

# VIRUS : AMIS OU ENNEMIS ?

En 1880, Louis Pasteur et Robert Koch émettent la « théorie germinale » selon laquelle les maladies infectieuses trouvent leur origine dans un micro-organisme visible au microscope, qui peut être cultivé sur un milieu nutritif approprié, et qui est retenu par un filtre de porcelaine. Dès 1881 cependant, Pasteur cultive l'agent infectieux de la rage, qui ne répond pas à ces critères : en particulier, il nécessite la culture sur tissus. La notion de virus, parasite intracellulaire, émergera dix sept ans plus tard avec Beijerinck.

La virologie et les biotechnologies ont fait évoluer les relations virus-hôte qui ont été longtemps des relations de lutte. Les connaissances structurales et fonctionnelles, acquises grâce à la virologie et à la biologie moléculaire, ont permis de développer, à l'aide des nouvelles technologies, des usages thérapeutiques allant de la prophylaxie à la thérapie génique.

## 1 Stratégies thérapeutiques antivirales : le virus de la grippe sous contrôle

### 1.1 Présentation du virus de la grippe

La grippe est provoquée par un ensemble de virus, les virus grippaux de la famille des Orthomyxoviridae, genre *Influenzavirus*.

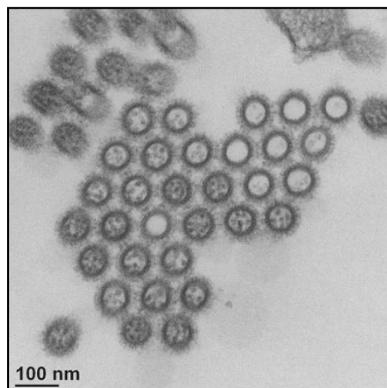


Figure 1 : Observation en microscopie électronique à transmission du virus de la grippe A/H1N1 (x 50000)  
www.inserm.fr

Ces virus sont responsables d'épidémies saisonnières et de pandémies, dont la tristement célèbre « grippe espagnole ».

- 1.1.1 Définir les termes « pandémie » et « épidémie ».
- 1.1.2 La structure du virus est représentée sur le schéma de l'**annexe 1**. Reporter sur la copie les numéros indiqués sur le schéma et compléter les légendes à l'aide de la description donnée en **annexe 1**.
- 1.1.3 Décrire la structure d'une capsidie à symétrie hélicoïdale.

## 1.2 Le cycle de multiplication

- 1.2.1 Le cycle de multiplication du virus de la grippe est schématisé dans l'**annexe 2**. Reporter sur la copie les numéros indiqués sur ce schéma et nommer les étapes correspondantes.

Lors de l'**étape 1** le virus s'attache à la cellule cible grâce à une hémagglutinine. L'hémagglutinine est un trimère. Chaque monomère est constitué de deux parties, HA1 et HA2, maintenues entre elles par un pont disulfure. HA1 est responsable de l'attachement au récepteur de la cellule. HA2 assure l'ancrage de l'hémagglutinine dans l'enveloppe virale grâce à un segment transmembranaire.

- 1.2.2 A partir de l'**annexe 1**, schématiser une hémagglutinine puis, à l'aide des données ci-dessus, positionner sur ce schéma les sous unités HA1 et HA2.
- 1.2.3 Schématiser le processus conduisant à la formation de l'endosome lors de l'**étape 2**.

Dans l'endosome, à l'extérieur du virus, la concentration en ions  $H^+$  est élevée. Les canaux ioniques constitués par les protéines M2 permettent l'entrée des ions  $H^+$  à l'intérieur du virus. Cette baisse de pH à l'intérieur du virus entraîne un changement de conformation de l'hémagglutinine (HA), permettant le rapprochement puis la fusion des membranes du virus et de l'endosome. Ensuite, a lieu l'**étape 3** libérant les huit segments d'ARN.

- 1.2.4 A l'aide des données ci-dessus, indiquer le type de transport membranaire assuré par les protéines M2 et justifier la réponse.
- 1.2.5 Donner une définition de la structure tertiaire d'une protéine et citer les liaisons stabilisant ce niveau de structure.
- 1.2.6 Expliquer alors comment la baisse de pH à l'intérieur du virus peut entraîner un changement de conformation de la protéine HA.

Deux médicaments contiennent des molécules bloquant la protéine M2, l'Amantadine (Mantadix®) et la Rimantidine (Roflual®). Ces amines synthétiques se fixent sur M2, au niveau de la région du pore du canal, empêchant ainsi le transfert d'ions  $H^+$ .

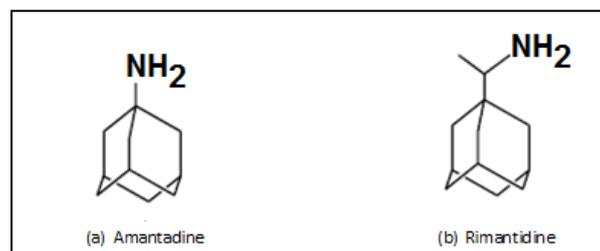


Figure 2: Structure chimique des amines synthétiques

- 1.2.7 Expliquer comment ces molécules peuvent bloquer le cycle de multiplication du virus de la grippe.

Lors de l'**étape 7**, les virus restent dans un premier temps attachés à leur cellule cible, grâce à l'association entre la protéine HA virale et l'acide sialique du récepteur cellulaire du virus. La structure de ces récepteurs figure à l'**annexe 3**.

Dans un deuxième temps les neuraminidases (NA), permettent de détacher les virus des cellules.

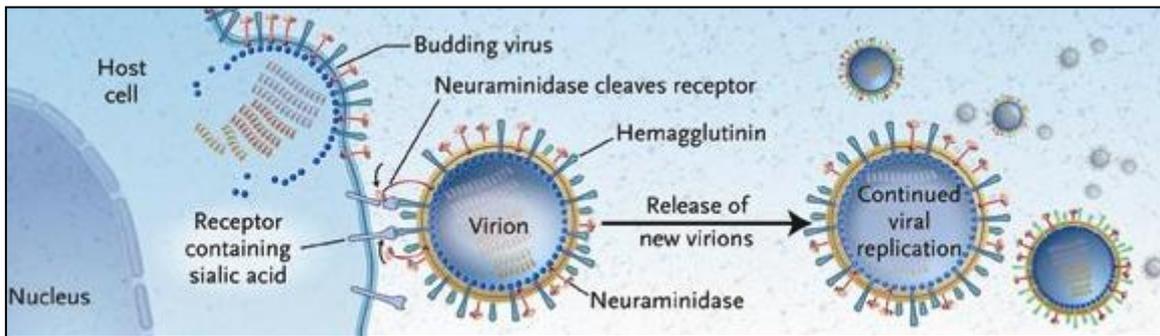


Figure 3: Rôle de la neuraminidase dans la libération du virus;  
d'après [www.fluwiki.info](http://www.fluwiki.info)

1.2.8 Nommer le type de liaison rompue grâce à la neuraminidase d'après l'**annexe 4**.

Des cellules infectées par le virus de la grippe sont observées en microscopie électronique à transmission, en absence et en présence d'inhibiteur de neuraminidase (**document 5A de l'annexe 5**).

1.2.9 Décrire les phénomènes observables sur ces micro-électronographies.

1.2.10 Indiquer l'origine de l'enveloppe virale puis, à l'aide de la figure 3, expliquer pourquoi les virus sont susceptibles de s'agglutiner entre eux.

1.2.11 Justifier l'agglutination des virus entre eux en présence d'un inhibiteur de neuraminidase (**document 5A de l'annexe 5**).

Les inhibiteurs de la neuraminidase (NA) sont des molécules dont la conformation spatiale est analogue à celle de l'acide sialique, substrat de la neuraminidase.

L'une de ces molécules inhibitrices, l'Oseltamivir contenue dans le Tamiflu® est présentée dans le document 5B de l'**annexe 5** en représentation de Cram.

1.2.12 Justifier la catégorie d'inhibiteur à laquelle appartient cette molécule.

Au début de l'infection, peu de virus sont produits par la cellule infectée. Le Tamiflu® diminue la durée et la gravité de la maladie, à condition d'être administré assez tôt, en quantité suffisante et non toxique pour l'organisme.

1.2.13 Expliquer pourquoi le Tamiflu® doit être administré dans les douze premières heures suivant l'apparition de la fièvre pour être efficace.

### 1.3 La variabilité génétique

Au sein du genre *Influenzavirus* type A, les virus grippaux sont différenciés en sous-types selon les propriétés antigéniques de l'hémagglutinine et de la neuraminidase. Il existe 16 sous-types d'hémagglutinines (H1 à H16) et 9 de neuraminidases (N1 à N9).

De nouvelles formes de virus émergent à la suite de modifications génétiques obtenues selon deux modalités :

- Le « glissement antigénique », dû à des mutations ponctuelles portant sur l'ARN viral, est responsable des épidémies saisonnières.

- La « cassure antigénique », due à un réassortiment génétique survenu entre souches humaines et animales est à l'origine des pandémies.

L'**annexe 6** présente différents mécanismes (b, c, d) pouvant être à l'origine d'une mutation ponctuelle.

- 1.3.1 Définir une mutation ponctuelle.
- 1.3.2 Décrire les différents mécanismes (b, c, d), observables au niveau du codon UCG.
- 1.3.3 Préciser, dans chaque cas, les conséquences de ce type de mutation sur la séquence peptidique.

Sous la pression immunitaire de la population humaine mondiale, le virus de la grippe évolue en accumulant progressivement des mutations, ce qui entraîne un « glissement antigénique » lui permettant de retrouver périodiquement une population humaine non immunisée contre le virus mutant présent.

Le document en **annexe 7** montre les conséquences d'un « glissement antigénique » au cours du temps.

- 1.3.4 Expliquer les conséquences sur la protéine HA.
- 1.3.5 Montrer en quoi le glissement antigénique explique que le virus échappe au système immunitaire au cours du temps.

Le principe de l'efficacité des vaccins antigrippaux est de provoquer la synthèse d'anticorps neutralisants dirigés contre l'antigène majeur des *Influenzavirus* : l'hémagglutinine HA.

- 1.3.6 Expliquer pourquoi les vaccins doivent être renouvelés chaque année.

Les virus grippaux infectent d'autres espèces que l'homme, en particulier les oiseaux et le porc. Les oiseaux constituent le réservoir principal des virus de la grippe. Le porc est sensible aussi bien aux virus infectant les oiseaux qu'à ceux infectant l'homme. L'**annexe 8** présente le mécanisme de la « cassure antigénique » pour les virus de type A.

- 1.3.7 Expliquer le schéma du mécanisme de la « cassure antigénique ».
- 1.3.8 Indiquer la conséquence du réassortiment génétique sur le virus hybride.
- 1.3.9 Indiquer si un individu vacciné contre la grippe saisonnière est protégé contre ce virus hybride. Justifier.

## 2 Stratégie vaccinale antitumorale : papillomavirus et cancer du col de l'utérus

Le cancer du col de l'utérus est le deuxième en terme d'incidence dans le monde et le dixième en France; le pic des cas dépistés se situe vers 40 ans. Il est le premier cancer féminin pour la mortalité dans les pays en voie de développement. Il a été établi un lien entre l'infection par un papillomavirus et le développement du cancer de l'utérus. Près des 2/3 des femmes qui ont une activité sexuelle sont en contact avec le virus, mais seules 1 à 2 % de celles qui sont contaminées par le virus vont développer un cancer du col de l'utérus.

Ce cancer est hormono-sensible et se développe aux dépens de la muqueuse de l'exocol. Il est lié à la transformation de cellules normales en cellules cancéreuses par les virus HPV16 et HPV18 (HPV : *Human Papillomavirus*).

## 2.1 Cancer du col de l'utérus : les modifications histologiques observées

### 2.1.1 Anatomie de l'appareil génital féminin.

Reporter sur la copie les lettres indiquées sur l'**annexe 9** et compléter les légendes.

### 2.1.2 Étude cytologique : le frottis exocervical

Le principe du dépistage du cancer du col de l'utérus est fondé sur une étude de « cytologie exfoliative » qui consiste à prélever par frottements des cellules superficielles et intermédiaires de l'exocol et de l'endocol à l'aide d'une spatule et de les étaler sur une lame, comme présenté sur la **figure 4**.

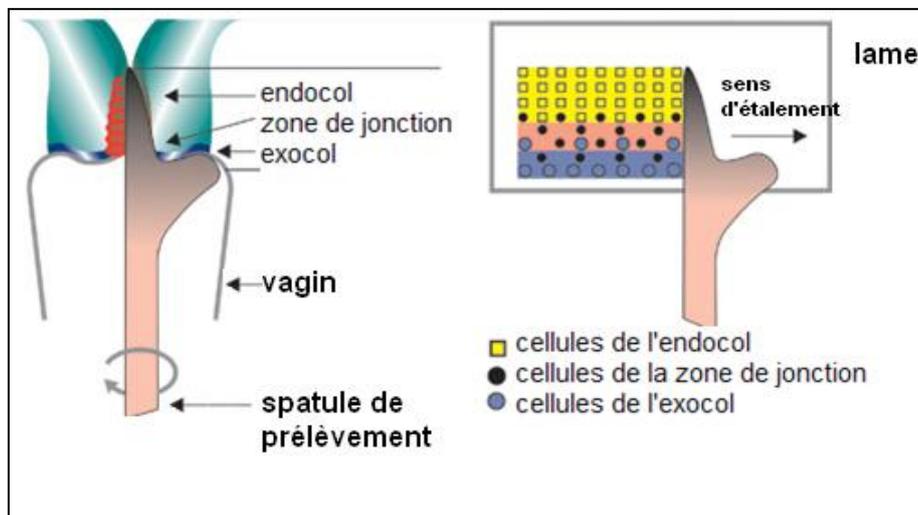


Figure 4: Prélèvement des cellules du col et réalisation du frottis

Le frottis est coloré selon la coloration de Papanicolaou, dont le principe présenté en **annexe 10** est voisin de celui de la coloration de May Grünwald Giemsa .

- 2.1.2.1 Nommer les affinités tinctoriales mises en évidence par la coloration de May Grünwald Giemsa MGG et expliquer le lien entre affinité tinctoriale et ultrastructure cellulaire en utilisant des exemples issus du MGG.

Les **documents 10A et 10B de l'annexe 10** présentent les aspects hormonaux et cytologiques du cycle menstruel chez une femme non infectée par le HPV.

- 2.1.2.2 En comparant les **documents 10B et 10C de l'annexe 10**, commenter le frottis obtenu en phase folliculaire pour une patiente infectée par le virus HPV. Proposer une explication pour la modification tinctoriale affectant la cellule désignée par une flèche dans le **document 10C**.

En cas de lésion grave détectée au frottis, le chirurgien est amené à pratiquer une biopsie du col de l'utérus. Une étude histologique est alors réalisée.

### 2.1.3 Étude histologique : la biopsie exocervicale

En comparant les **documents 11A et 11B de l'0**, commenter l'aspect d'une coupe histologique obtenue par biopsie de l'exocol pour une patiente présentant un cancer provoqué par le HPV.

### 2.1.4 Le contrôle hormonal

Le **document 10A de l'annexe 10** montre que le développement de la muqueuse de l'exocol et celui de l'endomètre sont sous contrôle hormonal.

2.1.4.1 Donner une définition du terme « hormone ».

2.1.4.2 Indiquer les deux catégories d'hormone en fonction de leur nature biochimique et préciser à quelle catégorie appartiennent les œstrogènes et la progestérone.

Les œstrogènes agissent sur la prolifération et la maturation cellulaire, la progestérone agit sur la synthèse et la sécrétion du glycogène et sur la desquamation cellulaire.

2.1.4.3 Indiquer le devenir d'une cellule desquamante.

2.1.4.4 En s'appuyant sur la structure de l'épithélium de l'exocol montrée dans le **document 11A de l'0**, citer le type de cellules prélevées par frottis en phase folliculaire.

2.1.4.5 En s'appuyant sur les propriétés du glycogène, citer le type de cellules prélevées par frottis en phase lutéinique. Justifier.

Le glycogène est un substrat pour le Bacille de Döderlein (*Lactobacillus acidophilus*).

2.1.4.6 Expliquer l'aspect du frottis réalisé en phase lutéinique montré dans le **document 10B de l'annexe 10**.

2.1.4.7 Préciser le rôle du Bacille de Döderlein dans l'immunité naturelle de la muqueuse vaginale.

## 2.2 **Le papillomavirus : un virus oncogène**

Les papillomavirus sont des virus à ADN double brin circulaire d'environ 8 kb associé à des histones cellulaires à capsidie icosaédrique. Le génome peut être divisé en trois régions principales :

- La région précoce : les gènes E1 à E7, indispensables à la transcription et à la réplication de l'ADN viral, sont placés sous le contrôle du promoteur précoce.
- La région tardive : les gènes L1 et L2, indispensables à la synthèse des protéines de la capsidie, sont placés sous le contrôle du promoteur tardif.
- La région LCR (*Long Control Region*).

Les différentes étapes du cycle viral du papillomavirus sont présentées dans la **figure 5**.

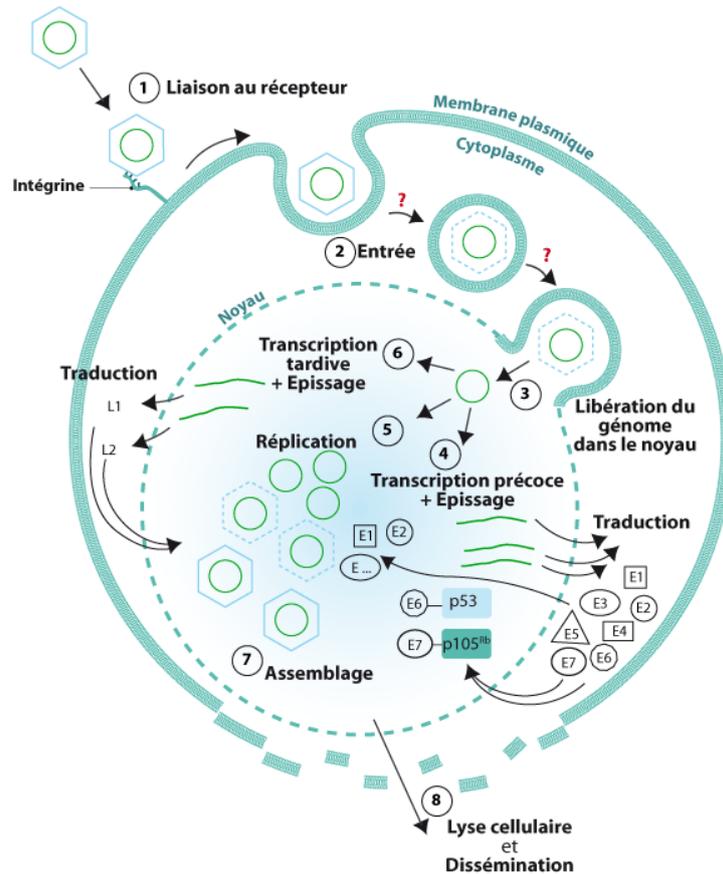


Figure 5: cycle viral du papillomavirus

### 2.2.1 Le génome viral

2.2.1.1 Définir le terme « gène ».

2.2.1.2 A partir de la représentation schématique de son génome (**annexe 12**), indiquer la particularité de la répartition des gènes d'HPV.\*

2.2.1.1 Définir les termes « réplication », « transcription » et « traduction », en précisant les principales molécules mises en jeu.

### 2.2.2 La réplication virale

L'**annexe 13** montre que les protéines précoces E1 et E2 jouent un rôle essentiel dans la réplication virale. E1 reconnaît l'origine de réplication et s'y fixe. Le complexe E1/E2 active la réplication.

2.2.2.1 Sachant que l'ADN est une hélice d'ADN double brin, expliquer le rôle enzymatique « hélicase » de E1 aux étapes 2 et 3 de l'**annexe 13**.

2.2.2.2 Donner le nom de l'enzyme A responsable du processus de réplication présenté à l'**annexe 13**.

2.2.2.3 Schématiser une molécule d'ADN avant et après réplication en distinguant les brins d'origine et les brins néosynthétisés de deux couleurs différentes. Qualifier cette réplication.

### 2.2.3 La transcription virale et sa particularité

Les protéines E1 et E2 jouent également un rôle important dans la régulation de la transcription précoce des gènes codant les protéines E6 et E7.

L'**annexe 14** présente la fixation de la protéine E2 sur une région en amont du promoteur.

2.2.3.1 Indiquer le rôle du promoteur dans la transcription d'un gène.

2.2.3.2 Donner une hypothèse pour expliquer comment E2 réprime la transcription du gène codant la protéine E6 à partir de l'**annexe 14**.

2.2.3.3 Reporter sur la copie les lettres indiquées sur l'**annexe 15** et compléter les légendes.

L'ARN pré-messager issu de la transcription subit un épissage. Le mécanisme est présenté dans le **document 16A de l'annexe 16**.

2.2.3.4 Expliquer en quoi consiste le phénomène d'épissage.

2.2.3.5 Nommer, en le justifiant, les séquences codantes et non codantes du gène présenté dans le **document 16A de l'annexe 16**.

Le schéma d'hybridation obtenu entre un ADN simple brin et son transcrit ARNm mature est présenté dans le **document 16B de l'annexe 16**.

2.2.3.6 Indiquer à quoi correspondent les régions n°1 et n°2 légendées. Justifier.

Une particularité du génome de HPV est que tous les gènes sont exprimés à partir d'un même brin d'ADN. Grâce à l'utilisation de promoteurs et de signaux alternatifs, différents transcrits peuvent être générés à partir d'une même séquence d'ADN.

2.2.3.7 A l'aide de l'**annexe 12**, donner un exemple précis illustrant cette affirmation.

Dans le cas du virus HPV, les différents transcrits subissent un épissage particulier appelé « épissage alternatif ». Un même ARN pré-messager peut alors donner lieu à des ARN messagers matures différents capables de coder des protéines distinctes. Ceci permet au génome viral de coder jusqu'à une dizaine de protéines malgré sa petite taille. L'**annexe 17** présente un exemple d'épissage alternatif.

2.2.3.8 Indiquer la composition en exons des ARNm n°1 et ARNm n°2 matures obtenus pour chaque épissage alternatif de l'ARN pré-messager.

#### 2.2.4 Le Cycle cellulaire

Dans un épithélium, la couche basale est formée de cellules non différenciées mais à fort pouvoir de mitose et de différenciation. La prolifération cellulaire et la différenciation sont coordonnées. Au cours du cycle cellulaire il existe des points de contrôle et de réparation de l'ADN. L'**annexe 18** présente les différentes phases du cycle cellulaire et leurs points de contrôle.

2.2.4.1 Représenter, sous forme d'un schéma, l'évolution de la quantité d'ADN au cours du cycle cellulaire en faisant apparaître le nom des phases.

2.2.4.2 Citer dans l'ordre chronologique les étapes de la mitose.

#### 2.2.5 L'oncogénèse

On peut mettre en évidence le virus HPV intégré dans le génome des cellules par une méthode FISH (fluorescent hybridation in situ) en utilisant une sonde complémentaire marquée par un fluorochrome (**document 19A de l'annexe 19**). Le virus infecte les cellules basales, il s'intègre à proximité du gène myc dont il amplifie l'expression.

Le gène myc est un oncogène qui code des facteurs de transcription. L'inhibition du gène myc permet la poursuite de la différenciation cellulaire dans l'épithélium de l'exocol (**document 11A de l'0**).

2.2.5.1 Représenter un chromosome normal en métaphase.

2.2.5.2 Comparer les structures des chromosomes notés 2 et der(2) apparaissant sur le **document 19A de l'annexe 19**

2.2.5.3 Donner les conséquences sur le cycle viral de l'intégration du génome viral dans celui de la cellule, à l'aide du **document 19B de l'annexe 19**.

La protéine virale E6 a une forte affinité pour la protéine P53 et provoque sa dégradation et la protéine virale E7 se fixe sur la protéine pRb et provoque sa dégradation.

2.2.5.4 En utilisant l'**annexe 18** et le **document 19B de l'annexe 19**, indiquer les conséquences de l'intégration du virus sur le cycle cellulaire.

2.2.5.5 D'après le document 19C de l'annexe 19 et le rôle du gène myc, donner les caractéristiques supplémentaires des cellules de l'épithélium de l'exocol dans un cancer représenté par la zone X. Le vaccin anti-tumoral

## 2.2.6 Présentation des différents vaccins

Le cancer du col de l'utérus est le premier des cancers qu'il est possible de prévenir par vaccination. La mise sur le marché de vaccins à base de pseudoparticules virales ou VLP (Virus Like Particles) a rendu cet objectif possible. Les pseudoparticules virales (VLP) ont une structure et une morphologie similaires à celles des virions. Elles sont formées de protéines capsidales et possèdent les épitopes nécessaires à l'induction des anticorps neutralisants. Elles sont dépourvues de génome viral.

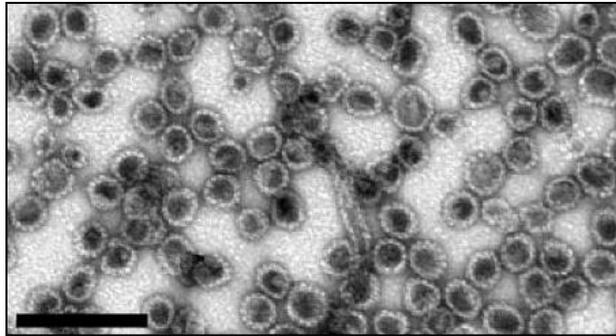


Figure 6 : Pseudo-particules virales de papillomavirus (HPV) purifiées de cellules d'insecte infectées par un baculovirus recombinant codant la protéine L1 d'HPV16. (Coloration négative- échelle : Barre =200 nm)  
<http://www.john-libbey-eurotext.fr/>

Deux vaccins à base de pseudoparticules virales sont actuellement commercialisés.

- vaccin *Gardasil*<sup>®</sup> : vaccin quadrivalent (HPV 6, 11, 16 et 18) dont les VLP sont produites par des levures (*Saccharomyces cerevisiae*) recombinantes
- vaccin *Cervarix*<sup>®</sup> : vaccin bivalent (HPV 16 et 18) dont les VLP sont produites par des cellules d'insectes infectées par un baculovirus recombinant.

2.2.6.1 Expliquer pourquoi les pseudoparticules virales peuvent être utilisées comme vaccins.

2.2.6.2 Comparer les deux vaccins actuellement commercialisés.

## 2.2.7 Production du vaccin Cervarix<sup>®</sup> : rôle du baculovirus

Les baculovirus sont des virus qui infectent les insectes. Ce sont des virus enveloppés, en forme de bâtonnets, d'une longueur d'environ 350 nm et d'un diamètre moyen de 50 nm. Ils contiennent un génome constitué d'une molécule d'ADN bicaténaire, circulaire, de longueur variable comme présenté dans le document ci-dessous.

La particularité du baculovirus est liée à son cycle de multiplication et à la production de deux formes différentes du virus au cours de l'infection des cellules d'insectes :

- **virion libre** : forme de transmission du virus de cellule à cellule produite par le bourgeonnement des cellules d'insecte infectées
- **polyèdre** : forme de résistance du virus et de transmission d'insecte à insecte synthétisée en phase tardive du cycle de multiplication. Un polyèdre est constitué d'une matrice protéique formée principalement de polyédrine présente en grande quantité. Il contient un nombre variable de virions enveloppés réunis en corps d'inclusion ou ODV (occlusion derived virion)

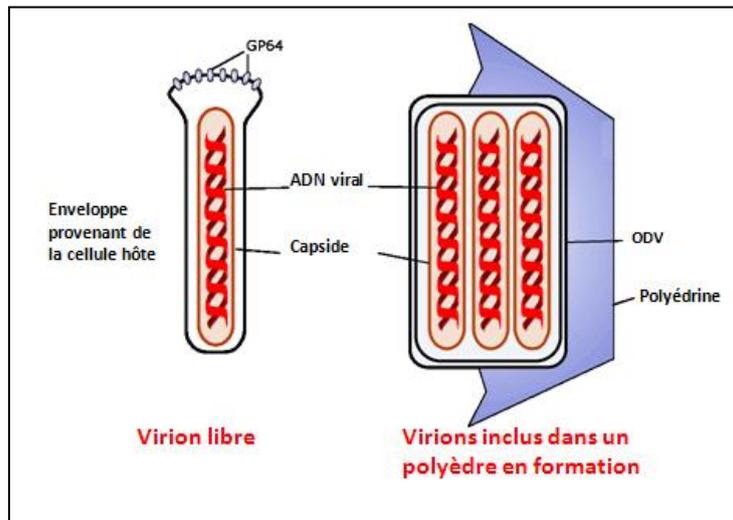


Figure 7: Structure du baculovirus

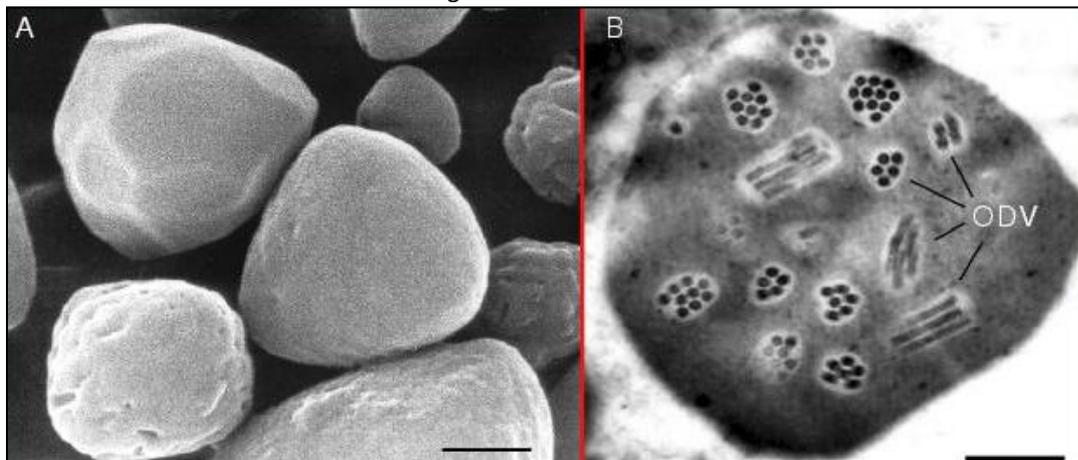


Figure 8: <http://www.john-libbey-eurotext.fr/>

- A. Photo de microscopie électronique à balayage des polyèdres d'un baculovirus (échelle : barre = 500nm)
- B. Photo d'une coupe de polyèdre de baculovirus observé au microscope électronique à transmission (échelle : barre = 500 nm)

Le cycle de multiplication du baculovirus est schématisé dans l'**annexe 20**.

2.2.7.1 A l'aide de l'**annexe 20**, expliquer les notions d'infection primaire et secondaire par le baculovirus.

Indiquer les formes virales produites dans chaque cas.

2.2.7.2 Préciser le type d'infection qui concerne la production de virus en culture cellulaire. Expliquer pourquoi le gène codant la polyédrine n'est pas indispensable pour obtenir un cycle de multiplication en culture cellulaire

### 2.2.8 Les baculovirus d'insectes, vecteurs d'expression de gènes d'intérêt

Le principe de la production d'un vaccin par le système baculovirus-cellule d'insecte consiste à remplacer la région du génome du baculovirus sauvage qui code la polyédrine par un gène d'intérêt qui code une protéine étrangère comme une protéine de capsid d'un papillomavirus, fortement antigénique. Ces baculovirus modifiés ou « baculovirus recombinants » permettent ainsi la synthèse de protéines vaccinales en grande quantité dans des cultures de cellules d'insectes infectées par le virus.

La réalisation d'un « **baculovirus recombinant** » nécessite :

- la production d'un vecteur (contenant le plasmide PUC) de transfert comprenant le gène d'intérêt (codant une protéine de capsid de papillomavirus);
- la purification de l'ADN du baculovirus sauvage ;
- le co-transfert des deux éléments précédents dans une culture de cellules permissives d'insecte.

2.2.8.1 Proposer une explication pour la notion de « cellules permissives ».

2.2.8.2 Expliquer le phénomène de recombinaison homologue schématisé dans l'**annexe 21**.

2.2.8.3 Comparer les deux génomes des baculovirus sauvage et recombinant. En déduire les conséquences sur la synthèse protéique.

La sélection des baculovirus recombinants peut se faire par la technique des plages de lyse en culture cellulaire d'insectes. Les principales étapes sont données dans l'**annexe 22**.

2.2.8.4 Indiquer à quoi correspondent les « plages blanches ».

2.2.8.5 Expliquer, à partir de l'**annexe 22**, comment repérer les baculovirus recombinants destinés à être amplifiés pour la production de protéines vaccinales.

### **3 Stratégie contre un gène défectueux : rétrovirus et thérapie génique**

#### **3.1 Le DICS-X1**

L'acronyme DICS (Déficit Immunitaire Combiné Sévère) regroupe un ensemble de pathologies rares affectant principalement le système immunitaire.

Certains gènes responsables d'un tel syndrome ont été identifiés :

- Dans 40 à 50% des DICS, le gène *IL2RG* est muté. Il s'agit du syndrome DICS-X1.
- Dans 10 à 20% des cas, le gène codant l'adénosine désaminase (ADA) est muté.

##### 3.1.1 Mode de transmission de DICS-X1

3.1.1.1 Déterminer le mode de transmission du DICS lié au gène *IL2RG* à l'aide de l'arbre généalogique proposé en **figure 9**, en indiquant si :

- la transmission est récessive ou dominante ;
- gonosomique (sur un chromosome sexuel) ou autosomique (sur un chromosome non sexuel).

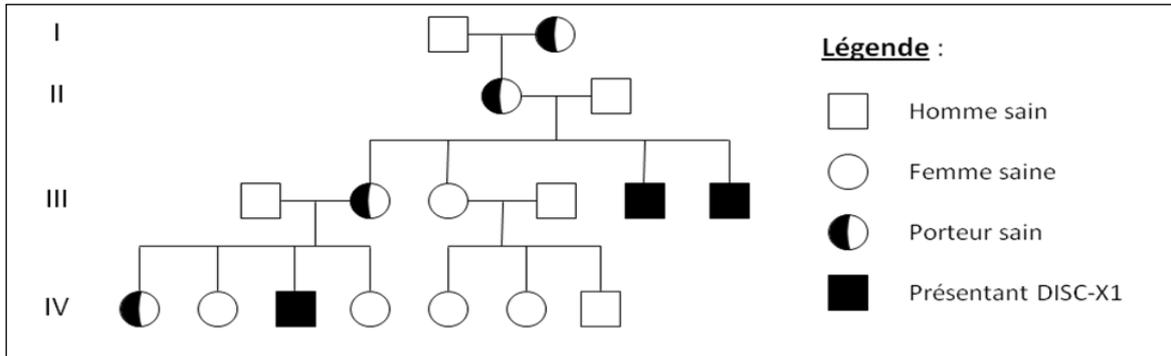


Figure 9: arbre généalogique d'une famille présentant des cas de DICS-X1.

### 3.1.2 Conséquences du DICS-X1

L'hématopoïèse est le processus physiologique au cours duquel l'ensemble des cellules sanguines (hématies, leucocytes et plaquettes) sont produites. Ces cellules dérivent toutes d'un précurseur commun nommé cellule souche hématopoïétique (« *Hematopoietic Stem Cell* » ou HSC). Le **document 23A de l'annexe 23** présente des lignées hématopoïétiques chez des sujets sains ou atteints de DICS-X1.

3.1.2.1 Identifier les cellules hématopoïétiques affectées par la mutation du gène *IL2RG*.

Le gène *IL2RG* code la chaîne  $\gamma_c$ , une sous-unité protéique des récepteurs membranaires des interleukines IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 et IL-15. Ces molécules sont des messagers chimiques intervenant dans la communication cellulaire.

3.1.2.2 Expliquer, à partir du **document 23B de l'annexe 23**, en quoi la mutation de la chaîne  $\gamma_c$  affecte le développement des cellules identifiées à partir du **document 23A**.

## 3.2 Traitement des DICS par thérapie génique

### 3.2.1 la thérapie génique *ex-vivo*

Les jeunes patients atteints de DICS sont en général traités par greffe de moelle osseuse. Mais pour certains, il est difficile de trouver des donneurs de moelle compatibles. C'est pourquoi certains chercheurs eurent l'idée de traiter ces patients par l'introduction d'un gène non muté dit « thérapeutique » ; il s'agit de la thérapie génique.

Une des méthodes utilisée est la **thérapie génique *ex-vivo***. Cette technique est décrite sur la **figure 10**.

Les cellules souches hématopoïétiques sont isolées puis cultivées *in-vitro* et infectées à l'aide d'un vecteur rétroviral.

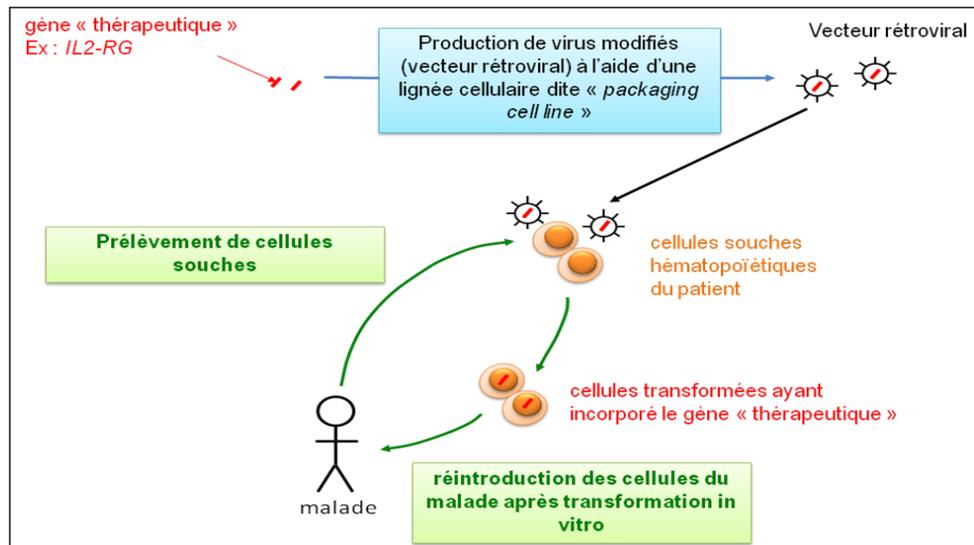


Figure 10: technique de thérapie génique ex-vivo

3.2.1.1 Justifier l'expression « thérapie génique *ex-vivo* ».

### 3.2.2 Production du vecteur rétroviral

L'**annexe 24** présente le génome du rétrovirus sauvage, du vecteur rétroviral et le cycle de multiplication.

3.2.2.1 Définir la transcription inverse.

3.2.2.2 Préciser les gènes perdus par le vecteur rétroviral et citer les étapes du cycle viral modifiées lors de l'infection par le vecteur rétroviral.

La production de tels vecteurs rétroviraux nécessite la création d'une lignée cellulaire génétiquement modifiée, nommée la « *packaging cell line* » (lignée cellulaire d'emballage).

3.2.2.3 Préciser les caractéristiques supplémentaires que doivent posséder ces cellules d'emballage.

### Étude d'un essai clinique

Un essai clinique a été réalisé au début des années 2000 chez deux très jeunes patients (11 et 8 mois) atteints d'un DICS-X1 selon la méthode de thérapie génique *ex-vivo*.

Après réintroduction du gène thérapeutique à l'aide d'un vecteur rétroviral, de nombreux tests furent réalisés afin d'étudier l'efficacité de cette thérapie.

### 3.2.3 Présence et expression du gène thérapeutique chez les patients\*

Dans un premier test, des expériences de PCR (Réaction de Polymérisation en Chaîne) et RT-PCR (Réaction de Polymérisation en Chaîne suite à une Transcription inverse) sont réalisées et représentées en annexe 25. Ces techniques utilisent des amorces spécifiques du gène d'intérêt (ou de son ARNm pour la RT-PCR) et permettent l'amplification de ce dernier à partir de différents types cellulaires issus des patients étudiés. Elles ont pour but, respectivement, de mettre en évidence la présence du gène étudié (PCR) ou son expression, débutant par la transcription en ARN messenger (RT-PCR).

Les résultats sont présentés dans le **document 25B de l'annexe 25**.

3.2.3.1 Analyser les résultats de PCR obtenus à J-1

3.2.3.2 Conclure sur la présence du gène thérapeutique à J+150.

3.2.3.3 Analyser les résultats de RT-PCR obtenus à J-1.

3.2.3.4 Conclure quant à l'expression du gène IL2-RG à J+150.

### 3.2.4 Évolution du nombre de lymphocytes

Après s'être assuré que la sous-unité protéique  $\gamma_c$  est fonctionnelle et "adressée" (dirigée puis intégrée) correctement à la membrane plasmique, l'évolution du nombre de lymphocytes T au cours du temps est analysée et représentée sur la **figure 11**.

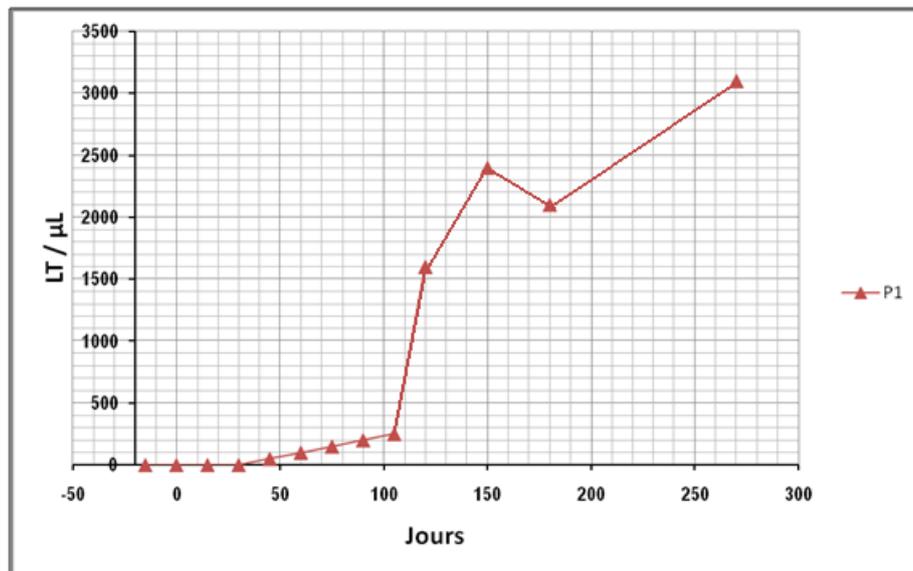


Figure 11: évolution du nombre de lymphocytes T par  $\mu\text{L}$  de sang en fonction du temps chez le patient P1.

3.2.4.1 Expliquer pourquoi le nombre de LT est nul avant le traitement.

3.2.4.2 Expliquer pourquoi ce nombre est toujours nul entre 0 et 30 jours après le traitement.

3.2.4.3 Interpréter les résultats de la **figure 11**.

### 3.2.5 Production d'anticorps

Par la suite, les patients sont vaccinés à l'aide du « DTPolio » (contre le tétanos, la diphtérie et la poliomyélite).

Cinq mois après la vaccination, la présence d'anticorps anti-toxines tétanique et diphtériques ainsi que le poliovirus est recherchée dans le sérum des patients par la méthode d'ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbant Assay). Les résultats obtenus pour le patient 1 (P1) sont représentés sur le **tableau 1**.

	Titrage d'anticorps contre : (UA : unités arbitraires)		
	Toxine tétanique	Toxine diphtérique	Poliovirus
P1 traité	0,53	0,86	160
Valeurs de référence pour un seuil de protection	> 0,20	> 0,20	> 80

**Tableau 1** : recherche d'anticorps chez le patient 1 cinq mois après sa vaccination.

- 3.2.5.1 Analyser les résultats du tableau 1.
- 3.2.5.2 Citer les cellules du système immunitaire capables de produire des anticorps.
- 3.2.5.3 Préciser en quoi cette expérience met en évidence la présence de Lymphocytes T fonctionnels chez le patient 1, sachant que les Lymphocytes B étaient présents mais non fonctionnels avant la thérapie.

### Conclusion

*Rétrovirus, papillomavirus, baculovirus et influenza virus possèdent des caractéristiques communes, définies par Lwoff en 1957 pour caractériser les virus : entités de taille inférieure à 250 nm, les virus sont des parasites cellulaires obligatoires. Ils ne possèdent qu'un seul type d'acide nucléique, ne se multiplient pas par division binaire et ne possèdent pas d'enzyme pouvant produire de l'énergie.*

*Au cours des vingt dernières années cependant, les technologies ont permis de mettre en évidence de nouveaux virus, les mimivirus, qui remettent en cause cette définition : de grande taille (400 nm), ils possèdent de l'ARN, de l'ADN et leur génome est plus grand que celui d'une vingtaine de bactéries. Il peut être en outre infecté par un virophage dénommé « sputnik ». L'analyse de la séquence nucléotidique du Mimivirus, qui contient des gènes codant des protéines impliquées dans la synthèse protéique, est en train de modifier profondément la vision de l'évolution de la Vie en brouillant la frontière entre virus et bactéries intracellulaires : les Mimivirus pourraient ainsi constituer une nouvelle branche évolutive de l'arbre de la vie, distincte des trois branches connues, eucaryotes, bactéries et archées. Cette nouvelle classification suggérerait que certains virus à ADN auraient pu être déjà présents il y a plus de trois milliard d'années, avant même l'apparition des premiers organismes eucaryotes, et seraient le résultat de l'évolution par perte de gènes d'un organisme cellulaire ancestral aujourd'hui disparu.*

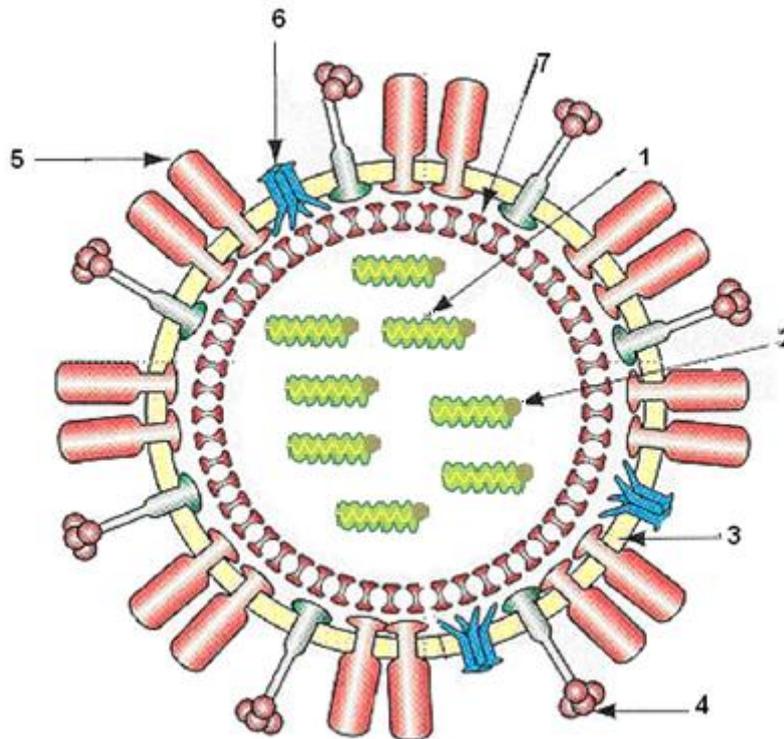
# TABLE DES ANNEXES

ANNEXE 1.	STRUCTURE DU VIRUS DE LA GRIPPE .....	18
ANNEXE 2.	CYCLE DE MULTIPLICATION DU VIRUS DE LA GRIPPE .....	19
ANNEXE 3.	STRUCTURE DU RÉCEPTEUR CELLULAIRE DU VIRUS DE LA GRIPPE .....	19
ANNEXE 4.	REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DE L'ACTION DE LA NEURAMINIDASE SUR SON SUBSTRAT	20
ANNEXE 5.	ÉTUDE DE L'EFFET D'UN INHIBITEUR DE NEURAMINIDASE .....	20
ANNEXE 6.	MÉCANISMES DES MUTATIONS PONCTUELLES .....	21
ANNEXE 7.	GLISSEMENT ANTIGÉNIQUE AU COURS DU TEMPS .....	21
ANNEXE 8.	MÉCANISME DE LA CASSURE ANTIGÉNIQUE .....	22
ANNEXE 9.	APPAREIL GÉNITAL FÉMININ.....	22
ANNEXE 10.	LE CYCLE FÉMININ .....	23
ANNEXE 11.	HISTOLOGIE DU COL DE L'UTÉRUS.....	24
ANNEXE 12.	REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DU GÉNOME DE HPV .....	25
ANNEXE 13.	RÔLE DES PROTÉINES E1 ET E2 DANS LA RÉPLICATION VIRALE .....	25
ANNEXE 14.	TRANSCRIPTION PRÉCOCE VIRALE RÉGULÉE PAR E2.....	26
ANNEXE 15.	PHASE D'ALLONGEMENT DE LA TRANSCRIPTION .....	26
ANNEXE 16.	EPISSAGE .....	27
ANNEXE 17.	PHÉNOMÈNE D'ÉPISSAGE ALTERNATIF .....	28
ANNEXE 18.	LE CYCLE CELLULAIRE ET SON CONTRÔLE .....	28
ANNEXE 19.	ONCOGÉNÈSE.....	29
ANNEXE 20.	CYCLE DE MULTIPLICATION DU BACULOVIRUS.....	31
ANNEXE 21.	OBTENTION D'UN BACULOVIRUS RECOMBINANT .....	32
ANNEXE 22.	SÉLECTION DES BACULOVIRUS RECOMBINANTS PAR LA TECHNIQUE DES PLAGES DE LYSE.	33
ANNEXE 23.	HÉMATOPOÏÈSE ET RÉCEPTEURS DES INTERLEUKINES .....	34
ANNEXE 24.	RÉTROVIRUS ET VECTEUR RÉTROVIRAL.....	35
ANNEXE 25.	ÉTUDE DE L'INSERTION ET DE L'EXPRESSION DU GÈNE THÉRAPEUTIQUE .....	36

## ANNEXE 1. Structure du virus de la grippe

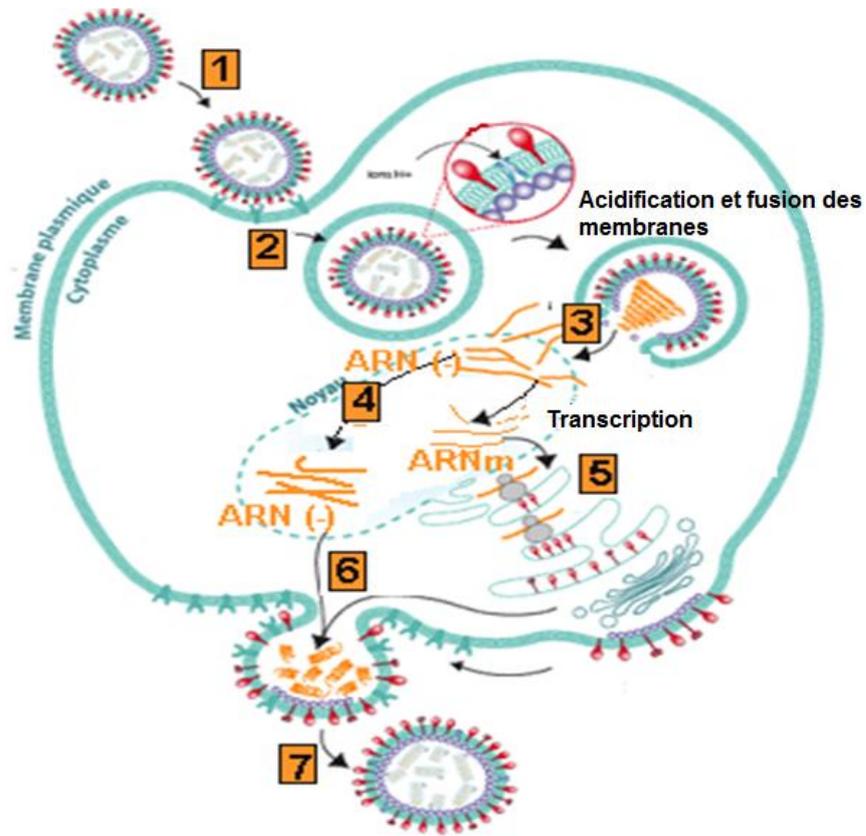
Le virus de la grippe est une particule de forme sphérique de 80 à 120 nm de diamètre, constituée de différents éléments.

- Huit **nucléocapsides** protéiques à symétrie hélicoïdale dans lesquels se trouve un ARN monocaténaire associé à une **ARN polymérase ARN dépendante**.
- Une **enveloppe** entoure les huit nucléocapsides. Elle est formée d'une membrane portant des glycoprotéines externes : les **hémagglutinines (H ou HA)** les plus nombreuses, et les **neuraminidases (N ou NA)** en forme de « champignons ». L'enveloppe contient également des protéines M : les **protéines M2** qui s'associent en tétramères pour former des canaux ioniques et les **protéines de matrice M1**, associées à la face interne de l'enveloppe.



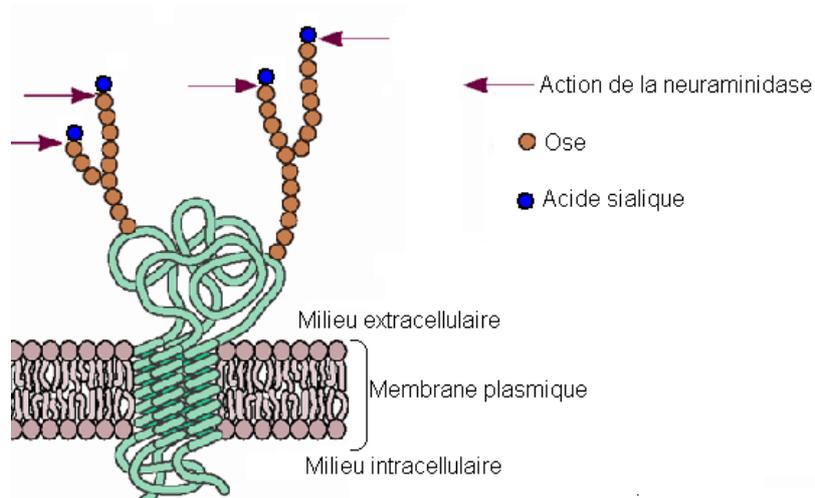
## ANNEXE 2.

## Cycle de multiplication du virus de la grippe



## ANNEXE 3.

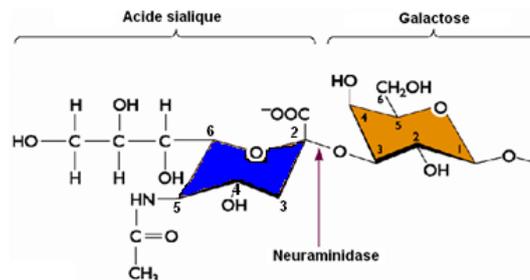
## Structure du récepteur cellulaire du virus de la grippe



Le récepteur cellulaire du virus de la grippe est une glycoprotéine transmembranaire comportant des chaînes glucidiques dont l'extrémité est l'acide sialique (ou acide N-acétylneuraminique), un dérivé d'ose.

## ANNEXE 4.

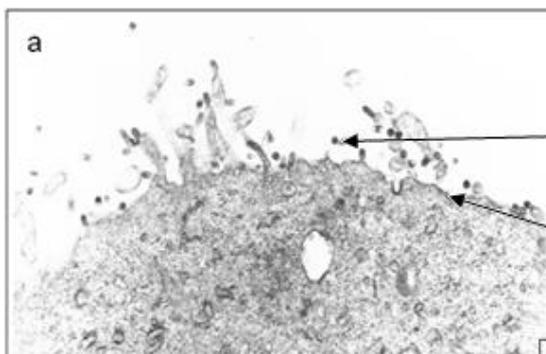
### Représentation schématique de l'action de la neuraminidase sur son substrat



## ANNEXE 5.

### Étude de l'effet d'un inhibiteur de neuraminidase

**Document 5A : observation en microscopie électronique à transmission (x 10000) de l'effet d'un inhibiteur de neuraminidase sur des cellules infectées par le virus de la grippe**

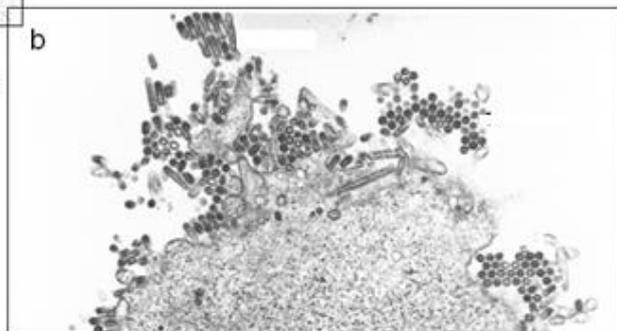


(a) Observation réalisée en absence d'inhibiteur de neuraminidase

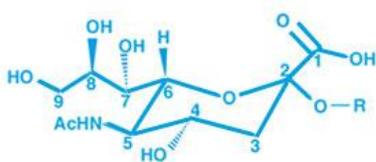
Virus

Membrane plasmique de la cellule cible

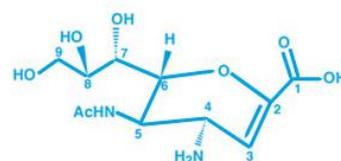
(b) Observation réalisée en présence d'un inhibiteur de neuraminidase



**Document 5B : analogie structurale de l'acide sialique (a) et d'un inhibiteur de neuraminidase, l'Oseltamivir (b)**

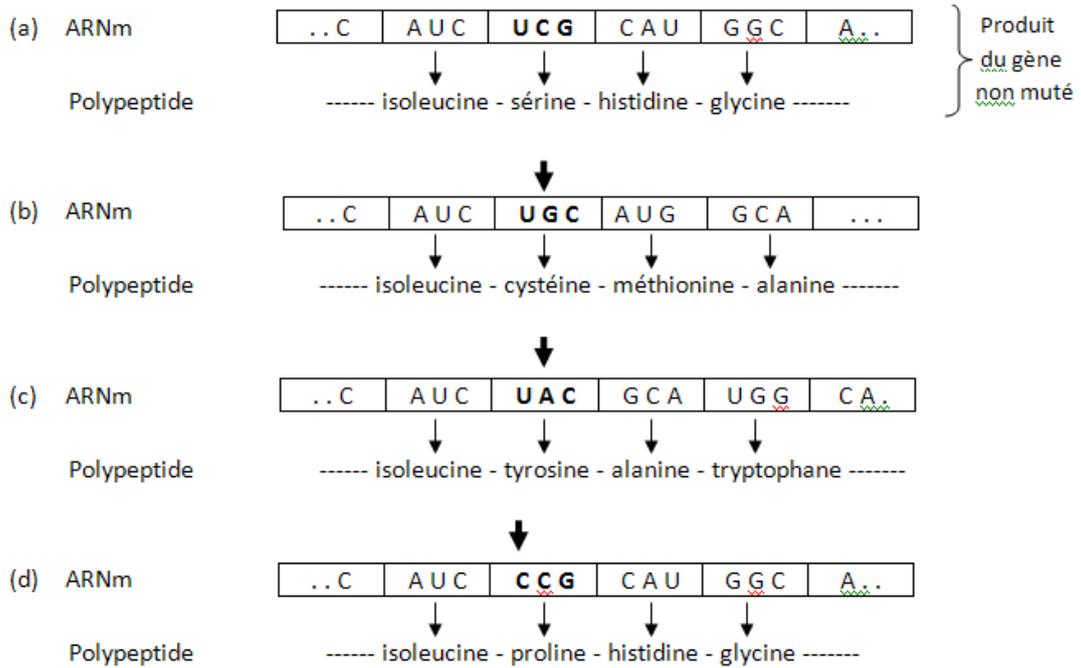


(a) Acide sialique



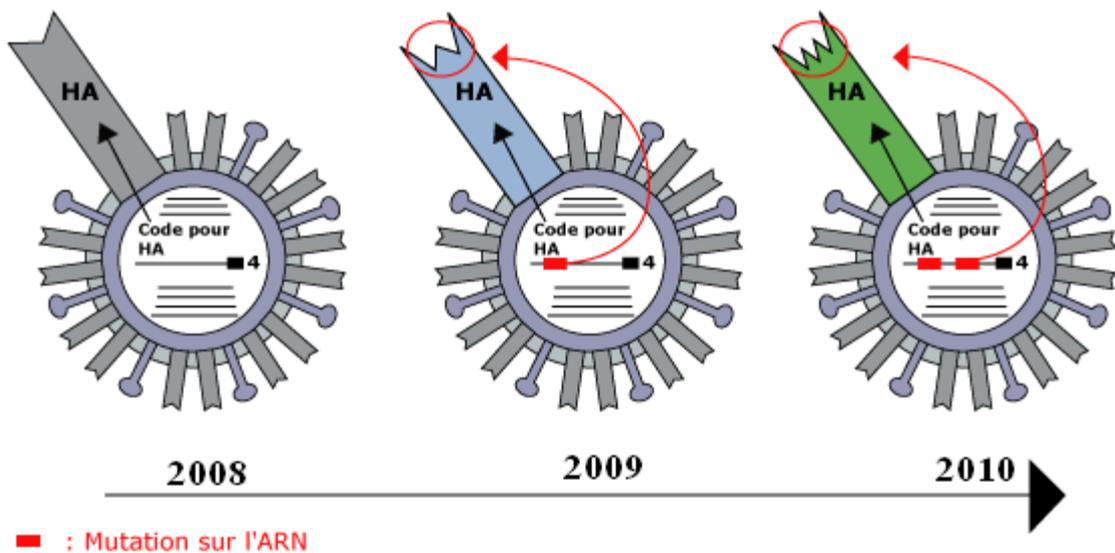
(b) Oseltamivir

## ANNEXE 6. Mécanismes des mutations ponctuelles



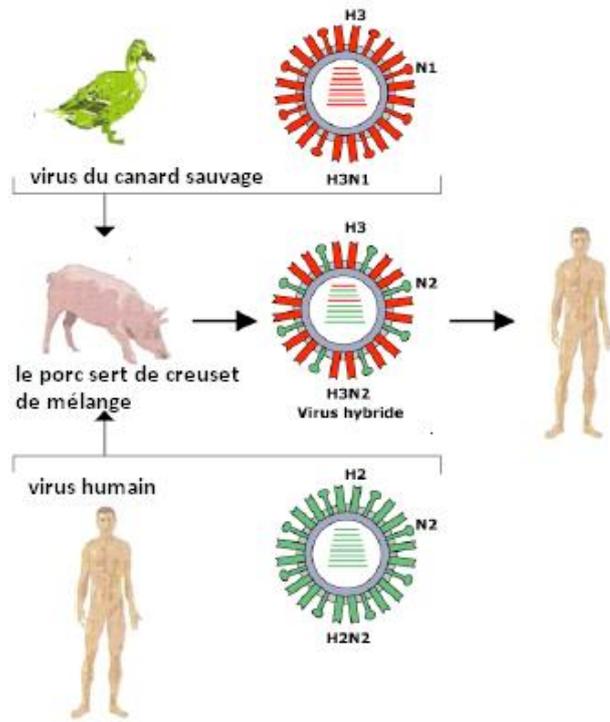
(a) ARNm et polypeptides synthétisés à partir du gène non muté  
L'effet de chaque mutation ponctuelle est indiqué par une flèche ↓

## ANNEXE 7. Glissement antigénique au cours du temps



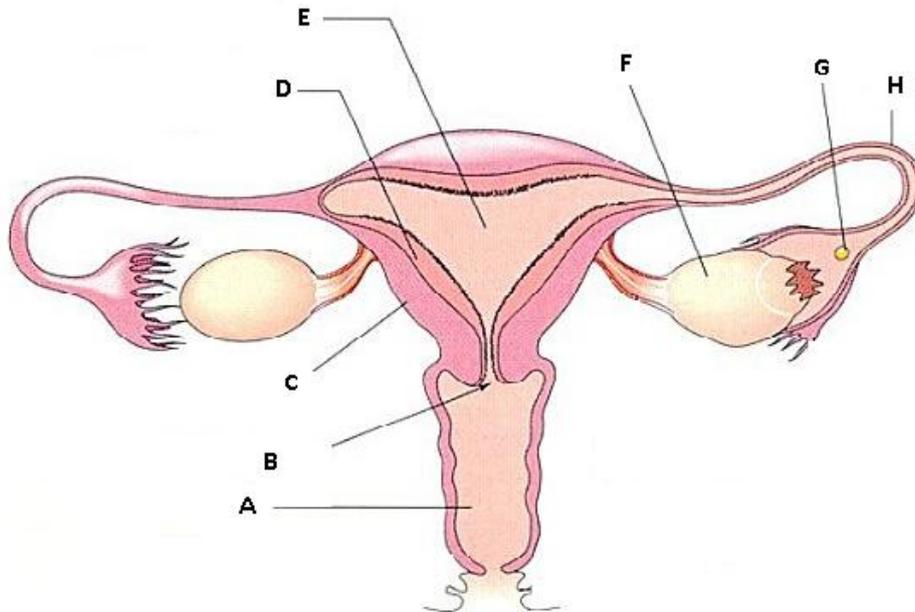
**ANNEXE 8.**

**Mécanisme de la cassure antigénique**



**ANNEXE 9.**

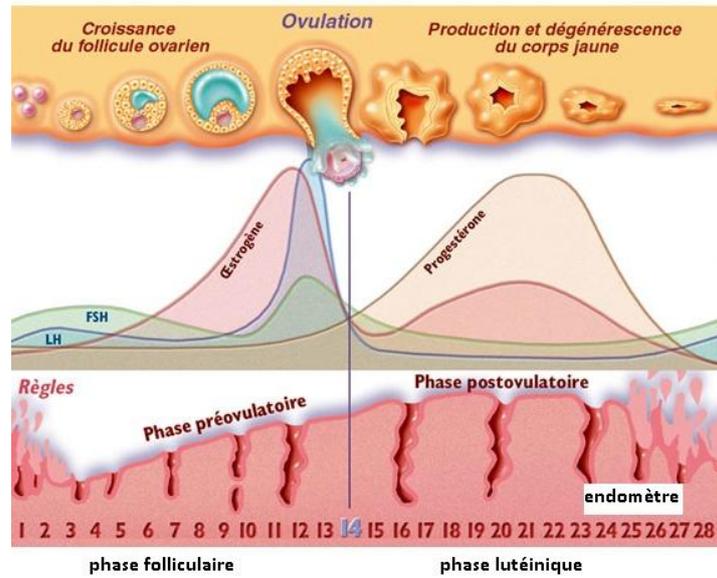
**Appareil génital féminin**



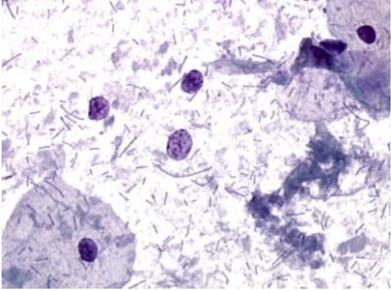
## ANNEXE 10.

## Le cycle féminin

### Document 10A : le cycle menstruel



### Document 10B : Frottis normaux

Phase folliculaire	Phase lutéinique
 <p>coloration de Papanicolaou x 1000</p>	 <p><i>flore lactique abondante</i> coloration de Papanicolaou x 1000</p>

### Document 10C : frottis en phase folliculaire, cas d'une patiente infectée par le HPV



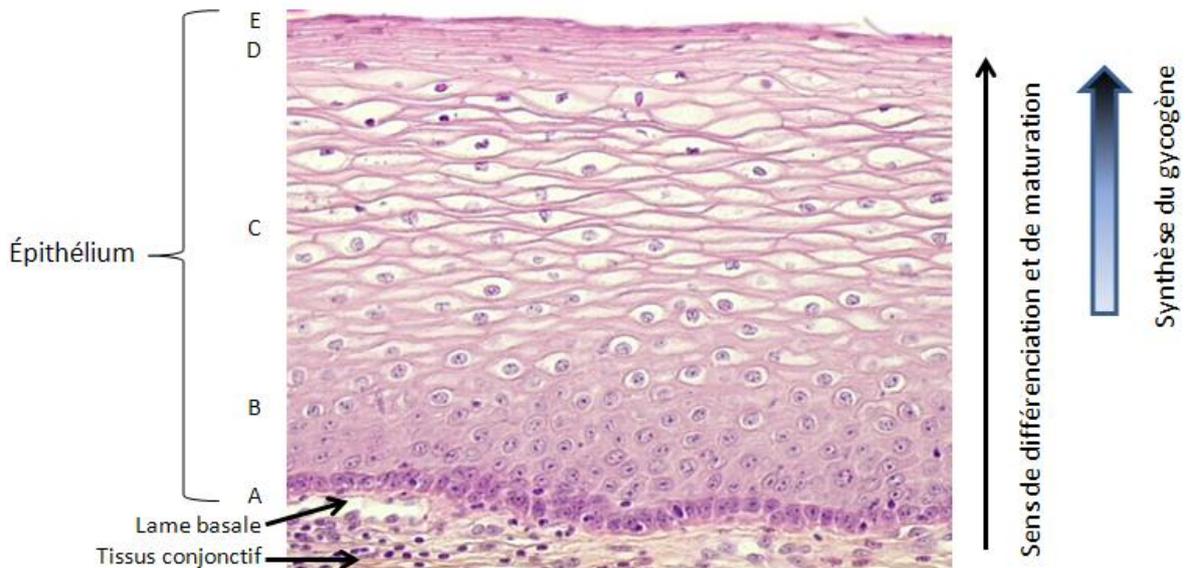
<http://nih.techriver.net> coloration de Papanicolaou x 1000

#### Principe de la coloration de Papanicolaou

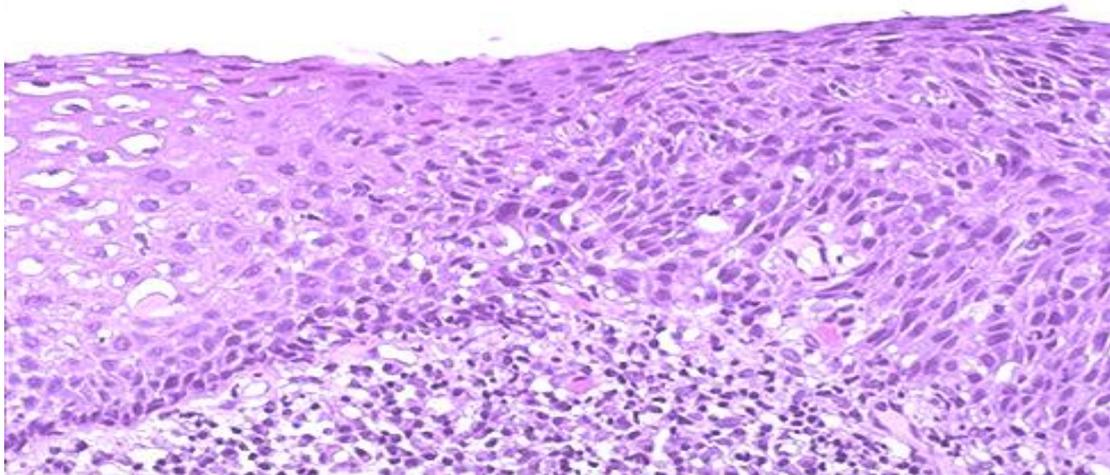
Coloration nucléaire en phase aqueuse par l'hématoxyline de Harris : **les noyaux sont colorés en bleu violacé et les nucléoles en bleu ou rouge foncé**. Coloration cytoplasmique par un mélange de colorants (Orange G6 et EA 50) en phase alcoolique : **le cytoplasme acidophile ou éosinophile est coloré de rose à orange rouge et le cytoplasme basophile est coloré de bleu à bleu verdâtre**

## Document 11A : Épithélium normal de l'exocol de l'utérus en phase folliculaire

Coloration hématoxyline éosine x400

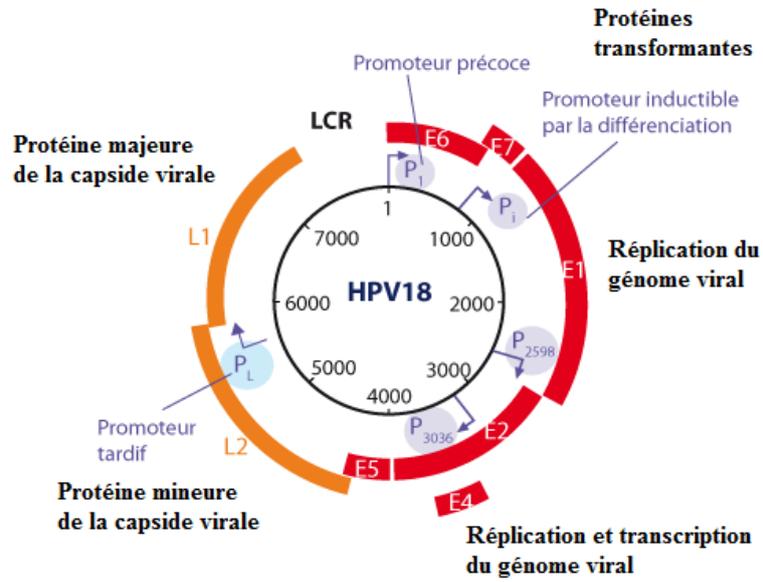
**Aspect à la coloration de Papanicolaou****E** : cellules desquamantes 60  $\mu\text{m}$ , 5 couches acidophiles**D** : cellules superficielles 50  $\mu\text{m}$ , 6 couches acidophiles**C** : cellules intermédiaires 30  $\mu\text{m}$ , 8 couches acido/basophiles**B** : cellules parabasales 20  $\mu\text{m}$ , 2 couches basophiles**A** : cellules basales 15  $\mu\text{m}$ , 1 couche basophile

## Document 11B : dysplasie importante (cancer in situ).



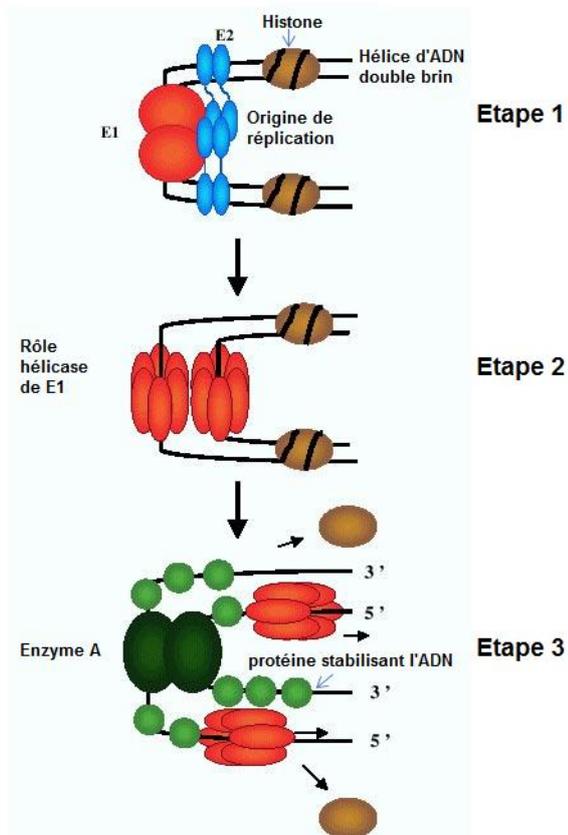
**ANNEXE 12.**

**Représentation schématique du génome de HPV**

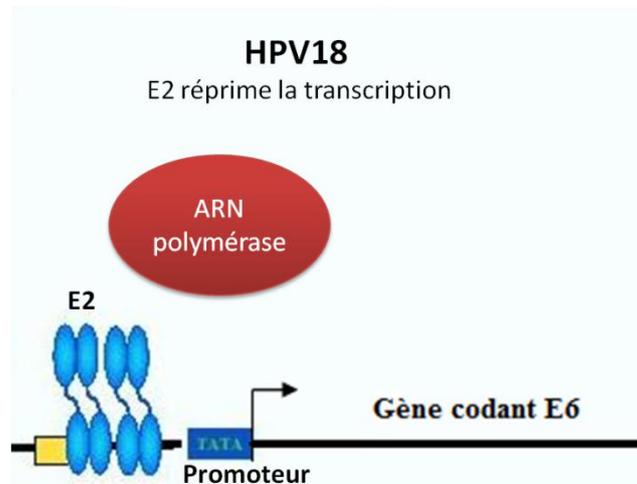


**ANNEXE 13.**

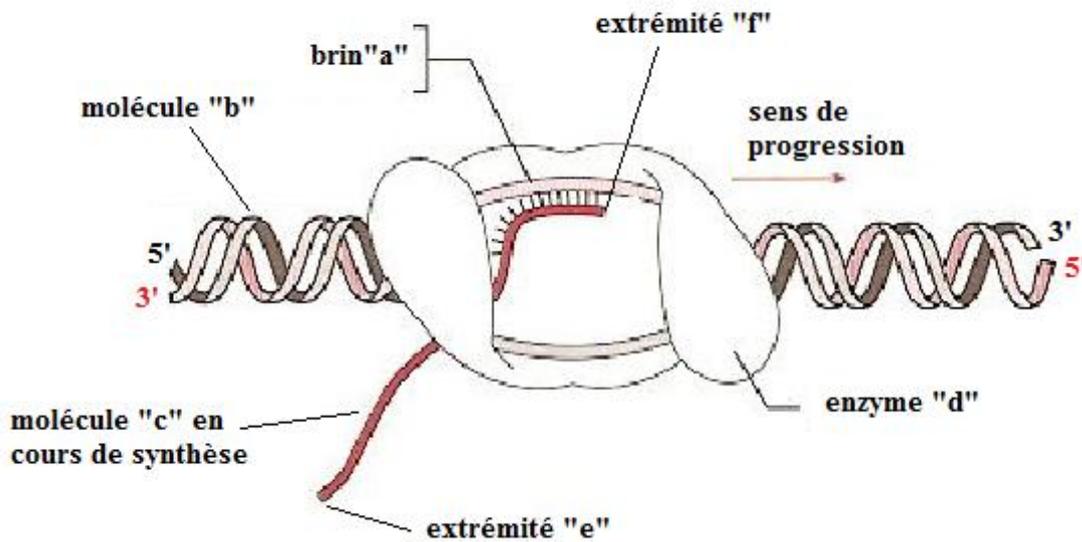
**Rôle des protéines E1 et E2 dans la réplication virale**



## ANNEXE 14. Transcription précoce virale régulée par E2

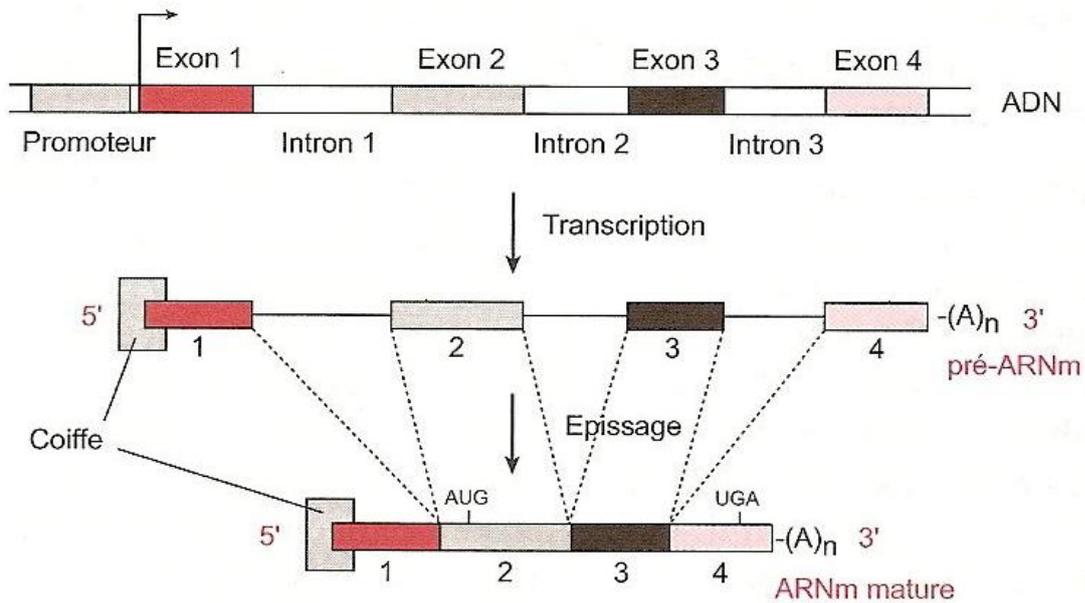


## ANNEXE 15. Phase d'allongement de la transcription

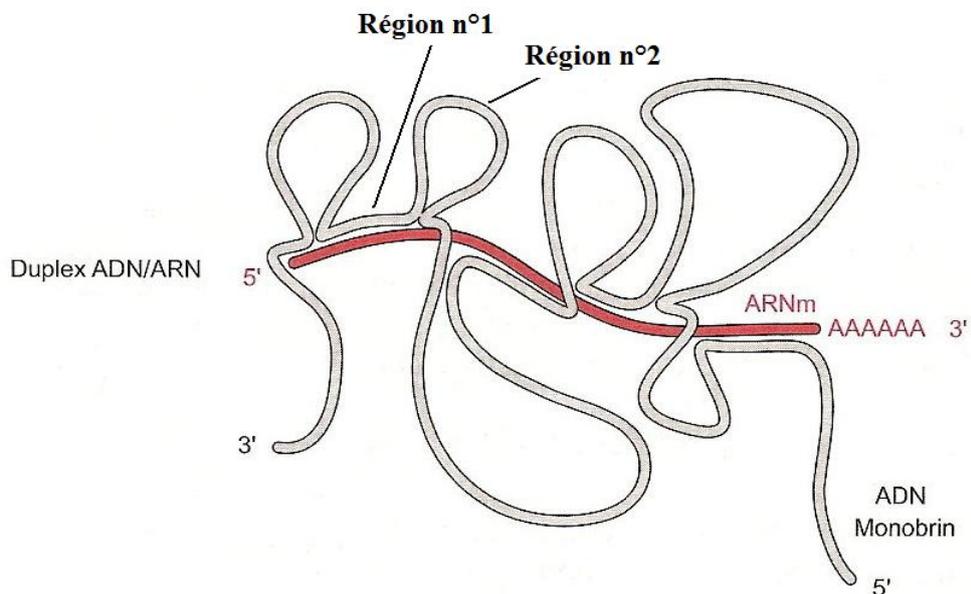


## ANNEXE 16. Epissage

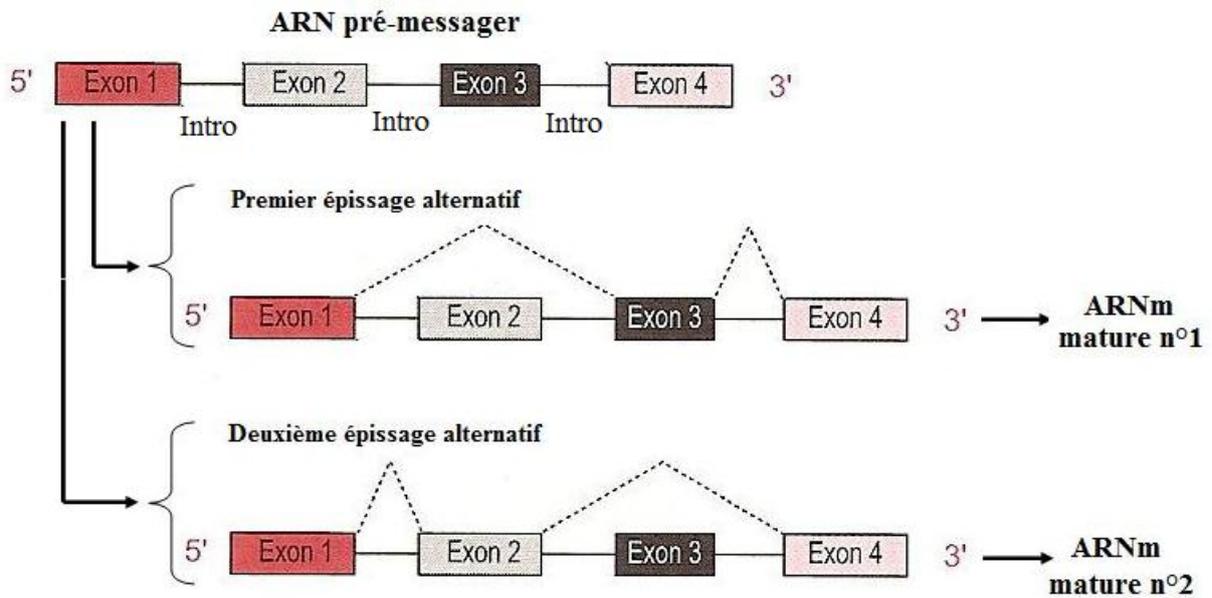
Document 16A : Obtention d'un transcrit ARN messager à partir d'un transcrit primaire (pré-messager)



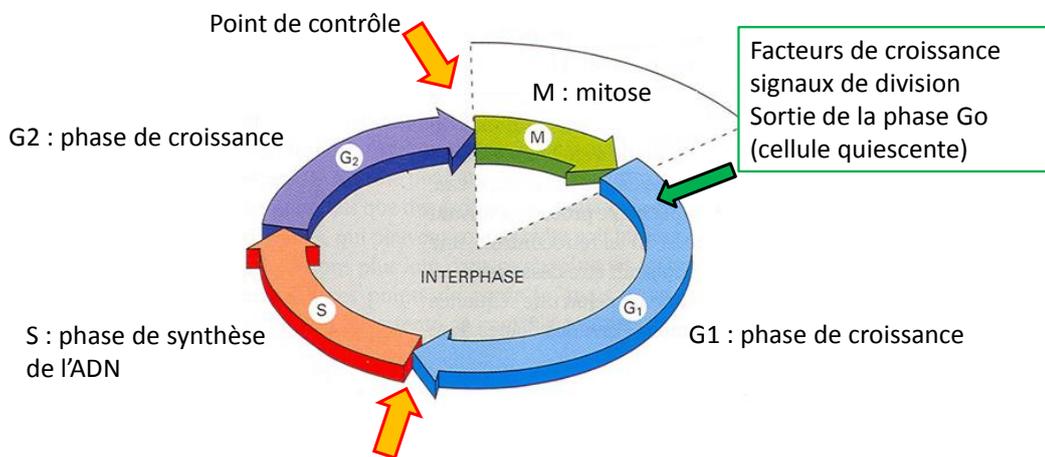
Document 16B : Hybridation entre ADN simple brin et son transcrit ARN mature



## ANNEXE 17. Phénomène d'épissage alternatif



## ANNEXE 18. Le cycle cellulaire et son contrôle



### Point de contrôle

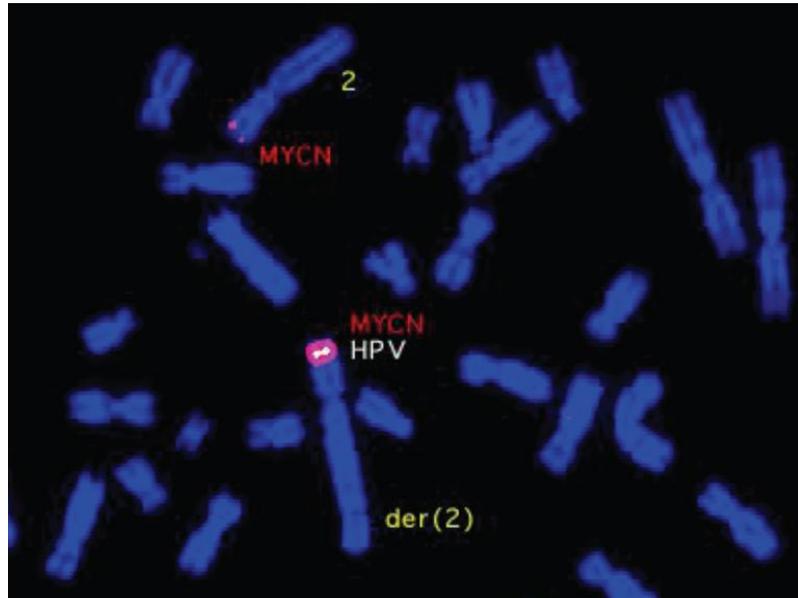
#### Protéine P53 :

- arrêt du cycle
- mise en route des systèmes de réparation de l'ADN
- apoptose cellulaire (suicide cellulaire programmé) si les anomalies ne sont pas réparables

**Protéine pRb** : blocage du cycle cellulaire

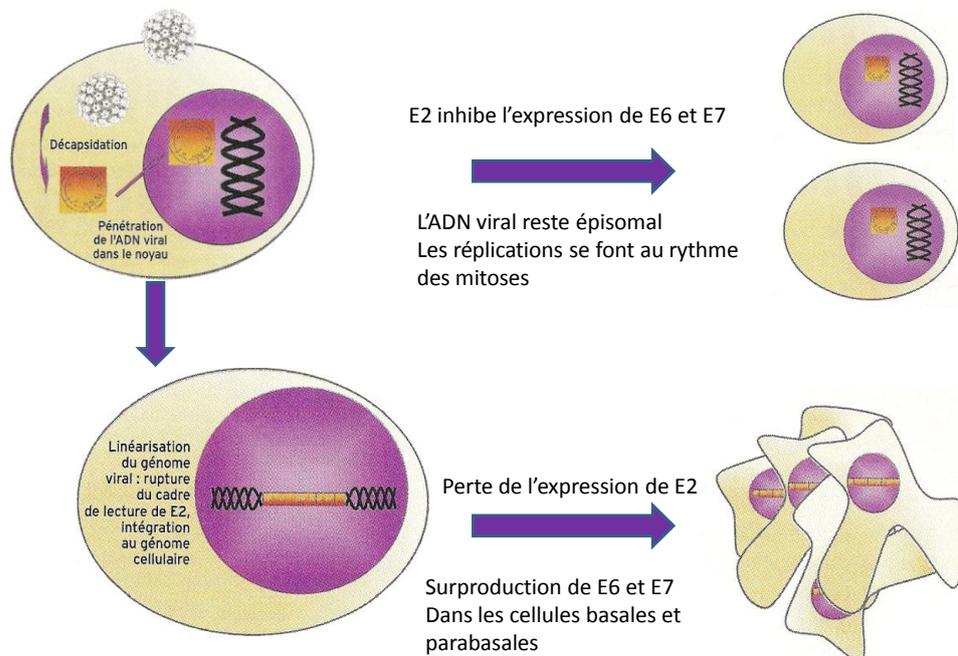
## ANNEXE 19. Oncogénèse

### Document 19A : Observation du caryotype de cellules cancéreuses après double marquage par une Méthode Fish



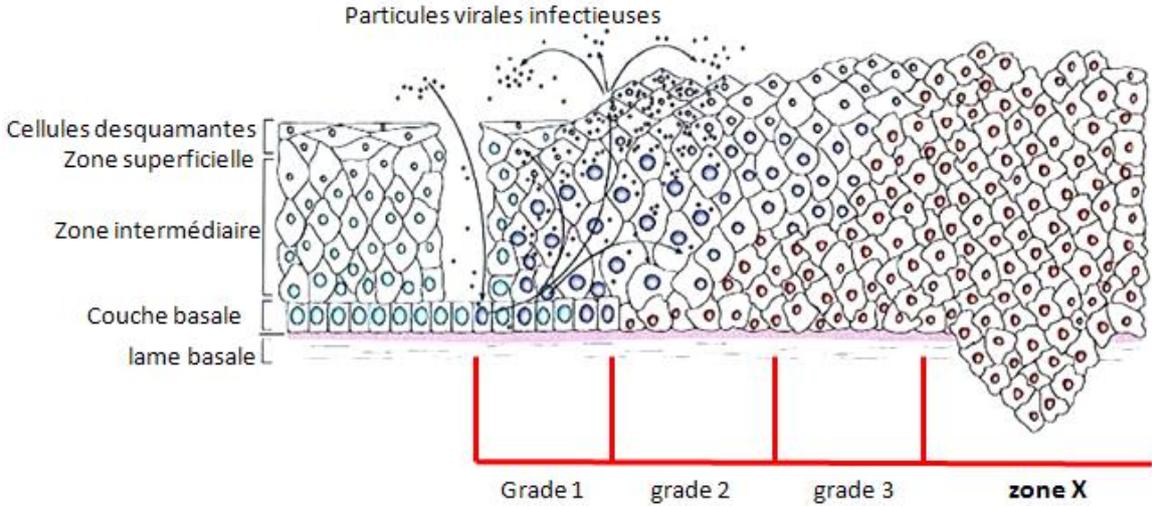
Source : Institut Curie  
HPV : génome du papillomavirus marqué  
MYCN : gène MYC marqué  
Chromosome 2 : chromosome normal  
Der(2) : chromosome dérivé du chromosome 2

### Document 19B : intégration et transformation cellulaire (d'après biologiste et praticien)



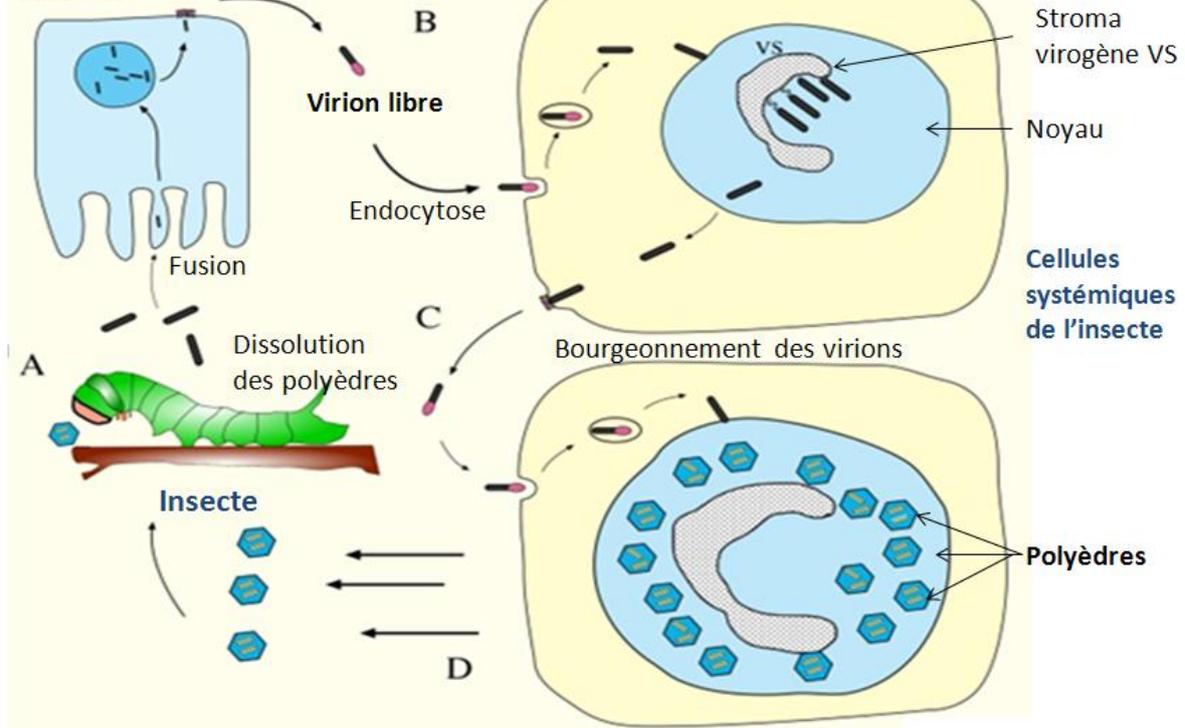
Document 19C : classification des cancers du col de l'utérus

<http://fr.academic.ru/dic.nsf/frwiki/1289128>



## INFECTION PRIMAIRE

Cellule intestinale de l'insecte

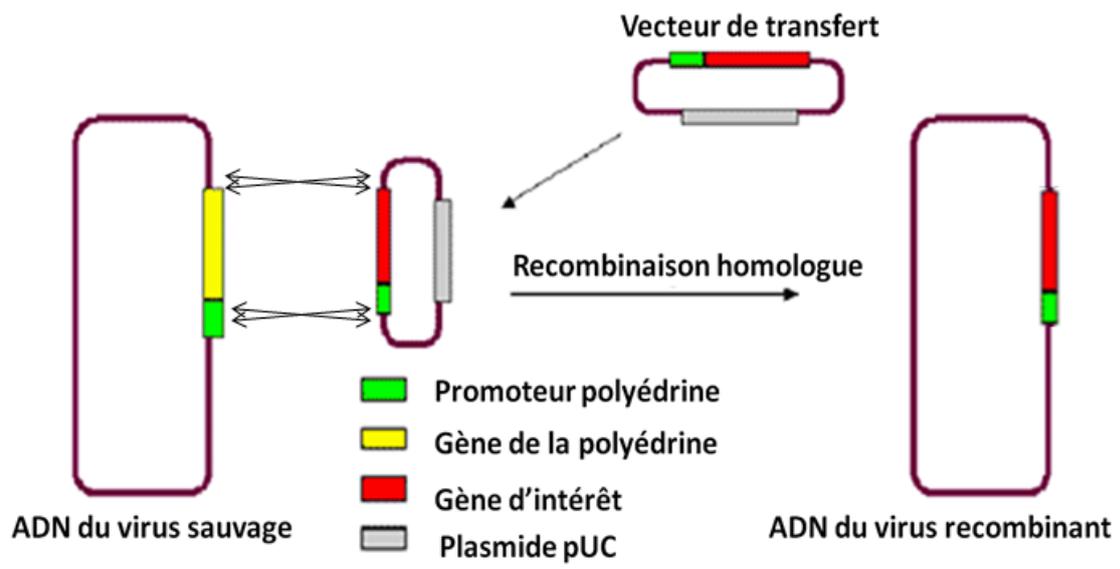
**Cycle de multiplication du baculovirus dans une larve d'insecte**

La larve ingère des polyèdres et digère leur matrice protéique ce qui libère les virions.

- A. **Infection primaire** des cellules intestinales de la larve d'insecte après pénétration des virions par fusion de l'enveloppe avec la membrane plasmique de la cellule intestinale,
- B. **Infection secondaire** des cellules systémiques de la larve et production importante de virions par bourgeonnement dans le milieu extracellulaire. Ces virions libres vont infecter les cellules voisines.
- C. **Formation tardive de polyèdres dans les cellules infectées** après production d'une quantité importante de polyédrine sous le contrôle d'un gène codé par le baculovirus. Les polyèdres sont libérés après lyse cellulaire.
- D. **Libération des polyèdres après lyse cellulaire puis ingestion** par la larve d'insecte.

ANNEXE 21.

Obtention d'un baculovirus recombinant



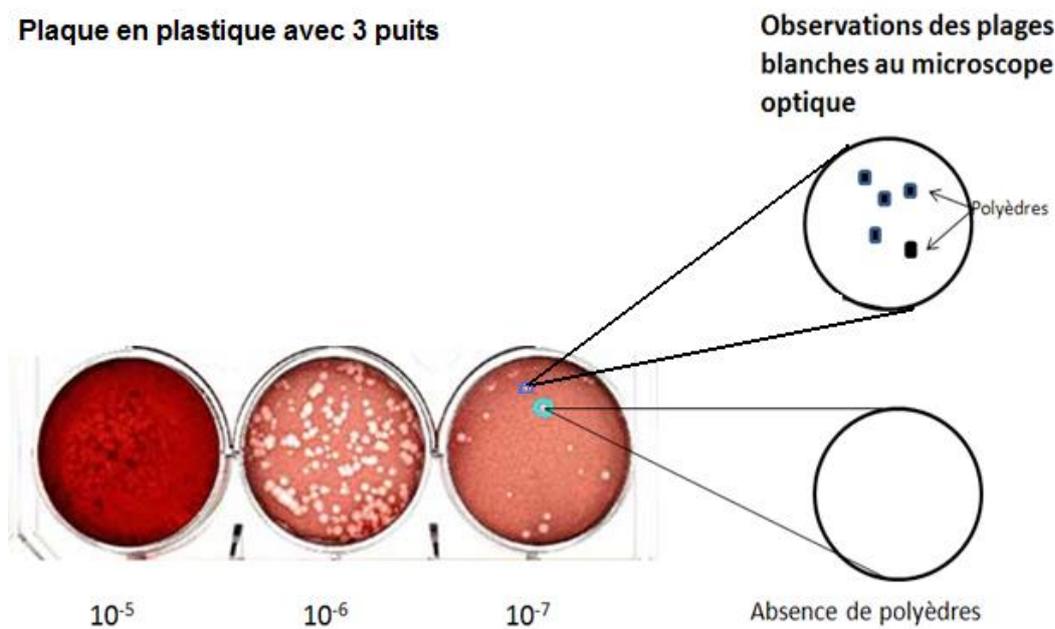
## ANNEXE 22.

## Sélection des baculovirus recombinants par la technique des plages de lyse

### Étapes :

- Utilisation d'une plaque en plastique formée de puits tapissés d'une culture de cellules d'insecte (formation d'un tapis cellulaire)
- Ajout d'une suspension de virus obtenus par phénomène de recombinaison homologue. Différentes dilutions de la suspension virale sont testées
- Ajout d'une couche d'agarose à 2,5 %
- Après 5 jours à 28°C en atmosphère humide, ajout d'un colorant vital, le rouge neutre, qui ne se concentre que dans les cellules vivantes. Observation des plages blanches pour rechercher les virus recombinants

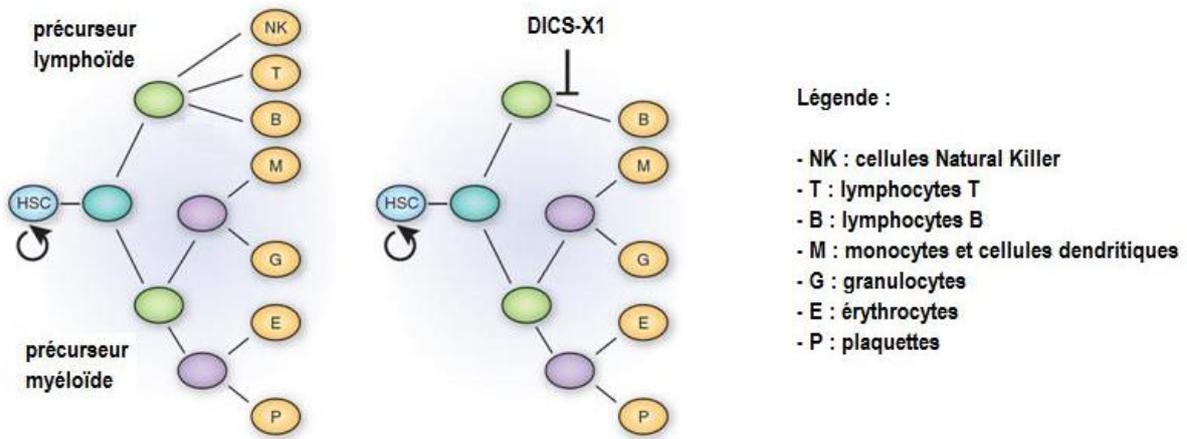
### Plaque en plastique avec 3 puits



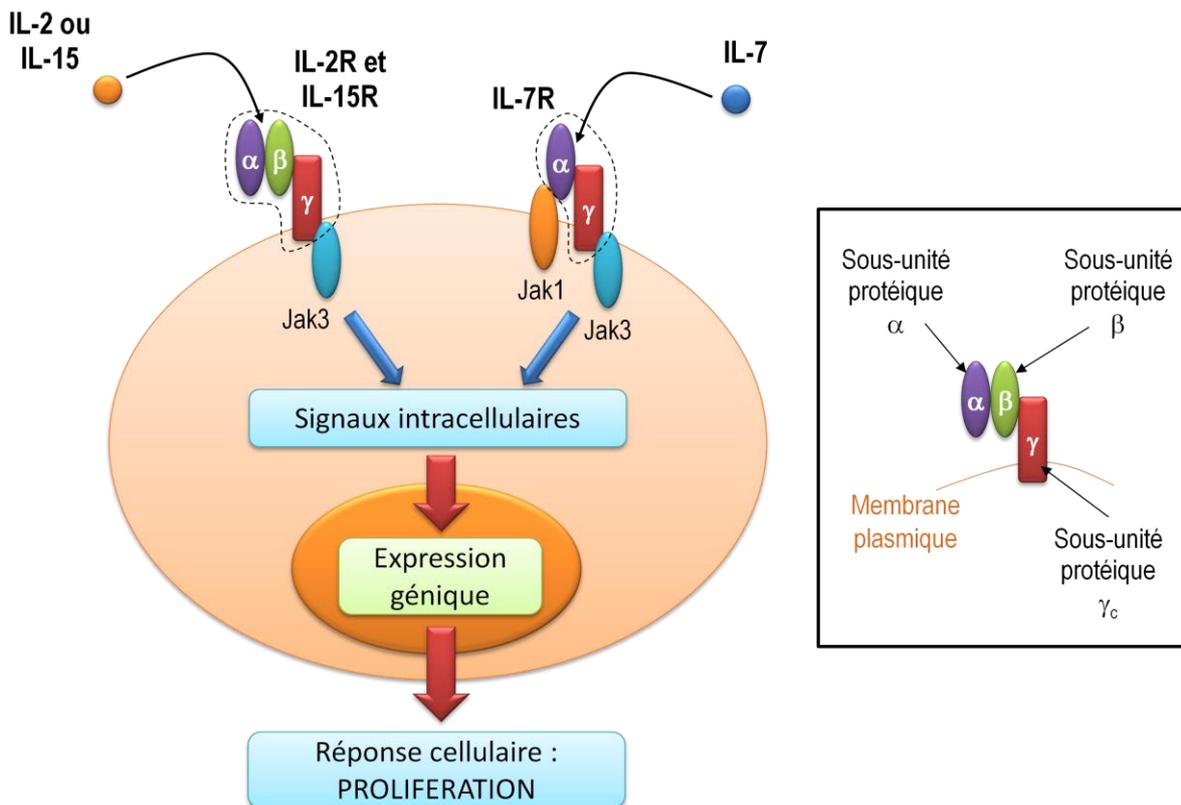
## ANNEXE 23.

## Hématopoïèse et récepteurs des interleukines

Document 23A : Hématopoïèse chez les sujets sains (gauche) et les patients souffrant de DICS-X1 (droite).



Document 23B : Représentation schématique de l'activation des récepteurs membranaires (IL-2R, IL-7R et IL-15R) par fixation des interleukines IL-2, IL-7 et IL-15



L'activation des récepteurs membranaires aux IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 et IL-15 permet de déclencher des signaux de prolifération dans les cellules qui les expriment dont les cellules du système immunitaire. Ces récepteurs sont composés de deux ou trois sous-unités :  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma_c$ , associées avec d'autres molécules de signalisation telles que JAK-1 et JAK-3.

## ANNEXE 24. Rétrovirus et vecteur rétroviral

Document 24A : Représentation du génome d'un rétrovirus sauvage (molécule d'ARN).



Représentation du génome d'un rétrovirus sauvage (molécule d'ARN).

**LTR** : séquences de régulation (5'-LTR : début de transcription ; 3'-LTR : fin de transcription) et d'insertion du génome rétroviral dans le génome cellulaire.

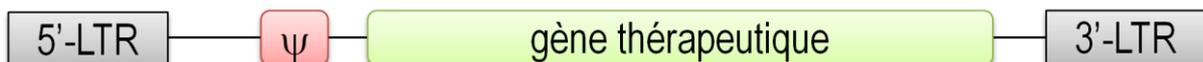
**gag** : gène codant les protéines de la capsid virale.

**pol** : gène codant la transcriptase inverse.

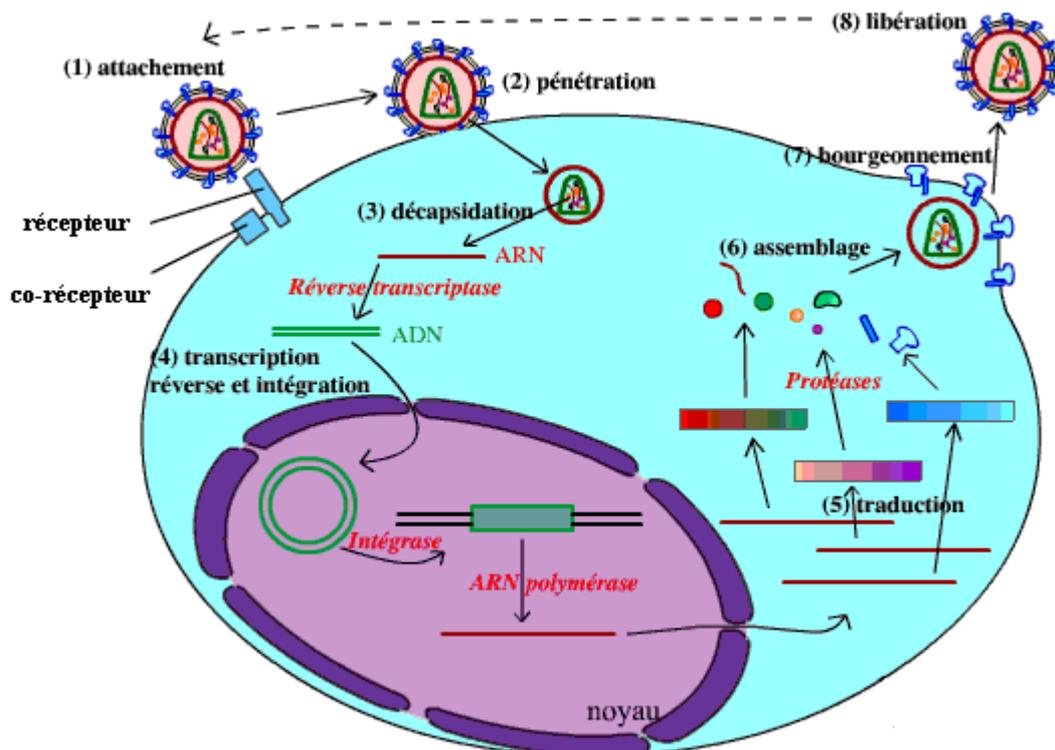
**env** : gène codant les protéines de l'enveloppe virale.

**ψ** : séquence non codante essentielle à l'encapsidation du génome viral.

Document 24B. Représentation du génome d'un vecteur rétroviral (molécule d'ADN).



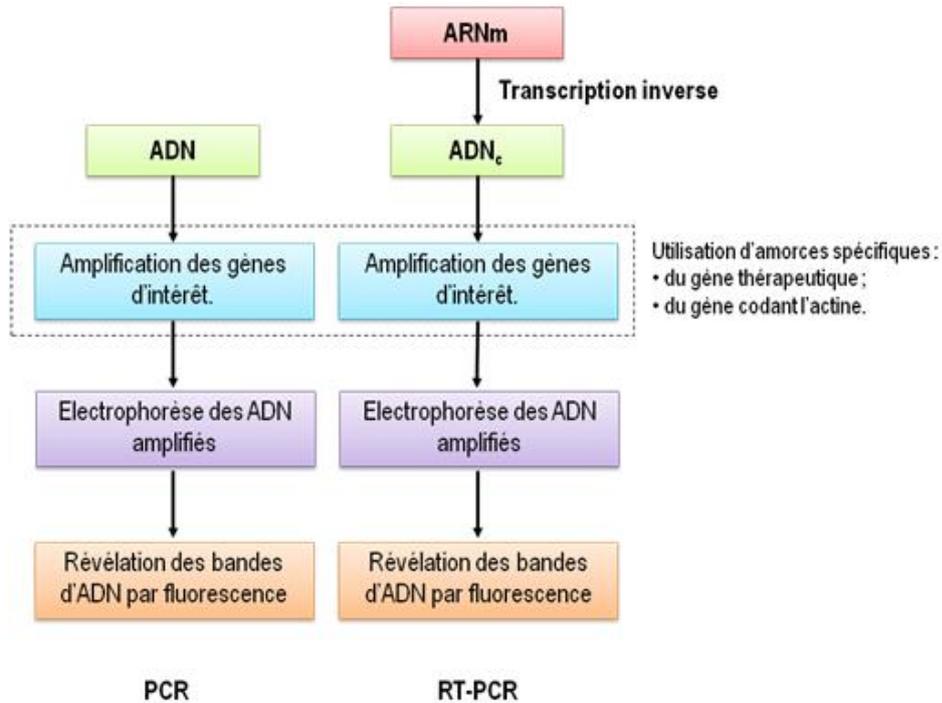
Document 24C : Cycle d'infection d'un rétrovirus.



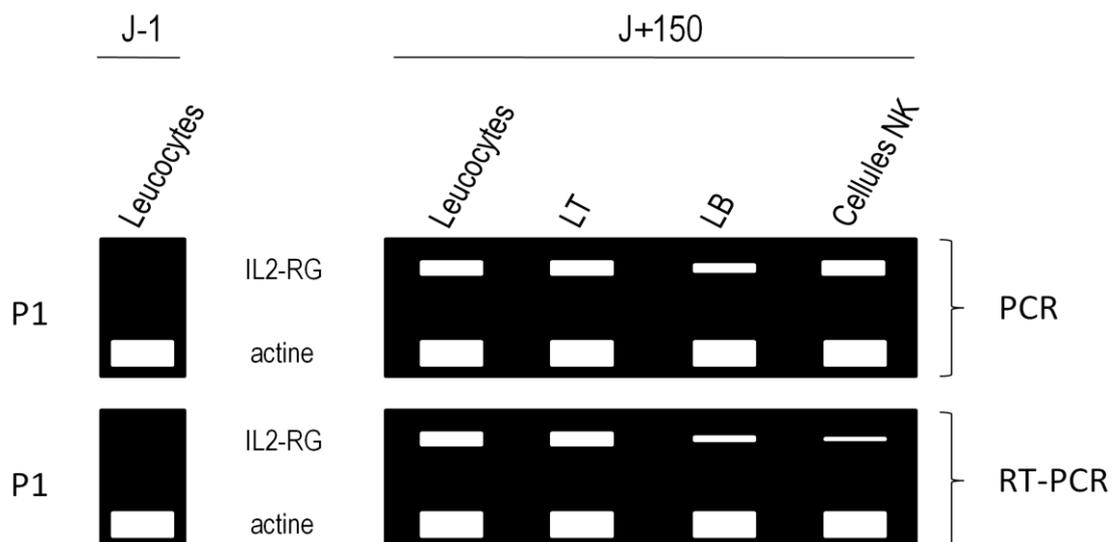
## ANNEXE 25.

## Étude de l'insertion et de l'expression du gène thérapeutique

### Document 25A : Principes des techniques de PCR et RT-PCR



### Document 25B : Résultats de PCR et RT-PCR obtenus sur le patient 1 (P1) un jour avant (J-1) ou 150 jours après (J+150) le début de la thérapie



L'actine est un témoin interne. Son amplification permet de mettre en évidence le bon fonctionnement de la technique.