présence du virus sans toutefois « saisir » celui-ci, donc de façon indirecte, par les réactions de l'hôte à l'infection par le virus (réaction antigène-anticorps) par exemple.

Ces mêmes outils peuvent aussi être utilisés dans des études particulières (épidémiologie génétique, phylogénie) et permettre la caractérisation (génétique) des virus et de leurs composants (protéines et acides nucléiques).

L'isolement viral

L'isolement d'une souche de virus de la dengue nécessite un prélèvement biologique (sang, liquide céphalorachidien, biopsie) pratiqué durant la phase précoce de la maladie (pendant les cinq premiers jours à partir du début de la maladie) et conservé moins de six heures à 4 °C ou plus longtemps à – 80° C avant d'être inoculé à un système cellulaire permissif.

Le virus de la dengue peut être isolé du sang (sérum, plasma, cellules du sang), des ganglions lymphatiques, de la rate, de la moelle osseuse, du foie, du cerveau, du thymus. Des tentatives d'isolement sans succès ont été faites à partir du rein, du pancréas, du cervelet. Les conditions de la collecte et du conditionnement de l'échantillon sont déterminantes pour le succès de l'isolement (voir *supra*).

Il peut être procédé à l'isolement viral sur cultures cellulaires *in vitro*, ou *in vivo* par inoculation au moustique ou à un animal de laboratoire. Le premier isolat sera toujours préservé : des passages successifs sur culture cellulaire ou animal de laboratoire peuvent en effet induire des mutations ou des sélections qui se traduiront par un génome différent de celui du génotype sauvage qui est inoculé à l'homme en situation de transmission naturelle ; ces modifications génomiques expérimentales limiteraient les résultats attendus d'une étude avancée de la caractérisation du génotype aux fins de connaissance de la pathogénicité, de l'origine géographique de la souche...

Isolement sur cultures de lignées cellulaires. Des lignées de cellules de moustiques sont entretenues : AP61 (*Aedes pseudocutellaris*), TRA284 (*Toxorhynchites amboinensis*), C6-36 (*Ae. albopictus*). La lignée C6-36 est largement utilisée en raison de sa sensibilité et de sa manipulation aisée en laboratoire. Des lignées cellulaires de vertébrés sont aussi utilisées : ainsi, par ordre de fréquence, les lignées BHK21 (« Baby hamster kidney »), LLC-MK2 (« Monkey kidney »), Vero (cellules humaines), PS (cellules de porc). Il est en fait davantage recouru aux cellules de vertébrés dans des réactions de neutralisation que pour l'isolement viral, celui-ci étant plus aisé à obtenir et plus sensible sur les cellules de moustique (C6-36).

La méthode consiste à inoculer les cultures cellulaires avec du virus vivant prélevé précocement et à mettre en évidence sa présence (effet cytopathogène, détection de l'antigène ou de l'ARN viral) et sa croissance (titrage). Le virus isolé pourra être conservé, concentré, purifié, pour des études approfondies de caractérisation.

Inoculation au moustique. Elle consiste en une amplification virale sur des moustiques vivants, par sécurité non piqueurs (*Toxorhynchites brevipalpis*, *T. amboinensis*, *Aedes aegypti* mâles, par exemple). Ces insectes sont inoculés avec une suspension virale soit directement par voie transpariérale (intra-thoracique). Dans le cas d'expériences en laboratoire de haute sécurité, des insectes piqueurs sont nourris artificiellement en sang infectant, en recourant à des techniques variées, une membrane perméable par exemple.

Le virus est ensuite identifié directement par une réaction antigènes/anticorps marqués, par exemple à la fluorescéine, en microscopie électronique sur des tissus fixés, ou indirectement par son ARN (PCR) sur un broyat de tissus.

Ces méthodes nécessitent un insectarium pour l'élevage de spécimens de moustiques adaptés au laboratoire et exempts de virus, ainsi que des conditions de sécurité du type 2 à 4 en fonction de l'expérimentation.

Inoculation aux animaux de laboratoire. La souris, les singes et le lapin peuvent être infectés par les virus de la dengue, permettre la multiplication du virus et présenter des signes cliniques. Des conditions de sécurité de niveau 2 ou 3 (BSL2 ou BSL3, de l'anglais *Biosafety Level*) sont requises.

Dans tous les cas, le produit attendu est une souche virale viable et adaptée aux manipulations de laboratoire.

Détection de l'antigène viral

Matériel et méthode

La détection de l'antigène viral peut être faite directement sur des cellules potentiellement infectées par le virus : cellules de lignées infectées expérimentalement pour isoler ou multiplier le virus, prélèvements tissulaires *post mortem* sur un patient décédé ou sur modèle animal, cellules blanches de la lignée sanguine. Elle peut aussi être réalisée à partir d'un liquide biologique contenant une suspension virale ou de l'antigène viral libre (liquide céphalorachidien, plasma sanguin).

La détection de l'antigène viral peut être directe (fluorescence appliquée à des produits biologiques ou anatomopathologiques), par la mise en évidence *in situ* du virus ou de ses protéines virales intracellulaires. Elle peut aussi être indirecte, par capture d'antigènes (Mac-ELISA sur du sérum ou du plasma) utilisant des anticorps très affins (anticorps monoclonaux) qui, fixés sur un support solide, vont capturer l'antigène libre.

Stratégie

La détection de l'antigène viral peut être pratiquée dans les circonstances suivantes :

- sur les cultures de lignée cellulaires infectées par un spécimen biologique aux fins de diagnostic ou de multiplication et d'obtention d'un stock de virus ;
- sur un tissu cellulaire d'origine humaine (biopsie) ou animale (infection expérimentale d'animaux de laboratoire ou de moustique).

Détection de l'ARN viral

Matériel et méthode

La détection de l'ARN viral se fera généralement par transcription reverse suivie d'une amplification génomique (en anglais, *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*, RT-PCR). Plusieurs tests sont disponibles en fonction des amorces utilisées et du génome exploré. La RT-PCR universelle qui permet de détecter un ARN viral de la famille des flaviviridés sera utilisée quand plusieurs flavivirus peuvent circuler de façon concomitante. La RT-PCR spécifique des sérotypes de dengue fait appel à la technique de « *nested PCR* » qui nécessite deux réactions successives : une amplification génomique spécifique d'espèce (dengue) suivie d'une seconde amplification spécifique de sérotype, généralement dirigée à l'intérieur du fragment de gène précédemment amplifié (voir ci-après figure 5). En pratique la RT-PCR permet d'identifier et de caractériser l'ARN viral.

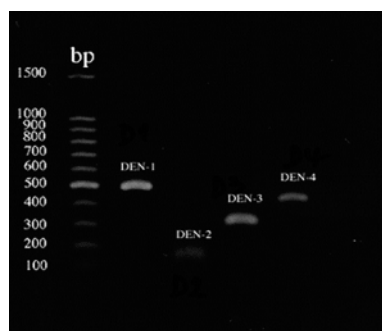


Figure 5 : Électrophorèse des produits de RT-PCR pour l'identification des sérotypes de virus de la dengue

La première ligne de migration représente le marqueur moléculaire nécessaire à l'identification du poids moléculaire des produits de polymérisation en chaîne des différents sérotypes de l'ARN viral du virus de la dengue. Les autres lignes correspondent respectivement aux amplicons des quatre sérotypes du virus :

D1 = 482 paires de base ; D2 = 119 pb ; D3 = 290pb ; D4 = 392 pb

Stratégie

La PCR va être utilisée principalement dans le diagnostic spécifique (sérotypes 1 à 4), pour assurer un suivi sans ambiguïté de la succession des sérotypes dans une zone ou une population donnée. Cet outil servira aussi aux études d'épidémiologie génétique (après séquençage des produits de PCR) pour le suivi des génotypes, de leur circulation et de leur origine.

Caractérisation

Après identification de la souche virale, faite au cours de l'isolement (détection du virus par un anticorps monoclonal spécifique de groupe, d'espèce ou de type), une caractérisation plus poussée sera nécessaire si la souche présente un intérêt particulier, clinique : (pathogénicité accrue) ; épidémiologique (origine nouvelle), ou potentiellement vaccinal.

Matériel et méthode

Caractérisation des protéines virales. Plusieurs outils et techniques peuvent être utilisés pour caractériser le virion : l'utilisation des anticorps polyclonaux (par exemple en immunofluorescence) permettra d'identifier des virus proches, donnant des réactions sérologiques croisées avec les virus de la dengue. L'usage d'anticorps neutralisants permettra de préciser de façon certaine le sérotype de la souche. Un panel d'anticorps monoclonaux favorisera une identification du sérotype d'une souche de dengue et éventuellement la cartographie (par un test de compétition ou en utilisant des protéines virales digérées) des sites antigéniques explorés.

La caractérisation de l'ARN viral peut aussi mener à l'identification du sérotype (phénotype de la souche) ou d'un toptotype (origine géographique de la souche) particulier selon la partie explorée du gène.

Plusieurs autres techniques peuvent conduire à une meilleure connaissance de l'ARN viral, plus au moins fine ou spécifique selon le but poursuivi. On peut citer parmi les plus classiques : l'amplification génomique (PCR), pour laquelle le choix du gène sera déterminant, et la séquence limitée à 300 ou 400 nucléotides ; l'analyse de séquence des amplicons obtenus par PCR et par identification de la souche, en comparaison avec les séquences connues (banque de données : Genbank®), la digestion des ARN (*Finger Print TIRnase*) qui donne des cartes d'oligonucléotides plus ou moins spécifiques de souches (topotypes par exemple), l'isolement direct de l'ARN, qui permettra une caractérisation fine du génome de type sauvage.

Stratégie

Les techniques de caractérisation du virion et de l'ARN viral seront utilisées dans le cadre, 1) de l'aide au diagnostic (identification des sous-types viraux connus pour leur pathogénicité accrue), 2) de l'épidémiologie génétique (détermination de l'origine et de la circulation des sérotypes), 3) du développement de nouveaux outils de diagnostic (protéines précoces indicatrices du phénotype viral, du stade d'infection, de la sévérité clinique), 4) de l'identification de souches ou de protéines candidates vaccinales.

Résultats attendus

Les objectifs des systèmes de détection et de caractérisation des virus de la dengue sont de plusieurs ordres : 1) mettre des outils spécifiques et sensibles (précision et rapidité, méthodes et matériels de qualité, accessibilité) au service du diagnostic précoce, de la surveillance et du contrôle des cas de dengue (incidence, sévérité clinique) ; 2) obtenir un diagnostic différentiel à l'égard des virus antigéniquement proches ; 3) identifier le sérotype viral qui permettra un suivi temporel de la succession des sérotypes et l'évaluation du risque d'introduction d'un nouveau sérotype dans une population non immune ; 4) identifier le génotype viral qui donnera une information sur l'origine géographique des souches (épidémiologie génétique) et leur pouvoir pathogène éventuel.

Avant tout, il faut avoir à l'esprit que l'isolement ou la caractérisation génotypique de l'agent causal prévaudra toujours sur la sérologie : ce sont les éléments intangibles du diagnostic positif et un matériel unique pour l'épidémiologie prospective et la recherche. La sérologie reste une aide certaine au diagnostic et à l'indispensable suivi de la maladie, mais avec des difficultés souvent insurmontables d'interprétation en l'absence de détection du virus causal.

Sérologie

L'obtention des données sérologiques doit être rapide pour le clinicien et les responsables chargés de la surveillance ; le test ELISA est à ce jour le plus approprié. Une sérologie faite sur une paire de sérums donnera toujours une information supplémentaire sur la réalité de l'infection (active ou ancienne), l'évolution ou le statut immunitaire du patient, de l'individu sain, de la population. Une réaction sérologique non spécifique suscitera un diagnostic différentiel avec un autre flavivirus.

L'ensemble des outils utilisant la réaction antigène-anticorps sous-tend leur utilisation dans des études de sérologie qui sont au centre de la compréhension de la dynamique d'infection et de transmission des virus de la dengue (séroprévalence, cinétique d'apparition des anticorps).

Virologie

Les résultats de la virologie (isolement de souche, amplification génomique, séquençage) viennent en général confirmer le diagnostic sérologique et apporter une certitude quand ils sont positifs. L'isolement viral reste important au niveau clinique : a) pour obtenir une souche et la caractériser par rapport à son degré de pathogénicité (élément de compréhension du tableau clinique, candidat vaccin de souches peu pathogènes) ; b) pour identifier un génotype, ses caractéristiques intrinsèques (mutations associées à la pathogénicité ou à d'autres caractères phénotypiques comme l'infectiosité pour les vecteurs ou les hôtes) et son origine géographique (épidémiologie génétique, phylogénie).

Écologie /épidémiologie

On pourra caractériser les souches selon deux types de critères d'intérêt :

1) Le sérotype viral permettra le suivi temporel de la succession des sérotypes dans une population donnée et l'évaluation du risque d'introduction d'un nouveau sérotype dans une population non immune.

2) Le génotype viral pourra donner une information sur l'origine géographique de la souche (études d'épidémiologie génétique), et sur une pathogénicité éventuellement associée à un génotype. Ces données participeront au développement d'une base de données des génotypes qui puisse être utilisée en tant que référentiel régional et international.

La surveillance épidémiologique participera enfin à la compréhension de l'évolution et de l'émergence de la dengue dans une région donnée.

Propositions de recherches dans les DFA et recommandations

Les actions de recherche ou les propositions d'études présentées ci-après participent toutes d'une priorité particulière :

- prise en charge du malade ;
- contrôle des épidémies ;
- aide à la prévention des épidémies ou du risque encouru par l'introduction de souches nouvelles dans les DFA.

Il est aussi important de noter que, dans les DOM-TOM et les DFA, ces actions doivent être conduites pour améliorer la prise en charge de la dengue en priorité chez les populations concernées.

Étude rétrospective des génotypes de virus de la dengue isolés dans les DFA

L'objectif de cette recherche est, d'une part, de saisir la séquence temporelle d'apparition des divers sérotypes et génotypes des souches de virus de la dengue dans les DFA et, d'autre part, de

comprendre leur circulation (épidémiologie génétique) au niveau de la région Caraïbe d'abord, plus globalement ensuite.

Étude rétrospective du profil d'apparition des IgM lors des épidémies de 1997 et 2001 dans les DFA

Ce travail vise à mettre en évidence la dynamique d'émergence du phénomène épidémique au cours de ces épisodes dans les DFA. La finalité en est d'identifier des marqueurs, indicateurs du passage de l'état endémique à l'état épidémique. En effet, l'épidémiologie de la dengue dans les DFA peut revêtir plusieurs modèles, celui d'épidémies sporadiques sur fond d'endémie (modèle encore insuffisamment documenté pour être affirmé), ou celui d'explosion épidémique due à des souches importées de virus de la dengue.

Recadrage sémiologique de l'infection par les virus de la dengue

Il s'agit là d'identifier des facteurs de sévérité en tenant compte de la variété des tableaux cliniques de la dengue rencontrés dans les DFA.

Au vu du nombre croissant d'observations de syndromes graves hémorragiques et non hémorragiques dans les zones d'endémie, il devient indispensable d'identifier des marqueurs précoces (cliniques et biologiques) de gravité de l'infection. Cette approche permettrait d'intervenir efficacement sur la prise en charge du malade et la mise en place du système de surveillance.

Étude de la charge virale

Un travail de ce type est actuellement en cours au Centre régional universitaire de Pointe-à-Pitre (Dr A. Césaire, comm. pers.)

Dans le cadre des syndromes graves, d'infections par les virus de la dengue, la cinétique de la virémie chez les patient pourrait apporter un élément de pronostic décisif pour le traitement et la prise en charge précoce des patients. Cela est vrai pour d'autres infections virales et le nécessaire décryptage de la complexité des tableaux cliniques (cf. *infra*) et de leur évolution donne tout son intérêt à ce type d'étude.

Diagnostic différentiel

Le but en est de produire un référentiel pour un diagnostic étiologique aussi précis et rapide que possible, par rapport à d'autres pathologies infectieuses, par exemple les infections à virus West Nile et autres flavivirus, les encéphalites virales, les leptospiroses, les rickettsioses, des fièvres inexpliquées. En pratique, dans les contextes endémo-épidémiques variables rencontrés dans les départements, et en fonction des écosystèmes, un inventaire virologique devrait fournir l'aide (« panel » d'antigènes) nécessaire du diagnostic différentiel. Les éléments ainsi acquis se situeraient dans le cadre de l'analyse du risque d'émergence des maladies et de la mise en place de systèmes d'alerte précoce basés sur des indicateurs spécifiques des germes potentiellement présents ou susceptibles d'être introduits.

Marqueurs biologiques

La mise en évidence de ces marqueurs est utile d'une part à la détection précoce de l'infection, qui devrait améliorer le diagnostic, et d'autre part à la reconnaissance précoce de l'évolution du tableau clinique vers la sévérité, pour une prise en charge immédiate du patient. Des recherches sur l'identification de marqueurs biologiques précoces d'origine virale (*i.e.* : protéine NS1) ou humaine (*i.e.* : interleukines) sont à l'étude, mais elles nécessitent clairement d'être étendues. L'utilisation prometteuse de la biologie moléculaire (transcriptome) à grande échelle sur les sérums des patients infectés pourrait constituer une approche décisive : il est aujourd'hui possible de passer au crible de façon comparative, chez un patient et par rapport à un individu sain, les produits biologiques circulants qui sont induits par les ARN messagers de l'hôte et qui diffèrent selon les sujets. Il s'agit de démontrer que ceux qui sont spécifiques au patient jouent un rôle essentiel dans le développement de la maladie.

Enfin, dans la continuité de ces études du transcriptome, la recherche de facteurs humains de susceptibilité à l'infection et/ou aux formes graves (marqueurs génétiques) se doit aussi d'être prise en considération pour aboutir à l'identification de gènes responsables, dans le cadre du projet du génome humain.

Spécificité et sensibilité de la sérologie

Une amélioration de la confirmation sérologique consisterait à apporter un diagnostic de certitude, rapide, dans tous les cas d'infection. Des recherches sont engagées pour améliorer la spécificité du test ELISA de capture des IgM, de façon à le rendre spécifique par rapport aux sérotypes. Une autre voie serait l'augmentation de la sensibilité du test de séroneutralisation en utilisant des cellules extrêmement permissives aux virus de la dengue, ou encore en se servant du modèle de séro-neutralisation *in vivo* sur le moustique au laboratoire.

Identification de souches candidates vaccinales

Plus de cent millions d'habitants sont exposés aux risques des fièvres et des syndromes cliniques graves dus à la dengue. La mise au point et le développement de vaccins tétravalents contre les virus de la dengue sont devenus une priorité globale. Plusieurs vaccins sont en cours de développement. Un des plus avancés est le vaccin vivant inactivé tétravalent mis au point et en phase III de développement en Thaïlande, pays hyperendémique pour la dengue hémorragique. Dans le cadre de cette première génération de vaccins, la mise en évidence de souches naturellement peu pathogènes dans les divers régions d'endémie conduirait nécessairement à l'amélioration des vaccins actuellement à l'étude (tolérance, efficacité, spécificité géographique).

Les voies nouvelles de la recherche vaccinale et chimiothérapeutique

Deux voies s'ouvrent avant tout dans la lutte directe contre le virus : tout d'abord, celle classique, de la prévention contre l'infection virale avec l'utilisation de vaccins tétravalents ; elle protégerait contre les quatre sérotypes de virus. C'est ensuite celle de la chimiothérapie, plus complexe et moins avancée, utilisant respectivement les effets virucides ou virostatiques de substances destinées à supprimer ou réduire la virémie chez les patients infectés.

Dans le développement des vaccins, deux stratégies sont aujourd'hui suivies : 1) la mise au point de vaccins vivants atténués tétravalents qui utilisent des virus sauvages ayant perdu leur pouvoir pathogène avec, comme vaccin premier, celui inventé en Thaïlande ; 2) la construction de « virus chimères » qui utilisent les manipulations génétiques chez un virus vivant vaccinal connu et éprouvé chez l'homme, par exemple le vaccin 17D contre la fièvre jaune. Un gène d'intérêt vaccinal (protéines immunogènes) dirigé contre un ou plusieurs sérotypes des virus de la dengue y est introduit ou substitué. Ces travaux sont dans une phase expérimentale avancée et prometteuse sur le modèle animal.

En virologie, la recherche chimiothérapeutique a toujours eu quelque retard ; les voies sont pourtant aussi prometteuses en raison de la richesse des composants potentiels existants et du développement des technologies de criblage à grand débit, lequel permet de tester un grand nombre de ces composés candidats. Si quelques molécules virucides ont été utilisées contre l'infection par les virus de la dengue, avec des résultats non conclusifs chez l'homme (Ribavirine®), d'autres molécules de synthèse et en particulier des substances d'origine naturelle sont actuellement en phase expérimentale d'essais sur des lignées de cultures cellulaires et des modèles animaux ; les résultats sont encourageants...

Dans ces deux domaines, une société pharmaceutique française, pour le vaccin, et des laboratoires de recherche français, pour la chimiothérapie, devraient être soutenus dans leurs travaux pour, à terme, en faire bénéficier plus directement les DFA.

Remerciements

Les auteurs adressent leurs remerciements au Dr Jean-Paul Cornet (IRD, UR 034, Bangkok, Thaïlande), à miss Bussayamas Charuchandra (RCEVD/IRD, UR034, Bangkok, Thaïlande), au Pr B. Carme (Cayenne), au Dr B. Politur (Cayenne), au Dr A. Césaire (Fort-de-France), et également aux directions de la Santé et du Développement sanitaire (DSDS) de Guadeloupe, Guyane et Martinique, à M. George-Henri Sala, représentant de l'IRD en Guyane, aux équipes de démostication de Martinique et de Guyane.

collection **Expertise collégiale**



*Expertise réalisée par l'IRD
à la demande des Conseils généraux
de Martinique, de Guadeloupe
et de Guyane
et du ministère de la Santé*

Version bilingue

La dengue

dans les départements français d'Amérique

Dengue in Martinique, Guadeloupe and French Guiana

Coordination scientifique

RAYMOND CORRIVEAU, BERNARD PHILIPPON, ANDRÉ YÉBAKIMA



Institut de recherche
pour le développement

La dengue dans les départements français d'Amérique

COMMENT OPTIMISER LA LUTTE CONTRE CETTE MALADIE ?

Coordination scientifique

RAYMOND CORRIVEAU, BERNARD PHILIPPON, ANDRÉ YÉBAKIMA

*La première partie (synthèse et recommandations) du rapport
est présentée successivement en français et en anglais sur support papier.
La seconde partie (analytique) est présentée sur le CD-ROM joint.*

IRD Éditions

INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE DÉVELOPPEMENT

collection Expertise collégiale

Paris, 2003

Préparation éditoriale

Patrice Beray

Mise en page

CapSud Création Graphique

Maquette couverture et intérieur

Pierre Lopez

Traduction en anglais

Harriet Coleman

**Cette expertise collégiale a été réalisée à la demande
du Conseil général du département de la Martinique,
du Conseil général du département de la Guadeloupe,
du Conseil général du département de la Guyane et
de la Direction générale de la Santé.**

La loi du 1er juillet 1992 (code de la propriété intellectuelle, première partie) n'autorisant, aux termes des alinéas 2 et 3 de l'article L. 122-5, d'une part, que les " copies ou reproductions strictement réservées à l'usage du copiste et non destinées à une utilisation collective " et, d'autre part, que les analyses et les courtes citations dans le but d'exemple ou d'illustration, " toute représentation ou reproduction intégrale ou partielle faite sans le consentement de l'auteur ou de ses ayants droit ou ayants cause, est illicite " (alinéa 1er de l'article L. 122-4).

Cette représentation ou reproduction, par quelque procédé que ce soit, constituerait donc une contrefaçon passible des peines prévues au titre III de la loi précitée.