Le syndrome de choc de dengue : vers un décryptage de la physiopathologie

Devignot S, Tolou H, Couissinier-Paris P

Institut de Recherche Biomédicales des Armées, Antenne de Marseille (IMTSSA), Unité de Virologie Tropicale, France.

Med Trop 2010 ; **70** : 288-301

RÉSUMÉ • Principale arbovirose humaine, la dengue se présente sous différentes formes cliniques, dont certaines peuvent évoluer vers des complications mortelles, tel le syndrome de choc de dengue. A l'heure actuelle, les moyens de prédiction et de traitement spécifique de ce choc hypovolémique font défaut et rendent difficile la prise en charge des patients atteints de dengue. Cette revue propose de faire l'état des connaissances sur la physiopathologie du syndrome de choc, et de souligner les apports de nouvelles techniques d'exploration dans les approches « translationnelles » entre recherche et clinique, pour l'investigation de la réponse de l'individu au cours du choc de dengue.

MOTS-CLÉS • Dengue. Syndrome de choc. Physiopathologie.

DENGUE SHOCK SYNDROME: DECODING THE PATHOPHYSIOLOGY

ABSTRACT • Considered as major human arbovirosis, dengue occurs in several clinical forms. Some forms can lead to fatal complications such as dengue shock syndrome. This hypovolemic shock cannot be predicted and specific curative treatments are still lacking, and thus management of patients with dengue is difficult. The purpose of this review is to describe state-of-the-art of the knowledge on the pathophysiology of shock syndrome and to highlight the interest of high-content screening methods in translational approaches between research and medicine for investigation of individual response during dengue shock syndrome.

KEY WORDS • Dengue. Shock syndrome. Pathophysiology

La dengue est aujourd'hui la principale arbovirose humaine et un problème majeur de santé publique dans les pays tropicaux et sub-tropicaux. Elle se présente sous différentes formes cliniques, dont certaines peuvent évoluer vers des complications mortelles, la plus fréquente étant le syndrome de choc de dengue. Ce choc hypovolémique survient de façon aléatoire, et les moyens pour le prédire et le traiter spécifiquement font défaut. Le décryptage des mécanismes conduisant au dysfonctionnement de l'endothélium, site et acteur de la fuite plasmatique, devrait rendre le dépistage et la prise en charge des patients plus aisés et performants, à l'usage de tous les cliniciens confrontés à cette infection. Objet de nombreuses recherches, cette physiopathologie apparaît aujourd'hui complexe, associant probablement des aspects spécifiques et d'autres communs à d'autres syndromes inflammatoires systémiques infectieux ou non. L'analyse combinée des différentes hypothèses proposées et des observations faites chez les patients, en particulier par des techniques récentes d'exploration largement multiparamétriques, permet aujourd'hui dans une approche translationnelle entre les domaines de la recherche et de la démarche clinique, de proposer des pistes qui pourraient accompagner le clinicien en termes d'aide à la décision en vue de l'amélioration de la prise en charge des patients.

• *Correspondance : parisp@imtssa.fr*
• *Article reçu le 31/03/2010, définitivement accepté le 20/05/2010.*

La dengue, une maladie émergente

La dengue est infection virale aiguë qui connaît une forte expansion géographique depuis les 50 dernières années. Elle est actuellement un problème majeur de santé publique dans les pays tropicaux et sub-tropicaux (1, 2). La moitié de la population mondiale vit dans des zones à risque d'infection par le virus de la dengue (*Flavivirus*), transmis par le moustique vecteur principal *Aedes aegypti* (carte disponible à cette adresse, page 3 : http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241547871_eng.pdf (2)). L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime à 50 millions le nombre de cas d'infection par an, dont 500 000 cas considérés comme cliniquement sévères, avec un taux de mortalité variant de 0,2 à 5 % selon les épidémies et environ 30 000 morts annuels (2).

Les infections dues au virus de la dengue sont responsables d'importantes épidémies de syndromes fébriles connues depuis la fin du XVIIIe siècle, et décrites notamment à Philadelphie, Jarkata et au Caire. Parmi ces épidémies historiques, certaines ont été marquées par une forte mortalité, comme en Grèce en 1928 (3), où ont été identifiées des formes cliniques graves avec des manifestations hémorragiques, neurologiques et rénales. La dengue hémorragique est devenue une entité sémiologique dans les années 1950 : des manifestations hémorragiques et des syndromes de choc sont venus au premier plan et ont été associés à une très forte mortalité en Thaïlande et aux Philippines (4, 5).

Depuis cette époque, la dengue connaît une double évolution, qui la fait encore considérer comme une maladie émergente. D'une part, elle s'étend progressivement à la totalité des régions chaudes, qui connaissent des épidémies répétées, sous l'effet combiné de plusieurs facteurs : la croissance et les mouvements des populations humaines, ainsi que l'urbanisation non contrôlée. Les transports favorisant la dissémination des vecteurs augmentent le risque de transmission du virus et permettent son introduction dans des régions non-endémiques. Bien que controversé, le réchauffement climatique pourrait lui aussi contribuer à cette modification du faciès épidémiologique de la dengue. D'autre part, on observe une augmentation de l'incidence des formes graves de l'infection, particulièrement celles avec des manifestations hémorragiques, qui ne sont plus limitées au sud-est asiatique mais sont maintenant observées dans toutes les zones d'endémie. Les premiers cas en Amérique Centrale, Amérique du Sud et Caraïbes ont été décrits au début des années 1980 (6, 7) ; ils ont ensuite été observés en Polynésie et dans le Pacifique (8, 9). En Afrique, dont la dengue pourrait être originaire (10), l'infection est peu rapportée, en partie parce qu'elle n'est pas recherchée et probablement du fait qu'elle se présente le plus souvent sous des formes bénignes voire asymptomatiques, au cours d'épidémies d'ampleur limitée. Cependant, récemment, des cas de dengue grave ont été rapportés lors d'épidémies de dengue 3 survenues dans plusieurs pays d'Afrique de l'Ouest (11, 12).

Des cycles selvatiques existeraient, impliquant des singes, diverses espèces de moustiques et des souches de virus spécifiques, en Asie du sud-est et en Afrique (13, 14). Bien que des cas d'infections humaines par ces souches aient été rapportés (15), elles ne semblent pas responsables d'épidémies chez l'homme. La dengue est ainsi une maladie essentiellement humaine, dont la transmission est assurée par le vecteur *Ae. aegypti*, moustique anthropophile adapté aux environnements urbains et présent dans tous les pays de la ceinture inter-tropicale. *Ae. aegypti* jouerait aussi le rôle de réservoir, rôle qu'il partage avec *Ae. albopictus*, vecteur moins efficace mais de plus en plus répandu et capable de s'adapter à des environnements très divers (16). La présence de ce dernier, vecteur du virus Chikungunya lors des épidémies de la Réunion en 2005 et d'Italie en 2007, fait maintenant craindre une extension de la dengue dans les pays tempérés où il s'est implanté (17).

L'évolution clinique de l'infection se fait selon des modalités très différentes. Longtemps, la dengue a été considérée comme une affection bénigne se présentant comme un syndrome grippal, associant fièvre à début brutal, et douleurs diffuses et intenses (« break-bone fever » des Anglosaxons), et évoluant toujours vers une guérison complète après une convalescence parfois longue. Mais depuis leur émergence dans le sud-est asiatique, les formes avec des manifestations hémorragiques, qui concernent surtout les sujets jeunes en zone hyper-endémique, deviennent de plus en plus fréquentes. Observées à Cuba lors d'une épidémie en 1981 (6, 18), elles le sont maintenant avec une incidence variable mais croissante au cours de toutes les épidémies survenant sur le continent américain et dans la région Caraïbe, où elles touchent des individus de tous âges.

L'incidence croissante et la gravité de la dengue en font un problème de santé publique et un problème économique de premier plan, dans des pays qui connaissent des difficultés de tous ordres, où les moyens affectés à la santé des populations sont insuffisants (19). En l'absence de vaccin, la prévention, qui repose essentiellement sur la lutte anti-vectorielle, reste le seul moyen de limiter la propagation de la maladie, mais elle requiert une participation active de la population et des autorités locales, ainsi qu'une gestion très rigoureuse, souvent difficiles à mettre en place (20, 21). Outre des frais de santé élevés difficilement assumés par les familles des patients (19), l'impact économique des épidémies de dengue, incluant notamment le coût de la lutte anti-vectorielle et de l'hospitalisation des patients, s'élève à plusieurs centaines de millions de dollars (US$) par an (2, 22, 23). En l'absence de traitement spécifique, en particulier d'antiviraux, un dépistage et une prise en charge précoce des formes graves sont nécessaires pour limiter les conséquences mortelles. Actuellement, l'absence d'outils de prédiction n'autorise pas une orientation adéquate des malades lors d'épidémies de grande ampleur, telle que celle survenue au Cambodge en 2007, et conduit à l'indication d'une hospitalisation souvent attendue ou dans le cadre de l'activation d'une filière de soin. Elle conduit aussi à la mise en oeuvre de traitements symptomatiques ou à la programmation de soins intensifs chez les cas confirmés ou suspects de dengue. Cette situation a pour effet d'induire une surcharge rapide des services hospitaliers et l'impossibilité d'accueil de nombreux patients.

La dengue grave : une ou plusieurs entités ?

Le diagnostic clinique précoce de la dengue est difficile, en raison de symptômes (fièvre, céphalées, myalgies, arthralgies) similaires à ceux d'autres maladies infectieuses sévissant en zones tropicales : seule la détection de protéines ou de matériel génétique viral permet d'affirmer une infection par le virus de la dengue (22). Cependant, la phase virémique de la maladie est courte (4 à 7 jours), et le virus devient indétectable au moment de la défervescence thermique : les techniques indirectes de sérologie sont alors le seul moyen d'orienter le diagnostic, mais elles doivent prendre en compte l'existence de réactions croisées avec d'autres flavivirus.

On estime que plus de 60 % des infections dues au virus de la dengue restent asymptomatiques. Dans les autres cas, après une incubation de 7 jours en moyenne, débute un épisode fébrile et algique de 4 à 7 jours en moyenne, qui évoluera le plus souvent spontanément vers la guérison (figure 1) ; cependant, au moment de la défervescence thermique, 0,5 à 10 % des patients développent des complications sévères, dont la fréquence varie en fonction de l'âge du patient et d'autres facteurs. On observe généralement chez ces patients de nombreux troubles sanguins, comme une thrombocytopénie, une hémoconcentration et une coagulopathie, ayant pour conséquence des hémorragies de localisation variable. Les patients atteints de dengue sévère présentent également des signes de fuite plasmatique (épanchements pleuraux, ascites...) qui, associés aux déséquilibres hémodynamiques, peuvent entraîner une altération rapide de l'état général des patients, avec choc hypovolémique et décompensation cardiaque.

Outre les formes regroupées dans l'entité « dengue hémorragique », un nombre croissant d'études cliniques décrivent des « formes atypiques de dengue » [revue : (24)] marquées par des manifestations gastro-intestinales [hépatomégalie cytolyse hépatique, hépatites, pancréatites, cholécystites alithiasiques], des manifestations neurologiques [encéphalites, neuropathies oculaires, syndrome de Guillain-Barré], des défaillances rénales et spléniques, ou encore un syndrome de détresse respiratoire aiguë. Certaines de ces complications ont un pronostic sévère et peuvent entraîner le décès (25-27), en particulier sur des terrains fragilisés (asthme, diabète, drépanocytose...) (28-31). Leur origine n'est

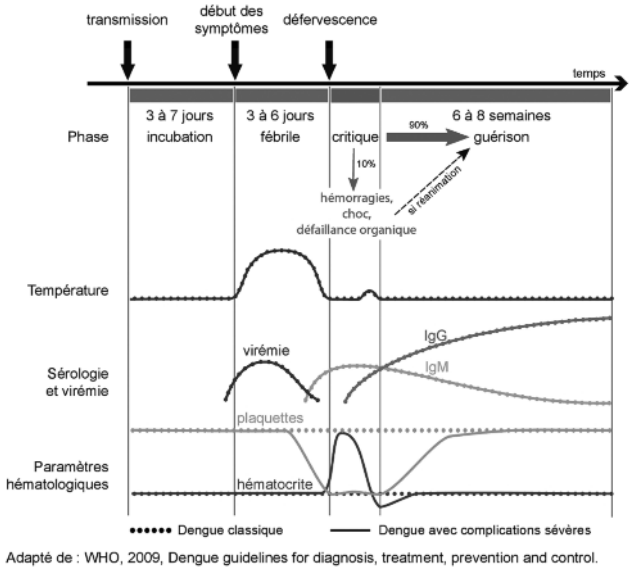

Figure 1. Cinétique des paramètres cliniques et biologiques au cours des formes symptomatiques d'infection par le virus de la dengue.

L'évolution d'une infection par le virus de la dengue se déroule schématiquement en quatre étapes. La première phase débute, suite à la piqûre d'un moustique infecté, par une période d'incubation asymptomatique de 3 à 7 jours. Elle est suivie par une phase clinique, correspondant à l'augmentation de température et la hausse de la virémie. Suit alors une phase critique, coïncidant avec la défervescence thermique, durant laquelle le patient évolue soit spontanément vers la guérison, soit vers une complication de type hémorragique, choc ou défaillance multi-viscérale. La réanimation, réalisée de façon précoce et adaptée, permet généralement au patient souffrant de complications d'amorcer la phase de guérison. IgM : immunoglobulines M ; IgG, immunoglobulines G.

pas établie : il pourrait s'agir de conséquences directes de l'infection, mais également de complications secondaires aux désordres métaboliques et hémodynamiques induits par cette infection.

Afin d'aider les cliniciens dans la prise en charge des cas de dengue, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a établi en 1997 une classification de ses formes, basée sur une combinaison de paramètres cliniques et hématologiques simples à rechercher (22). Cette classification identifie 2 formes et 4 stades de la maladie. Alors que la fièvre dengue (DF pour « dengue fever ») est la forme classique la plus souvent observée et caractérisée généralement par un état pseudo-grippal sévère incapacitant le patient, la fièvre hémorragique de dengue (DHF / « dengue hemorrhagic fever », stades I et II) et le syndrome de choc de dengue (DHF stades III et IV, ou DSS / « dengue shock syndrome ») sont des phénotypes de sévérité croissante. Quatre critères non exclusifs définissent les formes DHF/DSS : forte fièvre (>39°C), signes hémorragiques (pétéchies, ecchymoses, purpura, hématémèse, méléna, test du lacet positif), thrombocytopénie (< 100 000 plaquettes par mm^3) et signes de fuite plasmatique (épanchement pleural, ascite, élévation de l'hématocrite > 20 %) (figure 2A).

Bien que cette classification s'avère utile chez certaines populations, beaucoup la considèrent aujourd'hui inadaptée à définir l'ensemble des cas sévères, et notamment le DSS et les formes atypiques (32, 33). En effet, ces critères ne permettent pas toujours de classer correctement les patients (34). Ainsi, les signes hémorragiques mineurs (pétéchies, ecchymoses...) jusqu'ici considérés parmi les critères de sévérité, semblent peu spécifiques et sont rencontrés dans les différentes formes de dengue, dont la dengue fébrile non compliquée (DF). A l'opposé, l'entrée en état de choc

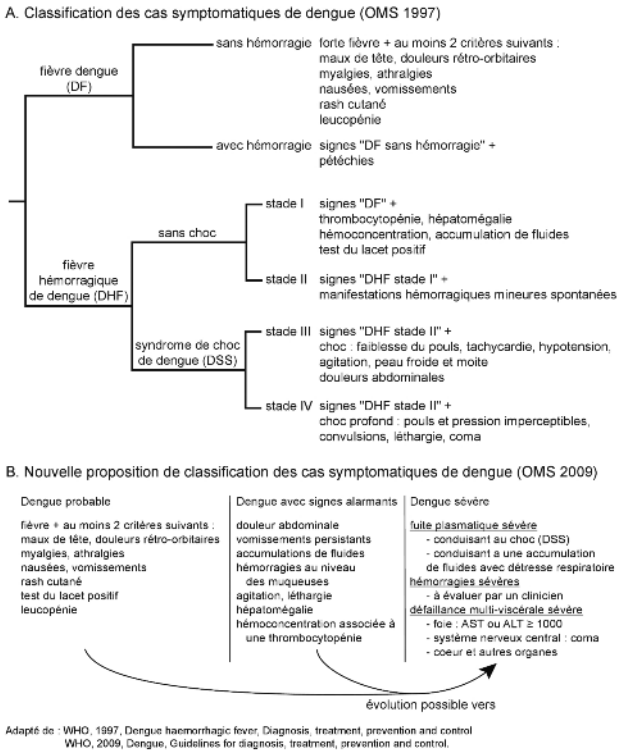

Figure 2. Classification des cas symptomatiques de dengue.

(A) La classification établie par l'OMS en 1997 se base sur des critères cliniques et hématologiques, et répartit les cas symptomatiques de dengue en 2 formes et 4 stades : fièvre dengue (DF), et fièvre hémorragique de dengue (DHF) sans choc (stades I et II) et avec choc (stade III et IV, correspondant au syndrome de choc de dengue DSS). (B) Du fait des difficultés rencontrées par les cliniciens, l'OMS a proposé fin 2009 une nouvelle classification des cas symptomatiques de dengue : une dengue probable, avec ou sans signes alarmants, qui dans les deux cas, peut évoluer vers une dengue sévère, marquée par une fuite plasmatique, et/ou des hémorragies, et/ou une atteinte multi-viscérale. ALT, alanine aminotransférase ; AST, aspartate aminotransférase ; DF, « dengue fever » ou fièvre dengue ; DHF, « dengue hemorrhagic fever » ou fièvre hémorragique de dengue ; DSS, « dengue shock syndrome » ou syndrome de choc de dengue ; OMS, organisation mondiale de la santé.

peut se faire chez des patients qui n'ont pas présenté un ou plusieurs des critères de gravité retenus par la classification (35). De plus, les signes hépatiques et neurologiques ne sont pas bien pris en compte.

Un nouveau guide pour le diagnostic, le traitement, la prévention et le contrôle de la dengue a été proposé par l'OMS fin 2009 (2), intégrant les observations de nombreux cliniciens : un patient est considéré comme faisant une dengue sévère lorsqu'il présente des signes de fuite plasmatique massive (menant au choc et/ou à la détresse respiratoire) et/ou des saignements sévères et/ou une défaillance multi-viscérale (2B).

Le syndrome de choc de dengue, une complication sévère

Le syndrome de choc de dengue (DSS) est la complication la plus fréquemment observée en zone hyper-endémique, et la plus redoutée puisqu'il survient de façon brutale, imprévisible et seulement chez certains patients. Il se caractérise par d'importants troubles circulatoires, mis en évidence par des extrémités froides, un pouls périphérique non perceptible, une tachycar-

die, une hypotension par rapport à l'âge du patient ou une pression sanguine inférieure à 20 mmHg, signant une hypovolémie. Les patients classés en DHF stade III restent généralement conscients. Dans les cas les plus graves de choc profond réfractaire (DHF stade IV), où la pression et/ou les pulsations deviennent imperceptibles, l'hypovolémie marquée entraîne une hypoxie contribuant à un dysfonctionnement multi-viscéral et un collapsus cardio-vasculaire (22). L'atteinte des fonctions neurologiques peut entraîner un coma, voire la mort du patient dans les 12 à 24 heures. Ce type de choc est également rencontré dans d'autres fièvres hémorragiques virales, comme les fièvres de Lassa, Crimée-Congo, Marburg, Ebola, les infections à hantavirus (36, 37), mais aussi dans des infections bactériennes (choc septique). Il présente une évolution spontanée vers la mort, si une prise en charge thérapeutique adaptée n'est pas rapidement mise en œuvre pour rétablir le volume sanguin et la fonction cardiaque.

A ce jour, on ne dispose pas de marqueurs précoces et fiables pouvant prédire l'évolution vers le choc de dengue, ni de moyens spécifiques de le traiter. De ce fait, le traitement du DSS reste symptomatique et repose sur le rétablissement du volume sanguin par perfusion de fluides hyperosmolaires, dont la nature, le débit de perfusion et la quantité administrée doivent être adaptés en fonction de l'état et du poids du patient, et contrôlés par un monitorage rigoureux (22, 38, 39). Bien que non spécifiques, ces traitements permettent néanmoins de réduire le taux de mortalité de 40 % à moins de 1 % lorsqu'ils sont appliqués précocément (40, 41).

Le choc hypovolémique de dengue résulte d'une fuite plasmatique massive et soudaine vers différents compartiments extravasculaires, comme attesté par la présence d'épanchements pleuraux et d'ascites chez les patients. L'origine et les mécanismes impliqués dans cette fuite de plasma ont été recherchés : les premières observations ont concerné les tissus endothéliaux, puisqu'ils recouvrent la partie interne des vaisseaux sanguins et constituent donc le site de la fuite plasmatique. Tout d'abord, de rares observations anatomo-pathologiques, réalisées sur des patients décédés de dengue, montrent l'absence de lésions anatomiques et de dommages majeurs de l'endothélium au niveau tissulaire (42). Ensuite, le rétablissement rapide des patients atteints de DSS bénéficiant de perfusion de fluides hyperosmolaires (22), suggère que ce phénomène de fuite plasmatique est transitoire et réversible *ad integrum*. Ces observations suggèrent que les atteintes endothéliales au cours du DSS sont d'ordre fonctionnel, et non dues à une destruction des cellules.

Une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans le dysfonctionnement endothélial responsable de la fuite plasmatique, pourrait permettre de mettre en évidence des bio-marqueurs spécifiques voire prédictifs d'évolution vers le choc, ainsi que des mécanismes ou molécules susceptibles de constituer des cibles thérapeutiques.

Des aspects multi-factoriels prédisposent à une évolution vers le choc

L'évolution clinique de la dengue est sans doute la résultante de nombreux facteurs, imparfaitement identifiés, qui rendent difficile la compréhension de la maladie et en conséquence, l'établissement de diagnostic précoce et de traitement adapté (figure 3). En l'absence de modèle animal reproduisant les symptômes principaux des formes graves de dengue, notamment du choc, la plupart des connaissances et hypothèses avancées se basent sur des observations épidémiologiques, qui sont généralement investiguées dans des modèles *in vitro*.

La densité et les propriétés des moustiques vecteurs, ainsi que les variations génétiques du virus lui-même (43), pourraient intervenir dans la variabilité épidémiologique et clinique observée. Il existe quatre sérotypes du virus de la dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3 et DENV-4) (44), qui sont tous susceptibles d'induire les différentes formes de la maladie, mais n'induisent pas de protection croisée chez les sujets infectés. Cependant, dans chaque sérotype, on identifie des génotypes (45), dont certains sont plus fréquemment associés à la survenue de formes graves de dengue. C'est le cas notamment pour le sérotype 2 d'un génotype originaire du sud-est asiatique (46, 47). L'introduction de cette souche en Amérique lors de l'épidémie majeure survenue à Cuba en 1981 serait responsable de l'émergence rapide des formes graves de dengue sur ce continent (48). *In vitro*, ce génotype est capable de se répliquer plus efficacement dans des cellules humaines et dans les glandes salivaires de moustique que le génotype américain (49, 50) : la production accrue de particules virales, notamment dans les glandes salivaires des moustiques, augmenterait la transmission de ce virus plus pathogène à l'homme (47, 51, 52). Cependant, notre laboratoire a montré qu'un virus DENV-2 de génotype asiatique avait été responsable de l'épidémie de dengue qui a touché la Martinique en 1998. Or, cette épidémie n'a pas été marquée par une forte incidence de cas sévères (53), suggérant que les spécificités et la variabilité de virulence des souches de dengue ne sont pas les seuls déterminants requis dans l'évolution vers le choc de dengue.

Bien que les déterminants viraux de pathogénicité soient encore mal connus, l'intensité (54-56) et la durée (56, 57) de la virémie semblent être associées à la sévérité de la dengue. Certaines protéines virales, telles que les protéines non-structurales NS1 et NS4B, pourraient contribuer au pouvoir pathogène accru de certains virus de dengue. NS1 est considérée comme un marqueur de sévérité, sa concentration plasmatique étant associée à la virémie et la sévérité clinique de la dengue (58, 59), mais son rôle direct dans la physiopathologie n'est pas connu. Le rôle de la protéine NS4B est mieux défini : cette protéine participerait à

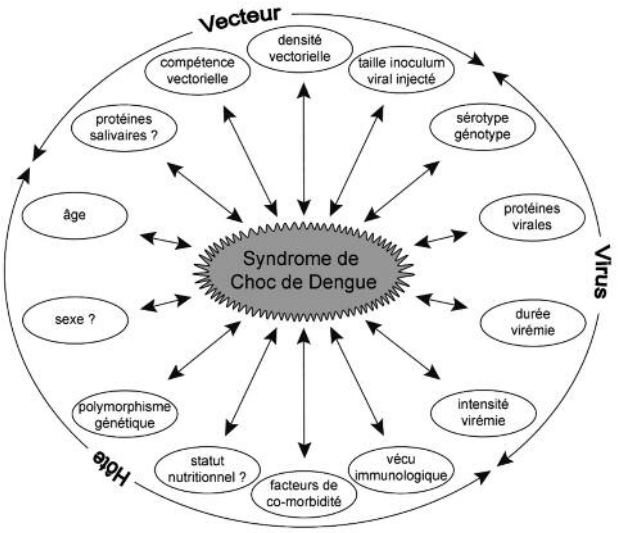

Figure 3. Aspect multi-factoriel du syndrome de choc de dengue.

Le syndrome de choc de dengue résulte d'une interaction complexe entre différents facteurs relatifs au vecteur, au virus et à l'hôte. Certains ont un rôle encore hypothétique (facteurs identifiés par « ? ») et la part relative de chacun reste à être déterminée.

l'échappement du virus à la réponse antivirale innée de l'hôte, en bloquant la voie de l'interféron de type I activée par les cellules infectées (60, 61).

Certains facteurs de l'hôte, d'ordre démographique et individuel, seraient également des déterminants importants de l'évolution clinique de l'infection. Alors que les données épidémiologiques quant à l'implication du sexe (18, 62) et du statut nutritionnel (62, 63) sont controversées, il a été montré des associations entre la sévérité de la dengue et l'origine ethnique des populations (28, 64-67), les polymorphismes génétiques [revues : (68, 69)], le groupe sanguin (70) ou encore l'âge des patients. Les nouveau-nés (0 - 11 mois) (71) et les enfants (1 - 14 ans) (27, 71, 72) souffrent le plus souvent de choc hypovolémique avec décompensation cardiaque, notamment dans le sud-est asiatique (73). Les adultes présentent plus fréquemment des hémorragies profondes (71, 74), mais des cas de chocs hypovolémiques ont également été décrits chez les plus âgés (72). Il semblerait que la physiologie même de l'endothélium intervienne dans ce processus complexe : la perméabilité physiologique plus importante des capillaires chez les enfants pourrait expliquer que ce groupe d'âge soit plus susceptible à la fuite plasmatique et au choc (75).

L'un des déterminants essentiel dans l'évolution clinique vers le syndrome de choc semble cependant être la réponse de l'hôte à l'infection, dont l'intensité et l'orientation conditionnent, comme dans de nombreux processus physiopathologiques, la survenue des cas graves (76). La présence de maladies chroniques comme l'asthme, le diabète ou la drépanocytose semblent prédisposer à une évolution péjorative, voire mortelle, de la dengue (28-31). Le vécu immunologique du patient peut également conditionner le déroulement clinique de l'infection, puisque certaines études épidémiologiques montrent que l'incidence du DSS est plus élevée lors d'une infection secondaire par un sérotype viral différent de celui ayant provoqué la primo-infection (46, 77, 78). La théorie de la facilitation de l'infection par des anticorps pré-existants (ADE : « Antibody-Dependant Enhancement ») (76, 79) a été proposée comme explication possible à cette observation épidémiologique. Selon cette hypothèse très controversée (80), les anticorps, produits par les lymphocytes B mémoires réactivés, ou transmis de façon materno-fœtale (81, 82), seraient incapables de neutraliser un sérotype viral différent lors d'une infection ultérieure. Ces anticorps à réactivité croisée formeraient au contraire des complexes avec les particules virales, qui faciliteraient l'infection de cellules portant des récepteurs Fc, telles que les monocytes/macrophages (83). Il en résulterait une réplication virale plus intense qui pourrait ainsi constituer un facteur d'aggravation, comme le suggère l'association entre le niveau de la virémie et la sévérité clinique de la maladie montrée par d'autres études (54-57, 84). De plus, l'augmentation du taux d'infection des monocytes/macrophages induirait une présentation d'antigènes viraux et l'activation de lymphocytes T mémoires à réactivité croisée (85). Ces lymphocytes, générés lors une primo-infection, prolifèrent de façon massive lors d'une seconde infection (86, 87) et sécrètent en abondance de nombreuses cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IFNγ et le TNFα (88, 89), pouvant entraîner des dommages vasculaires (figure 4).

Cependant, l'hypothèse de facilitation par les anticorps est contredite par plusieurs études épidémiologiques [revue : (80)]. Ainsi, au cours d'une infection naturelle, en zone d'endémie, les anticorps maternels semblent jouer un rôle essentiellement protecteur et non facilitant de l'infection (90). En outre, la survenue de cas de DSS lors de primo-infection (91, 92) et l'existence d'infections secondaires non compliquées de syndrome de choc (93) montrent que d'autres mécanismes sont impliqués dans la survenue du syndrome de choc de dengue. Enfin, les preuves expérimentales du rôle possible d'anticorps facilitants chez l'homme font défaut, et animent le débat entre les pro- et les anti-ADE, concernant notamment l'élaboration d'un vaccin anti-dengue : en effet, l'hypothèse de l'ADE, imposée comme un dogme au niveau mondial, oblige les industries pharmaceutiques à mettre sur le marché un vaccin tétravalent (94), dont l'élaboration s'avère très difficile [revue : (95)].

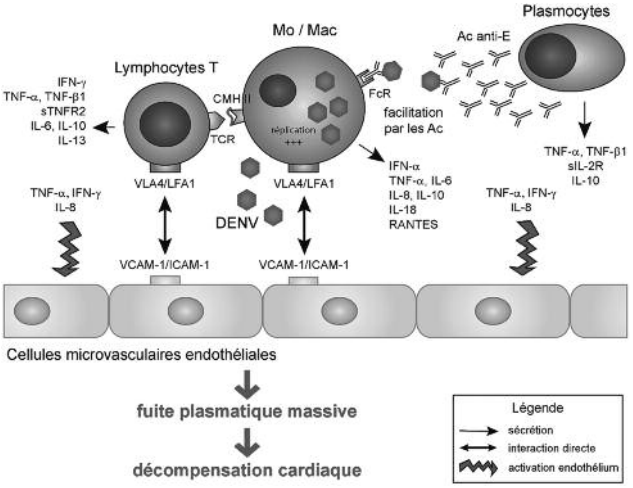

Figure 4. Théorie de la facilitation de l'infection par des anticorps pré-existants ou ADE (« Antibody Dependant Enhancement »).

Lors d'une infection secondaire, les anticorps produits par les lymphocytes B mémoires facilitent l'infection de monocytes/macrophages, via l'internalisation des particules virales par les anticorps fixés sur les récepteurs Fc. Selon cette hypothèse, ce mécanisme induirait une production importante de virions, ainsi que l'activation des lymphocytes T suite à la présentation d'antigènes viraux par les monocytes/macrophages. De nombreuses cytokines pro-inflammatoires sont libérées, certaines pouvant agir directement sur l'endothélium. Ac, anticorps ; DENV, virus de la dengue ; E, protéine d'enveloppe virale ; Mo/Mac, monocytes/macrophages.

Des hypothèses physiopathologiques décryptent en partie le syndrome de choc de dengue

L'investigation des mécanismes et acteurs de la cascade physiopathologique dans le syndrome de choc a été récemment facilitée par l'utilisation et la comparaison de prélèvements sanguins de patients présentant différentes formes cliniques de dengue. Le sang est un tissu complexe, dont la richesse en cellules et en médiateurs solubles reflète à la fois la réponse immune de l'hôte et les dysfonctionnements tissulaires ou organiques, soit à un moment précis du processus pathologique, soit dans la continuité de ce processus (analyses longitudinales). Cependant, la difficulté à recruter des patients en syndrome de choc a amené la plupart des chercheurs à inclure dans leur cohorte des patients en DHF de stade I et II, considérés comme faisant une dengue grave selon la classification de l'OMS de 1997 (22). Cette hétérogénéité clinique a entraîné l'investigation de la « dengue grave » et non du choc en particulier, et a conduit des conclusions ambiguës, voire contradictoires, quant aux déterminants impliqués véritablement dans le syndrome de choc de dengue. De plus, il n'est pas rare d'observer des discordances entre des études menées sur des cohortes très différentes : il est en effet établi que l'âge et l'origine ethnique des populations influent sur l'évolution clinique de l'infection. Ces discordances sont également dues aux différences de conception des études (taille de l'échan-

tillonnage, randomisation ou non des patients dans les groupes étudiés, moment du prélèvement au cours de la maladie) et à l'absence d'homogénéisation des protocoles utilisés (anticoagulants utilisés, conditions de stockage, traitement des prélèvements). Enfin, la plupart des études s'intéressent à un ou quelques médiateurs, et rendent difficiles les interprétations et l'intégration des différents facteurs étudiés dans une compréhension globale de la physiopathologie de la maladie.

En dépit de ces discordances, il semble néanmoins que la concentration plasmatique de certaines cytokines, notamment pro-inflammatoires, soit trouvée fréquemment associée à la sévérité de la maladie. Le syndrome de choc de dengue est en effet considéré comme la conséquence d'une « tempête cytokinique » (96, 97), mécanisme également évoqué pour expliquer d'autres syndromes inflammatoires systémiques engendrant des dysfonctionnements multi-viscéraux (98), tels que le sepsis sévère (99). Ces nombreuses cytokines, secrétées en abondance et pouvant avoir des effets synergiques, pourraient résulter de l'infection ou l'activation de nombreux types cellulaires, tels que les monocytes/macrophages, les lymphocytes T, les lymphocytes B, les cellules dendritiques ou encore des cellules non immunitaires comme les hépatocytes et les cellules endothéliales.

Certaines cytokines sont connues pour avoir des effets délétères sur l'endothélium, comme le TNFα. Du fait de son rôle dans l'induction d'une phase aiguë avec fièvre, libération de molécules chimio-tactiques et modification de la perméabilité endothéliale (100), phénomènes retrouvés dans les formes sévères de dengue, le TNFα a été l'un des premiers médiateurs pro-inflammatoire recherché. Tous les patients atteints de dengue ont des taux élevés de TNFα et de la forme soluble du récepteur au TNF (sTNFR) comparé à des personnes saines (101-105). Bien que plus d'une dizaine d'études cliniques [parmi lesquelles (87, 101, 104, 106)] montrent que les taux de TNFα et sTNFR sont plus élevés chez les patients en choc de dengue que les patients présentant une dengue fébrile classique, il n'y a pas systématiquement d'association avec la sévérité de la dengue (107-111). D'autres cytokines pro-inflammatoires comme IL-6 (105, 109, 111, 112) et IL-8 (111, 113) ont été recherchées, et sont généralement en concentration plus élevée dans le plasma de patients en DSS, comparé à des patients souffrant de dengue fébrile classique. De façon intéressante, la détection précoce de IL-8 (111, 113), IL-6 (111) et sTNFR (107) suggère leur utilisation possible comme bio-marqueurs d'évolution de la maladie vers un syndrome de choc. Des cytokines, comme l'IL-13 (114), l'IL-18 (114), le sIL2R (86, 87, 106), MCP-1 (115) et l'IFNγ (110), résultant pour la plupart de l'activation des lymphocytes T ou de monocytes/macrophages, ont également des taux plasmatiques associés à la sévérité de la dengue.

D'autres études ont également mis en évidence chez des patients classés « DHF » (sans distinction de stade) des taux plus élevés de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 (106, 109, 116-118) et le TGF-β1 (108), aux fonctions immunosuppressives. Cette réponse anti-inflammatoire devrait normalement contre-balancer l'inflammation mise en place suite à l'infection, mais il semblerait que dans la dengue grave, cette homéostasie ne soit pas maintenue : la réponse anti-inflammatoire, soit en excès, ou au contraire insuffisante, entraîne un déséquilibre néfaste pour le patient.

La présence à des taux élevées de cytokines comme l'IL-12 (119) et MIP-1β (110) est au contraire associée positivement aux formes classiques de dengue et pourrait avoir un rôle protecteur contre l'évolution vers le syndrome de choc. La diminution du taux d'IL-12 rapportée dans les patients faisant un DSS (119) signe une diminution de la réponse de type Th1 (96, 118), qui dans de nombreuses infections tend vers une exacerbation des signes de la maladie. La cytokine MIP-1β (« Macrophage Inflammatory Protein-1β ») est synthétisée suite à une infection par le virus de la dengue, de façon plus importante dans les cas de dengue fébrile non compliquée (110). Elle agit comme molécule chimio-tactique pour les cellules NK (« Natural Killer ») au site de l'inflammation : or l'activation de ces cellules a été associée positivement aux formes classiques de dengue (DF) (120), suggérant la participation de MIP-1β à une réponse protectrice contre les formes graves de dengue.

L'attention a également été portée sur d'autres facteurs solubles ayant un rôle dans la perméabilité endothéliale, comme le « Vascular Endothelial Growth Factor » (VEGF). Des études *in vitro* ont montré que suite à une infection par le virus de la dengue, les cellules endothéliales produisent du VEGF (121), facteur angiogénique qui augmente également la perméabilité microvasculaire, et pourrait ainsi participer à la fuite plasmatique observée chez les patients faisant une DHF. Cependant, les études cliniques chez des patients atteints de dengue présentent des données contradictoires quant au taux de VEGF et des formes solubles de ses récepteurs (sVEGFR1 et sVEGFR2), qui régulent la bio-disponibilité du VEGF libre circulant et donc sa capacité à activer l'endothélium. Alors que certaines études rapportent une association positive entre le taux élevé de VEGF, la diminution de la forme soluble du récepteur sVEGFR2 circulant et la sévérité de la maladie (122, 123), d'autres au contraire ont conclu à une absence d'association (124, 125). Ces discordances ne permettent pas actuellement de statuer sur le rôle du VEGF dans la physiopathologie du syndrome de choc de dengue. De la même façon, l'association entre la sévérité de la dengue et les concentrations des formes solubles de molécules impliquées dans l'adhérence de cellules immunitaires aux cellules endothéliales, telles que sICAM-1 (107, 126) et sVCAM-1 (127, 128), n'est pas retrouvée de façon systématique.

Les mécanismes physiopathologiques du DSS impliqueraient d'autres types de médiateurs solubles. En effet, une activation exacerbée de la voie alternative du complément chez les patients en état de choc (129-131), laissant supposer un rôle actif du com-

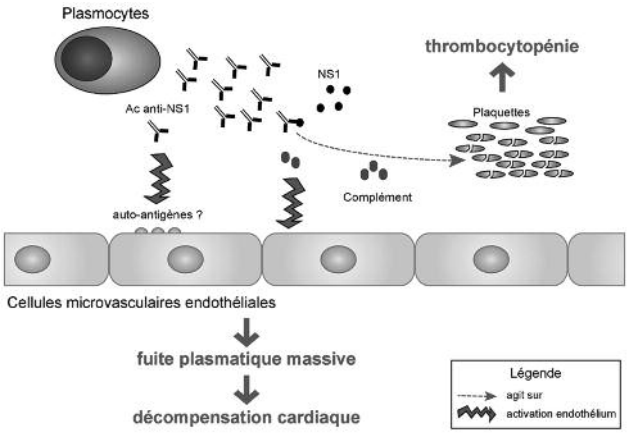

Figure 5. Hypothèse « auto-immune ».

Selon cette hypothèse, des anticorps dirigés contre la protéine NS1 virale seraient impliqués dans la physiopathologie du syndrome de choc de dengue. Ces anticorps de type « auto-immun » participeraient directement au dysfonctionnement endothélial et induiraient la lyse des plaquettes par les molécules du complément, à l'origine de la thrombocytopénie observée chez les patients en DSS. Ac, anticorps ; NS1, protéine non-structurale 1 virale.

plément dans la physiopathologie du DSS. D'autre part, des travaux réalisés sur des modèles *in vitro* et chez la souris, suggèrent que des anticorps dirigés contre la protéine non-structurale NS1 du virus présenteraient une réactivité croisée avec des épitopes présents sur les plaquettes et les cellules endothéliales (132), et pourraient aussi avoir une responsabilité dans le DSS. Ces anticorps de type auto-immun pourraient contribuer à la fois à la thrombocytopénie observée dans les cas avec hémorragie et choc, en induisant une lyse des plaquettes *via* la voie du complément (133, 134), et participer au dysfonctionnement endothélial, en activant les cellules microvasculaires endothéliales (135) (figure 5).

Le syndrome de choc : une pathologie vasculaire

Quelles que soient la nature, la complexité et la spécificité des phénomènes situés en amont, l'endothélium est la cible finale des mécanismes physiopathologiques menant au syndrome de choc de dengue. Au niveau tissulaire, l'endothélium de patients décédés suite à un choc de dengue semble rester intègre (42), signifiant que la fuite plasmatique n'est pas due à une destruction physique de l'endothélium, mais plutôt à une atteinte d'ordre fonctionnel.

Bien que longtemps considéré comme simple barrière passive, l'endothélium tapissant la partie interne des vaisseaux sanguins est une interface active entre le sang et les tissus, capable d'être activé et de répondre à de nombreux stimuli. Son rôle est déterminant dans la régulation de l'homéostasie et le maintien de nombreuses fonctions physiologiques, telles que l'hémostase, la perméabilité sélective aux facteurs solubles, le recrutement et la transmigration des leucocytes vers les tissus, et la tonicité vasculaire. A l'état quiescent, l'endothélium a des propriétés anticoagulantes, anti-adhérentes, anti-inflammatoires et vasodilatatrices. Au contraire, en réponse à des stimuli tels que la présence d'un pathogène, de facteurs inflammatoires ou encore de cellules immunes activées, l'endothélium acquiert un phénotype activé, se traduisant par des propriétés procoagulantes, pro-adhérentes, pro-inflammatoires et vasoconstrictrices, qui lui confèrent un rôle d'acteur central dans de nombreux processus physiopathologiques d'origine infectieuse ou non (136).

Le dysfonctionnement endothélial est défini comme des changements, d'origine pathologique et non-adaptés, dans la structure et les fonctions endothéliales, entraînant des modifications dans les interactions entre les composés cellulaires et macromoléculaires du sang et la paroi des vaisseaux sanguins (137). Les fonctions et les structures endothéliales ne peuvent pas être étudiées directement chez le patient, car elles nécessitent des méthodes d'investigation invasives. En l'absence de modèle animal reproduisant les principaux aspects de la maladie humaine, des modèles d'étude *in vitro* ont été élaborés (138). Ces modèles simplifiés reproduisent certaines caractéristiques fonctionnelles des cellules endothéliales, mais ne permettent pas d'aborder la complexité globale des interactions entre les différents facteurs probablement impliqués dans la physiopathologie du choc. Ils permettent néanmoins d'appréhender au niveau cellulaire, la réponse de cellules endothéliales à des stimuli tels que le virus de dengue, des cellules immunes, ou encore des cytokines, et d'évaluer l'effet de ces stimuli sur les changements structuraux et fonctionnels, notamment les modifications de perméabilité sélective des endothélia. De nombreux modèles cellulaires endothéliaux ont été utilisés, mais l'hétérogénéité fonctionnelle des endothelia a peu été prise en compte. Alors que les cellules endothéliales macrovasculaires ont un rôle de régulation du tonus artériel, l'endothélium microvasculaire, localisé au niveau des capillaires, assure les échanges entre le sang et les tissus, et a une fonction de perméabilité sélective. L'endothélium microvasculaire régule le trafic de macromolécules différemment selon sa localisation dans l'arbre vasculaire : en conditions physiologiques, les capillaires sinusoïdes hépatiques sont très perméables, alors que la barrière hémato-encéphalique est très sélective (136). L'étude des cellules microvasculaires endothéliales issues de différents capillaires peut permettre de comprendre l'augmentation de perméabilité et d'expliquer les atteintes à l'origine du syndrome de choc de dengue.

L'origine du dysfonctionnement endothélial dans la dengue n'est pas clairement établie. Il peut résulter de l'infection directe des cellules endothéliales (avec réplication virale), et/ou être la conséquence d'une interaction avec des cellules inflammatoires et des médiateurs (cytokines, chimiokines, facteurs vaso-actifs...) eux-mêmes activés par l'infection (figure 6).

L'infection directe des territoires endothéliaux *in vivo* reste discutée. Néanmoins, des biopsies de patients décédés de dengue ont montré que l'endothélium des sinusoïdes hépatiques et des poumons peuvent être infectés par les virus de dengue (139). Des données *in vitro* confirment ces observations : les virus DENV-2 et DENV-3 induisent des effets cytopathogènes dans la lignée cellulaire HPMEC (« Human Pulmonary Microvascular Endothelial Cells ») (140), et environ 10 % des cellules de la lignée LSEC (« Liver Sinusoidal Endothelial Cells ») expriment des protéines virales après infection par un virus DENV-2 (141). Le pourcentage de cellules infectées *in vitro* (ou taux d'infection) varie en fonction du territoire endothélial (141), mais également de la souche virale utilisée. En effet, suite à une infection par un virus de dengue proche

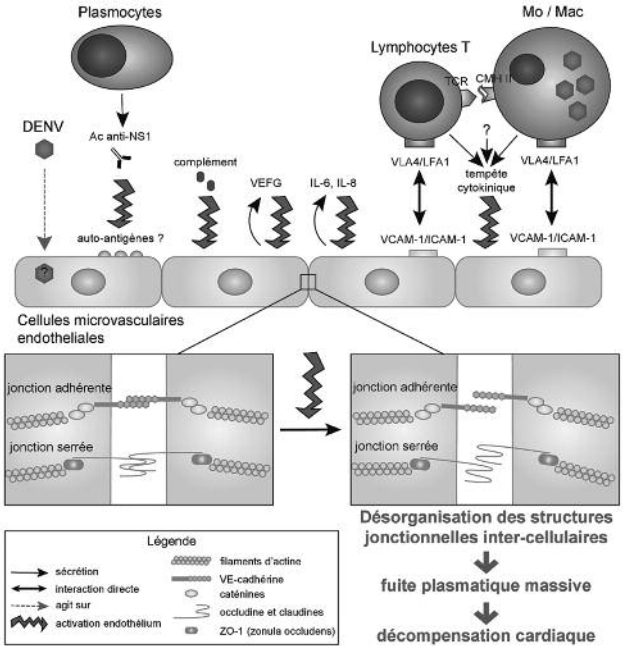

Figure 6. Schéma récapitulatif des différentes hypothèses et nature du dysfonctionnement endothélial dans la dengue grave.

Le dysfonctionnement endothélial dans le DSS est probablement dû à l'action synergique du virus lui-même, et d'effecteurs cellulaires et médiateurs solubles activés par l'infection. Au niveau de l'endothélium, les modifications cellulaires se traduisent par une réorganisation du cytosquelette et des jonctions inter-cellulaires adhérentes et serrées, entraînant une perte de la régulation de la perméabilité endothéliale probablement à l'origine de la fuite plasmatique. Ac, anticorps ; DENV, virus de la dengue ; Mo/Mac, monocytes/macrophages ; NS1, protéine non-structurale 1 virale.

d'un isolat clinique, le taux d'infection de cellules microvasculaires de derme (HMEC-1) est de 1 à 2 % (141), mais peut atteindre 40 % avec un virus adapté (142). Cependant, même dans le cas où les cellules endothéliales sont peu infectées, elle sont néanmoins activées *in vitro* en présence de virus de dengue, comme le montre l'induction ou la sur-expression de molécules d'adhérence à leur surface, et la production de cytokines comme IL-6, IL-8 et RANTES (141, 143, 144).

L'activation des cellules endothéliales par le virus de la dengue ne suffit généralement pas à induire une augmentation de la perméabilité *in vitro*, mais comme dans les infections à hantavirus (145), il est probable que cette stimulation agisse comme une sensibilisation à d'autres effecteurs induits/activés par l'infection. En effet, une augmentation de la perméabilité de cellules endothéliales préalablement activées par le virus de la dengue a été rapportée *in vitro*, en présence de cellules immunes naïves (146) ou de cytokines/chimiokines purifiées (115, 142). De plus, certaines cytokines retrouvées plus fréquemment chez les patients faisant un syndrome de choc de dengue, comme le TNFα, l'IFNγ et l'IL-8, ont des actions directes voire synergiques sur l'endothélium et favorisent l'augmentation de perméabilité.

Il est donc probable que l'activation directe des cellules endothéliales par le virus de dengue, et l'effet d'effecteurs cellulaires et de médiateurs immunitaires induits par l'infection, agissent de façon synergique pour induire le dysfonctionnement endothélial observé chez les patients en syndrome de choc de dengue. La constitution d'un réseau complexe d'effecteurs et d'interactions dans le dysfonctionnement endothélial pourrait expliquer le caractère inconstant et aléatoire du syndrome de choc.

Etant donné la rareté des effets cytopathogènes et des phénomènes de mort cellulaire par apoptose observés *in vitro* (143, 147), l'hyper-perméabilité endothéliale sous-jacente au DSS résulte probablement d'une dérégulation de structures impliquées dans le contrôle de la perméabilité sélective, telles que les molécules des différents types de jonctions inter-cellulaires, et celles du cytosquelette contrôlant à la fois les jonctions et la morphologie cellulaire (figure 6). Des expériences ont été réalisées *in vitro* sur des monocouches endothéliales, afin d'observer au niveau moléculaire les effets de différents facteurs induisant une augmentation de perméabilité. Il a ainsi été montré par immunofluorescence des réarrangements au niveau du cytosquelette des cellules endothéliales, en particulier la redistribution des filaments d'actine, suite à une infection directe par DENV-2 (142, 148) ou suite à la stimulation par du surnageant de cellules dendritiques infectées (149). L'expression de la VE-cadhérine, molécule essentielle à la cohésion des jonctions adhérentes, est diminuée lorsque les cellules endothéliales sont infectées par DENV-2 puis co-cultivées avec des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC « Peripheral Blood Mononuclear Cells ») non infectées (146). Il en est de même suite à une stimulation des monocouches endothéliales par du surnageant de cellules dendritiques infectées par DENV-2 (149). Les protéines des jonctions serrées, comme ZO-1 et l'occludine, sont redistribuées et ne se présentent plus de façon homogène sur le pourtour des cellules, après infection directe par DENV-2 (142) ou stimulation par du surnageant de monocytes infectés par DENV-2 (115). Ces différentes re-localisations montrent des pertes de contact entre les cellules, et ont pour conséquence une perte de régulation de la perméabilité inter-cellulaire. Ces expériences montrent également que différents effecteurs peuvent induire des changements moléculaires susceptibles de participer à la fuite plasmatique, ce qui reflète la complexité de la physiopathologie.

Du laboratoire de recherche au lit du malade : apport des approches « translationnelles » dans l'amélioration de la prise en charge des patients

Malgré les nombreuses investigations faites *ex vivo* et *in vitro*, les mécanismes physiopathologiques sous-jacents au syndrome de choc ne sont pas bien définis et la compréhension n'est pas suffisante pour permettre de prédire le choc ou d'interférer avec son processus. Le développement d'approches à haut débit permet d'élargir le champ d'investigation et d'aboutir à une vision plus complète et intégrée des mécanismes et effecteurs impliqués dans une pathologie. Contrairement aux autres méthodes d'étude, ces approches ne se basent pas sur une hypothèse posée *a priori* : elles permettent de comparer et d'analyser de façon exhaustive les niveaux d'expression de l'ensemble des gènes (transcriptome), protéines (protéome), métabolites (métabolome) ou autres, dans un tissu donné, entre des phénotypes cliniques d'une même maladie ou à différents moments d'un processus pathologique (études longitudinales) (150). Les tissus analysés peuvent être de différente nature et de complexité variable, en fonction de la pathologie : sang total, cellules purifiées, plasma, sérum, biopsies... En effet, des échantillons complexes en cellules et en médiateurs solubles, tels que le sang, peuvent être analysés et décryptés par ces techniques à haut débit, à partir de très faibles volumes, apportant deux avantages : une simplicité et une rapidité de prélèvement, et une étude possible de la réponse immune de l'hôte et des dysfonctionnement tissulaires ou organiques. Cet outil très puissant peut permettre, à partir d'échantillons de patients, (i) d'améliorer la compréhension des mécanismes physiopathologiques, (ii) d'identifier des nouveaux biomarqueurs de diagnostic ou de pronostic d'évolution clinique, (iii) d'identifier des nouvelles cibles thérapeutiques ou (iv) d'évaluer les propriétés pharmacotoxicologiques des traitements proposés. Ces techniques s'inscrivent donc parfaitement dans une approche « translationnelle » des pathologies, en rapprochant la recherche et la médecine au plus près du malade. En effet, les approches « translationnelles » exploitent les avancées des différents domaines de la recherche pour en extraire au plus vite les informations permettant d'améliorer la prise en charge des patients, et s'appuient sur des éléments épidémiologiques et cliniques pour donner à la recherche des nouveaux objectifs ou des données à prendre en compte.

La figure 7 schématise le processus d'une étude prospective qui utilise les techniques à haut débit dans une approche « translationnelle », visant à améliorer la prise en charge de patients dans une pathologie donnée. La première phase de l'étude doit se faire de façon interactive entre les chercheurs et les cliniciens : la pertinence des résultats par rapport à la pathologie étudiée repose sur des choix qui sont faits dès la conception de l'étude, notamment sur le phénotype à étudier (« étapes clés » de la figure 7). Des critères d'inclusion et/ou d'exclusion sont nécessaires pour un recrutement dans l'étude de patients aux caractéristiques bien définies, qui sont ensuite appariés ou randomisés (si nombre suffisant de patients) au sein de chaque groupe clinique préalablement défini : cet appariement permet de rendre comparables les groupes pour limiter les biais de sélection dus à des facteurs confondants (âge, sexe...) (151). La suite du processus est réalisée par le chercheur, et comporte des étapes techniques, statistiques et d'analyse. Outre la validation de chaque étape technique, le choix des méthodes statistiques permettant d'associer des gènes/protéines à la maladie ou à l'expression clinique étudiée doit être très rigoureux (152). La masse de données générée par ce type d'approche est très dense, aboutissant généralement

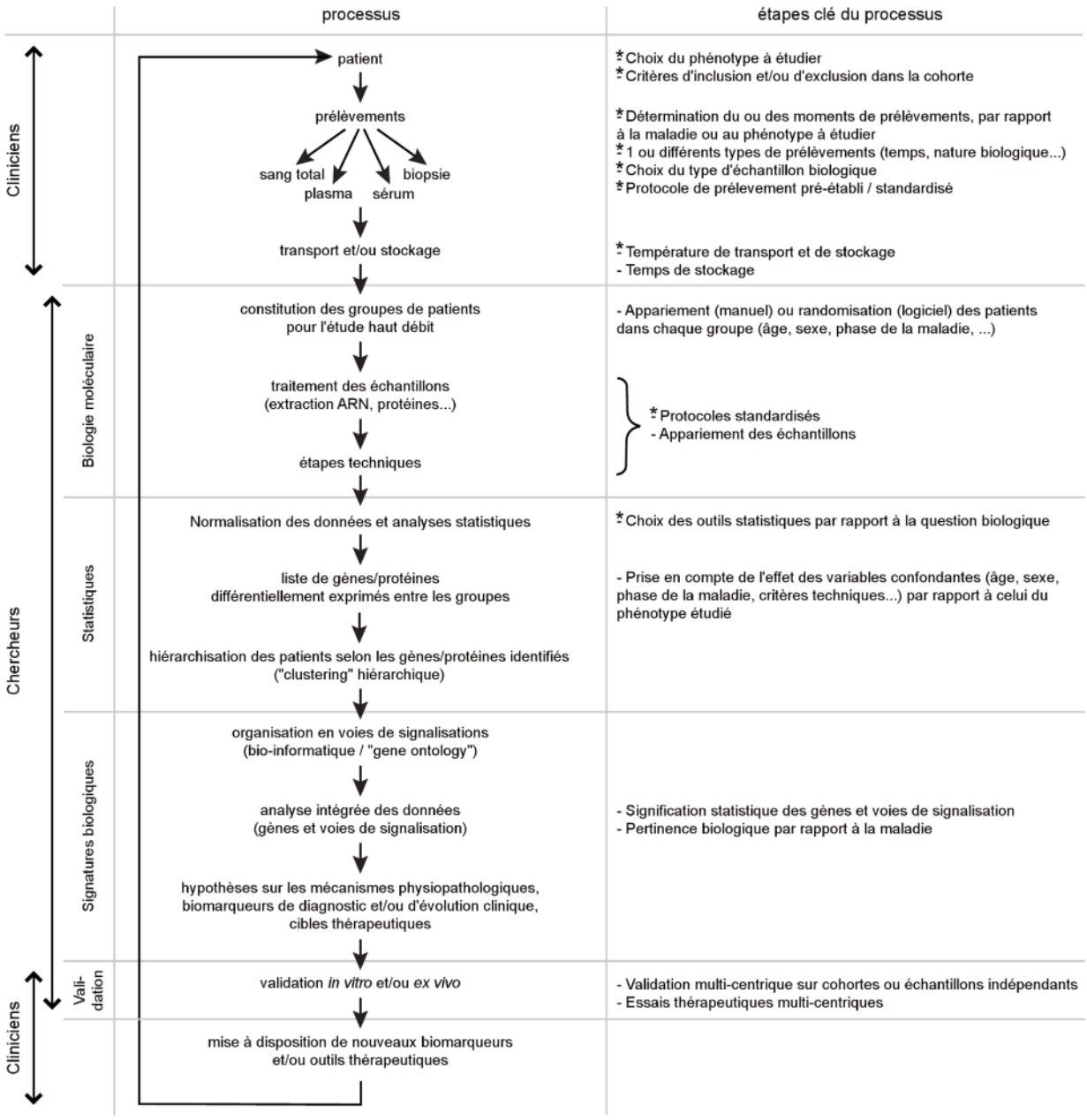

Figure 7. Processus d'une étude clinique prospective visant à identifier des mécanismes physiopathologiques et/ou bio-marqueurs spécifiques d'un phénotype clinique en utilisant les techniques à haut débit.

*Le schéma fait apparaître les différentes étapes du processus, et le cas échéant, les éléments clé à respecter à chaque étape afin d'obtenir des résultats probants et pertinents par rapport à la maladie étudiée. Les étapes clé à déterminer avant le recrutement des patients sont indiquées par *. L'application des techniques à haut débit sur des prélèvements de patients permettent de mettre en évidence des signatures géniques, protéiques ou autres, spécifiques d'un phénotype clinique. Ces signatures organisées, une fois intégrées et validées, reflètent les mécanismes physiopathologiques impliqués et permettent de mettre en évidence des bio-marqueurs ou cibles thérapeutiques potentiels, visant à améliorer la prise en charge des patients.*

à une liste de plusieurs centaines ou milliers de gènes ou protéines exprimés de façon différentielle entre des groupes de patients. Il est alors essentiel et primordial d'intégrer ces données et de valider leur pertinence biologique, pour en extraire les mécanismes spécifiquement mis en jeu dans la pathologie et proposer des potentiels biomarqueurs/cibles thérapeutiques aux cliniciens. La dernière étape est la validation des mécanismes, bio-marqueurs ou cibles proposées, afin que les cliniciens disposent de nouveaux outils pour améliorer la prise en charge des patients.

Les approches haut débit sont très utilisées en oncologie depuis plusieurs années et ont permis d'améliorer la prise en charge des patients, en proposant des bio-marqueurs de diagnostic dans le cancer du sein (153), des cibles thérapeutiques dans le sarcome de Kaposi (154), et en mettant en évidence à un niveau moléculaire des différences phénotypiques au sein de tumeurs histologiquement similaires (155, 156). Ces études de criblage à haut débit commencent à être utilisées pour explorer les mécanismes moléculaires impliqués dans des syndromes systémiques inflammatoires aigus,

comme le sepsis (157, 158), ainsi que d'autres pathologies d'origine infectieuse (159).

Dans la dengue, ces approches ont à ce jour été peu utilisées pour améliorer la compréhension de la physiopathologie du choc de dengue et tenter d'identifier des bio-marqueurs de cette complication sévère. En effet, les investigations ont été ralenties par les difficultés de recrutement de patients classés « DSS » au cours d'épidémies, notamment dues à la faible incidence du choc. De plus, il est difficile d'accéder à des prélèvements obtenus avant la déclaration du choc : les patients souffrant de dengue grave se présentent généralement à l'hôpital au moment de la décompensation cardiaque, et ne peuvent donc pas être inclus dans un protocole de suivi d'évolution clinique. L'investigation de bio-marqueurs qui seraient prédictifs de l'évolution vers le syndrome de choc n'est donc actuellement pas envisageable : les bio-marqueurs proposés dans ces approches sont spécifiques du choc, et devront être validés pour leur valeur prédictive chez des cohortes indépendantes, dans le cadre d'études plus ciblées.

A ce jour, seuls deux groupes, dont le nôtre, ont recherché des signatures spécifiques du DSS, en incluant des patients en syndrome de choc bien caractérisé : ces études ont toutes utilisé une approche par analyse des profils transcriptionnels totaux (« genome-wide expression profiling ») de cellules sanguines de patients en syndrome de choc de dengue (160-162). L'étude de Simmons *et al.*, publiée en 2007 (160), s'est basée sur des prélèvements sanguins d'adultes vietnamiens, dont 6 classés en DHF et 6 classés en DSS. La comparaison des profils transcriptionnels a permis de montrer chez les patients en DSS une diminution d'expression des gènes codant pour des protéines impliquées dans la réponse antivirale liée à l'interféron de type I. Ceci laisse supposer que comme dans de nombreuses pathologies, cette réponse antivirale innée jouerait un rôle protecteur contre les formes graves de dengue. Leur deuxième étude, publiée en 2009 (161), également réalisée au Vietnam, a comparé les profils transcriptionnels en phase aiguë de cellules sanguines d'enfants ayant fait une dengue « non compliquée » (9 DF/DHF) à celles d'enfants en choc (9 DSS). Comme dans leur étude précédente (160), les auteurs constatent une diminution d'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans la réponse antivirale liée à l'interféron de type I. Aucune sur-expression de voies pro-inflammatoires n'a pu être mise en évidence : seule une sur-expression de gènes impliqués dans différentes voies métaboliques a été identifiée chez les patients en DSS.

En 2007, notre équipe a mis en place une étude prospective visant à identifier des bio-marqueurs du DSS, en comparant les profils transcriptionnels de cellules sanguines d'enfants cambodgiens classés DF, DHF et DSS selon les critères de l'OMS (162, 163). Le recrutement initial de plus de 100 enfants, dont 25 patients en DSS, a été effectuée lors de l'épidémie de grande ampleur survenue dans le sud-est asiatique en 2007, au cours de laquelle l'incidence des cas de choc était élevée. L'analyse transcriptionnelle a pu être conduite sur les échantillons de 48 jeunes patients, dont 19 en choc. L'appariement des patients dans chaque groupe clinique et l'analyse en ANOVA (« ANalysis Of VAriance ») multi-variée ont permis de rendre les groupes comparables et de sélectionner les gènes différentiellement exprimés entre les trois groupes cliniques : le « phénotype clinique » a été choisi comme variable principale, et ces méthodes ont permis de limiter le biais de sélection dus à des variables confondantes comme l'âge, le sexe, le jour de prélèvement, le sérotype viral ou encore des critères techniques, qui peuvent affecter de manière significative le niveau d'expression des gènes. De façon très intéressante, notre étude a permis de mettre en évidence pour la première fois une signature transcriptionnelle fortement associée au choc de dengue, alors que les réponses transcriptionnelles des formes DF et DHF stades I/II sont très semblables.

L'analyse de cette signature globale du choc de dengue a révélé que les patients en choc sous-expriment des gènes codant pour des protéines impliquées dans la réponse immunitaire antivirale classique des lymphocytes T et des « Natural Killers » NK, comparé aux patients faisant une dengue non compliquée. Ce mécanisme est également décrit dans le sepsis sévère et d'autres syndromes systémiques inflammatoires. De façon intéressante, notre analyse a révélé des profils d'expression pro-inflammatoires, à l'interface entre immunité innée, inflammation et métabolisme lipidique. En effet, l'expression de nombreux gènes laisse supposer l'activation et la participation dans la physiopathologie du DSS de cellules de l'immunité innée, dont certaines sont impliquées dans le métabolisme lipidique. Ce type de réponse de l'hôte est également décrit au cours de processus inflammatoires majeurs aigus (sepsis, SIRS stérile) ou chroniques (athérosclérose, diabète de type 2, obésité), associés à des dysfonctionnements endothéliaux systémiques. Il serait donc intéressant de considérer les drogues utilisées pour traiter ces différentes maladies dans le traitement des patients atteints de dengue. De plus, parmi les gènes altérés, certains codent des DAMPs (« Danger-Associated Molecular Patterns ») ou encore « alarmines », qui transmettent des signaux de danger *via* les voies des TLR (« Toll-Like Receptors »), de la même façon que les PAMPs (« Pathogen-Associated Molecular Patterns ») exogènes. Ainsi, les DAMPs, molécules endogènes, seraient impliquées dans la réponse inflammatoire exacerbée chez les patients souffrant de sepsis, traumatisme, brûlures ou ischémie, et pourraient donc représenter des cibles thérapeutiques de choix.

Conclusion et perspectives

L'investigation du syndrome de choc de dengue et du dysfonctionnement endothélial sous-jacent a été ralentie par l'impossibilité d'accéder aux territoires endothéliaux chez les patients et par l'absence de modèle animal reproduisant les principaux aspects de la maladie humaine. Les chercheurs ont contourné ces problèmes en développant des modèles cellulaires *in vitro*, et en recherchant en parallèle des associations entre « phénotype maladie » et altération du taux de marqueurs biologiques candidats par des techniques classiques : ils ont pu ainsi commencer à décrypter la physiopathologie du choc. L'évolution des techniques permet depuis quelques années d'aborder les pathologies de façon plus globale, sans hypothèse posée *a priori* et d'apporter un éclairage plus global sur les mécanismes impliqués dans diverses pathologies ou entités cliniques. Bien que leur utilisation soit laborieuse, une extrême rigueur et des moyens statistiques adaptés permettent de limiter les biais et de mettre en évidence des signatures ou bio-marqueurs spécifiques, statistiquement significatifs et pertinents par rapport au processus pathologique étudié.

Ainsi, les récentes avancées suggèrent la participation de mécanismes physiopathologiques jusqu'alors jamais décrits ni recherchés dans le syndrome de choc de dengue, et proposent des cibles thérapeutiques potentielles, qui doivent à ce jour être validées sur le plan clinique. De façon complémentaire, des approches protéomiques du syndrome de choc de dengue seraient nécessaires pour identifier directement, dans le plasma ou sérum des patients, des marqueurs ou des combinaisons de marqueurs d'intérêt, faciles à

surveiller ou à doser, et utilisables directement par les cliniciens pour le suivi des patients.

Le dysfonctionnement vasculaire et le syndrome de choc observés dans la dengue sont également des complications d'autres fièvres hémorragiques virales et des mécanismes communs pourraient expliquer l'altération de la perméabilité des endothélia vasculaires. Le décryptage des mécanismes physiopathologiques menant au choc de dengue peut non seulement aider à améliorer les connaissances sur la dengue sévère, mais également servir de modèle pour d'autres fièvres hémorragiques virales, notamment celles dues à des virus de classe IV, plus difficiles à étudier du fait de la difficulté à recruter des patients dans des études cliniques.

Références

1. Gubler DJ, Clark GG. Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. *Emerg Infect Dis* 1995 ; 1 : 55-7.
2. World Health Organization. Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control: new edition. World Health Organization ed, Geneva, 2009.
3. Halstead SB, Papaevangelou G. Transmission of dengue 1 and 2 viruses in Greece in 1928. *Am J Trop Med Hyg* 1980 ; 29 : 635-7.
4. Hammon WM, Rudnick A, Sather GE. Viruses associated with epidemic hemorrhagic fevers of the Philippines and Thailand. *Science* 1960 ; 131 : 1102-3.
5. Halstead SB, Yamarat C, Scanlon JE. The Thai hemorrhagic fever epidemic of 1962 (A preliminary report). J Med Assoc Thai 1963 ; 6 : 449-62.
6. Kouri GP, Guzmán MG, Bravo JR, Triana C. Dengue haemorrahgic fever/dengue shock syndrome: lessons from the Cuban epidemic, 1981. Bull World Health Organ 1989 ; 67 : 375-80.
7. Dengue haemorrhagic fever (DHF). Increase in number of cases in the Americas 1980-1987. *Wkly Epidemiol Rec* 1990 ; 65 : 13-5.
8. Fang R, Lo E, Lim TW. The 1982 dengue epidemic in Malaysia: epidemiological, serological and virological aspects. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1984 ; 15 : 51-8.
9. King CC, Wu YC, Chao DY, Lin TH, Lin C, Wang HT *et al.* Major Epidemics of Dengue in Taiwan in 1981-2000: Related to Intensive Virus Activities in Asia. *Dengue Bulletin* 2000 ; 24 : 1-10.
10. Christophers SR. *Aedes aegypti* the yellow fever mosquito: its life history, bionomics, and structure. Cambridge University Press ed, 1960.
11. Ninove L, Parola P, Baronti C, De Lamballerie X, Gautret P, Doudier B, *et al.* Dengue virus type 3 infection in traveler returning from west Africa. *Emerg Infect Dis* 2009 ; 15 : 1871-2.
12. Dengue fever, Cape Verde. *Wkly Epidemiol Rec* 2009 ; 84 : 469.
13. Rudnick A. Studies of the ecology of dengue in Malaysia: a preliminary report. J *Med Entomol* 1965 ; 2 : 203-8.
14. Saluzzo JF, Cornet M, Adam C, Eyraud M, Digoutte JP. Dengue 2 au Sénégal oriental : enquête sérologique dans les populations simiennes et humaines 1974-85. *Bull Soc Pathol Exot* 1986 ; 79 : 313-22.
15. Cardosa J, Ooi MH, Tio PH, Perera D, Holmes EC, Bibi K, *et al.* Dengue virus serotype 2 from a sylvatic lineage isolated from a patient with dengue hemorrhagic Fever. *PLoS Negl Trop Dis* 2009 ; 3 : e423.
16. Paupy C, Delatte H, Bagny L, Corbel V, Fontenille D. Aedes albopictus, an arbovirus vector: from the darkness to the light. *Microbes Infect* 2009 ; 11: 1177-85.
17. Moutailler S, Barre H, Vazeille M, Failloux AB. Recently introduced Aedes albopictus in Corsica is competent to Chikungunya virus and in a lesser extent to dengue virus. *Trop Med Int Health* 2009 ; 14 : 1105-9.
18. Guzmán MG, Kouri G, Morier L, Soler M, Fernández A. A study of fatal hemorrhagic dengue cases in Cuba, 1981. *Bull Pan Am Health Organ* 1984 ; 18 : 213-20.
19. Khun S, Manderson L. Poverty, user fees and ability to pay for health care for children with suspected dengue in rural Cambodia. *Int J Equity Health* 2008 ; 7 : 10.
20. Heintze C, Velasco Garrido M, Kroeger A. What do community-based dengue control programmes achieve? A systematic review of published evaluations. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2007 ; 101 : 317-25.
21. Vanlerberghe V, Toledo ME, Rodriguez M, Gomez D, Baly A, Benitez JR, *et al.* Community involvement in dengue vector control: cluster randomised trial. *BMJ* 2009 ; 338 : b1959.
22. World Health Organization. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd edition. World Health Organization ed, Geneva, 1997.
23. Suaya JA, Shepard DS, Siqueira JB, Martelli CT, Lum LC, Tan LH, *et al.* Cost of dengue cases in eight countries in the Americas and Asia: a prospective study. *Am J Trop Med Hyg* 2009 ; 80 : 846-55.
24. Gulati S, Maheshwari A. Atypical manifestations of dengue. *Trop Med Int Health* 2007 ; 12 : 1087-95.
25. Lum LC, Lam SK, Choy YS, George R, Harun F. Dengue encephalitis: a true entity? *Am J Trop Med Hyg* 1996 ; 54 : 256-9.
26. Solomon T, Dung NM, Vaughn DW, Kneen R, Thao LT, Raengsakulrach B, *et al.* Neurological manifestations of dengue infection. *Lancet* 2000 ; 355 : 1053-9.
27. Kalayanarooj S, Nimmannitya S. Clinical presentations of dengue hemorrhagic fever in infants compared to children. *J Med Assoc Thai* 2003 ; 86 : S673-80.
28. Bravo JR, Guzmán MG, Kouri GP. Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? 1. Individual risk factors for dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1987 ; 81: 816-20.
29. Guzmán MG, Kouri G, Soler M, Bravo J, Rodriguez de La Vega A, Vazquez S, *et al.* Dengue 2 virus enhancement in asthmatic and non asthmatic individual. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1992 ; 87 : 559-64.
30. González D, Castro OE, Kouri G, Perez J, Martinez E, Vazquez S, *et al.* Classical dengue hemorrhagic fever resulting from two dengue infections spaced 20 years or more apart: Havana, Dengue 3 epidemic, 2001-2002. *Int J Infect Dis* 2005 ; 9 : 280-5.
31. Limonta D, González D, Capó V, Torres G, Pérez AB, Rosario D, *et al.* Fatal severe dengue and cell death in sickle cell disease during the 2001-2002 Havana dengue epidemic. *Int J Infect Dis* 2009 ; 13 : e77-8.
32. Bandyopadhyay S, Lum LC, Kroeger A. Classifying dengue: a review of the difficulties in using the WHO case classification for dengue haemorrhagic fever. *Trop Med Int Health* 2006 ; 11: 1238-55.
33. Setiati TE, Mairuhu AT, Koraka P, Supriatna M, Mac Gillavry MR, Brandjes DP, *et al.* Dengue disease severity in Indonesian children: an evaluation of the World Health Organization classification system. *BMC Infect Dis* 2007 ; 7 : 22.
34. Rigau-Pérez JG. Severe dengue: the need for new case definitions. *Lancet Infect Dis* 2006 ; 6 : 297-302.
35. Guzmán MG, Kouri G, Martinez E, Bravo J, Riverón R, Soler M, *et al.* Clinical and serologic study of Cuban children with dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Bull Pan Am Health Organ* 1987 ; 21 : 70-9.
36. Peters CJ, Zaki SR. Role of the endothelium in viral hemorrhagic fevers. *Crit Care Med* 2002 ; 30 : S268-73.
37. Aleksandrowicz P, Wolf K, Falzarano D, Feldmann H, Seebach J, Schnittler H. Viral haemorrhagic fever and vascular alterations. *Hamostaseologie* 2008 ; 28 : 77-84.
38. Wills BA, Nguyen MD, Ha TL, Dong TH, Tran TN, Le TT, *et al.* Comparison of three fluid solutions for resuscitation in dengue shock syndrome. *N Engl J Med* 2005 ; 353 : 877-89.
39. Smart K, Safitri I. Evidence behind the WHO guidelines: hospital care for children: what treatments are effective for the management of shock in severe dengue? *J Trop Pediatr* 2009 ; 55 : 145-8.
40. Kalayanarooj S. Standardized Clinical Management: Evidence of Reduction of Dengue Haemorrhagic Fever Case-Fatality Rate in Thailand. *Dengue Bulletin* 1999 ; 23 : 10-17.
41. Chaturvedi UC, Shrivastava R. Dengue haemorrhagic fever: A global challenge. *Indian J Med Microbiol* 2004 ; 22 : 5-6.
42. Sahaphong S, Riengrojpitak S, Bhamarapravati N, Chirachariyavej T. Electron microscopic study of the vascular endothelial cell in dengue hemorrhagic fever. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1980 ; 11 : 194-204.
43. Rosen L. The Emperor's New Clothes revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* 1977 ; 26 : 337-43.
44. Calisher CH, Karabatsos N, Dalrymple JM, Shope RE, Porterfield JS, Westaway EG, *et al.* Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. *J Gen Virol* 1989 ; 70 : 37-43.
45. Rico-Hesse R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology* 1990 ; 174 : 479-93.
46. Guzmán MG, Kouri G, Valdés L, Bravo J, Vázquez S, Halstead SB. Enhanced severity of secondary dengue-2 infections: death rates in 1981 and 1997 Cuban outbreaks. *Rev Panam Salud Publica* 2002 ; 11 : 223-7.

47. Rico-Hesse R. Microevolution and virulence of dengue viruses. *Adv Virus Res* 2003 ; 59 : 315-41.
48. Rico-Hesse R, Harrison LM, Salas RA, Tovar D, Nisalak A, Ramos C, *et al.* Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology* 1997 ; 230 : 244-51.
49. Cologna R, Rico-Hesse R. American genotype structures decrease dengue virus output from human monocytes and dendritic cells. *J Virol* 2003 ; 77 : 3929-38.
50. Anderson JR, Rico-Hesse R. *Aedes aegypti* vectorial capacity is determined by the infecting genotype of dengue virus. *Am J Trop Med Hyg* 2006 ; 75 : 886-92.
51. Guzmán MG, Kouri G. Dengue: an update. *Lancet Infect Dis* 2002 ; 2: 33-42.
52. Cologna R, Armstrong PM, Rico-Hesse R. Selection for virulent dengue viruses occurs in humans and mosquitoes. *J Virol* 2005 ; 79 : 853-9.
53. Tolou H, Couissinier-Paris P, Mercier V, Pisano MR, de Lamballerie X, de Micco P, *et al.* Complete genomic sequence of a dengue type 2 virus from the French West Indies. *Biochem Biophys Res Commun* 2000 ; 277 : 89-92.
54. Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, *et al.* Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis* 2000 ; 181 : 2-9.
55. Murgue B, Roche C, Chungue E, Deparis X. Prospective study of the duration and magnitude of viraemia in children hospitalised during the 1996-1997 dengue-2 outbreak in French Polynesia. *J Med Virol* 2000 ; 60 : 432-8.
56. Wang WK, Chao DY, Kao CL, Wu HC, Liu YC, Li CM, *et al.* High levels of plasma dengue viral load during defervescence in patients with dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. *Virology* 2003 ; 305 : 330-8.
57. Guilarde AO, Turchi MD, Siqueira JB Jr., Feres VC, Rocha B, Levi JE, *et al.* Dengue and dengue hemorrhagic fever among adults: clinical outcomes related to viremia, serotypes, and antibody response. *J Infect Dis* 2008 ; 197: 817-24.
58. Libraty DH, Young PR, Pickering D, Endy TP, Kalayanarooj S, Green S, *et al.* High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis* 2002 ; 186 : 1165-8.
59. Thayan R, Huat TL, See LL, Tan CP, Khairullah NS, Yusof R, *et al.* The use of two-dimension electrophoresis to identify serum biomarkers from patients with dengue haemorrhagic fever. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009 ; 103 : 413-9.
60. Muñoz-Jordan JL, Sánchez-Burgos GG, Laurent-Rolle M, Garcia-Sastre A. Inhibition of interferon signaling by dengue virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 ; 100 : 14333-8.
61. Muñoz-Jordan JL, Laurent-Rolle M, Ashour J, Martinez-Sobrido L, Ashok M, Lipkin WI, *et al.* Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses. *J Virol* 2005 ; 79 : 8004-13.
62. Nguyen TH, Nguyen TL, Lei HY, Lin YS, Le BL, Huang KJ, *et al.* Association between sex, nutritional status, severity of dengue hemorrhagic fever, and immune status in infants with dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* 2005 ; 72 : 370-4.
63. Pichainarong N, Mongkalangoon N, Kalayanarooj S, Chaveepojnkamjorn W. Relationship between body size and severity of dengue hemorrhagic fever among children aged 0-14 years. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2006 ; 37 : 283-8.
64. Halstead SB, Streit TG, Lafontant JG, Putvatana R, Russell K, Sun W, *et al.* Haiti: absence of dengue hemorrhagic fever despite hyperendemic dengue virus transmission. *Am J Trop Med Hyg* 2001 ; 65 : 180-3.
65. de la C Sierra B, Garcia G, Pérez AB, Morier L, Alvarez M, Kouri G, *et al.* Ethnicity and difference in dengue virus-specific memory T cell responses in Cuban individuals. *Viral Immunol* 2006 ; 19 : 662-8.
66. de la C Sierra B, Kouri G, Guzmán MG. Race: a risk factor for dengue hemorrhagic fever. *Arch Virol* 2007 ; 152 : 533-42.
67. Blanton RE, Silva LK, Morato VG, Parrado AR, Dias JP, Melo PR, *et al.* Genetic ancestry and income are associated with dengue hemorrhagic fever in a highly admixed population. *Eur J Hum Genet* 2008 ; 16 : 762-5.
68. Chaturvedi U, Nagar R, Shrivastava R. Dengue and dengue haemorrhagic fever: implications of host genetics. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006 ; 47 : 155-66.
69. Coffey LL, Mertens E, Brehin AC, Fernandez-Garcia MD, Amara A, Després P, *et al.* Human genetic determinants of dengue virus susceptibility. *Microbes Infect* 2009 ; 11 : 143-56.
70. Kalayanarooj S, Gibbons RV, Vaughn D, Green S, Nisalak A, Jarman RG, *et al.* Blood group AB is associated with increased risk for severe dengue disease in secondary infections. *J Infect Dis* 2007 ; 195 : 1014-7.
71. Hammond SN, Balmaseda A, Pérez L, Tellez Y, Saborio SI, Mercado JC, *et al.* Differences in dengue severity in infants, children, and adults in a 3-year hospital-based study in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg* 2005 ; 73 : 1063-70.
72. Guzmán MG, Kouri G, Bravo J, Valdes L, Vazquez S, Halstead SB. Effect of age on outcome of secondary dengue 2 infections. *Int J Infect Dis* 2002 ; 6 : 118-24.
73. World Health Organization. Prevention and control of dengue and dengue haemorrhagic fever: comprehensive guidelines: WHO Regional Publication, SEARO; 1999.
74. Kittigul L, Pitakarnjanakul P, Sujirarat D, Siripanichgon K. The differences of clinical manifestations and laboratory findings in children and adults with dengue virus infection. *J Clin Virol* 2007 ; 39 : 76-81.
75. Gamble J, Bethell D, Day NP, Loc PP, Phu NH, Gartside IB, *et al.* Age-related changes in microvascular permeability: a significant factor in the susceptibility of children to shock? *Clin Sci* 2000 ; 98 : 211-6.
76. 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 : 311-28.
77. Thein S, Aung MM, Shwe TN, Aye M, Zaw A, Aye K, *et al.* Risk factors in dengue shock syndrome. *Am J Trop Med Hyg* 1997 ; 56 : 566-72.
78. Endy TP, Nisalak A, Chunsuttitwat S, Vaughn DW, Green S, Ennis FA, *et al.* Relationship of preexisting dengue virus (DV) neutralizing antibody levels to viremia and severity of disease in a prospective cohort study of DV infection in Thailand. *J Infect Dis* 2004 ; 189 : 990-1000.
79. Halstead SB. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science* 1988 ; 239 : 476-81.
80. Deparis X, Maréchal V, Matheus S. Mécanismes physiopathologiques de la dengue : revue critique des hypothèses. *Med Trop* 2009 ; 69 : 351-7
81. Kliks SC, Nimmanitya S, Nisalak A, Burke DS. Evidence that maternal dengue antibodies are important in the development of dengue hemorrhagic fever in infants. *Am J Trop Med Hyg* 1988 ; 38 : 411-9.
82. Simmons CP, Chau TN, Thuy TT, Tuan NM, Hoang DM, Thien NT, *et al.* Maternal antibody and viral factors in the pathogenesis of dengue virus in infants. *J Infect Dis* 2007 ; 196 : 416-24.
83. Halstead SB, O'Rourke EJ. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. *J Exp Med* 1977 ; 146 : 201-17.
84. Gubler DJ, Suharyono W, Tan R, Abidin M, Sie A. Viraemia in patients with naturally acquired dengue infection. *Bull World Health Organ* 1981 ; 59 : 623-30.
85. Mongkolsapaya J, Dejnirattisai W, Xu XN, Vasanawathana S, Tangthawornchaikul N, Chairunsri A, *et al.* Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nat Med* 2003 ; 9 : 921-7.
86. Kurane I, Innis BL, Nimmannitya S, Nisalak A, Meager A, Janus J, *et al.* Activation of T lymphocytes in dengue virus infections. High levels of soluble interleukin 2 receptor, soluble CD4, soluble CD8, interleukin 2, and interferon-gamma in sera of children with dengue. *J Clin Invest* 1991 ; 88 : 1473-80.
87. Green S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Nisalak A, *et al.* Early immune activation in acute dengue illness is related to development of plasma leakage and disease severity. *J Infect Dis* 1999 ; 179 : 755-62.
88. Mangada MM, Endy TP, Nisalak A, Chunsuttiwat S, Vaughn DW, Libraty DH, *et al.* Dengue-specific T cell responses in peripheral blood mononuclear cells obtained prior to secondary dengue virus infections in Thai schoolchildren. *J Infect Dis* 2002 ; 185 : 1697-703.
89. Mangada MM, Rothman AL. Altered cytokine responses of dengue-specific CD4+ T cells to heterologous serotypes. *J Immunol* 2005 ; 175 : 2676-83.
90. Libraty DH, Acosta LP, Tallo V, Segubre-Mercado E, Bautista A, Potts JA, *et al.* A prospective nested case-control study of Dengue in infants: rethinking and refining the antibody-dependent enhancement dengue hemorrhagic fever model. *PLoS Med* 2009 ; 6 : e1000171.
91. Laoprasopwattana K, Libraty DH, Endy TP, Nisalak A, Chunsuttiwat S, Vaughn DW, *et al.* Dengue Virus (DV) enhancing antibody activity in preillness plasma does not predict subsequent disease severity or viremia in secondary DV infection. *J Infect Dis* 2005 ; 192 : 510-9.
92. Ong A, Sandar M, Chen MI, Sin LY. Fatal dengue hemorrhagic fever in adults during a dengue epidemic in Singapore. *Int J Infect Dis* 2007 ; 11 : 263-7.
93. Harris E, Videa E, Perez L, Sandoval E, Téllez Y, Pérez ML, *et al.* Clinical, epidemiologic, and virologic features of dengue in the 1998 epidemic in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg* 2000 ; 63 : 5-11.

94. Thomas S, Redfern JB, Lidbury BA, Mahalingam S. Antibody-dependent enhancement and vaccine development. *Expert Rev Vaccines* 2006 ; 5 : 409-12.

95. Durbin AP, Whitehead SS. Dengue vaccine candidates in development. *Curr Top Microbiol Immunol* 2010 ; 338 : 129-43.

96. Chaturvedi UC, Agarwal R, Elbishbishi EA, Mustafa AS. Cytokine cascade in dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2000 ; 28 : 183-8.

97. Pang T, Cardosa MJ, Guzman MG. Of cascades and perfect storms: the immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Immunol Cell Biol* 2007 ; 85 : 43-5.

98. Wang H, Ma S. The cytokine storm and factors determining the sequence and severity of organ dysfunction in multiple organ dysfunction syndrome. *Am J Emerg Med* 2008 ; 26 : 711-5.

99. Sriskandan S, Altmann DM. The immunology of sepsis. *J Pathol* 2008 ; 214 : 211-23.

100. Dewi BE, Takasaki T, Kurane I. In vitro assessment of human endothelial cell permeability: effects of inflammatory cytokines and dengue virus infection. *J Virol Methods* 2004 ; 121 : 171-80.

101. Hober D, Poli L, Roblin B, Gestas P, Chungue E, Granic G, *et al.* Serum levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-1 beta (IL-1 beta) in dengue-infected patients. *Am J Trop Med Hyg* 1993 ; 48 : 324-31.

102. Hober D, Delannoy AS, Benyoucef S, De Groote D, Wattré P. High levels of sTNFR p75 and TNF alpha in dengue-infected patients. *Microbiol Immunol* 1996 ; 40 : 569-73.

103. Braga EL, Moura P, Pinto LM, Ignácio SR, Oliveira MJ, Cordeiro MT, *et al.* Detection of circulant tumor necrosis factor-alpha, soluble tumor necrosis factor p75 and interferon-gamma in Brazilian patients with dengue fever and dengue hemorrhagic fever. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001 ; 96 : 229-32.

104. Wang L, Chen RF, Liu JW, Yu HR, Kuo HC, Yang KD. Implications of dynamic changes among tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), membrane TNF receptor, and soluble TNF receptor levels in regard to the severity of dengue infection. *Am J Trop Med Hyg* 2007 ; 77 : 297-302.

105. Levy A, Valero N, Espina LM, Añnez G, Arias J, Mosquera J. Increment of interleukin 6, tumour necrosis factor alpha, nitric oxide, C-reactive protein and apoptosis in dengue. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009 ; 104 : 16-23.

106. Libraty DH, Endy TP, Houng HS, Green S, Kalayanarooj S, Suntayakorn S, *et al.* Differing influences of virus burden and immune activation on disease severity in secondary dengue-3 virus infections. *J Infect Dis* 2002 ; 185 : 1213-21.

107. Bethell DB, Flobbe K, Cao XT, Day NP, Pham TP, Buurman WA, *et al.* Pathophysiologic and prognostic role of cytokines in dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis* 1998 ; 177 : 778-82.

108. Laur F, Murgue B, Deparis X, Roche C, Cassar O, Chungue E. Plasma levels of tumour necrosis factor alpha and transforming growth factor beta-1 in children with dengue 2 virus infection in French Polynesia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1998 ; 92 : 654-6.

109. Chen LC, Lei HY, Liu CC, Shiesh SC, Chen SH, Liu HS, *et al.* Correlation of serum levels of macrophage migration inhibitory factor with disease severity and clinical outcome in dengue patients. *Am J Trop Med Hyg* 2006 ; 74 : 142-7.

110. Bozza FA, Cruz OG, Zagne SM, Azeredo EL, Nogueira RM, Assis EF, *et al.* Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. *BMC Infect Dis* 2008 ; 8 : 86.

111. Priyadarshini D, Gadia RR, Tripathy A, Gurukumar KR, Bhagat A, Patwardhan S, *et al.* Clinical findings and pro-inflammatory cytokines in dengue patients in Western India: a facility-based study. *PLoS One* 2010 ; 5 : e8709.

112. Juffrie M, Meer GM, Hack CE, Haasnoot K, Sutaryo, Veerman AJ, *et al.* Inflammatory mediators in dengue virus infection in children: interleukin-6 and its relation to C-reactive protein and secretory phospholipase A2. *Am J Trop Med Hyg* 2001 ; 65 : 70-5.

113. Raghupathy R, Chaturvedi UC, Al-Sayer H, Elbishbishi EA, Agarwal R, Nagar R, *et al.* Elevated levels of IL-8 in dengue hemorrhagic fever. *J Med Virol* 1998 ; 56 : 280-5.

114. Mustafa AS, Elbishbishi EA, Agarwal R, Chaturvedi UC. Elevated levels of interleukin-13 and IL-18 in patients with dengue hemorrhagic fever. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2001 ; 30 : 229-33.

115. Lee YR, Liu MT, Lei HY, Liu CC, Wu JM, Tung YC, *et al.* MCP-1, a highly expressed chemokine in dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome patients, may cause permeability change, possibly through reduced tight junctions of vascular endothelium cells. *J Gen Virol* 2006 ; 87 : 3623-30.

116. Green S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Nisalak A, *et al.* Elevated plasma interleukin-10 levels in acute dengue correlate with disease severity. *J Med Virol* 1999 ; 59 : 329-34.

117. Pérez AB, Garcia G, Sierra B, Alvarez M, Vázquez S, Cabrera MV, *et al.* IL-10 levels in Dengue patients: some findings from the exceptional epidemiological conditions in Cuba. *J Med Virol* 2004 ; 73 : 230-4.

118. Chen RF, Liu JW, Yeh WT, Wang L, Chang JC, Yu HR, *et al.* Altered T helper 1 reaction but not increase of virus load in patients with dengue hemorrhagic fever. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005 ; 44 : 43-50.

119. Pacsa AS, Agarwal R, Elbishbishi EA, Chaturvedi UC, Nagar R, Mustafa AS. Role of interleukin-12 in patients with dengue hemorrhagic fever. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2000 ; 28 : 151-5.

120. Azeredo EL, De Oliveira-Pinto LM, Zagne SM, Cerqueira DI, Nogueira RM, Kubelka CF. NK cells, displaying early activation, cytotoxicity and adhesion molecules, are associated with mild dengue disease. *Clin Exp Immunol* 2006 ; 143 : 345-56.

121. Azizan A, Fitzpatrick K, Signorovitz A, Tanner R, Hernandez H, Stark L, *et al.* Profile of time-dependent VEGF upregulation in human pulmonary endothelial cells, HPMEC-ST1.6R infected with DENV-1, -2, -3, and -4 viruses. *Virol J* 2009 ; 6 : 49.

122. Tseng CS, Lo HW, Teng HC, Lo WC, Ker CG. Elevated levels of plasma VEGF in patients with dengue hemorrhagic fever. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005 ; 43 : 99-102.

123. Srikiatkhachorn A, Ajariyakhajorn C, Endy TP, Kalayanarooj S, Libraty DH, Green S, *et al.* Virus-induced decline in soluble vascular endothelial growth receptor 2 is associated with plasma leakage in dengue hemorrhagic Fever. *J Virol* 2007 ; 81 : 1592-600.

124. Sathupan P, Khongphattanayothin A, Srisai J, Srikaew K, Poovorawan Y. The role of vascular endothelial growth factor leading to vascular leakage in children with dengue virus infection. *Ann Trop Paediatr* 2007 ; 27 : 179-84.

125. Seet RC, Chow AW, Quek AM, Chan YH, Lim EC. Relationship between circulating vascular endothelial growth factor and its soluble receptors in adults with dengue virus infection: a case-control study. *Int J Infect Dis* 2009 ; 13 : e248-53.

126. Khongphatthanayothin A, Phumaphuti P, Thongchaiprasit K, Poovorawan Y. Serum levels of sICAM-1 and sE-selectin in patients with dengue virus infection. *Jpn J Infect Dis* 2006 ; 59 : 186-8.

127. Murgue B, Cassar O, Deparis X. Plasma concentrations of sVCAM-1 and severity of dengue infections. *J Med Virol* 2001 ; 65 : 97-104.

128. Koraka P, Murgue B, Deparis X, Van Gorp EC, Setiati TE, Osterhaus AD, *et al.* Elevation of soluble VCAM-1 plasma levels in children with acute dengue virus infection of varying severity. *J Med Virol* 2004 ; 72 : 445-50.

129. Bokisch VA, Top FH Jr, Russell PK, Dixon FJ, Muller-Eberhard HJ. The potential pathogenic role of complement in dengue hemorrhagic shock syndrome. *N Engl J Med* 1973 ; 289 : 996-1000.

130. Avirutnan P, Punyadee N, Noisakran S, Komoltri C, Thiemmeca S, Auethavornanan K, *et al.* Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement. *J Infect Dis* 2006 ; 193 : 1078-88.

131. Nascimento EJ, Silva AM, Cordeiro MT, Brito CA, Gil LH, Braga-Neto U, *et al.* Alternative complement pathway deregulation is correlated with dengue severity. *PLoS One* 2009 ; 4 : e6782.

132. Falconar AK. The dengue virus nonstructural-1 protein (NS1) generates antibodies to common epitopes on human blood clotting, integrin/adhesin proteins and binds to human endothelial cells: potential implications in haemorrhagic fever pathogenesis. *Arch Virol* 1997 ; 142 : 897-916.

133. Mitrakul C, Poshyachinda M, Futrakul P, Sangkawibha N, Ahandrik S. Hemostatic and platelet kinetic studies in dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* 1977 ; 26 : 975-84.

134. Lin CF, Lei HY, Liu CC, Liu HS, Yeh TM, Wang ST, *et al.* Generation of IgM anti-platelet autoantibody in dengue patients. *J Med Virol* 2001 ; 63 : 143-9.

135. Lin CF, Chiu SC, Hsiao YL, Wan SW, Lei HY, Shiau AL, *et al.* Expression of cytokine, chemokine, and adhesion molecules during endothelial cell activation induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1. *J Immunol* 2005 ; 174 : 395-403.

136. Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res* 2007 ; 100 : 158-73.

137. Aird WC. Endothelium in health and disease. *Pharmacol Rep* 2008 ; 60 : 139-43.

138. Bonner SM, O'Sullivan MA. Endothelial cell monolayers as a model system to investigate dengue shock syndrome. *J Virol Methods* 1998 ; 71 : 159-67.
139. Jessie K, Fong MY, Devi S, Lam SK, Wong KT. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. *J Infect Dis* 2004 ; 189 : 1411-8.
140. Azizan A, Sweat J, Espino C, Gemmer J, Stark L, Kazanis D. Differential proinflammatory and angiogenesis-specific cytokine production in human pulmonary endothelial cells, HPMEC-ST1.6R infected with dengue-2 and dengue-3 virus. *J Virol Methods* 2006 ; 138 : 211-7.
141. Peyrefitte CN, Pastorino B, Grau GE, Lou J, Tolou H, Couissinier-Paris P. Dengue virus infection of human microvascular endothelial cells from different vascular beds promotes both common and specific functional changes. *J Med Virol* 2006 ; 78 : 229-42.
142. Talavera D, Castillo AM, Dominguez MC, Gutierrez AE, Meza I. IL8 release, tight junction and cytoskeleton dynamic reorganization conducive to permeability increase are induced by dengue virus infection of microvascular endothelial monolayers. *J Gen Virol* 2004 ; 85 : 1801-13.
143. Avirutnan P, Malasit P, Seliger B, Bhakdi S, Husmann M. Dengue virus infection of human endothelial cells leads to chemokine production, complement activation, and apoptosis. *J Immunol* 1998 ; 161 : 6338-46.
144. Huang YH, Lei HY, Liu HS, Lin YS, Liu CC, Yeh TM. Dengue virus infects human endothelial cells and induces IL-6 and IL-8 production. *Am J Trop Med Hyg* 2000 ; 63 : 71-5.
145. Gavrilovskaya IN, Gorbunova EE, Mackow NA, Mackow ER. Hantaviruses direct endothelial cell permeability by sensitizing cells to the vascular permeability factor VEGF, while angiopoietin 1 and sphingosine 1-phosphate inhibit hantavirus-directed permeability. *J Virol* 2008 ; 82 : 5797-806.
146. Dewi BE, Takasaki T, Kurane I. Peripheral blood mononuclear cells increase the permeability of dengue virus-infected endothelial cells in association with down-regulation of vascular endothelial cadherin. *J Gen Virol* 2008 ; 89 : 642-52.
147. Limonta D, Capó V, Torres G, Pérez AB, Guzmán MG. Apoptosis in tissues from fatal dengue shock syndrome. *J Clin Virol* 2007 ; 40 : 50-4.
148. Kanlaya R, Pattanakitsakul SN, Sinchaikul S, Chen ST, Thongboonkerd V. Alterations in actin cytoskeletal assembly and junctional protein complexes in human endothelial cells induced by dengue virus infection and mimicry of leukocyte transendothelial migration. *J Proteome Res* 2009 ; 8 : 2551-62.
149. Luplertlop N, Misse D, Bray D, Deleuze V, Gonzalez JP, Leardkamolkarn V, *et al.* Dengue-virus-infected dendritic cells trigger vascular leakage through metalloproteinase overproduction. *EMBO Rep* 2006 ; 7 : 1176-81.
150. Lockhart DJ, Winzeler EA. Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature* 2000 ; 405 : 827-36.
151. Cobb JP, Mindrinos MN, Miller-Graziano C, Calvano SE, Baker HV, Xiao W, *et al.* Application of genome-wide expression analysis to human health and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 ; 102 : 4801-6.
152. Tian L, Greenberg SA, Kong SW, Altschuler J, Kohane IS, Park PJ. Discovering statistically significant pathways in expression profiling studies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 ; 102 : 13544-9.
153. Ruiz-Garcia E, Scott V, Machavoine C, Bidart JM, Lacroix L, Delaloge S, *et al.* Gene expression profiling identifies Fibronectin 1 and CXCL9 as candidate biomarkers for breast cancer screening. *Br J Cancer* 2010 ; 102 : 462-8.
154. Moses AV, Jarvis MA, Raggo C, Bell YC, Ruhl R, Luukkonen BG, *et al.* Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-induced upregulation of the c-kit proto-oncogene, as identified by gene expression profiling, is essential for the transformation of endothelial cells. *J Virol* 2002 ; 76 : 8383-99.
155. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, *et al.* Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000 ; 403 : 503-11.
156. Segal NH, Pavlidis P, Antonescu CR, Maki RG, Noble WS, DeSantis D, *et al.* Classification and subtype prediction of adult soft tissue sarcoma by functional genomics. Am *J Pathol* 2003 ; 163 : 691-700.
157. Feezor RJ, Cheng A, Paddock HN, Baker HV, Moldawer LL. Functional genomics and gene expression profiling in sepsis: beyond class prediction. *Clin Infect Dis* 2005 ; 41 : S427-35.
158. Tang BM, McLean AS, Dawes IW, Huang SJ, Lin RC. The use of gene-expression profiling to identify candidate genes in human sepsis. Am J Respir *Crit Care Med* 2007 ; 176 : 676-84.
159. Ren Y, He QY, Fan J, Jones B, Zhou Y, Xie Y, *et al.* The use of proteomics in the discovery of serum biomarkers from patients with severe acute respiratory syndrome. *Proteomics* 2004 ; 4 : 3477-84.
160. Simmons CP, Popper S, Dolocek C, Chau TN, Griffiths M, Dung NT, *et al.* Patterns of host genome-wide gene transcript abundance in the peripheral blood of patients with acute dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis* 2007 ; 195 : 1097-107.
161. Long HT, Hibberd ML, Hien TT, Dung NM, Van Ngoc T, Farrar J, *et al.* Patterns of gene transcript abundance in the blood of children with severe or uncomplicated dengue highlight differences in disease evolution and host response to dengue virus infection. *J Infect Dis* 2009 ; 199 : 537-46.
162. Devignot S, Sapet C, Duong V, Bergon A, Rihet P, Ong S, *et al.* Genome-wide expression profiling deciphers host responses altered during dengue shock syndrome and reveals the role of innate immunity in severe dengue. En révision.
163. Devignot S, Duong V, Sapet C, Rihet P, Bergon A, Tolou H, *et al.* Recherche de biomarqueurs biologiques associés au syndrome de choc de dengue chez des patients vivant en zone d'endémie. *Med Trop* 2009 ; 69 : 366.