

Cours International Francophone de Vaccinologie 2011
Université Bordeaux Segalen - Ecole du Val-de-Grâce
Diplôme Universitaire

**"Développement d'un vaccin combiné contre la
rougeole et les flaviviroses: futur vaccin
pédiatrique?"**

GILHET-MAILFAIT Sandrine
(20 mai 1972)

Date de soutenance
Lundi 24 octobre 2011

Président du jury : Pr D. Malvy

Membres du jury : Pr J.L. Koeck – Pr R. Migliani – Pr P. Saliou – Pr R. Teyssou

Table des matières

Abréviations

Résumé / Abstract

1.	Introduction.....	5
2.	Le virus de la rougeole.....	5
3.	L'infection rougeoleuse.....	7
4.	Vaccin contre la rougeole	8
5.	Génétique inverse et vecteur rougeole.....	10
5.1	Clonage de la souche vaccinale Schwarz du virus de la rougeole.....	11
5.2	Immunogénicité de virus de la rougeole recombinants exprimant des protéines du VIH.....	14
6.	Les flavivirus et les flaviviroses	18
6.1	Les Flavivirus.....	18
6.2	Les flaviviroses	20
6.2.1	L'Encéphalite japonaise.....	20
6.2.2	La fièvre jaune	20
6.2.3	Les infections au Virus du Nil Occidental (West Nile Virus: WNV)	21
6.2.4	La dengue.....	23
6.3	Vaccin existants contre les flaviviroses	24
6.3.1	Vaccin contre la fièvre jaune	24
6.3.2	Vaccin contre l'encéphalite japonaise.....	25
6.3.3	Vaccin contre l'encéphalite à tique	25
6.3.4	Vaccin contre la dengue	25
7.	Vecteur de la rougeole recombinant pour les vaccins à flavivirus: Induction d'une immunité protectrice.....	26
7.1	Immunisation concomitante contre la rougeole et le WNV.....	26
7.2	Immunisation concomitante contre la rougeole et la dengue.....	29
8.	Avantages du vecteur rougeole et questions à résoudre	33
9.	Conclusion	35

Références bibliographiques

Abréviations

Ac	Anticorps
ADN	Acide DésoxyRibonucléique
ADNc	Acide DésoxyRibonucléique complémentaire
Ag	Antigène
ARN	Acide RiboNucléique
CD	Cellule Dendritique
CTL	Lymphocyte T Cytotoxique
Ed	Edmonston
ELISA	<i>EnzymeLinked ImmunoSorbent Assay</i>
F	Protéine de Fusion
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
gp	glycoprotéine
H	Hémagglutinine
HLA	<i>Human Leucocyte Antigen</i>
Ig	Immunoglobuline
JE	Encéphalite Japonaise
L	Polymérase Large
M	Protéine de Membrane
MV	<i>Measles Virus</i>
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
P	Phosphoprotéine
RdRp	<i>ARN polymérase ARN dépendant</i>
RNP	Ribonucléoprotéine
VD	Virus de la Dengue
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VR	Virus de la Rougeole
WNV	<i>West Nile Virus</i>

Résumé

Le vaccin vivant atténué contre la rougeole est l'un des meilleurs vaccins humains. Au cours des 30 dernières années, il a été administré à des centaines de millions d'enfants et a démontré son efficacité et sa sûreté (aucune réversion observée). Cependant, la rougeole reste une infection courante qui atteint encore 45 millions d'individus et tue 800 000 enfants par an, notamment dans les pays en développement.

Un travail pionnier réalisé par l'équipe de M. Billeter a été d'établir un procédé de génétique inverse permettant de produire la souche Edmonston B du virus de la rougeole. A partir de ce clone, un vecteur pouvait être développé pour exprimer de façon stable une variété de gènes ou de combinaisons de gènes de grande taille. A partir de ces travaux, l'équipe de F. Tangy et *al.* a envisagé son utilisation comme vecteur de vaccination pédiatrique permettant d'immuniser simultanément des enfants ou des adolescents contre la rougeole et d'autres infections virales. Dans ce but, cette équipe a développé un vecteur dérivé de la souche vivante atténuée Schwarz du virus de la rougeole (VR) contenu dans les vaccins actuellement commercialisés. Dans un premier temps, ces chercheurs ont inséré des gènes de glycoprotéines d'enveloppe du VIH dans le vecteur de la rougeole et ont ainsi démontré la capacité de ce vecteur à exprimer fortement et stablement ces gènes et à induire des réponses immunitaires humorales et cellulaires spécifiques *in vivo*. Leurs études ont aussi montré que ce vecteur pouvait surmonter une immunité préexistante contre la rougeole, au moins chez l'animal, quand deux doses de vaccin recombinant étaient administrées.

Sur la base de ces résultats prometteurs, cette équipe a décidé de produire des vecteurs rougeole exprimant des protéines de flavivirus tel que le virus du Nil occidental ou le virus de la dengue. En effet, ces maladies à flavivirus, maladies humaines aiguës associées à des manifestations hémorragiques ou à des syndromes méningo-encéphalitiques entraînent une forte létalité surtout chez les enfants, et constituent un problème de santé publique dans les pays en voie de développement. Les résultats obtenus que ce soit avec le vecteur recombinant du virus du Nil occidental ou celui de la dengue sont très encourageants. Ces virus de la rougeole vivants atténués exprimant des glycoprotéines de flavivirus ont une forte capacité à induire une immunité protectrice et durable. Si les essais cliniques le confirment, ces vecteurs basés sur une souche vaccinale vivante atténuée approuvée et couramment utilisée dans le monde, pourraient être utilisés dans les pays en développement comme vaccins combinés pour immuniser des enfants et des adolescents simultanément contre la rougeole et des flaviviroses telles que l'encéphalite du Nil occidental, la dengue ou voire l'encéphalite japonaise.

Abstract

The attenuated live measles vaccine is one of the best vaccines currently available. Over the last 30 years, it has been administered to hundreds of millions of children and has proved to be both effective and safe (without any observed reversion). However, measles remains a frequent infection and was estimated to cause 45 millions of illnesses and 800 000 children deaths per year especially in the developing countries.

In a remarkable pioneer work, the team of M. Billeter developed a reverse genetics procedure for the production of the Edmonston B strain of MV. From this, a vector stably expressing several genes or combination of genes with high size could be developed.

Based on this work, the F. Tangy and *al.* team consider its use as a paediatric live vector simultaneously to immunize children or adolescents against measles and other viral infections. For this purpose, this team has developed a vector derived from the live attenuated Schwarz strain of the measles virus (MV) currently contained in the marketed vaccines. Firstly, these researchers inserted HIV genes of envelope glycoproteins in the measles vector and have demonstrated the capacity of this vector to strongly and stably express genes encoding proteins from HIV and to induce specific humoral and cellular immune responses *in vivo*. Importantly, their studies also showed that, at least in animal models, the vector can bypass measles vaccine pre-existing immunity when two doses of recombinant vaccine are administered.

Based on these promising results, F. Tangy *et al.* decided to produce measles vectors encoding flavivirus proteins such as West Nile Virus (WNV) proteins or dengue virus proteins. In fact, flavivirus diseases are human acute diseases associated with hemorrhagic manifestations or meningo-encephalitic syndromes, leading to a high lethality usually in children and considered as public health issues in developing countries. The results obtained with the recombinant vector of the WNV or the Dengue virus was very encouraging. These attenuated live measles virus expressing flavivirus glycoproteins are able to induce specific long-term protective immune response. After confirmation with clinical trials, these recombinant vectors might be used in developing world as combined vaccination vector to mass immunize children and adolescents against both measles and flaviviral diseases such as West Nile fever, Dengue or Japanese Encephalitis.

1. Introduction

Le vaccin vivant atténué contre la rougeole est l'un des vaccins humains les plus efficaces et les plus sûrs. Il a été administré à des centaines de millions d'enfants depuis les années soixante. Les campagnes de vaccination ont été très efficaces pour contrôler la rougeole dans la plupart des pays développés. Cependant, en raison d'une distribution insatisfaisante du vaccin dans les pays en développement, la rougeole infecte encore 45 millions d'individus et tue 800 000 enfants par an. L'OMS a donc renforcé son programme de vaccination mondiale pour les 10-20 ans à venir. Le développement de vecteurs de vaccination dérivés du vaccin contre la rougeole permettrait de mettre au point de nouveaux vaccins pédiatriques multivalents sûrs et efficaces ciblant plusieurs maladies. Tirant profit des campagnes de vaccination de l'OMS, il pourrait être avantageux de remplacer dans certaines régions du monde le vaccin standard par des vaccins recombinants permettant d'immuniser simultanément les enfants contre la rougeole et d'autres maladies infectieuses tel que la fièvre du Nil occidental, la dengue ou l'encéphalite japonaise.

2. Le virus de la rougeole

Le virus de la rougeole (VR) est un Morbillivirus de la famille des *Paramyxoviridae*. C'est un virus à ARN monocaténaire de polarité négative (Mononegavirales) comprenant 15 894 nucléotides, anti-messenger, non segmenté, enveloppé, avec une capsidie hélicoïdale pléiomorphe. Son diamètre à l'état de particule virale varie entre 150 et 350 nm [1].

Son ARN est complexé à 2649 protéines N (nucléoprotéine) pour former la nucléocapside, une structure hélicoïdale relativement souple mesurant 1,25 µm environ de long pour un diamètre externe de 18 nm (*figure 1*). Le long de cette structure, environ 300 protéines P (phosphoprotéines) se fixent aux protéines N. Ces protéines servent d'ancrage à la protéine polymérase « large » L (entre 20 et 50 par nucléocapside) garante de l'activité ARN-polymérase ARN dépendante (RdRp). L'ensemble ARN-N/P/L constitue le complexe transcriptionnellement actif appelé ribonucléoparticule (RNP). Chaque particule virale contiendrait selon les analyses structurales au moins 2 nucléocapsides. Une enveloppe lipidique (provenant de la cellule hôte) entoure l'ensemble. Elle est tapissée sur sa face interne par la protéine de matrice M. Deux types de glycoprotéines de surface sont enchâssées dans

l'enveloppe : l'hémagglutinine H et la protéine de fusion F respectivement impliquées dans l'attachement à la cellule *via* des récepteurs spécifiques et la fusion des bicouches lipidiques (*Figure 1*). Au cours de l'infection virale, 3 protéines non structurales (c'est-à-dire théoriquement non incorporées dans les particules) sont également produites à partir du gène P : les protéines V, C et R.

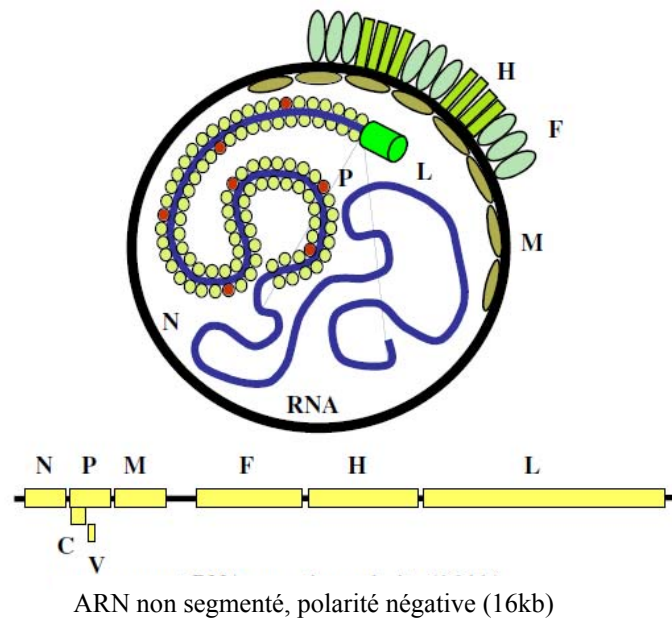


Figure 1: diagramme schématique du VR et de son génome (N: nucléoprotéine, P: phosphoprotéine, M: protéine de la matrice; F: protéine de fusion, H: hémagglutinine, L: polymérase large [1]).

Le VR infecte de nombreux types cellulaires *in vitro* et *in vivo*. Selon la souche, primaire ou adaptée à la culture cellulaire, il utilise la molécule ubiquitaire CD46 et/ou la molécule CD150/SLAM (*signaling lymphocyte activation molecule*) comme récepteur cellulaire [2, 3]. Une fois introduit dans le cytoplasme des cellules cibles, l'ARN génomique, sous forme de complexes ribonucléoprotéiques (RNP), dirige à la fois la synthèse des ARN messagers viraux de polarité positive et la production de brins complémentaires entiers antigénomiques. Ces derniers sont répliqués pour redonner des génomes encapsidés dans les particules bourgeonnantes. L'abondante progénie virale produite entraîne l'infection des cellules voisines et une virémie permettant au virus de se répandre dans tout l'organisme.

3. L'infection rougeoleuse

La rougeole ne survient que chez l'homme; le virus est très contagieux et se transmet par les gouttelettes respiratoires en suspension dans l'air (gouttelettes de Flügge) et par contact direct. La période d'incubation est de 10 à 14 jours (étendue: 8-15 jours) entre l'exposition et l'apparition de l'exanthème et les patients sont contagieux environ 4 jours avant à 4 jours après l'éruption [4].

Ainsi, l'infection rougeoleuse commence par une phase asymptomatique allant de 3-4 à une quinzaine de jours en fonction de la souche virale et de l'état de l'individu infecté. Vers la fin de la période d'incubation, les patients développent des symptômes prodromiques, avec une forte fièvre à 39-40°C, catarrhe oculo-nasal (rhinite, conjonctivite), toux puis énanthème. L'exanthème maculo-papulaire typique qui permet de diagnostiquer la maladie apparaît 3 à 4 jours plus tard et s'accompagne souvent d'une fièvre pouvant atteindre 39 à 40° C. Lors de l'apparition de cet exanthème, on observe sur la muqueuse buccale des tâches blanchâtres (signe de Koplik), pathognomoniques de la rougeole. Cette éruption cutanée coïncide avec l'apparition de la réponse immunitaire antivirale adaptative et le début de l'élimination du virus de l'organisme, mais également avec le développement d'une immunosuppression systémique profonde mais transitoire responsable de complications par surinfections opportunistes. L'état des malades s'améliore normalement à partir du troisième jour suivant l'apparition de l'exanthème et guérissent complètement de 7 à 10 jours après le début de leur maladie.

La gravité de la rougeole peut varier énormément, en fonction de facteurs liés à l'hôte et à l'environnement. Le risque de contracter une rougeole sévère ou mortelle augmente pour les sujets de moins de 5 ans et pour ceux qui vivent dans des conditions de promiscuité, qui souffrent de malnutrition (avec, en particulier, une carence en vitamine A), et qui ont des troubles immunologiques, notamment une infection à VIH à un stade avancé. L'otite moyenne, la laryngotrachéo-bronchite et la pneumonie sont des complications relativement courantes. Chez l'enfant, l'otite moyenne survient dans 5 à 15% des cas et la pneumonie dans 5 à 10% des cas. Des encéphalites post-infectieuses surviennent dans environ 1 cas sur 1000, et la pan-encéphalite sclérosante subaiguë, infection du système nerveux centrale d'évolution lente, dans 1 cas sur 10 000–100 000. Dans les pays en développement, les taux de létalité chez les jeunes enfants peuvent atteindre 5 à 10%. En revanche, dans les pays industrialisés,

les décès par rougeole sont rares, même si des formes graves de la maladie et même la mort peuvent survenir chez des sujets auparavant en bonne santé.

Dans les régions tropicales, la plupart des cas surviennent pendant la saison sèche alors qu'en climat tempéré, on observe les pics d'incidence à la fin de l'hiver et au début du printemps. La rougeole atteint dans les régions tropicales les enfants très jeunes, souvent vers 9 mois (tranche d'âge 6-9 mois: 15, 2% au Cameroun).

Il n'y a pas de traitement antiviral spécifique de la rougeole. Le traitement est symptomatique.

La rougeole ne se contracte qu'une seule fois car le système immunitaire développe une forte réponse spécifique et établit une mémoire à long terme qui protège d'une réinfection toute la vie. Cette protection repose à la fois sur la production d'anticorps et de lymphocytes T cytotoxiques CD8+ mémoires (CTL). Les anticorps contre la nucléoprotéine sont les plus abondants et les plus rapidement produits, mais ce sont les anticorps contre la protéine de fusion (F) et l'hémagglutinine (H) qui participent à la neutralisation du virus. Des CTL-HLA restreints spécifiques de la rougeole sont détectés dans le sang et les lavages bronchoalvéolaires au cours de l'éruption rougeoleuse. Ils sont dirigés contre toutes les protéines virales. Les souches primaires pathogènes du virus perturbent fortement l'hématopoïèse, induisant une immunosuppression transitoire de 5 à 6 semaines responsable de la majorité des décès dus à l'infection rougeoleuse dans les pays en développement.

4. Vaccin contre la rougeole

Avant l'apparition en 1963 d'un vaccin efficace, plus de 90% des individus étaient infectés avant l'âge de 10 ans. Depuis, l'incidence de la rougeole a considérablement diminué. Cette maladie reste pourtant une cause importante de mortalité et d'incapacité chez l'enfant dans des pays ayant des infrastructures sanitaires limitées et où l'accès à la vaccination est encore réduit. Chaque année, plus de 30 millions de cas surviennent dans le monde, avec près de 900 000 décès en 1999. Grâce aux activités de vaccination, le nombre des décès a chuté de 750 000 en 2000 (couverture vaccinale estimée à 72%) à 197 000 en 2007 (couverture vaccinale estimée à 82%).

La souche Edmonston (Ed) du virus a été isolée en 1954 par culture sur cellules primaires humaines. L'adaptation du VR Ed aux fibroblastes d'embryon de poulet a produit les

semences EdA et EdB. Des passages ultérieurs sur ces fibroblastes ont produit les souches plus atténuées Schwarz et Moraten dont les séquences se sont révélées identiques.

A cause de problèmes de réactogénicité, la souche Ed a été abandonnée pour la vaccination en 1975 et remplacée par la souche Schwarz/Moraten. La souche Schwarz/Moraten constitue le vaccin rougeole le plus couramment utilisé à côté des souches AIK-C ou Zagreb.

Le vaccin antirougeoleux induit une réponse immunitaire à médiation à la fois humorale et cellulaire, comme celle qui suit l'infection naturelle, bien que les titres en anticorps soient en général plus faibles. Après la vaccination, des immunoglobulines (Ig)M spécifiques de la rougeole apparaissent provisoirement dans le sang et des IgA dans les sécrétions muqueuses. Les anticorps IgG persistent dans le sang pendant plusieurs années. La vaccination induit aussi la production de lymphocytes T CD4+ et T CD8+ spécifiques du virus. Les anticorps contre les protéines H et F contribuent à la neutralisation du virus et sont les meilleurs indicateurs de la protection contre l'infection rougeoleuse. On considère que la présence d'Ac neutralisants, le plus souvent mis en évidence par l'essai de neutralisation sur plaque, est le corrélat le plus fiable de la protection (titre protecteur >120 mUI/ml). Dans de nombreux laboratoires cependant, les évaluations immunologiques se fondent sur les résultats de titrages immuno-enzymatiques (ELISA). Comme les souches sauvages, les virus du vaccin antirougeoleux exercent à la fois un effet stimulant et supprimeur sur les réponses immunitaires à médiation cellulaire. Néanmoins, cette immunosuppression après la vaccination ne dure que quelques semaines et on considère qu'elle est inoffensive. La vaccination induit une immunité à vie après une ou deux injections. La persistance des cellules CD8 et des anticorps a été démontrée 25 ans après la vaccination. En revanche, on ne sait pas avec certitude si une dose unique du vaccin, sans rappel naturel par des expositions récurrentes à la rougeole, assure une protection définitive tout au long de la vie.

En général les réactions indésirables suite à la vaccination antirougeoleuse sont bénignes et passagères. De légères douleurs et une sensibilité au palper peuvent se produire au site d'injection dans les 24 heures; il s'ensuit parfois une légère fièvre et une adénopathie locale. Environ 7 à 12 jours après la vaccination, jusqu'à 5% des sujets vaccinés peuvent présenter une fièvre d'au moins 39,4 °C pendant 1 à 2 jours. Cette fièvre provoque parfois des convulsions (chez environ 1/3 000 personnes). Un exanthème transitoire survient chez environ 2% des personnes et un purpura thrombopénique chez 1/30 000 personnes vaccinées. À l'exception des réactions anaphylactiques, le risque d'événements indésirables est moindre

après l'injection de la seconde dose. Après la vaccination, il arrive d'observer des réactions allergiques à certains constituants du vaccin, dont la néomycine et les produits stabilisants, gélatine ou sorbitol. Les réactions anaphylactiques sont rares et surviennent pour 1/100 000 doses administrées. Des études approfondies dans différents pays ont montré qu'il n'y avait pas de risque accru de séquelles neurologiques définitives et que rien n'indiquait une augmentation du risque de syndrome de Guillain-Barré après l'administration de vaccins antirougeoleux. Par ailleurs, il n'existe aucune preuve scientifique étayant les informations selon lesquelles la vaccination antirougeoleuse pourrait être un facteur de risque de maladies inflammatoires digestives ou d'autisme. La taille des populations étudiées permet d'obtenir une puissance statistique suffisante pour détecter même de rares associations.

Le vaccin contre la rougeole est facilement produit à grande échelle dans la plupart des pays et peut être distribué à faible coût. L'atténuation du génome du virus de la rougeole résulte d'une combinaison avantageuse de nombreuses mutations. Ainsi, le vaccin est très stable et la réversion des souches vaccinales vers la pathogénicité n'a jamais été observée. De plus, le virus se réplique exclusivement dans le cytoplasme, éliminant la possibilité d'intégration dans les chromosomes de l'hôte. Toutes ces caractéristiques font du vaccin vivant atténué contre la rougeole un candidat attractif pour le développement d'un vecteur de vaccination multivalent.

5. Génétique inverse et vecteur rougeole

Un travail pionnier réalisé par l'équipe de M. Billeter (Zurich) [5] a été de cloner un ADN complémentaire (ADNc) infectieux correspondant à l'antigénome de la souche Edmonston B du VR et d'établir un procédé de génétique inverse permettant de produire le virus correspondant. Ce clone a permis de développer un vecteur pouvant exprimer de façon stable une variété de gènes ou de combinaisons de gènes de grande taille pendant plus de douze passages. L'expression la plus forte des transgènes était observée lorsqu'ils étaient insérés en amont du gène de la nucléoprotéine (N) et diminuait lorsqu'ils étaient insérés en aval du gène de l'hémagglutinine (H) (*figure 1*). Ces virus recombinants ont été utiles pour observer la dissémination du VR en culture cellulaire. Ainsi, il a été montré que le VR infectait les cellules individuelles autour des syncytia bien avant que la fusion n'apparaisse, contrairement à des mutants déficients en protéine de matrice (M) ou des mutants plus fusiogènes modifiés dans leurs glycoprotéines d'enveloppe. Des VR recombinants contenant plus de 5 000

nucléotides additionnels, soit 30 % de génome supplémentaire, étaient facilement produits. Ces virus, dont le génome était fortement alourdi en séquences additionnelles, se multipliaient légèrement plus lentement en culture cellulaire que le VR standard, mais étaient produits à des titres semblables. Après 12 passages impliquant une amplification d'un facteur 1020, plus de 96 % des cellules infectées exprimaient toujours les gènes additionnels. Cette excellente stabilité d'expression des transgènes additionnels par les virus à ARN négatif est probablement due à l'absence de contraintes géométriques exercées sur la taille du génome de ces virus pléiomorphes à nucléocapsides hélicoïdales, contrairement aux virus à capsides icosaédriques, pour lesquels l'extension trop importante du génome empêche l'assemblage des particules.

Le VR infecte les cellules du système immunitaire, en particulier les macrophages et les cellules dendritiques, ce qui permet au vecteur rougeole de délivrer les antigènes qu'il véhicule directement dans les cellules présentatrices d'antigènes les plus efficaces, un avantage majeur pour un vecteur vaccinal.

5.1 Clonage de la souche vaccinale Schwarz du virus de la rougeole

Sur le même modèle que le clonage de souche Ed B, l'équipe de F. Tangy a développé un vecteur dérivé du vaccin contre la rougeole à partir de la souche Schwarz/Moraten, en clonant l'ADNc infectieux correspondant à l'antigénome de la souche Schwarz/Moraten [6]. En supposant que la sûreté et l'efficacité d'une souche atténuée dépendaient ultimement de sa séquence génomique, l'ADNc du virus de la rougeole a été cloné à partir de particules virales purifiées d'une production industrielle de vaccin Schwarz avec des procédures optimisées pour la fidélité du clonage. La séquence du clone moléculaire obtenue s'est révélée identique à celle du génome parental. Pour optimiser le rendement du système de génétique inverse, l'ADNc antigénomique viral a été placé sous contrôle du promoteur de la polymérase du phage T7 avec le motif GGG nécessaire pour une efficacité optimale. Un ribozyme en tête de marteau a été inséré entre ce motif GGG et le premier nucléotide viral pour permettre le clivage exact de l'ARN viral. Pour assurer le clivage à l'autre extrémité, le ribozyme du virus de l'hépatite delta a été placé en aval de la séquence terminatrice du phage T7. Le plasmide pTM-MV Schw résultant (*figure 2*) a permis de produire le virus correspondant à l'aide du système de génétique inverse précédemment décrit basé sur la transfection de cellules

humaines *helper* [5]. Pour éviter l'adaptation du vaccin recombinant à des cellules non certifiées, les cellules *helper* transfectées par l'ADNc étaient co-cultivées avec des fibroblastes embryonnaires de poulet, cellules sur lesquelles ce vaccin a été originellement sélectionné et sur lesquelles il est actuellement produit. Le virus recombinant a été passé deux fois sur ces cellules et son génome a été entièrement séquencé. Aucune mutation n'a été trouvée par rapport à la séquence d'origine. De plus, la cinétique de croissance et le rendement de production du virus recombinant étaient identiques à ceux du virus Schwarz original. Le virus recombinant a été également produit après co-culture des cellules *helper* transfectées sur des cellules Vero (singe vert africain) qui sont très sensibles au virus de la rougeole. Le plasmide pTM-MVSchw a été modifié pour l'expression de gènes étrangers par l'introduction d'unités additionnelles de transcription (UAT) en différentes positions du génome. Ces UAT sont des cassettes de sites multiples de clonage insérées dans une copie de la région intergénique N-P (nucléoprotéine-phosphoprotéine) du génome viral. Cette région contient les séquences cis actives nécessaires pour la transcription du gène viral P. La séquence de la protéine fluorescente GFP (*green fluorescent protein*) a été insérée dans la cassette. L'UAT a été introduite dans le plasmide pTM-MVSchw en deux positions (entre les gènes P et M et entre les gènes H et L) (*figure 2*).

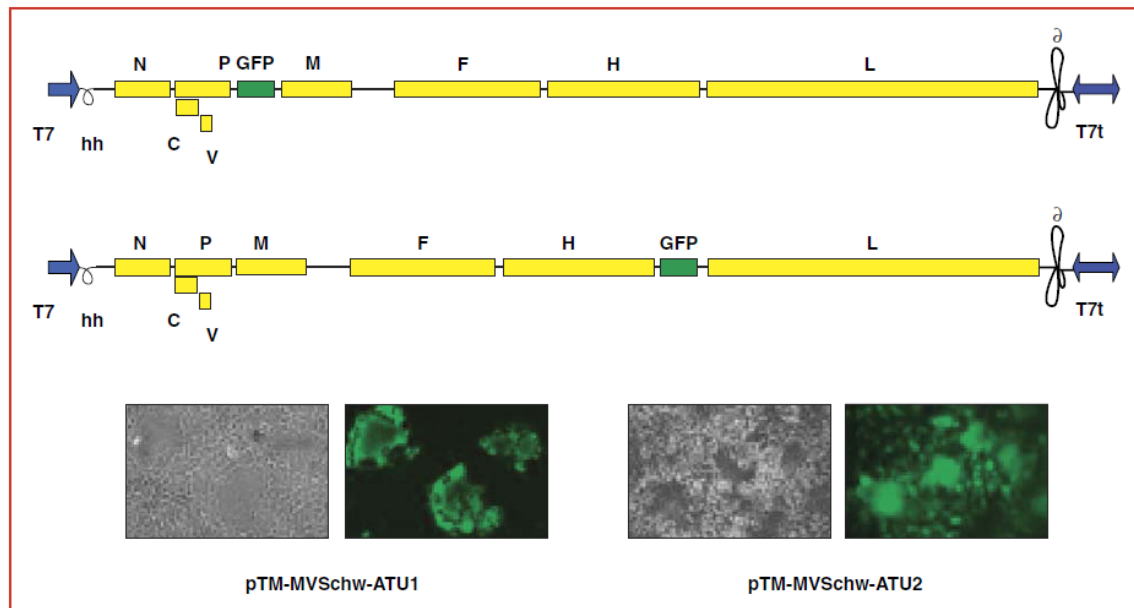


Figure 2: Le vecteur rougeole Schwarz. N = nucléoprotéine; P = phosphoprotéine; M = protéine de matrice; F = protéine de fusion; H = hémagglutinine; L = large polymérase; T7 = promoteur de ma T7RNA pol; T7t = terminateur de la T7 RNApol; hh = ribozyme en tête de marteau; δ = ribozyme génomique du virus de l'hépatite delat (HDV); plasmide = pTM; GFP = green fluorescent protein; nombre total de nucléotides du génome du VR: 15 894. L'expression de la GFP dans les cellules Vero infectées est présentée en bas de la figure.

Quelle que soit la séquence additionnelle, le nombre total de nucléotides antigénomiques devait être maintenu comme un multiple de six afin de respecter la «règle des six nucléotides» qui optimise la réplication virale. Les virus recombinants ont été produits à partir des plasmides correspondants. Le transgène GFP s'exprimait dans tous les types cellulaires infectés, prouvant que le virus de la rougeole Schwarz recombinant fonctionnait comme vecteur. L'immunogénicité du virus produit à partir du plasmide pTM-MV Schw et passé deux fois sur fibroblastes embryonnaires de poulet ou cellules Vero a été évaluée chez le macaque cynomolgus et comparée à celle du vaccin Schwarz industriel. Ces macaques sont sensibles à l'infection et à la vaccination par le virus de la rougeole. Des singes ont reçu par voie sous-cutanée soit une dose standard de vaccin contre la rougeole Schwarz soit la même dose de virus produit à partir du plasmide pTM-MV Schw. Tous les macaques vaccinés ont développé des anticorps anti-MV et des réponses cellulaires spécifiques. Aucune différence n'a été observée entre le virus Schwarz produit à partir de l'ADNc et le vaccin Schwarz

original, indiquant que le virus cloné avait la même immunogénicité chez le macaque que le vaccin parental [6].

Ce vecteur permettrait donc de construire des vaccins combinés basés sur une souche vaccinale vivante atténuée approuvée et couramment utilisée dans le monde. Il pourrait alors être utilisé pour la vaccination chez l'Homme soit en primo-immunisation pédiatrique chez des enfants naïfs, soit chez l'adulte ayant une immunité pré-existante à la rougeole. La plupart des essais cliniques ont montré que la re-vaccination d'individus immunisés induisait une augmentation de la production d'anticorps anti-rougeoleux. Ceci suggère donc que, malgré une immunité préexistante, le vaccin vivant atténué se réplique et produit toutes ses protéines après une dose rappel. De façon similaire, la vaccination rougeole chez les enfants de moins de 1 an a montré que la présence d'Ac maternels contre la rougeole n'empêchait pas l'induction de la réponse cellulaire à la rougeole et que celle-ci pouvait être relancée par une dose de rappel. La plupart des adultes ayant déjà une pré-immunité, il était important de vérifier que leur vaccination demeurait possible. Pour répondre à cela, des recherches ont été menées en utilisant les vecteurs recombinants rougeole-virus de l'immunodéficiência humaine (VIH).

5.2 Immunogénicité de virus de la rougeole recombinants exprimant des protéines du VIH

La première stratégie explorée tirant profit de cette nouvelle technologie a été de produire un virus vivant atténué recombinant rougeole-VIH qui pouvait être utilisé comme vecteur bivalent de vaccination pour immuniser les enfants et les adolescents à la fois contre la rougeole et le sida. Le virus de la rougeole et le VIH ont la même capacité d'infecter les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques et d'induire la suppression immunitaire. Des VR recombinants exprimant différentes formes des glycoprotéines (gp) d'enveloppe du VIH ont été produits et leur immunogénicité a été testée chez la souris et le macaque [7]. Pour favoriser l'induction d'anticorps neutralisants à large spectre, les régions hypervariables V1, V2 et V3 de la gp160 (forme membranaire) et de la gp140 (forme soluble) du VIH89.6 (isolat primaire de clade B) ont été supprimées. Ces délétions permettent d'éliminer des « leurres immunologiques » et d'exposer des épitopes enfouis conservés. Les séquences codant pour ces protéines ont été insérées dans le vecteur rougeole et les virus recombinants ont été produits. L'analyse de l'expression des glycoprotéines d'enveloppe du VIH dans les lysats de

cellules infectées a montrée que les formes natives et mutantes des protéines gp160 et gp140 étaient efficacement exprimées et correctement arrivées à maturité (*figure 3*). Après cinq passages des virus recombinants VR-EnvHIV89.6 sur cellules Vero, l'expression de transgènes restait identique, confirmant la stabilité d'expression des vecteurs rougeole. La croissance des virus recombinants était légèrement retardée par rapport à celle du vaccin standard, mais le rendement final de production était identique.

L'immunogénicité des virus VR-EnvHIV89.6 a été évaluée chez des souris génétiquement modifiées exprimant le récepteur humain du virus de la rougeole CD46 et déficientes pour le récepteur des interférons de type I [7]. Les résultats ont montré qu'après une seule injection, les virus recombinants induisaient des hauts titres d'anticorps contre la rougeole et les protéines du VIH, ainsi qu'un taux élevé de cellules T CD4+ et CD8+ spécifiques de la rougeole et du VIH : 7 % des CD8+ et 4 % des CD4+ spécifiques du virus de la rougeole et 1,7 % des CD8+ et 0,9 % des CD4+ spécifiques du VIH. Par conséquent, les virus recombinants VR-EnvHIV89.6 étaient génétiquement stables, exprimaient des niveaux élevés des protéines d'enveloppe du VIH et induisaient des réponses humorales et cellulaires contre la rougeole et des glycoprotéines d'Env du VIH. Une injection de VR-VIHEnv a induit des anticorps anti-VIH capables de neutraliser le virus homologue SHIV89.6p ainsi que plusieurs isolats primaires hétérologues de clades A et B. La suppression des régions hypervariables a augmenté le niveau des anticorps neutralisant le virus SHIV89.6p homologue et les isolats VIH1 primaires hétérologues (*figure 3*). Cette observation suggérait que la délétion des régions hypervariables avait pu exposer des épitopes conservés et confirmait que la suppression des régions hypervariables élargissait les réponses humorales. La gp160 exprimée par le virus de la rougeole semblait être un meilleur mime antigénique du complexe trimérique présent à la surface des virions du VIH que la gp140.

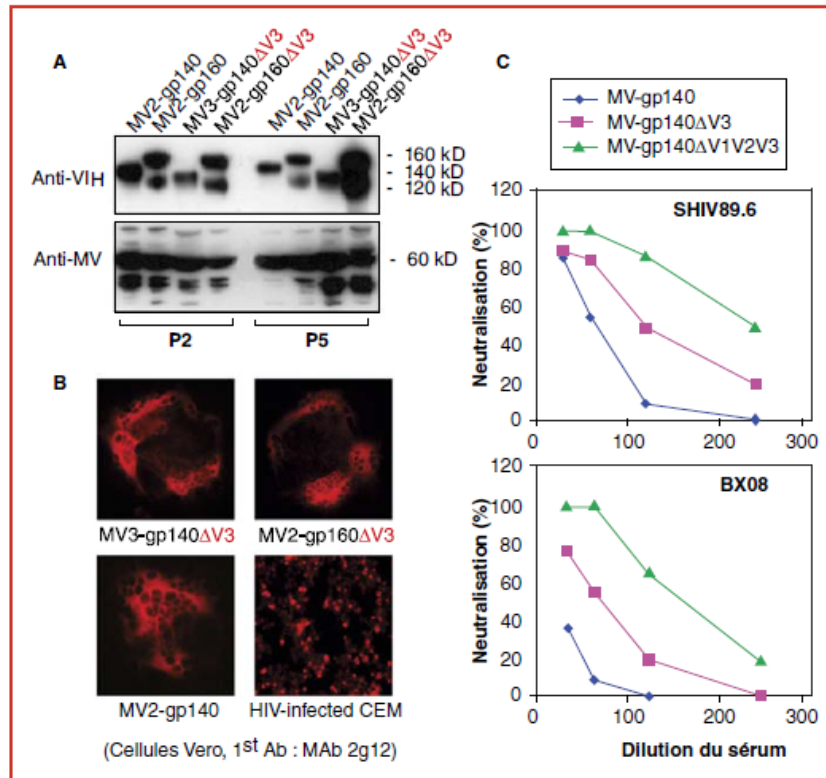


Figure 3: Expression des glycoprotéines Env du VIH1 par le vecteur rougeole et induction d'Ac neutralisants anti-VIH chez les souris immunisées. A) Expression des protéines du VIH_{89.6} gp160, gp140 et mutantes avec délétion des régions hypervariables, et de la nucléoprotéine N du VR (MV) détectées dans des lysats de cellules Vero infectées par les virus MV-Env_{HIV} (P2 et P5 sont différents passages des virus recombinants). Les protéines du VIH sont marquées avec un Ac monoclonal anti-HIV gp120 et la protéine N du VR avec un Ac monoclonal anti-VR N. B) Détection par immunofluorescence des protéines Env du VIH dans les syncytia de cellules Vero infectées par les virus VR-Env_{HIV} (marquage avec l'Ac monoclonal anti-VIH1 2g12). C) Neutralisation in vitro du virus homologue SHIV89.6 et d'un isolat primaire hétérologue VIH1 BX08 par les sérums de souris immunisées avec les virus VR-Env_{HIV89.6} (collectés 28 jours après immunisation). Les mutants avec délétion des régions hypervariables induisent de meilleurs titres d'Ac neutralisants.

L'équipe de F. Tangy a également observé que la présence d'une immunité préexistante contre le vecteur n'altérerait pas le potentiel immunogène du virus recombinant qui pouvait induire des anticorps anti-VIH chez des souris et des macaques déjà immuns, à condition que deux injections successives soient administrées [7]. Bien que les corrélats de protection immune contre l'infection par le VIH1 ne soient toujours pas compris, une immunisation préventive

idéale devrait induire des lymphocytes T spécifiques et des anticorps capables de neutraliser des isolats primaires. Ces résultats montrent que l'expression des protéines du VIH par un virus vivant atténué recombinant basé sur un vaccin déjà existant permet d'induire ces réponses après une seule injection. Afin d'élargir les réponses induites par le virus recombinant, ils ont produit un VR exprimant la gp140 et les protéines du "core viral" (Gag) insérées dans les deux UAT du vecteur. Ce virus, contenant plus de 4 000 nucléotides additionnels, exprime de façon stable les deux protéines à des niveaux élevés et induit de bons niveaux de réponse cellulaire chez le macaque. Ils ont également montré l'immunogénicité chez la souris et le macaque d'un VR exprimant la protéine Nef.

Quels sont les avantages du VR parmi les vecteurs viraux existants développés pour l'immunisation contre le VIH?

Les aspects pratiques et logistiques ont été déjà exposés. En outre, le VR répliquatif atténué a la capacité de produire une immunité durable. De plus, le VR et le VIH ont plusieurs propriétés en commun, en particulier le fait qu'ils infectent tous les deux les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques. Ainsi, un vecteur dérivé du VR qui cible les protéines du VIH dans le même compartiment que le VIH lui-même présente l'avantage d'induire des « signaux de danger » identiques. La bonne immunogénicité de ce système est probablement due aux bons niveaux d'expression et de maturation de l'Env du VIH dans les cellules infectées par les virus recombinants, entraînant une présentation efficace au système immunitaire.

La grande majorité des 40 millions d'individus actuellement infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) vivent dans les pays en développement (UNAIDS/WHO, 2004). Dans ces régions, la transmission de la mère à l'enfant, y compris par l'allaitement, est responsable d'un demi-million d'infections par an, et la plupart des cas de transmission sexuelle se produisent avant l'âge de 20 ans. Par conséquent, le développement d'un vaccin pédiatrique préventif serait vraiment une nécessité pour combattre l'épidémie de sida. Ce vaccin devra être sûr et induire une immunité protectrice après une ou deux injections. Les recherches, études et les investigations, notamment mieux comprendre les corrélats de la protection immunitaire contre le VIH restent donc à mener et poursuivre sur ce modèle.

6. Les flavivirus et les flaviviroses

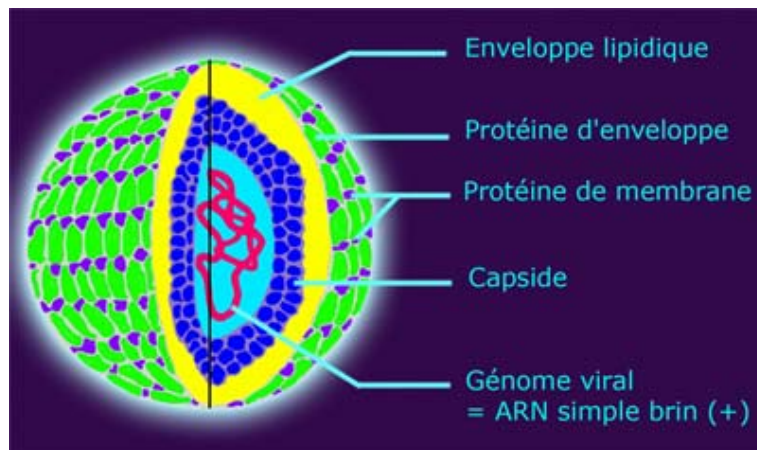
En terme de santé publique, les pays en voie de développement sont également fortement concernés par les flaviviroses. Il s'agit de maladies humaines aiguës associées à des manifestations hémorragiques ou des syndromes méningo-encéphaliques liés aux flavivirus et qui entraînent une forte létalité surtout chez les enfants.

6.1 Les Flavivirus

Les *Flavivirus* (du latin *flavus*: jaune) sont un genre de virus de la famille *Flaviviridae* parmi les arbovirus. Ce groupe comprend entre autres:

- le virus du Nil occidental
- le virus de la dengue
- le virus de l'encéphalite japonaise
- le virus de la fièvre jaune

Ce sont des virus enveloppés d'un diamètre de 40 et 50 nm en moyenne. Leur enveloppe est une bicouche lipidique dérivée de la cellule-hôte, dans laquelle sont ancrées deux glycoprotéines structurales virales, la protéine d'enveloppe (E), impliquée dans le processus d'attachement et d'entrée du virus dans la cellule, et la protéine de membrane (M). Deux formes de la glycoprotéine M ont été caractérisées : prM, contenue dans les virions intracellulaires immatures et précurseur de la protéine structurale M ; et la protéine M, contenue dans les virions extracellulaires matures. Leur génome est contenu dans une nucléocapside de structure icosaédrique, composée d'une troisième protéine structurale, la protéine de capsid (C). Leur génome est un ARN monocaténaire, linéaire, non-segmenté, de polarité positive d'environ 11 000 nucléotides et qui code pour 10 protéines: les 3 protéines structurales, la capsid (C), le précurseur glycosylé de la protéine de Membrane (prM) et l'Enveloppe (E), et 7 protéines non structurales (NS1, NS2a et b, NS3, NS4a et b, NS5) (*Figure 4*).



A



B

Figure 4: Le virus de la dengue. A) Organisation structurale; B) Organisation génomique (<http://www.ilm.pf/Dengueetvecteurs-virus>)

Ces virus sont principalement transmis par les moustiques et les tiques. Ils ont un cycle de réplication semblable entre eux: l'entrée dans la cellule cible se fait grâce à la protéine E qui va se lier aux récepteurs cellulaires et entraîner une endocytose. Le virus est alors embarqué dans une vésicule endosomiale. Le pH acide de cette dernière va entraîner une fusion de l'enveloppe virale et de la membrane endosomiale, relargant alors le génome dans le cytosol. Il est alors directement traduit en une polyprotéine qui va donner les 10 protéines virales. La RNA-dependent-RNA-polymérase va alors copier le génome pour créer un brin "matrice" servant à la réplication de tous les ARN viraux. Les virions immatures formés se retrouvent dans le Réticulum endoplasmique pour être lié aux protoprotéines prM et E, puis vont dans l'appareil de Golgi où une furine va cliver les deux protéines pour permettre au virion de prendre sa forme finale. Les virions matures sont alors transportés par des vésicules et passent dans le milieu extracellulaire par exocytose.

6.2 Les flaviviroses

6.2.1 L'Encéphalite japonaise

L'encéphalite japonaise est une arbovirose liée à un flavivirus et transmise à l'homme et à d'autres animaux comme les oiseaux et le porc (réservoirs) par les moustiques *Culex tritaeniorhynchus* et *Culex vishnui*. La durée d'incubation est de 5 à 15 jours. Même si dans la majorité des cas l'infection est asymptomatique, elle provoque dans un cas sur 200 une atteinte du système nerveux central, avec une mortalité de 60%. Les symptômes principaux correspondent à un syndrome méningé (raideur de la nuque, photophobie, vomissements), associé à des troubles neurologiques périphériques, des troubles de la conscience et des troubles végétatifs. Des séquelles (paralysies, dommages cérébraux) subsistent chez 30% des survivants. Elle touche principalement l'Inde, la Chine, le Japon et le Sud Est asiatique, sous forme d'épidémies annuelles entre mai et septembre, dans les zones rurales. Cette maladie touche essentiellement les enfants de moins de 15 ans, car elle est fortement immunisante. Le tableau clinique ne comporte aucune particularité par rapport à d'autres encéphalites virales. Le diagnostic doit être évoqué selon le contexte épidémiologique (retour d'un séjour dans les zones endémiques). Il sera confirmé par la sérologie par la méthode d'immunocapture ELISA, qui met en évidence les anticorps (IgM) dans le sang et dans le liquide céphalo-rachidien (LCR). Il n'existe pas de traitement spécifique actuellement efficace pour l'encéphalite japonaise, comme il en existe pour l'encéphalite herpétique. Seuls les moyens préventifs (vaccin et anti-moustique) permettent de lutter contre cette affection.

6.2.2 La fièvre jaune

Le virus de la fièvre jaune infecte l'Homme et le Singe. Il est transmis de façon horizontale (entre individus infectés) par différentes espèces de moustiques, dont *Aedes aegypti*, et de façon verticale en subsistant dans les œufs de moustiques, ce qui permet sa persistance d'une année sur l'autre. Les moustiques sont donc à la fois le vecteur et le réservoir de ce virus.

Cette maladie est recensée dans les régions intertropicales d'Amérique du Sud et d'Afrique. En Amérique du Sud, il cause essentiellement des infections sporadiques, presque exclusivement chez les agriculteurs et les personnes travaillant dans les forêts. En Afrique, le

virus de la fièvre jaune est présent dans trois environnements principaux : la savane d’Afrique Centrale et d’Afrique de l’Ouest pendant la saison des pluies, les régions de jungle, et les milieux urbains (villes et villages) où surviennent des épidémies occasionnelles.

Le virus de la fièvre jaune pose un réel problème de santé publique puisque le nombre de cas d’infections est en recrudescence malgré les campagnes de prévention. Les estimations de l’OMS (janvier 2011) se chiffrent à 200 000 infections par an, dont 30 000 morts par an. Le nombre de cas de fièvre jaune a progressé ces deux dernières décennies en raison de la diminution de l’immunité de la population vis-à-vis de cette infection, de la déforestation, de l’urbanisation, des mouvements de population et du changement climatique.

La durée d’incubation du virus de la fièvre jaune est de 3 à 6 jours. La maladie se caractérise principalement par une hépatonéphrite, des hémorragies et un choc hypotensif. L’atteinte hépatique se caractérise par une altération de l’architecture lobulaire du foie et une infiltration microstéatosique des hépatocytes. On observe également une inflammation et une forte nécrose hépatique.

La forme modérée de l’infection est asymptomatique ou provoque un syndrome pseudo-grippal pendant 3 ou 4 jours (fièvre, douleurs musculaires, frissons, perte d’appétit, nausées et/ou vomissements). La fièvre est cependant associée à un pouls faible.

Dans 15% des cas, la maladie évolue en « phase toxique » qui se traduit par une fièvre hémorragique, associée à une atteinte hépatique, dont 50% des cas conduisent à la mort en 10 à 14 jours. Les symptômes sont alors les suivants : fièvre, ictère (jaunisse), douleurs abdominales, vomissements, saignements des yeux, du nez, de la bouche.

La fièvre jaune est une maladie incurable. Le traitement est symptomatique et vise donc à réduire les symptômes pour le confort du patient. Seuls les moyens préventifs (vaccin et anti-moustique) sont actuellement efficaces.

6.2.3 Les infections au Virus du Nil Occidental (West Nile Virus: WNV)

Le virus West Nile est transmis par plusieurs espèces de moustiques principalement du genre *Culex*. Il a été classé du point de vue sérologique dans le complexe antigénique de l’encéphalite japonaise (JE) qui inclut 4 virus apparentés qui causent des infections du système nerveux central : le virus JE en Asie, les virus d’encéphalite St. Louis en Amérique

du Nord et en Amérique du Sud et le virus d'encéphalite Murray Valley en Australie. Il circule surtout chez les oiseaux mais peut aussi infecter différentes espèces de mammifères ainsi que des amphibiens et des reptiles. Cette maladie virale émergente concerne l'Homme et de très nombreuses espèces animales et pose ainsi des problèmes de santé humaine et vétérinaire. Ce virus touche principalement des régions d'Afrique, et d'Europe, mais depuis son introduction aux États-Unis en 1999, l'infection par le WNV est l'une des maladies transmises par les moustiques les plus sérieuses dans l'hémisphère occidental [8] (New York, en 2003, 9000 cas).

Le virus du Nil occidental peut se manifester de trois façons différentes sur les humains. La première est une infection asymptomatique chez la grande majorité des gens qui ne présentent aucun trouble apparent (80 % des cas passent inaperçus), la seconde est un syndrome grippal, connu sous le nom de fièvre du Nil Occidental, la troisième enfin, est une maladie neuroinvasive appelée méningite ou encéphalite du Nil occidental. Dans la seconde éventualité, l'épisode fébrile apparaît après une période d'incubation de 3 à 6 jours. Il se caractérise par la survenue, accompagnée de maux de tête et de dos, de frissons, de sueurs, de douleurs musculaires, d'un gonflement des ganglions du cou, d'une toux, et de symptômes respiratoires. En plus de ce syndrome grippal, il existe parfois une brève éruption cutanée et certains patients présentent des symptômes gastro-intestinaux avec des nausées, des vomissements, une perte d'appétit ou des douleurs abdominales, ainsi que de la diarrhée. Tous les symptômes sont spontanément résolutifs en 7 à 10 jours, mais la fatigue peut se prolonger pendant plusieurs semaines et les adénopathies persister jusqu'à deux mois. Dans moins de 15% des cas, des complications peuvent survenir telles que méningites, encéphalites ou autres (hépatite, pancréatite, néphrite ou myocardite). L'encéphalite qui est la forme la plus grave se manifeste par des symptômes similaires aux précédents mais aussi par une baisse de la vigilance, pouvant aller jusqu'à un état comateux. Les réflexes ostéo-tendineux sont d'abord vifs, puis abolis. Il existe également des troubles extrapyramidaux. La récupération est marquée par une longue période de convalescence avec une grande fatigue avec des risques de séquelles et une mortalité d'environ 10 %.

Les manifestations du virus du Nil occidental ont coïncidé ces dernières années avec l'apparition d'un variant fortement virulent, la souche Isr98/NY99, qui circule en Amérique du Nord et au Moyen-Orient [9].

Il n'existe ni vaccins ni traitements contre cette maladie, mais l'utilisation préventive d'anti-moustiques est efficace.

L'immunité humorale joue un rôle important dans la résolution de l'infection. Les anticorps neutralisants anti-WNV sont principalement dirigés contre la glycoprotéine d'enveloppe (gpE), qui est exposée sur la surface du virion et est responsable de l'attachement du virus et de la fusion virus spécifique à la membrane cellulaire.

On distingue deux sous-types, caractérisés par des variations antigéniques de la protéine d'enveloppe, sites de N-glycosylation sur les acides aminés 154 à 156.

6.2.4 La dengue

Le virus de la dengue est transmis par les moustiques *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus*. Il existe quatre sérotypes de dengue (DEN1, DEN2, DEN3 et DEN4), lesquels sont sérologiquement liés mais antigéniquement distincts. Chaque sérotype comprend une variété de sous-types classés par l'analyse phylogénétique de leur génome, essentiellement des parties ou la totalité de la séquence du gène d'enveloppe E. L'infection par le virus de la dengue induit une immunité durable contre le sérotype infectant, mais il n'y a pas d'immunité croisée à long terme contre les autres sérotypes.

Cette maladie presque exclusivement humaine est présente dans toutes les zones tropicales et environ 50 millions de personnes sont infectées chaque année. Son aire de répartition est en expansion constante, et environ 2,5 milliards de personnes sont aujourd'hui exposées.

La forme normale de la maladie provoque un syndrome grippal pendant en général cinq jours avec fièvre, éruptions cutanées, céphalées éventuelles, maux de gorge, douleurs abdominales et rétro-orbitales, myalgies, nausées voire une anorexie dans les cas plus sévères.

Dans le cas de la forme sévère (dengue hémorragique), 1% des cas soit 500 000 par an, les symptômes sont similaires, mais s'accompagnent d'une forte fièvre, d'une léthargie, d'une altération de l'état général et de signes hémorragiques (saignements muqueux, purpura, ecchymoses). Elle peut évoluer vers une défaillance cardiovasculaire (syndrome de choc de la dengue).

En l'absence de prise en charge efficace, le taux de mortalité de la dengue hémorragique s'élève à 5% et à 40% quand la maladie évolue en syndrome de choc de la dengue.

La dengue suit un mécanisme de facilitation : le risque de survenue d'une forme grave est augmenté lors d'une seconde infection notamment par un sérotype différent. En effet, lors d'une première infection, le système immunitaire produit des anticorps dirigés contre les

protéines de surface du virus. Cette infection est donc efficacement combattue et donne seulement un syndrome grippal. Lors d'une seconde infection par un autre sérotype, la réponse immunitaire utilise les anticorps produits précédemment car les protéines de surface des différents sérotypes sont très proches. Cependant, les anticorps ne suffisent pas à inactiver le virus, qui infecte alors les macrophages attirés par les complexes anticorps/virus. Ceci entraîne la sécrétion de cytokines qui perméabilisent l'endothélium des vaisseaux sanguins, d'où la perte de liquide corporel et la survenue d'hémorragie [10].

Des traitements symptomatiques permettent de limiter la perte de liquide corporel. La prévention contre le virus de la dengue s'appuie pour l'instant uniquement sur les anti-moustiques.

6.3 Vaccin existants contre les flaviviroses

Il n'existe pas de vaccins contre toutes les flaviviroses, seuls quelques uns ont pu être développés.

6.3.1 Vaccin contre la fièvre jaune

C'est un vaccin anti-amaril vivant atténué produit sur des cellules d'embryons de poulet. Depuis 1986, la souche 17D-204 est utilisée. Ce vaccin confère une protection durable et efficace contre la fièvre jaune avec une efficacité d'au moins 99%. Son administration est contre indiquée chez les enfants de moins de 9 mois, chez les femmes enceintes et chez les individus immunodéficients. Le vaccin antiamaril est sûr, d'un prix abordable et il confère en une semaine une protection immunitaire efficace à 95 % des sujets vaccinés. Une seule dose confère une protection pour au moins 30 à 35 ans, et probablement à vie. Les effets secondaires graves sont extrêmement rares même si des cas de maladie vaccinale neurotrophe et viscérotrophe ont été observés.

6.3.2 Vaccin contre l'encéphalite japonaise

Plusieurs vaccins contre l'encéphalite japonaise sont actuellement disponibles sur le marché. Le vaccin inactivé BYKEN, utilisé en Asie du sud-est depuis 1950, a permis de contrôler la maladie au Japon, à Taiwan et en Corée. Ce vaccin est distribué au niveau mondial (JEVAX, sanofi pasteur). Ce vaccin est très réactogène et est constitué d'une suspension virale de la souche Nakayama inactivée obtenue après purification de tissu cérébral de souris infectées. L'immunisation nécessite 2 ou 3 primo-injections suivies d'un rappel annuel. Ce besoin de plusieurs doses ne facilite pas la vaccination des pays pauvres. De plus, des réactions allergiques et neurologiques ont été observées après vaccination. Un vaccin vivant atténué contre l'encéphalite, dérivé empirique de la souche SA14-14-2, produite sur les cellules primaires de rein de hamster est actuellement utilisé en Chine. Cependant le processus de production et le substrat cellulaire utilisé pour produire les virus doivent être améliorés pour répondre aux exigences réglementaires internationales.

6.3.3 Vaccin contre l'encéphalite à tique

C'est un vaccin inactivé produit sur des cellules embryonnaires de poulet. Le schéma de vaccination est basé sur au moins 2 doses de primo-vaccination suivies d'un rappel à un an puis des doses administrées périodiquement pour maintenir l'immunité. L'efficacité du vaccin est d'environ 97-98%. Des recherches sont actuellement en cours pour augmenter la pureté de l'Ag et supprimer les protéines dérivées de stabilisation afin de diminuer les effets secondaires, simplifier le schéma vaccinal et limiter les coûts de vaccination.

6.3.4 Vaccin contre la dengue

Il n'existe actuellement sur le marché aucun vaccin contre la dengue mais plusieurs sont en cours de développement. Ces vaccins sont particulièrement difficiles à mettre au point car ils doivent nécessairement immuniser contre les 4 sérotypes à la fois pour éviter les phénomènes de facilitation. Leur mise au point est entravée par le manque de modèle expérimental acceptable, une apparente implication du système immunitaire dans la pathogénèse de la maladie et la non connaissance de corrélats de protection. Le vaccin le plus prometteur semble être le vaccin dengue tétravalent CYD (tétravalent dengue vaccine: TDV). Ce vaccin candidat

est composé de 4 vaccins vivants atténué (CDY 1-4) basés sur le squelette du vaccin de la fièvre jaune 17D, chacun exprimant les gènes de pré-membrane et d'enveloppe d'un des 4 sérotypes du virus de la dengue. Ce vaccin est génétiquement et phénotypiquement stable, non viscérotrope et moins neurovirulent que celui de la fièvre jaune. Des études précliniques *in vitro* et *in vivo* montrent que ce vaccin induit une stimulation contrôlée des cellules dendritiques humaines et une réponse immunitaire chez le singe. Il a été administré à plus de 6000 enfants et adultes de zones endémiques et non-endémiques pour la dengue et aucun problème de sécurité n'a été observé [11]. Des études de phase III sont actuellement en cours.

7. Vecteur de la rougeole recombinant pour les vaccins à flavivirus: Induction d'une immunité protectrice

Compte tenu de l'absence de vaccins contre certaines flaviviroses, les besoins face à ces maladies graves notamment dans les pays en voie de développement et les résultats obtenus avec le vecteur recombinant VR-VIH, l'équipe de F. Tangy et *al.* a décidé de tester si l'immunisation par un vecteur rougeole pouvait protéger contre un virus hétérologue et médicalement important comme le flavivirus. Dans un premier temps, ils cherchèrent à protéger contre le virus du Nil occidental (West Nile Virus (WNV)) [12].

7.1 Immunisation concomitante contre la rougeole et le WNV

Ce virus a été initialement choisi car la souche Is-98-st1 du WNV induit chez les souris adultes une maladie neuro-invasive type encéphalite extrêmement létale et similaire à la maladie humaine. Ils ont donc produit un vecteur recombinant rougeole Schwarz exprimant la forme secrétée de la glycoprotéine E, glycoprotéine permettant d'obtenir une immunité protectrice contre l'infection au WNV, de la souche Is-98st1 du WNV, une souche voisine de la souche Isr98/NY99 (vecteur MVSchw-sE_{WNV}). Suite aux observations précédentes montrant que la croissance du vecteur VR exprimant des glycoprotéines virales d'ancrage membranaire était légèrement retardée, ils introduisirent un ADNc codant pour la glycoprotéine E tronquée de son groupe carboxyle terminal et de sa région d'ancrage transmembranaire (résidus E-1 à E-441; désigné par sE_{WNV}) de la souche IS-98-ST1 dans

l'ADNc du vaccin rougeole Schwarz (figure 5A). Les séquences WNV ont été introduites au niveau d'un site UAT localisé entre les gènes P et M dans le génome du VR. Ce virus recombinant MVSchw-sE_{WNV} était produit après transfection du plasmide correspondant dans des cellules T auxiliaires humaines permettant de délivrer l'ARN de parmyxovirus et ensuite sa propagation dans les cultures de cellules Vero. La croissance du vecteur MVSchw-sE_{WNV} dans les cellules Vero était seulement légèrement retardée comparée au VR Schwarz vide (figure 1B). 60 heures après l'infection, le taux de MVSchw-sE_{WNV} était comparable à celui du VR Schwarz. L'expression de sE_{WNV} dans les cellules Vero infectées par le MVSchw-sE_{WNV} a été déterminée par immunofluorescence et par des tests de radio-immunoprécipitation après 4 passages du vecteur MVSchw-sE_{WNV} sur les cellules Vero (figures 5C and 5D). 40 h après infection, la glycoprotéine gE du WNV était détectée par immunofluorescence dans les syncytia de cellules Vero infectés par le VRSchw-sE_{WNV} (marquage avec un ascite anti-WNV 1). Les analyses par radio-immunoprécipitation ont montrées que les Ac anti-WNV reconnaissaient la glycoprotéine sE_{WNV} qui avait migré plus rapidement que la glycoprotéine E authentique (figure 5D). Ce vecteur recombinant exprimait donc des niveaux élevés de la glycoprotéines E du WNV secrétés efficacement par des cellules infectées, même après 10 passages du virus recombinant (figure 5).

L'efficacité de ce vecteur rougeole recombinant à protéger contre une encéphalite expérimentale causée par le WNV a été évaluée chez le modèle murin. Des souris génétiquement modifiées exprimant le récepteur du VR humain CD46 mais ne présentant pas le récepteur IFN- α /b (CD46-IFNAR) sensibles à l'infection VR ont été utilisées pour évaluer la réponse immunitaire induite par le vecteur MVSchw-sE_{WNV}. L'immunisation de la souris avec une faible dose de vecteur MVSchw-sE_{WNV} a induit la production de niveaux élevés d'anticorps (Ac) neutralisants contre le WNV et a diminué la létalité avec le WNV. Cette protection a été observée rapidement dès 8 jours après l'administration d'une faible dose de virus recombinant et les souris restaient protégées pendant 6 mois après l'immunisation. Cette efficacité protectrice de ce vaccin candidat a également été confirmée chez le modèle primate, des singes écureuils (*Saimiri sciureus*). En effet, une simple dose du vaccin recombinant réduirait la charge virale de 99,85%. Cet exemple est la preuve qu'un vaccin recombinant basé sur le vecteur vivant atténué de la rougeole peut induire une complète protection contre une maladie virale hétérologue.

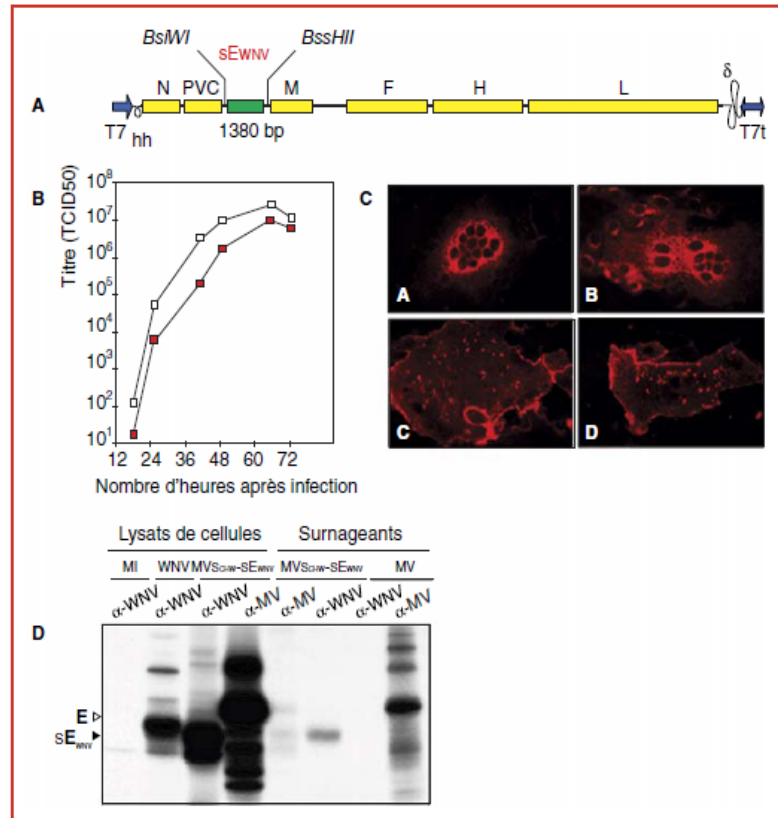


Figure 5: Expression de la glycoprotéine *sE* du WNV par le virus recombinant *MVSchw-sE_{WNV}* dans les cellules Vero infectées. A) Représentation schématique du génome du *MVSchw-sE_{WNV}*. B) Cinétiques de croissance du *MVSchw-sE_{WNV}* dans les cellules Vero (*MVSchw*, symboles ouverts et *MVSchw-sE_{WNV}* symboles pleins). C) Détection par immunofluorescence de la glycoprotéine *gE* du WNV dans les syncytia de cellules Vero infectés par le *MVSchw-sE_{WNV}* (marquage avec un ascite anti-WNV, A-B les cellules ont été perméabilisées au triton, C-D les cellules n'ont pas été perméabilisées). D) Radio-immunoprécipitation des protéines WNV montrant la sécrétion de la protéine *sE_{WNV}* par les cellules Vero infectées par le *MVSchw-sE_{WNV}* (immunoprécipitation avec des sérums polyclonaux spécifiques anti-MV et anti-WNV).

Avec sa capacité à induire une immunité protectrice forte et durable, le VR vivant atténué recombinant exprimant la glycoprotéine E du WNV pourrait servir de vaccin destiné à la prévention simultanée de la rougeole et de l'encéphalite du Nil occidental. Compte-tenu de la transmission hétéro-spécifique, la crainte est que le WNV crée une zoonose récurrente en

Amérique du Nord avec des manifestations saisonnières répétées chez les humains. Avec sa capacité à induire une immunité forte et persistante contre la rougeole et le WNV, le vecteur MVSchwsE_{WNS} offre la possibilité d'induire chez les enfants et les adolescents une immunité protectrice à long terme contre la rougeole et le WNV qui pourrait être naturellement rappelée en cas d'exposition au WNV.

7.2 Immunisation concomitante contre la rougeole et la dengue

Le vecteur recombinant du VR pédiatrique utilisé pour immuniser simultanément contre la rougeole et la dengue apparaît également particulièrement attractif dans les régions en Afrique, Asie du Sud-Est et en Amérique du Sud où ces 2 maladies menacent les enfants.

Un vaccin préventif contre la dengue devra cependant protéger les individus non exposés contre les 4 sérotypes de la dengue avec une immunité sur le long terme.

L'utilisation d'un simple vecteur exprimant un antigène (Ag) tétravalent pourrait pallier les problèmes d'interférences rencontrées par l'utilisation de 4 virus vivants atténués comme vaccin tétravalent candidat et semblerait moins coûteux à produire.

L'ectodomaine de la glycoprotéine E du virus de la dengue est repliée en 3 domaines distincts I, II et III. Les épitopes induisant les Ac qui interagissent entre les sérotypes sont localisés dans le domaine II contenant le peptide de fusion. Au contraire, le domaine Ig-like C-terminal EDIII est constitué d'une séquence de 100 acides aminés stabilisée par une liaison unique disulfure et contient les épitopes critiques générant les Ac neutralisants majeurs spécifiques des sérotypes. Par conséquent, l'EDIII est devenu l'Ag de choix pour être inclus dans le vaccin contre la dengue et pour exprimer des sérotypes spécifiques plutôt que des Ac de réactions croisées. En utilisant cette approche, l'équipe de F. Tangy et *al.*, a dans un premier temps, construit un Ag combiné composé de l'EDIII fusionné à l'ectodomaine de la protéine de membrane (ectoM) du sérotype-1 du virus de la dengue a minima capable de générer des Ac neutralisant contre DV-1 mais incapables d'induire des Ac contre les autres souches du virus de la dengue par réaction croisée afin d'éviter tout risque d'augmentation de l'infection Ac-dépendante [13]. L'immunisation des souris confirmait cette production sur le long terme des Ac neutralisants spécifiques du sérotype DV-1 qui n'interagissaient pas avec les autres sérotypes du virus de la dengue. La présence de la séquence ectoM pro-apoptotique était critique pour l'immunogénicité d'EDIII, sa capacité d'adjuvant étant corrélée à sa capacité d'entraîner la maturation des cellules dendritiques, la sécrétion de cytokines proinflammatoires et antivirales et de chémokines impliquées dans l'immunité adaptative.

Basé sur ces résultats et compte tenu de la grande capacité de clonage du vecteur MV, ils ont élaboré 3 Ag tétravalents (TetraA, TetraB, TetraC) du virus de la dengue permettant l'expression de l'EDIII de chacun des 4 sérotypes du virus de la dengue comme des Ag individuels (figure 6) [14]. Le court segment (E290 – E300) entre l'EDI et l'EDIII suffisamment flexible pour permettre l'ancrage de l'EDIII pendant le processus de fusion, a été conservé comme lien entre les séquences de chaque EDIII.

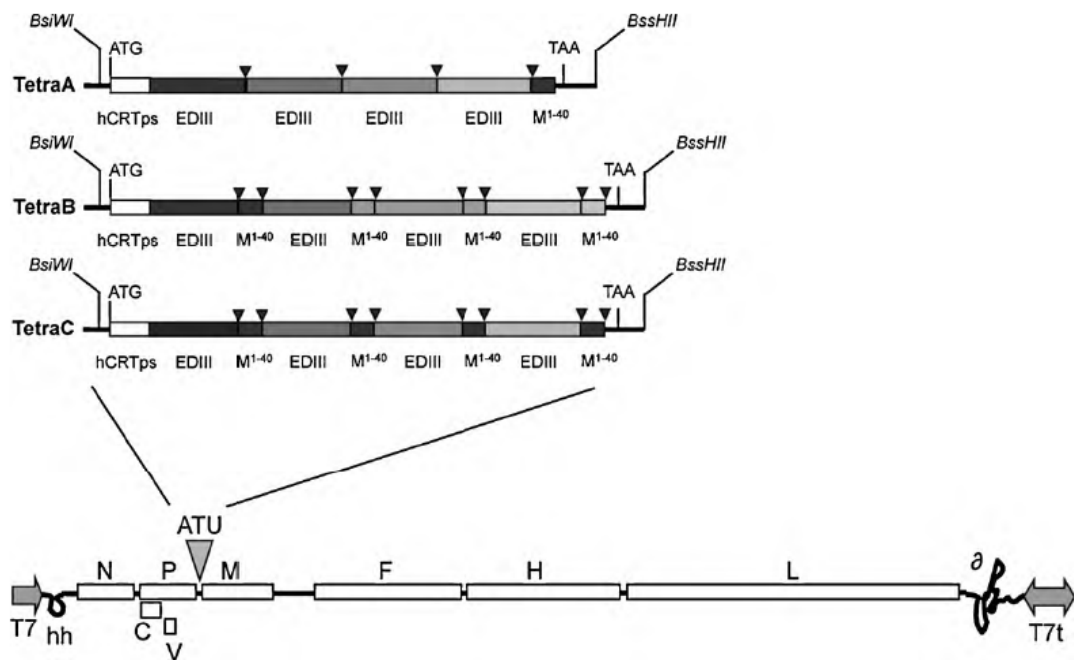


Figure 6: Représentation schématique des constructions du virus de la dengue tétravalent et du vecteur du VR recombinant. La séquence humaine du peptide signal de calreticuline (hCRTPs), le domaine III de l'enveloppe E (EDIII) des virus de la dengue 1, 2, 3 et 4 et l'ectodomaine M sont indiqués. Le site de clivage « furine-like » original RRDKR et les positions des acides aminés sont indiquées. Les séquences TetraA, B et C ont été clonées en position ATU du vecteur du VR en utilisant les sites BsiWI/BssHIII. Les gènes du VR sont indiqués comme suit: nucléoprotéine (N), phosphoprotéine et protéines accessoires V/C (PVC), matrice (M), fusion (F), hémagglutinine (H) et polymérase (L). L'ARN promoteur de la polymérase T7 (T7t), le rybozyme de l'hépatite delta (h), le rybozyme en forme de tête de marteau (hh).

Dans un modèle d'infection au VR, ils ont ainsi démontré que l'un des vecteurs recombinants induisait efficacement des Ac neutralisants contre les 4 sérotypes du virus de la dengue.

La détection des Ag intracellulaires du virus de la dengue dans les cellules Vero infectées par le VR recombinant a été dans un premier temps évaluée par immunofluorescence et avec des Ac monoclonaux spécifiques de l'EDIII. Les Ag du virus de la dengue étaient clairement immunocolorés indiquant que les 3 vecteurs VR recombinants étaient efficaces pour produire l'EDIII des 4 sérotypes du virus de la dengue (*figure 7*).

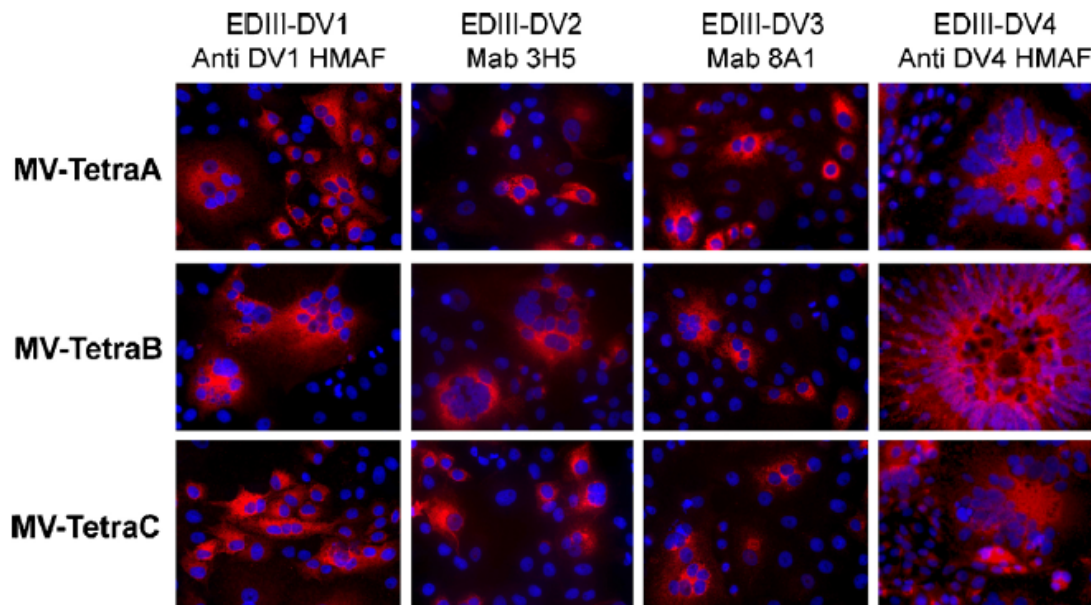


Figure 7: Détection par immunofluorescence des Ag EDIII des VD 1, 2, 3 et 4 sur des cellules Vero infectées pendant 24h avec VR-TetraA, B ou C. La présence des Ag EDIII du VD était détectée par immunofluorescence sur des cellules Vero infectées pendant 24h par les vecteurs recombinants VR. L'EDIII du VD1 a été détecté en utilisant un liquide hyper-immun d'ascite anti-DV1. L'EDIII du VD2 a été détecté en utilisant l'AGM 3H5. L'EDIII du VD3 a été détecté en utilisant l'AGM 8A1 et l'EDIII du VD4, en utilisant un liquide hyper-immun d'ascite anti-DV4. Tous les Ac du VD ont été utilisés à une dilution 1/1000 et les Ac secondaires à une concentration à 1/5000.

La stabilité d'expression a été vérifiée par RT-PCR et séquençage de l'ARN viral produit dans les cellules infectées après 5 passages des virus recombinants. Ils ont également analysé la production d'Ag du virus de la dengue recombinant par le suivi des formes intracellulaires et extracellulaires d'EDIII individuel dans les cellules Vero infectées par le VR recombinant par immunoblot. Concernant la répllication des virus recombinants VR-TetraA, VR-TetraB and VR-TetraC dans les cellules Vero (sécrétion dans le surnageant), les résultats montraient une croissance similaire du VR-Tetra A mais beaucoup moindre pour les VR-TetraB et VR-

TetraC. Cette diminution de la croissance virale semblerait due à l'accumulation de protéines ectoM par le vecteur VR qui augmenterait les propriétés apoptotiques du virus recombinant. L'immunogénicité des 3 virus recombinants VR-TetraA, VR-TetraB et VR-TetraC a été testée chez des souris génétiquement modifiées susceptible à l'infection au VR (CD46-IFNAR, exprimant le récepteur humain des souches vaccinales du VR, CD46 et inhibant le récepteur de l'interféron), précédemment utilisées comme modèle pour évaluer l'immunogénicité du VR recombinant (*figure 8*). Seules les souris immunisées avec le vecteur DV-TetraA présentaient des Ac contre les 4 sérotypes VD. Pour cette raison, les vecteurs DV-TetraB et DV-TetraC n'ont pas été retenus.

Ils ont ensuite déterminé l'activité neutralisante contre les 4 sérotypes du VD dans les sérums de souris immunisées par VR-TetraA (test de réduction de foyers de neutralisation sur cellules Vero) et ont constaté que le VR-TetraA était capable d'induire des Ac neutralisants contre les 4 sérotypes du VD. Ils ont aussi observé que les Ac neutralisants mémoires étaient fortement réactivés après inoculation du VD2 vivant. Pour déterminer si l'administration d'un sérotype du VD pouvait entraîner une réponse anamnésique contre d'autres sérotypes du VD, ils ont analysé l'activité neutralisante de sérums de souris inoculés avec chaque sérotype du VD contre chacun des autres sérotypes. Les données montrent clairement que l'administration d'un des sérotypes stimule une forte réponse neutralisante mémoire contre les 4 sérotypes chez des souris immunisées avec VR-TetraA. Comme les Ac neutralisants sont corrélés à la protection contre la maladie de la dengue, ces résultats suggèrent que les individus qui seraient vaccinés pourraient être protégés contre les infections de chacun des sérotypes, évitant le risque d'augmentation de l'infection Ac-dépendante après vaccination avec ce vaccin candidat.

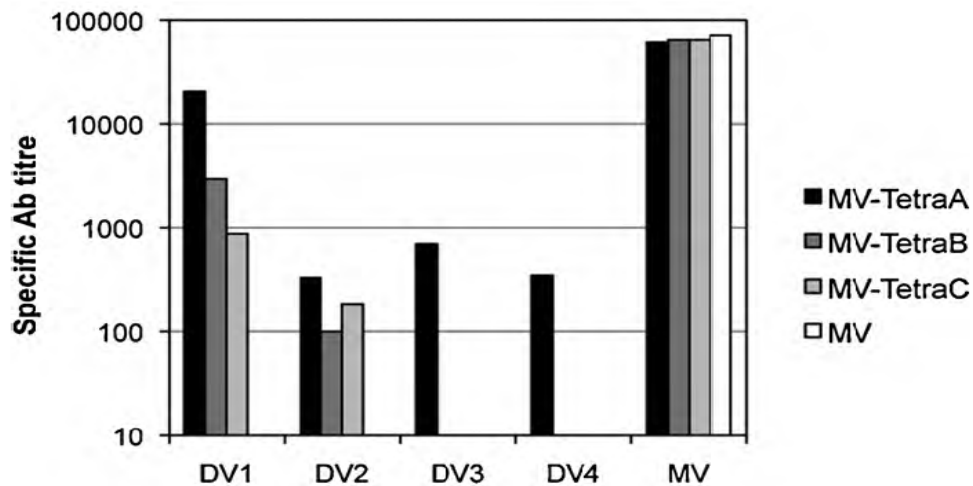


Figure 8: Réponse en Ac des souris CD46-IFNAR à l'immunisation avec VR-TetraA, VR-TetraB et VR-TetraC. 10^5 TCID₅₀ du VR, VR-TetraA, VR-TetraB ou VR-TetraC ont été administrés à des souris CD46-IFNAR à 1 mois d'intervalle (6 souris par groupe). Les titres en Ac anti-VD et anti-VR ont été déterminés par ELISA sur des sérums groupés inactivés par chauffage et collectés 1 mois après immunisation.

8. Avantages du vecteur rougeole et questions à résoudre

Plusieurs avantages à utiliser le VR comme vecteur de vaccination existent et ont été montrés:

- le VR ne code qu'un nombre restreint de protéines, évitant de ce fait la génération de réponses immunes inutiles contre un grand nombre d'antigènes du vecteur;
- il n'y a pas d'intégration du génome viral;
- le VR possède une excellente stabilité génétique;
- aucune recombinaison n'a été démontrée parmi les paramyxovirus;
- aucune persistance ni diffusion des souches atténuées du VR n'ont été démontrées;
- le vaccin atténué contre la rougeole est largement répandu dans le monde et présente un excellent rapport efficacité/sûreté;
- un grand nombre de doses de vaccin pourront être produites facilement et très économiquement;
- la vaccination contre la rougeole sera exigée pendant encore de longues années à venir et probablement pour toujours; en effet, l'éradication de la rougeole paraît aujourd'hui un objectif difficilement réalisable.

- il y a une bonne expérience pratique de l'application du vaccin contre la rougeole par voie aérosol. Ainsi, les vecteurs rougeole offrent la possibilité intéressante d'induire efficacement une immunité neutralisante muqueuse contre les antigènes véhiculés ;

Cependant, ces avantages pourraient s'avérer inutiles si la préexistence d'une immunité contre le vecteur altérait sévèrement l'utilisation des vecteurs rougeole chez l'homme. La présence d'immunité anti-rougeole dans la quasi-totalité de la population adulte humaine semblerait limiter l'utilisation des vecteurs rougeole recombinants aux enfants en bas âge. Cependant, des essais cliniques à grande échelle ont prouvé que la revaccination d'individus déjà immunisés induisait une poussée des anticorps anti-rougeole, suggérant que le vaccin vivant atténué de rappel se soit répliqué et ait exprimé ses protéines malgré l'immunité préexistante [15]. Des études de l'immunité cellulaire induite chez des enfants vaccinés contre la rougeole avant l'âge d'un an ont montré que la présence d'anticorps maternels anti-rougeole n'empêche pas l'induction des réponses cellulaires anti-rougeole et que ces réponses sont très efficacement rappelées ensuite [16]. On pourrait ainsi espérer pouvoir vacciner des adultes contre un antigène étranger avec un vecteur rougeole recombinant. Des expériences chez les souris et les macaques ont montré que les virus rougeole-VIH pouvaient induire des anticorps anti-VIH en présence de pré-immunité contre la rougeole [7]. Par ailleurs, les travaux développés par les groupes de R. Cattaneo et S. Russell ont démontré qu'en modifiant l'hémagglutinine du virus de la rougeole, on pouvait obtenir un reciblage du virus sur d'autres récepteurs que CD46 et CD150 et donc, possiblement, échapper en partie à une immunité préexistante [17]. La capacité des vecteurs rougeole à induire une immunité contre des protéines additionnelles chez des adultes déjà vaccinés contre la rougeole reste à évaluer. Des essais cliniques de phase I devront être réalisés pour évaluer la sûreté des vecteurs rougeole. De tels essais devront définir la dose appropriée de vecteur recombinant et démontrer un profil acceptable de réactivité et un niveau acceptable d'excrétion virale *in vivo*. L'absence de transmission du virus recombinant entre des macaques immunisés et des macaques naïfs a déjà été observée. Il conviendrait de documenter chez l'homme les capacités de propagation du virus recombinant excrété.

9. Conclusion

Le développement d'un nouveau vaccin vivant atténué chez l'homme pose un certain nombre de problèmes scientifiques, industriels, économiques et éthiques. Ce vaccin doit être suffisamment atténué pour n'induire aucun effet indésirable tout en gardant ses propriétés protectrices aux faibles doses maximales qui sont admises pour ce type de vaccin. Il doit être stable génétiquement, aussi bien au cours de la production *in vitro* qu'après injection chez l'hôte. Les normes sanitaires imposées pour la fabrication d'un vaccin vivant atténué sont très restrictives et leur coût impose une production en masse pour assurer la rentabilité de ce type de vaccin. Le développement d'un vecteur basé sur un vaccin déjà en usage chez l'homme est un avantage majeur car l'ensemble de ces questions est connu et les problèmes ont déjà été résolus pour le vaccin original.

Peut-on envisager de remplacer dans certaines régions du monde le vaccin contre la rougeole standard par un vaccin recombinant capable d'immuniser également contre le VIH ou contre les maladies à flavivirus? Si le nouveau vaccin protège aussi efficacement de la rougeole que le vaccin original et induit une immunité utile à la protection contre une autre maladie virale telle que la dengue ou les fièvres hémorragiques, la réponse est certainement oui. Seuls des essais cliniques permettront d'évaluer la sûreté et l'efficacité de cette approche. Nous aurons la réponse dans quelques années!

Références bibliographiques

- 1.- Recombinant vector derived from live attenuated measles virus: Potential for flavivirus vaccines - Samantha Brandler, Frédéric Tangy - *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 31 (2008) 271–291.
- 2.- Measles virus receptors: SLAM and CD46. Dhiman N, Jacobson RM, Poland GA. *Rev Med Virol* 2004;14(4): 217–29.
- 3.- Measles virus: cellular receptors, tropism and pathogenesis. Yanagi Y, Takeda M, Ohno S. *J Gen Virol* 2006;87(Pt 10): 2767–79.
- 4.- Weekly epidemiological record – Relevé épidémiologique Hebdomadaire – WHO – 2009, 84, 349-360.
- 5.- Rescue of measles viruses from cloned DNA.- Radecke F, Spielhofer P, Schneider H, *et al.* Radecke F, et al. *EMBO J* 1995 ; 14 : 5773-84.
- 6.- A Molecularly Cloned Schwarz Strain of Measles Virus Vaccine Induces Strong Immune Responses in Macaques and Transgenic Mice - Chantal Combredet, Valérie Labrousse, Lucile Mollet, Clarisse Lorin, Frédéric Delebecque, Bruno Hurtrel, Harold McClure, Mark B. Feinberg, Michel Brahic, and Frédéric Tangy – *Journal of Virology*, Nov. 2003, p. 11546–11554 Vol. 77, No. 21.
- 7.- A Single Injection of Recombinant Measles Virus Vaccines Expressing Human Immunodeficiency Virus (HIV) Type 1 Clade B Envelope Glycoproteins Induces Neutralizing Antibodies and Cellular Immune Responses to HIV - Clarisse Lorin, Lucile Mollet, Frédéric Delebecque, Chantal Combredet, Bruno Hurtrel, Pierre Charneau, Michel Brahic, and Frédéric Tangy – *Journal of Virology*, Jan. 2004, p. 146–157 Vol. 78, No. 1.
- 8.- Petersen LR, Marfin AA, Gubler DJ. West Nile virus. *JAMA* 2003; 290:524–8.

- 9.- Lanciotti R, et al. Complete genome sequences and phylogenetic analysis of West Nile virus strains isolated from the United States, Europe, and the Middle East. *Virology* 2002; 298(1): 96–105.
- 10.- Halstead SB, Nimmannitya S, Cohen SN. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. IV. Relation of disease severity to antibody response and virus recovered. *Yale J Biol Med* 1970; 42(5):311–28.
- 11.- Clinical development of the Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine - Bruno Guya, Beatrice Barrerea, Claire Malinowskib, Melanie Savillea, Remy Teyssouc, Jean Langa – *Vaccine* Volume 29, Issue 42, 23 September 2011, Pages 7229-7241.
- 12.- Live Measles Vaccine Expressing the Secreted Form of the West Nile Virus Envelope Glycoprotein Protects against West Nile Virus Encephalitis - Philippe Desprès, Chantal Combredet, Marie-Pascale Frenkiel, Clarisse Lorin, Michel Brahic, and Frédéric Tangy - *JID* 2005:191 (15 January) – p207-214.
- 13.- Pediatric Measles Vaccine Expressing a Dengue Antigen Induces Durable Serotype-specific Neutralizing Antibodies to Dengue Virus - Samantha Brandler, Marianne Lucas-Hourani, Arnaud Moris, Marie-Pascale Frenkiel, Chantal Combredet, Michèle Février, Hugues Bedouelle, Olivier Schwartz, Philippe Desprès, Frederic Tangy - *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2007, Volume 1, Issue 3, e96; 1-12.
- 14.- Pediatric measles vaccine expressing a dengue tetravalent antigen elicits neutralizing antibodies against all four dengue viruses - Samantha Brandler, Claude Ruffie, Valérie Najburg, Marie-Pascale Frenkiel, Hughes Bedouelle, Philippe Desprès Frédéric Tangy - *Vaccine* 28 (2010) 6730–6739.
- 15.- Persistence of measles antibody two years after revaccination by aerosol or subcutaneous routes. Dilraj A, Cutts F, Bennett J, Fernandez de Castro J, Cohen B, Coovadia H. *Pediatr Infect Dis J* 2000 ; 19 : 1211-3.

16.- Measles and mumps vaccination as a model to investigate the developing immune system: passive and active immunity during the first year of life Gans H, DeHovitz R, Forghani B, Beeler J, Maldonado Y, Arvin AM.. *Vaccine* 2003 ; 21 : 3398-405.

17.- Antibody-targeted cell fusion - Nakamura T, Peng KW, Vongpunsawad S, *et al.*. *Nature Biotechnol* 2004 ; 22 : 331-6.